

Thesis Title Topical Products of Mosquito Repellent from *Apium graveolens* Linn.

Author Miss Benjawan Tuetun

Degree Doctor of Philosophy (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assist. Prof. Dr. Benjawan Pitasawat	Chairperson
Assoc. Prof. Wej Choochote	Member
Assoc. Prof. Dr. Yanee Pongpaibul	Member
Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Member
Assoc. Prof. Dr. Atchariya Jitpakdi	Member
Assist. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Member

ABSTRACT

Chemical composition of hexane-extracted *Apium graveolens* (AHE) was investigated by using a qualitative GC/MS analysis. The results revealed that its major constituents were 3-*n*-butyl-tetrahydrophthalide (92.48%), followed by 5.10% β -selinene and 0.68% γ -selinene. Evaluation of skin irritation in 30 human volunteers revealed that the highest dosage of 25% ethanolic AHE solution exhibited no irritant. AHE-based products, including ethanolic AHE solutions and formulated preparations such as AHE solutions (S1-S22) and gels (G1-G10), were determined for repellency against female *Aedes aegypti* mosquitoes and compared to the standard chemical, DEET (*N,N*-diethyl-3-methylbenzamide), and commercial repellents. Ethanolic solutions of AHE and DEET showed varying degrees of repellency depending upon

both the concentrations of the active ingredients (AHE or DEET) and the addition of 5% vanillin. Repellent activity afforded by AHE alone seemed to be slightly lower than that of DEET, when compared on an equal concentration basis. With vanillin added, however, AHEv provided improved protection (3-5 hours), which was comparable to DEETv (4.5-5 hours). Furthermore, commercial repellents, except formulations of DEET, showed a lower repellency than AHEv. Preparation of AHE-based repellents by formulating 5-10% AHE and 3-5% vanillin with varying types and amounts of solvents, additives and surfactants in both solution and gel form were subsequently performed for improving efficiency. In repellent investigation of AHE formulations, most formulated solutions appeared to have lower repellency (0-3.5 hours) than formulated gels (2-4.5 hours), and the most effective was the Gel 10 (G10) formula.

Field repellent investigations were performed twice; Field I and Field II, in the same location of Chiang Mai province between the rainy and cold seasons of 2004 and 2005. In Field I investigations, the selected repellents, 25% AHEv, 25% DEETv and Soffell, afforded encouragingly good personal protection against a wide range of mosquito species. While 25 % AHEv and 25% DEETv were effective in reducing bites with 99.9% protection, the protective effect of Sofell appeared complete (100% protection). In field II, which investigated repellency of G10 (AHE gel), 25% DEETv and Insect block 28, the results were similar to those of Field I, but G10 showed improved repellency comparable to that of Insect block 28. G10 and Insect block 28 exhibited similarly strong repellent actions by reducing bites with 100% protection, whereas 25% DEETv was effective in reducing bites with 99.72% protection.

G10 formula, which was considered to be the best AHE-developed formulation, comprised 5% AHE, orange oil, eucalyptus oil, vanillin, Carbopol® Ultrez 21, propylene glycol, preservative solution, deionized water, D-ethanol, 50% neutral TE and PEG-RH 40. This formula provided not only remarkable repellency under laboratory conditions, with a median protection time of 4.5 (4.5-5) hours, but also powerful repellency against a wide range of mosquito populations in field applications. Biological stability of the G10 formula was investigated after it had been kept under two conditions; a heating and cooling cycle and varying temperature and time storage. After storage under 3 and 6 cycles of heating and cooling, G10 samples not only demonstrated a similarity in appearance and physical property to that of the fresh preparation, but they also provided equal repellency with a median protection time of 4.5 (4.5-5) hours. However, samples of G10 kept at conditions that varied in temperature and time storage exhibited some changes in appearance and differing degrees of repellency, with protection times that ranged between 2.5-3 hours. According to its highly effective repellency, no irritant side effect and stability, the G10 formula could qualify for registration as a commercial repellent that may be an alternative to conventional synthetic chemicals, particularly in community vector control applications.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลิตภัณฑ์ทำกันยุงจากเมล็ดขึ้นฉ่าย	
ผู้เขียน	นางสาวเบญจวรรณ ตี๋ตัน	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์	ประธานกรรมการ
	รศ. เวช ชูโชติ	กรรมการ
	รศ. ดร. ญานี พงษ์ไพบูลย์	กรรมการ
	รศ. ดร. อุดม ชัยทอง	กรรมการ
	รศ. ดร. อัจฉริยา จิตต์ภักดี	กรรมการ
	ผศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวง โภศล	กรรมการ
	บทคัดย่อ	

