หัวข้อวิทยานิพนธ์ องค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพไล่ยุงของผลิตภัณฑ์จากพืชต่อยุงลาย *Aedes aegypti* และยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae)

ผู้เขียน นายรักพงศ์ แสงหงษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ. ดร. อนุลักษณ์ จันทร์คำ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. อุดม ชัยทอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. อัจฉรียา จิตต์ภักดี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ดวงรัตน์ ริยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงได้คัดเลือกพืชจำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ ส้มป่อย (*Acacia concinna*), มะตูม (*Aegle marmelos*), โกฐสอ (*Angelica dahurica*), คำแสด (*Bixa orellana*), สาบเสือ (*Chromolaena odoratum*), อัญชัน (*Clitoria ternatea*), คาวพลู (*Houttuynia cordata*), ผกากรอง (*Lantana camara*), โกฐหัวบัว (*Ligusticum sinense*), แมงลัก (*Ocimum americanum*), โหระพา (*Ocimum basilicum*), โกฐน้ำเต้า (*Rheum palmatum*), โกฐกระดูก (*Saussurea lappa*), แฝกหอม (*Vetiveria zizanioides*) และกระทือ (*Zingiber zerumbet*) มาสกัดโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) และหมักกับตัวทำละลาย (Solvent maceration) จากนั้นนำมาคัดกรองประสิทธิภาพการไล่ยุงกับยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* พาหะนำโรคไข้เลือดออก ภายใต้ห้องปฏิบัติการ จากการสกัดพบว่าพืชทั้งหมดให้ผลิตผลของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดเฮกเซนอยู่ในช่วง 5.12-65.00% (w/w) และ 0.66-15.98% (w/w) ตามลำดับ แต่มีตัวอย่างพืชเพียงสองชนิดเท่านั้นคือ รากโกฐกระดูกและใบมะตูมที่สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ โดยให้ผลผลิตที่ 0.32% (v/w) และ 1.50% (v/w) ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการคัดกรองประสิทธิภาพไล่ยุงโดยใช้คนเป็นเหยื่อล่อพบว่าผลิตภัณฑ์จากพืชมีประสิทธิภาพป้องกันยุงกัดในระดับแตกต่างกัน ส่วนใหญ่สารสกัดเฮกเซนจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดเอทานอลที่เตรียมได้จากพืชชนิดเดียวกัน โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือสารสกัดเฮกเซนจากเหง้าโกฐหัวบัว (*L. sinense* : LHE) ที่มีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัดเท่ากับ 6.5 (5.0-8.0) ชั่วโมง ถือว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารเคมีไล่ยุงมาตรฐาน คือ *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) ที่มีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัดเท่ากับ 6.25 (5.0-6.5) ชั่วโมง ดังนั้นจึงคัดเลือก LHE ไปทำการศึกษาต่อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพไล่ยุงภายใต้ห้องปฏิบัติการและในภาคสนามกับยุงหลากหลายชนิดโดยใช้จำนวนอาสาสมัครมากขึ้น พร้อมทั้งวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และทดสอบความเสถียรทางกายภาพและชีวภาพของสาร

การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงภายใต้ห้องปฏิบัติการกับยุงสองสายพันธุ์ โดยเพิ่มจำนวนอาสาสมัครมากขึ้น พบว่าสารละลายเอทานอลของ LHE และ DEET ที่ไม่ผสม 5% vanillin (25% LHE และ 25% DEET) และผสม 5% vanillin (25% LHEv และ 25% DEETv) มีประสิทธิภาพป้องกันได้ทั้งยุงลาย *Ae. aegypti* และยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* ยิ่งไปกว่านั้น vanillin ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารทดสอบ โดยขยายระยะเวลาป้องกันยุงกัดของ 25% LHEv และ 25% DEETv ต่อยุงลาย *Ae. aegypti* จาก 6.5 (5.5-9.5) ชั่วโมง เป็น 11.0 (7.0-13.5) ชั่วโมง และ 8.0 (5.0-9.5) เป็น 8.75 (7.5-11.0) ชั่วโมง ตามลำดับ และต่อยุงก้นปล่อง *An. minimus* จาก 11.5 (9.0-14.0) ชั่วโมง เป็น 12.5 (9.0-16.0) ชั่วโมง และ 11.5 (10.5-15.0) ชั่วโมง เป็น 14.25 (11.0-18.0) ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกเอา 25% LHEv และ 25% DEETv ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดไปทำการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงในภาคสนาม โดยทำการทดลองในช่วงฤดูร้อน ตั้งแต่เดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2556 ในพื้นที่ตำบลสันผีเสื้อ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ภาคเหนือของประเทศไทย จากผลการทดลองพบว่า 25% LHEv และ 25% DEETv มีประสิทธิภาพสูงสามารถป้องกันยุงได้ 100% เหมือนกัน โดยสามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติที่มีมากมายหลากหลายชนิด จัดอยู่ในทั้งหมด 5 สกุล ได้แก่ ยุงลาย (*Aedes*), ยุงก้นปล่อง (*Anopheles*), ยุง *Armigeres*, ยุงรำคาญ (*Culex*) และยุงลายเสือ (*Mansonia*) โดยจากยุงที่จับได้ทั้งหมด 5,306 ตัว พบว่ามียุง *Armigeres subalbatus*, ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* และยุงรำคาญ *Culex vishnui* เป็นจำนวนมาก คิดเป็น 42.76%, 41.27% และ 9.69% ตามลำดับ ตลอดระยะเวลาที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงภายใต้ห้องปฏิบัติการและในภาคสนามไม่พบอาการผิดปกติของผิวหนัง เช่น ผื่นแดง บวม ระคายเคือง หรืออาการแพ้อื่นๆ ในอาสาสมัครที่ทาสารทดสอบ

