

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย (*Apium graveolens*)

การสกัดเมล็ดขึ้นฉ่ายด้วยวิธี Maceration โดยการหมักผงแห้งของเมล็ดขึ้นฉ่ายในตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทานอล 95%, เฮกเซน, ไคลลอโรมีเทนและเมททานอล จะได้ส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายทั้งหมด 5 ชนิด คือ ส่วนสกัดหยาบเอทานอล (Ethanolic extract: E₁), ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane fraction: F₁), ส่วนสกัดไคลลอโรมีเทน 1 (CH₂Cl₂ fraction 1: F₂), ส่วนสกัดไคลลอโรมีเทน 2 (CH₂Cl₂ fraction 2: F₃) และส่วนสกัดเมททานอล (Methanolic fraction: F₄) โดยมี Percentage yield (% Yield) เท่ากับ 1.14, 1.95, 0.63, 2.78 และ 1.24 % ตามลำดับ สารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีลักษณะทางกายภาพเป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลว มีสีน้ำตาลและมีกลิ่นหอม รายละเอียดแสดงดัง ตาราง 1

ตาราง 1 ลักษณะทางกายภาพและ Percentage yield (% Yield) ของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย

สารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย	ลักษณะทางกายภาพ		Percentage yield (% Yield)
	สี	กลิ่น	
สารสกัดหยาบเอทานอล (E ₁)	น้ำตาลอ่อน	กลิ่นหอมอ่อน ๆ	1.14
ส่วนสกัดเฮกเซน (F ₁)	น้ำตาลอ่อน	กลิ่นหอมเหมือนเปลือกส้ม	1.95
ส่วนสกัดไคลลอโรมีเทน 1 (F ₂)	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอมอ่อน ๆ	0.63
ส่วนสกัดไคลลอโรมีเทน 2 (F ₃)	น้ำตาลอ่อน	กลิ่นหอมอ่อน ๆ	2.78
ส่วนสกัดเมททานอล (F ₄)	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอมปนกลิ่นฉุน	1.24

3.2 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงของส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย

3.2.1 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในห้องปฏิบัติการ (Laboratory repellent test)

ก. การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงแบบ Dose-response study

ผลการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงแบบ Dose-response study แสดงได้ดังตาราง 2 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายทั้ง 5 ชนิด (E_1 , F_1 , F_2 , F_3 และ F_4) มีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัด โดยสามารถลดการกัดของยุงได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำเฉพาะตัวทำลาย (Absolute ethanol) และเมื่อใช้สารสกัดในความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะสามารถลดการกัดของยุงได้ดีขึ้นตามไปด้วย การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการป้องกันยุงของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายโดยพิจารณาจากค่า ED_{50} และ ED_{95} พบว่าส่วนสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายทั้ง 5 ชนิด มีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงต่างกัน ซึ่งส่วนสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ ส่วนสกัดเฮกเซน โดยมีค่า ED_{50} และ ED_{95} เท่ากับ 0.41 และ 2.93 mg/cm^2 ตามลำดับ

การศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงโดยใช้ส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายทาผิวหนังของอาสาสมัคร พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังและไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงหรือผลเสียใดๆ กับอาสาสมัครในระยะเวลา 6 เดือนหลังการใช้ทาผิวหนัง

ตาราง 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงลาย *Aedes aegypti* ของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย (Dose-response study) ในห้องปฏิบัติการ

สารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย	ED_{50} (mg/cm^2) (95% Confidence limits ¹)	ED_{95} (mg/cm^2) (95% Confidence limits ¹)
สารสกัดหยาบเอทานอล (E_1)	2.03 (1.63-2.50)	28.12 (16.05-75.53)
ส่วนสกัดเฮกเซน (F_1)	0.41 (0.36-0.48)	2.93 (1.99-5.28)
ส่วนสกัดไคคลอโรมีเรน 1 (F_2)	1.26 (1.14-1.39)	4.40 (3.44-6.44)
ส่วนสกัดไคคลอโรมีเรน 2 (F_3)	2.48 (2.12-2.97)	15.26 (9.61-34.72)
ส่วนสกัดเมทานอล (F_4)	0.85 (0.66-1.05)	10.76 (5.46-46.40)

¹ หากค่า 95% Confidence limits ไม่ซ้อนทับกันจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ข. การทดสอบหาระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Protection time)