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่าย (AHE) โดยวิธี GC/MS พบว่ามีองค์ประกอบหลักทางเคมี คือ 3-*n*-butyl-tetrahydrophthalide (92.48%) และองค์ประกอบอื่น ได้แก่ β -selinene (5.10%) และ γ -selinene (0.68%) การศึกษาฤทธิ์ก่อความระคายเคืองผิวหนังของสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายในอาสาสมัครจำนวน 30 คน พบว่าสารละลายเอทธานอลของสารสกัดขึ้นฉ่ายที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 25% ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัคร เมื่อนำสารไล่ยุงที่ผลิตจากสารสกัดขึ้นฉ่ายในรูปแบบต่าง ๆ คือ สารละลายเอทธานอลและผลิตภัณฑ์ที่เตรียมใน 2 รูปแบบ คือ น้ำยาใส่ (solution) จำนวน 22 คำรับ (S1-S22) และเจล (gel) จำนวน 10 คำรับ (G1-G10) มาทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในห้องปฏิบัติการกับยุงลาย *Aedes aegypti*

ตัวเติมวัยเพศเมีย โดยเปรียบเทียบกับสารไล่ยุงมาตรฐาน คือ DEET (*N,N*-diethyl-3-methylbenzamide) และสารไล่ยุงตามท้องตลาดชนิดต่าง ๆ พบว่าสารละลายเอทานอลของสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดขึ้นฉ่ายและ DEET มีฤทธิ์ไล่ยุงแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณของสารออกฤทธิ์ (active ingredient) และการผสมกับ 5% vanillin โดยสารละลายเอทานอลของสารสกัดขึ้นฉ่ายมีฤทธิ์ไล่ยุงต่ำกว่าสารละลายเอทานอลของ DEET เมื่อเปรียบเทียบในความเข้มข้นเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายเอทานอลของสารสกัดขึ้นฉ่ายที่ผสมด้วย 5% vanillin (AHEv) จะมีฤทธิ์เพิ่มสูงขึ้นเทียบเคียงได้กับฤทธิ์ไล่ยุงของสารละลายเอทานอล DEET ที่ผสม 5% vanillin (DEETv) ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าสารไล่ยุงตามท้องตลาดเกือบทุกชนิดยกเว้นชนิดที่มี DEET เป็นองค์ประกอบจะมีฤทธิ์ไล่ยุงต่ำกว่าสารละลายเอทานอลของสารสกัดขึ้นฉ่ายที่ผสมด้วย 5% vanillin การเตรียมสารไล่ยุงจากสารสกัดเฮกเซนของเมล็ดขึ้นฉ่ายใน 2 รูปแบบ คือ น้ำยาใสและเจลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดสามารถทำได้โดยผสมสารสกัดขึ้นฉ่ายในความเข้มข้น 5-10% และ 3-5% vanillin กับสารต่างๆ ได้แก่ ตัวทำละลาย (solvent) , สารปรุงแต่ง (additive) และ สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ซึ่งเมื่อนำสารไล่ยุงที่เตรียมได้มาศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงในห้องปฏิบัติการพบว่าตำรับน้ำยาใสที่มีประสิทธิภาพป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 0-3.5 ชั่วโมง จะมีฤทธิ์ต่ำกว่าตำรับเจลที่มีประสิทธิภาพป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 2-4.5 ชั่วโมง โดยผลิตภัณฑ์ไล่ยุงจากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการศึกษานี้คือ ตำรับเจลสูตรที่ 10 (G10)

ทำการศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนามทั้งหมด 2 ครั้ง ในพื้นที่เดียวกันของจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงระหว่างฤดูฝนกับฤดูหนาวของปี พ.ศ. 2547 และ พ.ศ. 2548 โดยในการทดสอบครั้งแรกที่ศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงของสาร 3 ชนิด คือ 25% AHEv, 25% DEETv และสารไล่ยุงตามท้องตลาด คือ Soffell พบว่าสารไล่ยุงทั้ง 3 ชนิด สามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติได้หลากหลายชนิด โดย 25% AHEv และ 25% DEETv มีฤทธิ์ป้องกันยุงกัดได้ 99.9% ส่วน Soffell สามารถป้องกันยุงได้ถึง 100% ในการทดสอบครั้งที่ 2 ที่ศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงของผลิตภัณฑ์ 3 ชนิด คือ G10, 25% DEETv และ

สารไล่ยุงตามท้องตลาด คือ Insect Block 28 จะให้ผลที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกับการทดสอบในครั้งแรกคือ สารไล่ยุงทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติได้หลากหลายชนิด แต่ G10 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ไล่ยุงที่ผลิตจากจีนน่าจะมีฤทธิ์ดีขึ้นเทียบเท่ากับ Insect Block 28 โดย G10 และ Insect Block 28 สามารถป้องกันยุงได้ถึง 100% ส่วน 25% DEETv มีฤทธิ์ป้องกันยุงได้ 99.72%

ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจีนน่าจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการศึกษานี้คือ G10 มีส่วนประกอบต่าง ๆ ได้แก่ 5% AHE, orange oil, eucalyptus oil, vanillin, Carbopol[®] Ultrez 21, propylene glycol, preservative solution, deionized water, D-ethanol, 50% neutral TE และ PEG-RH 40 นอกจากผลิตภัณฑ์ G10 จะสามารถป้องกันยุงกัดได้นานถึง 4.5 (4.5-5) ชั่วโมงในห้องปฏิบัติการแล้วผลการทดสอบในภาคสนามพบว่ายังสามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติได้หลากหลายชนิดด้วย ในการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ G10 โดยใช้การทดสอบ 2 แบบ คือ การทดสอบแบบเร่งอุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง (Heating and cooling cycle) และการเก็บไว้ในสถานะที่มีระดับอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บแตกต่างกันพบว่า ผลิตภัณฑ์ G10 ที่ผ่านการทดสอบในแบบเร่งอุณหภูมิจำนวน 3 และ 6 รอบ ทุกตัวอย่างจะมีลักษณะทางกายภาพคงเดิมและมีฤทธิ์ไล่ยุงได้นาน 4.5 (4.5-5) ชั่วโมง เทียบเท่ากับผลิตภัณฑ์ G10 ที่เตรียมใหม่ ๆ อย่างไรก็ตาม สำหรับผลิตภัณฑ์ G10 ที่ผ่านการเก็บรักษาในสถานะที่มีระดับอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าบางตัวอย่างจะมีลักษณะทางกายภาพบางอย่างเปลี่ยนแปลงไปและมีฤทธิ์ป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 2.5-3 ชั่วโมง การที่ผลิตภัณฑ์ G10 มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันยุงกัด ไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง และมีความคงสภาพค่อนข้างดี จึงถือว่าผลิตภัณฑ์นี้มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ที่สามารถลงทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์ไล่ยุงที่วางขายตามท้องตลาดได้ โดยอาจเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่นำมาทดแทนสารเคมีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะการใช้เพื่อควบคุมยุงพาหะภายในชุมชน