

## บทที่ 4

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

#### 4.1 อภิปรายผลการวิจัย

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อนและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ (ถนอมศรี และคณะ, 2534) เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสกัดตามต้องการทั้งชนิดและปริมาณจึงมีความสำคัญมาก การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกทำการสกัดสารจากเมล็ดขึ้นฉ่าย ด้วยวิธี Maceration ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกและสารไม่สลายตัวเพราะไม่ใช้ความร้อนในขั้นตอนการสกัด แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก เนื่องจากต้องมีการสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้ได้สารสกัดออกมามากที่สุด การสกัดด้วยวิธี Maceration จะหมักพืชหรือสมุนไพรกับตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งในการศึกษาในเบื้องต้นได้ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากมีอำนาจในการละลายได้กว้างมาก เพราะมีส่วนผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ ทำให้สามารถละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว จึงสามารถสกัดสารออกมาได้มากกลุ่มและจำนวนมากพอที่จะตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นได้ และหลังจากวิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีประสิทธิภาพสามารถป้องกันยุงได้ จึงนำเมล็ดขึ้นฉ่ายมาสกัดแยกเป็นส่วนสกัด (Fraction) ต่าง ๆ โดยเลือกใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ที่มีคุณสมบัติของความมีขั้ว (Polarity) แตกต่างกัน เรียงลำดับจากน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ทำให้ได้ส่วนสกัดที่มีขั้วต่าง ๆ กัน เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ไล่ยุง *Aedes aegypti* โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการป้องกันยุงระหว่างส่วนสกัดเหล่านี้และเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลที่สกัดได้ในตอนแรก จากนั้นคัดเลือกเฉพาะส่วนสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดมาทำการทดสอบความคงตัวของชีวภาพและทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงกับยุงธรรมชาติในภาคสนาม

ในการสกัดสารจากเมล็ดขึ้นฉ่ายได้สารสกัดที่มีลักษณะทางกายภาพเป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลว มีสีน้ำตาลและมีกลิ่นหอม ทั้งหมด 5 ชนิด คือ สารสกัดหยาบเอทานอล, ส่วนสกัดเฮกเซน, ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน 1, ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน 2 และส่วนสกัดเมทานอล ซึ่งสารสกัดที่มี Percentage yield (% Yield) สูงสุดและต่ำสุด คือ ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน 2 (2.78%) และส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน 1 (0.63%) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการป้องกันยุงของส่วนสกัดต่าง ๆ ภายใต้อำนาจปฏิบัติการ พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุง

สูงสุด โดยมีค่า ED<sub>50</sub> และ ED<sub>95</sub> เท่ากับ 0.41 และ 2.93 µg/cm<sup>2</sup> ตามลำดับ และสามารถป้องกันยุงได้ นานที่สุด 3.5 ชั่วโมง (3.5 - 4.5 ชั่วโมง) ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัด เอาสารออกฤทธิ์ (Active constituents) ที่มีผลต่อยุงออกมาได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ และยังมี Percentage yield ของส่วนสกัดเฮกเซน (1.95%) ในปริมาณที่สูงเป็นอันดับสองรองจากส่วนสกัด ไคคลอโรมีเทน 2 ข้อดีของเฮกเซนคือ เป็นสารที่ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไปทำให้สามารถกำจัดออก จากสารสกัดได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูง สารสกัดจึงไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน นอกจากนี้ เฮกเซนยังเป็นสารที่มีราคาถูกลงและมีอันตรายในขั้นตอนการสกัดค่อนข้างน้อย

เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสารที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar) มักใช้เป็นตัวทำ ละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร สารที่สกัดด้วยเฮกเซนจะเป็นสารกลุ่มที่ไม่มีขั้ว จึงพอ อนุมานได้ว่าสารออกฤทธิ์ต่อยุงพาหะในเมล็ดขึ้นฉ่ายน่าจะเป็นสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำ จาก การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีส่วนประกอบต่าง ๆ ทางเคมี ได้แก่ D-limonene, Selinene, Phthalides, 3-n-butylphthalide, Sedanolid และ Sedanonic anhydride (Blish, 1972; Fehr, 1974; Bjeldanes and Kim, 1977; Uhlig *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 1990) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สารเหล่านี้อาจมีอยู่ในส่วนสกัดเฮกเซนด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าสารใดเป็นสารที่ ออกฤทธิ์ไล่ยุง เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดของ สารเหล่านี้ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายกับยุงพาหะนำโรคในปัจจุบันยังมีค่อนข้าง น้อย มีเพียงการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ (Larvicidal activity) และฤทธิ์ฆ่ายุงตัวเต็มวัย (Adulticidal activity) ที่พบว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเมทธานอลจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีฤทธิ์ฆ่าลูก น้ำยุงลาย *Ae. aegypti* ระยะที่ 4 (Rafikali *et al.*, 2000; Rafikali and Muraleedharan, 2001) ส่วนสาร สกัดเอทานอลมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* ระยะที่ 4 และมีฤทธิ์ฆ่ายุง *Ae. togoi* ระยะตัวเต็ม วัย (พรพิมล, 2543; เพชรรัตน์, 2543)

ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ในการป้องกันยุงกัดกัน อย่างแพร่หลาย โดยมีวิธีการ รูปแบบการทดสอบ ชนิดของยุงและพืชสมุนไพรที่แตกต่างและหลากหลาย กันออกไป เพื่อสามารถศึกษาค้นคว้าหาพืชสมุนไพรใหม่ ๆ มาใช้ในการควบคุมยุงได้อย่างมี ประสิทธิภาพและสามารถใช้กับยุงพาหะชนิดต่าง ๆ ได้ครอบคลุมและกว้างขวางมากขึ้น การศึกษา ฤทธิ์ไล่ยุงในห้องปฏิบัติการมีหลายปัจจัยที่มีผลเกี่ยวข้องหรือมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพและ ระยะเวลาป้องกันยุงกัด เช่น ชนิด, ลักษณะทางชีววิทยา, ขนาด, อายุและสภาพของยุงที่ใช้ทดสอบ, ความเหมาะสมของน้ำ, น้ำตาลและอาหารที่ใช้เลี้ยงยุง, ความหนาแน่นของยุงในกรงทดสอบ, สภาพ แวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิและความชื้น ฯลฯ (Gouck and Smith, 1962; Khan *et al.*, 1975;

Rutledge *et al.*, 1983; Xue *et al.*, 1995) โดยในการทดลองจะต้องมีการควบคุมตัวแปรเหล่านี้ ให้อยู่ในมาตรฐานที่ยอมรับได้

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ป้องกันยุงกัดของสารสกัดจากพืชที่น่าสนใจ ได้แก่ การศึกษาของ Barnard *et al.* (1999) ที่ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ไล่ยุง *Ae. aegypti* และ *An. albimanus* ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ใบเลี่ยน (Cedarwood), กานพลู (Clove), สะระแหน่ (Peppermint), Bourbon geranium และ Thyme พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme และ Clove มีประสิทธิภาพในการไล่ยุงได้นาน 1.5 – 3.5 ชั่วโมง โดยน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีฤทธิ์ไล่ยุงสูงสุด แต่มีข้อจำกัดในการใช้ คือ มีกลิ่นฉุนซึ่งอาสาสมัครบางรายไม่ยอมรับ นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูยังก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัครด้วย จากรายงานของกิตติพันธ์และวรรณภา (2542) ที่ศึกษาฤทธิ์ป้องกันยุงโดยใช้ผลิตภัณฑ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดและผิวเปลือกของผลมะกรูดที่ผสมทำเป็นครีมป้องกันยุงกัด พบว่าเมื่อใช้ในความเข้มข้น 10%, 5%, 2.5%, 1.25 % v/v สามารถป้องกันยุงกัดได้นาน 4, 3.5, 2.5 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยให้ผลที่คล้ายกันทั้งการทดลองที่ทำในคนและหนูตะเภา และเมื่อนำไปทดสอบในภาคสนามโดยทาครีมที่ผิวหนังของอาสาสมัคร พบว่าที่ความเข้มข้น 10% v/v สามารถป้องกันยุงกัดได้ ในปีเดียวกันได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ไล่ยุง *Ae. aegypti* ของสารสกัดจากเปราะหอม (*Kaempferia galanga*) พบว่าสารสกัดเฮกเซนของเปราะหอมมีฤทธิ์ไล่ยุงได้โดยมีค่า  $ED_{50}$  และ  $ED_{95}$  เท่ากับ 30.73 และ 243.53 mg/cm<sup>2</sup> และมีระยะเวลาในการป้องกันยุงกัดนาน 3 ชั่วโมง (Choochote *et al.*, 1999) มีรายงานถึงฤทธิ์ไล่ยุงของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 4 ชนิด คือ ขมิ้น (*Curcuma longa*), มะกรูด (*Citrus hystrix*), ตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus*) และแมงลัก (*Ocimum americanum*) ที่ทำการทดสอบกับยุง *Ae. aegypti*, *An. dirus* และ *Cx. quinquefasciatus* โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับ Deet พบว่าเมื่อผสมด้วย 5% vanillin จะทำให้น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ป้องกันยุงได้นานขึ้น โดยน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้น, ตะไคร้หอม และแมงลักมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ Deet คือมีฤทธิ์ป้องกันยุงนานถึง 8 ชั่วโมง (Tawatsin *et al.*, 2001)