การทดสอบประสิทธิภาพของการป้องกันยุงกัด โดยทำการทดลองเพื่อหาระยะเวลาป้องกันยุงกัดของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายแต่ละชนิดต่อยุงลาย *Ae. aegypti* พบว่าสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายทั้ง 5 ชนิด (E_1 , F_1 , F_2 , F_3 และ F_4) สามารถป้องกันยุงกัดได้ โดยมีระยะเวลาป้องกันยุงนานต่างกัน (1.0-4.5 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Median protection time) ของสารสกัดแต่ละชนิด พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนสามารถป้องกันยุงกัดได้นานที่สุดโดยมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุง 3.5 ชั่วโมง ค่าสูงสุดของระยะเวลาป้องกันยุง 4.5 ชั่วโมง และระยะเวลาต่ำสุด 3.5 ชั่วโมง และส่วนสกัดไดคลอโรมีเรน 1 และ 2 มีระยะเวลาในการป้องกันยุงได้ต่ำสุด คือสามารถป้องกันยุงเพียง 1.5 ชั่วโมง (1.0-1.5 ชั่วโมง) รายละเอียดแสดงดัง ตาราง 3

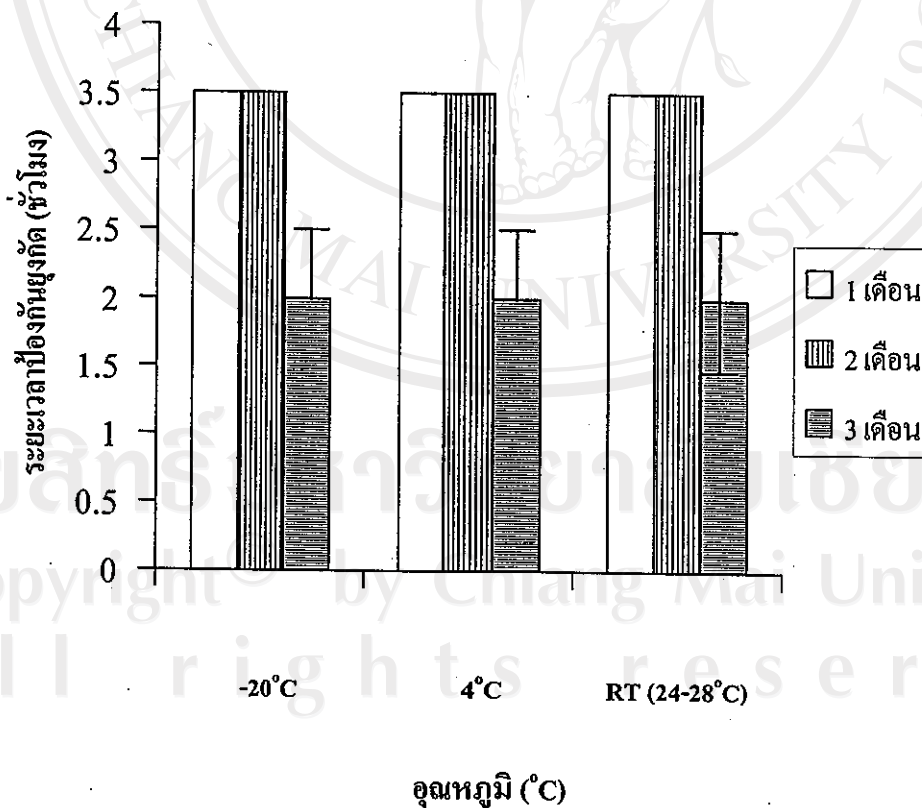
จากข้อมูลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดโดยพิจารณาจาก ค่า ED_{50} และ ED_{95} และระยะเวลาป้องกันยุงกัดของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายทั้ง 5 ชนิด พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงสูงสุด โดยมีค่า ED_{50} และ ED_{95} ต่ำสุด (0.41 และ 2.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) และสามารถป้องกันยุงได้นานที่สุด (3.5-4.5 ชั่วโมง) จึงได้นำส่วนสกัดเฮกเซนมาทำการศึกษาความคงตัวทางชีวภาพของสารและทำการทดสอบฤทธิ์ไต่ยุงในภาคสนามต่อไป

ตาราง 3 ระยะเวลาป้องกันยุงกัดของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

สารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย	ระยะเวลาป้องกันยุงกัด (ชั่วโมง)	
	ค่ามัธยฐาน	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด
สารสกัดหยาบเอทานอล (E_1)	3.0	2.5 - 3.0
ส่วนสกัดเฮกเซน (F_1)	3.5	3.5 - 4.5
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเรน 1 (F_2)	1.5	1.0 - 1.5
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเรน 2 (F_3)	1.5	1.0 - 1.5
ส่วนสกัดเมทานอล (F_4)	2.0	2.0 - 2.5

ค. การทดสอบความคงตัวของชีวภาพของสารสกัด (Biological stability test)

การทดสอบความคงตัวของชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่ใช้ส่วนสกัดเฮกเซนซึ่งมีประสิทธิภาพป้องกันยุงสูงสุดจากการทดสอบกับยุงลาย *Ae. aegypti* ในห้องปฏิบัติการ มาทำการทดลองหาระยะเวลาป้องกันยุงกัด ภายหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ -20°C , 4°C และ อุณหภูมิห้อง ($24-28^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 1, 2 และ 3 เดือน พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนมีความคงตัวของชีวภาพเป็นระยะเวลา 2 เดือนโดยสารสกัดที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน ในทุก ๆ อุณหภูมิ จะมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุง (Median protection time) 3.5 ชั่วโมง เท่ากับระยะเวลาป้องกันยุงของส่วนสกัดเฮกเซนที่สกัดได้ใหม่ ๆ โดยมีค่าสูงสุดและต่ำสุดของระยะเวลาป้องกันยุงเป็นค่าเดียวกัน คือ 3.5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บสารไว้เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าสารสกัดจะมีฤทธิ์ป้องกันยุงลดลงจากเดิม โดยสารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และ 4°C จะมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงที่ลดลงเป็น 2 ชั่วโมง และค่าสูงสุดและต่ำสุดของระยะเวลาป้องกันยุงเท่ากับ 2.5 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนสารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($24-28^{\circ}\text{C}$) จะมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัด 2 ชั่วโมง เช่นกัน แต่มีค่าสูงสุดและต่ำสุดของระยะเวลาป้องกันยุงเท่ากับ 2.5 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูป 6)



รูป 6 แสดงระยะเวลาป้องกันยุงกัดของส่วนสกัดเฮกเซนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนาม (Field repellent test)

ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนาม เมื่อวันที่ 8-20 สิงหาคม พ.ศ. 2546 ณ หมู่บ้าน ล้านนาวิลด์ ตำบลตันผีเสื้อ อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา เนื่องจากเป็นบริเวณที่มียุงอยู่ชุกชุม มีแหล่งเพาะพันธุ์และมีอาหารของยุงที่อุดมสมบูรณ์ เช่น มีลำธารและแหล่งน้ำขังเล็ก ๆ มีต้นไม้ใหญ่ พุ่มไม้และวัชพืชต่าง ๆ ปกคลุมอยู่ทั่วไป มีบ้านเรือนที่อยู่อาศัยและสัตว์เลี้ยงต่าง ๆ เช่น เป็ด ไก่ สุนัขและแมว ซึ่งจากการสำรวจเพื่อหาพื้นที่และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทดลอง เมื่อวันที่ 1-7 สิงหาคม 2546 โดยใช้คนเป็นเหยื่อล่อ พบว่ามียุงมากมายหลายชนิด โดยยุงที่พบมากที่สุดคือ ยุงลาย (*Aedes spp.*) และยุงรำคาญ (*Culex spp.*) ในช่วงที่ทำการสำรวจและศึกษาพบว่าบริเวณพื้นที่นี้จะมียุงชุกชุมในช่วงเวลาพลบค่ำ คือประมาณ 10-30 นาที หลังพระอาทิตย์ตกดิน ซึ่งเป็นเวลาประมาณ 19.00 น. หลังจากนั้นจำนวนยุงจะลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้กำหนดช่วงเวลาในการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงเป็นเวลา 19.00-21.30 น.

ผลการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนาม พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีประสิทธิภาพสูงสามารถป้องกันยุงกัดได้ โดยสามารถลดอัตราการกัดของยุง (Mosquito biting rate) ในแหล่งธรรมชาติได้อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองพบว่าอัตราการกัดของยุงในขาที่ทาสารสกัดจะมีค่าต่ำกว่าอัตราการกัดของยุงในขาควบคุมที่ทาเฉพาะตัวทำละลาย (Absolute ethanol) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุก ๆ ช่วงเวลา (10, 60 และ 120 นาที) รายละเอียดแสดงดัง ตาราง 4

ตาราง 4 ประสิทธิภาพของการป้องกันยุงในภาคสนามของส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่าย

สารทดสอบ	อัตราการกัดของยุง (Mosquito biting rate)		
	จำนวนยุง/คน/10 นาที	จำนวนยุง/คน/60 นาที	จำนวนยุง/คน/120 นาที
Absolute ethanol (Control)	4.93±2.71	29.61±17.50	59.21±21.24
ส่วนสกัดเฮกเซน (25 g%)	0.04±0.12*	0.25±0.97*	0.50±1.34*