จากการศึกษาต่าง ๆ ที่กล่าวมาจะเห็นว่าในปัจจุบันการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ในการป้องกันยุงได้มีการพัฒนาวิธีการและรูปแบบต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้มากขึ้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารเคมีสังเคราะห์ เช่น Deet, AI3-37220, AI3-35765 และ CIC-4 (Schreck and McGovern, 1985; Coleman *et al.*, 1993, 1994; Frances *et al.*, 1998, 2001; Mustapha *et al.*, 2000; Mark *et al.*, 2002) ซึ่งมีค่า  $ED_{50}$  และ  $ED_{95}$  อยู่ในช่วง 0.37-25.37 µg/cm<sup>2</sup> และมีฤทธิ์ไล่ยุงได้นาน 3-9 ชั่วโมง จะเห็นว่าโดยทั่วไปแม้สารสกัดจากพืชจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารเคมี แต่มีระยะเวลาป้องกันยุงกัด (1.5-8 ชั่วโมง) ที่นานใกล้เคียงกับสารเคมี (กิตติพันธ์และวรรณภา, 2542; Barnard

*et al.*, 1999; Choochote *et al.*, 1999; Tawatsin *et al.*, 2001) จึงควรมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยต่อไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชให้ดียิ่งขึ้น เช่น การนำสารที่ออกฤทธิ์ได้มาทำให้บริสุทธิ์และนำเอาเฉพาะส่วนที่ออกฤทธิ์ (Active constituents) มาใช้ หรือนำไปใช้ร่วมกับสารบางตัวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการไล่ยุง (Synergistic effect) หรืออาจมีการปรับปรุงรูปแบบให้ใช้ได้สะดวก และสามารถคงสภาพติดอยู่ที่ผิวหนังได้นาน ทำให้มีฤทธิ์ที่ดีและนานขึ้น อย่างไรก็ตามสารสกัดจากพืชยังมีข้อดีกว่าสารเคมีสังเคราะห์อย่างมากในเรื่องของความปลอดภัยและมีกลิ่นหอมน่าใช้มากกว่า ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอาสาสมัครทุกคนให้การยอมรับในเรื่องของกลิ่นและเนื้อสารที่ทาแล้วไม่เหนียวเหนอะหนะ นอกจากนี้ส่วนสกัดเฮกเซนยังไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัคร และไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงหรือผลเสียใด ๆ กับอาสาสมัครในระยะเวลา 6 เดือนหลังการใช้ทาผิวหนัง

ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งของสารสกัดจากพืชคือ ความคงตัวของชีวภาพ (Biological stability) ที่มักพบว่าสารสกัดจากพืชส่วนใหญ่จะมีประสิทธิภาพลดลงหลังจากเก็บไว้เป็นเวลานาน ซึ่งต่างจากสารประกอบทางเคมีที่มีความคงตัวสูงสามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานานโดยไม่เสื่อมสภาพและมีฤทธิ์คงเดิม (Mark *et al.*, 2002) จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนของเมล็ดขึ้นฉ่ายจะมีความคงตัวเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยสารสกัดที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน ในทุก ๆ อุณหภูมิ จะมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Median protection time) เท่ากับ 3.5 ชั่วโมง เท่ากับระยะเวลาป้องกันยุงของส่วนสกัดเฮกเซนที่สกัดได้ใหม่ ๆ แต่เมื่อเก็บสารไว้เป็นเวลา 3 เดือน สารสกัดจะมีฤทธิ์ป้องกันยุงลดลงจากเดิมเป็น 2 ชั่วโมง ซึ่งข้อด้อยในเรื่องความคงตัวของสารสกัดจากพืชนี้ควรมีการพัฒนาปรับปรุงและหาวิธีเก็บรักษาที่เหมาะสมที่ทำให้สารสกัดจากพืชมีความคงตัว ไม่เสื่อมสภาพและมีฤทธิ์คงเดิม เพื่อให้สามารถนำสารสกัดจากพืชมาใช้ในการควบคุมยุงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนาม พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีประสิทธิภาพสูงสามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติได้หลายชนิด โดยมีผลลดอัตราการกัดของยุง (Mosquito biting rate) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากจำนวนยุงที่จับได้ทั้งหมด 836 ตัว เป็นยุงที่จับจากขาควบคุมที่ทา Absolute ethanol ถึง 829 ตัว และเป็นยุงที่จับจากขาทดสอบที่ทาสกัดเฮกเซนเพียง 7 ตัวเท่านั้น สามารถคำนวณค่า % 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* พบว่าส่วนสกัด



เฮกเซนจากเมลิคชัน่ายสามารถป้องกันยุงเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมี % Protection เท่ากับ 100 %

จากการทดลองจะเห็นว่าในขาที่ทดสอบมียุงมาเกาะเพียงชนิดเดียวคือ *Ae. gardnerii* แสดงว่ายุงชนิดนี้สามารถทนต่อฤทธิ์ของสารสกัดได้บ้าง (Slightly tolerant) โดยจำนวนยุงที่จับได้จากขาทดสอบ (7 ตัว) มีจำนวนที่น้อยกว่าจำนวนยุงที่จับได้จากขาควบคุม (293 ตัว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาถึง % Protection (97.61 %) ต่อยุงชนิดนี้ก็ถือว่าส่วนสกัดเฮกเซนจากเมลิคชัน่ายมีฤทธิ์สามารถป้องกันยุง *Ae. gardnerii* ได้ดีพอสมควร นอกจากนั้นส่วนสกัดเฮกเซนยังสามารถป้องกันยุง *Ar. subalbatus* ซึ่งเป็นยุงที่ดุและมีความหิวกระหายสูง รวมทั้งยังป้องกันยุงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Ae. lineatopennis*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* group, *Cx. quinquefasciatus* และ *Ma. uniformis* ได้อย่างสมบูรณ์ (100 % Protection) ซึ่งยุงบางชนิดยังเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญของประเทศที่อยู่ในเขตร้อนหรือร้อนชื้น เช่น ยุง *Cx. tritaeniorhynchus* และ *Cx. vishnui* group เป็นพาหะนำโรคไขสมองอักเสบ (Japanese encephalitis) ยุง *Ma. uniformis* และ *Cx. quinquefasciatus* เป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (Filariasis) (วิชิตและคณะ, 2541; Murty et al., 2002)

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้แม้ว่าจะมียุงบางชนิดที่จับไม่ได้เลยในขาทดสอบแต่จำนวนยุงที่จับได้จากขาควบคุมก็มีน้อยเกินไป 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 นอกจากนั้นการศึกษาในภาคสนามยังมีข้อจำกัดในการควบคุมตัวแปรหลาย ๆ อย่าง เช่น ความสว่างของแสง, อุณหภูมิ, ความชื้น, กระแสลมและการมีฝนตก ฯลฯ ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะมีผลกระทบอย่างมากในการศึกษาวิจัยในภาคสนาม

#### 4.2 สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากเมล็ดขี้เหล็กมีประสิทธิภาพสามารถป้องกันยุงกัดได้ โดยส่วนสกัดเฮกเซนมี ประสิทธิภาพป้องกันยุงสูงสุด ( $ED_{50}$  และ  $ED_{95}$  เท่ากับ 0.41 และ 2.93 mg/cm<sup>2</sup> ตามลำดับ) และมี ระยะเวลาป้องกันยุงกัดนานที่สุด 3.5 ชั่วโมง (3.5-4.5 ชั่วโมง) ส่วนสกัดเฮกเซนมีความคงตัวของ ชีวภาพเป็นระยะเวลา 2 เดือน หากเก็บไว้นานเกินกว่านั้นฤทธิ์ป้องกันยุงจะลดลงไป การศึกษาฤทธิ์ ไล่ยุงในภาคสนามพบว่าส่วนสกัดเฮกเซนมีประสิทธิภาพสูง สามารถป้องกันยุงได้หลายชนิด ได้แก่ *Aedes gardnerii*, *Ae. lineatopennis*, *Armigeres subalbatus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* group., *Cx. quinquefasciatus* และ *Mansonia uniformis* นอกจากนี้ส่วนสกัดเฮกเซนไม่ได้ก่อให้เกิด ความระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัคร และไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงหรือผลเสียใด ๆ กับ อาสาสมัครในระยะเวลา 6 เดือนหลังการใช้ทาผิวหนัง ดังนั้นจึงสามารถนำส่วนสกัดเฮกเซนจาก เมล็ดขี้เหล็กมาใช้ทาผิวหนังเพื่อป้องกันยุงกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