* มีความแตกต่างจาก Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษาในครั้งนี้สามารถจับยุงได้ทั้งหมด 836 ตัว (ตาราง 5) ประกอบด้วยยุง 12 Species จัดอยู่ใน 5 Genera โดยยุงที่จับได้มากที่สุด คือ *Aedes gardnerii* (293, 35.89 %) รองลงมาคือ *Culex tritaeniorhynchus* (244, 29.19 %) ส่วนยุงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Ae. lineatopennis* (43, 5.14 %), *Ae. aegypti* (3, 0.36 %), *Anopheles barbirostris* (4, 0.48 %), *An. tesellatus* (1, 0.12 %), *Armigeres subalbatus* (32, 3.83 %), *Cx. vishnui* group (162, 19.38 %), *Cx. quinquefasciatus* (18, 2.15 %), *Cx. gelidus* (7, 0.84 %), *Cx. fuscocephala* (3, 0.36 %) และ *Mansonia uniformis* (19, 2.27 %) ซึ่งในจำนวนนี้เป็นยุงที่จับได้จากขาที่ทาสารทดสอบเพียง 7 ตัวเท่านั้น และเป็นยุงเพียงชนิดเดียว คือ *Ae. gardnerii* โดยคิดเป็น 2.39 % ของยุง *Ae. gardnerii* และ 0.84 % ของยุงทั้งหมดที่จับได้จากขาควบคุมที่ทาเฉพาะตัวทำลาย (Absolute ethanol)

ตาราง 5 จำนวนและชนิดของยุงที่จับได้จากการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนามของส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขิ้นฉ่าย

ยุง (Mosquitoes)	จำนวน (%)
Genus <i>Aedes</i>	
<i>Aedes gardnerii</i>	300 (35.89 %)
<i>Ae. lineatopennis</i>	43 (5.14 %)
<i>Ae. aegypti</i>	3 (0.36 %)
Genus <i>Anopheles</i>	
<i>Anopheles barbirostris</i>	4 (0.48 %)
<i>An. tesellatus</i>	1 (0.12 %)
Genus <i>Armigeres</i>	
<i>Armigeres subalbatus</i>	32 (3.83 %)
Genus <i>Culex</i>	
<i>Culex. tritaeniorhynchus</i>	244 (29.19 %)
<i>Cx. vishnui</i> group	162 (19.38 %)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	18 (2.15 %)
<i>Cx. gelidus</i>	7 (0.84 %)
<i>Cx. fuscocephala</i>	3 (0.36 %)
Genus <i>Mansonia</i>	
<i>Mansonia uniformis</i>	19 (2.27 %)
รวม	836 (100.00 %)

การศึกษาในภาคสนามกับยุงในแหล่งธรรมชาติพบว่าส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีประสิทธิภาพสูง สามารถป้องกันยุงได้หลายชนิด ซึ่งจากจำนวนยุงที่จับได้ทั้งหมด 836 ตัว เป็นยุงที่จับจากกลุ่มควบคุมถึง 829 ตัว และเป็นยุงที่จับจากกลุ่มทดสอบเพียง 7 ตัวเท่านั้น เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาคำนวณจะได้ค่า Percentage protection (% Protection) ของสารสกัดที่มีต่อยุงทั้งหมด เท่ากับ 99.16 % โดยยุงที่จับได้จากกลุ่มทดสอบมีเพียงชนิดเดียว คือ *Ae. gardnerii* จึงมี % Protection ต่อยุงชนิดนี้ เท่ากับ 97.61 % ส่วนผลต่อยุงชนิดอื่น ๆ เช่น *Ae. lineatopennis*, *Ar. subalbatus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* group, *Cx. quinquefasciatus* และ *Ma. uniformis* พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายสามารถป้องกันยุงเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมี % Protection เท่ากับ 100 % ในการศึกษาครั้งนี้มียุงบางชนิดที่จับไม่ได้เลยในขาทดสอบแต่จำนวนยุงที่จับได้จากขาควบคุมก็มีน้อยเกินไป เช่น *Ae. aegypti* (3, 0.36 %), *An. barbirostris* (4, 0.48%), *An. tesellatus* (1, 0.12 %), *Cx. gelidus* (7, 0.84 %) และ *Cx. fuscocephala* (3, 0.36 %) ทำให้มีข้อมูลไม่เพียงพอที่จะสรุปได้ว่าส่วนสกัดเฮกเซนสามารถป้องกันยุงเหล่านี้ได้ รายละเอียดแสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 Percentage protection ของส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายกับยุงธรรมชาติในภาคสนาม

ยุง (Mosquitoes)	จำนวนยุง (Number)		% Protection
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบ	
<i>Aedes gardnerii</i>	293	7	97.61
<i>Ae. lineatopennis</i>	43	-	100
<i>Ae. aegypti</i>	3	-	ND
<i>Anopheles barbirostris</i>	4	-	ND
<i>An. tesellatus</i>	1	-	ND
<i>Armigeres subalbatus</i>	32	-	100
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	244	-	100
<i>Cx. vishnui</i> group.	162	-	100
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	18	-	100
<i>Cx. gelidus</i>	7	-	ND
<i>Cx. fuscocephala</i>	3	-	ND
<i>Mansonia uniformis</i>	19	-	100
รวม	829	7	99.16

ND: Not done