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของ LHE โดยวิธี GC/MS พบว่ามีองค์ประกอบหลักทางเคมี ได้แก่ 3-n-Butylphthalide (31.46%), 2, 5-Lutidin (21.94%) และ Linoleic acid (16.41%) คิดเป็น 69.81% ขององค์ประกอบที่ระเหยได้ทั้งหมด ส่วนองค์ประกอบรองลงมาคือ 4-Hydroxyindole (7.05%), Butylidene phthalide (6.25%), Bis (2-ethylhexyl) phthalate (4.84%) และ β-Selinene (2.41%) การทดสอบความเสถียรทางกายภาพและชีวภาพของ LHE ที่เก็บไว้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและเวลาต่างๆ ได้แก่ 4 °C, อุณหภูมิสภาพแวดล้อม (21-35 °C) และ 45 °C เป็นเวลา 1, 2 และ 3 เดือน พบว่าลักษณะทางกายภาพ เช่น ลักษณะ สี และกลิ่นของตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 1, 2 และ 3 เดือน มีลักษณะคงเดิมเหมือนกับสารที่สกัดใหม่ อย่างไรก็ตามสำหรับกลุ่มตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสภาพแวดล้อม และ 45 °C เป็นเวลา 1, 2 และ 3 เดือน แม้จะยังคงความหนืดและมีกลิ่นหอมเหมือนเดิม แต่มีสีเปลี่ยนไปจากน้ำตาลอ่อนเป็นน้ำตาลเข้ม นอกจากนั้นกลุ่มตัวอย่างเหล่านี้ยังมีประสิทธิภาพป้องกันยุงได้อย่างน้อย 3 เดือน โดยกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ที่เก็บไว้ในแต่ละอุณหภูมิเป็นเวลา 2 และ 3 เดือน จะมีประสิทธิภาพลดต่ำกว่าสารสกัดใหม่และกลุ่มตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน เพียงเล็กน้อย

ดังนั้นผลิตภัณฑ์ LHE ที่พิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพป้องกันยุงกัด ไม่มีผลข้างเคียงต่อผิวหนังของอาสาสมัคร และมีความเสถียรทางกายภาพและชีวภาพ ถือเป็นตัวเลือกที่มีศักยภาพสามารถนำไปพัฒนาเป็นสารไล่ยุงธรรมชาติชนิดใหม่ เพื่อใช้ทดแทน DEET หรือนำไปใช้ร่วมกับสารเคมีหรือวิธีการอื่นๆ ในการควบคุมแมลงพาหะแบบบูรณาการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Chemical Composition and Repellent Efficacy of Plant Products Against *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae)
Author	Mr. Rukpong Sanghong
Degree	Master of Science (Parasitology)
Advisory Committee	

Asst. Prof. Dr. Anuluck Junkum	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Atchariya Jitpakdi	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Doungrat Riyong	Co-advisor

ABSTRACT

Fifteen plant species, including *Acacia concinna*, *Aegle marmelos*, *Angelica dahurica*, *Bixa orellana*, *Chromolaena odoratum*, *Clitoria ternatea*, *Houttuynia cordata*, *Lantana camara*, *Ligusticum sinense*, *Ocimum americanum*, *Ocimum basilicum*, *Rheum palmatum*, *Saussurea lappa*, *Vetiveria zizanioides*, and *Zingiber zerumbet* were selected for extraction by steam distillation and solvent maceration for use in repellency screening against the dengue fever vector, *Aedes aegypti* under laboratory conditions. While all plant materials extracted with ethanol and hexane provided yields ranging from 5.12 to 65.00% (w/w) and 0.66 to 15.98% (w/w), respectively, only two plant samples; *S. lappa* root and *A. marmelos* leaf, offered essential oils with a yield of 0.32 and 1.50% (v/w), respectively. Repellent screening using the human-bait technique found that plant products provided effective protection against *Ae. aegypti* with varying degrees of repellency. Most hexane extracts exhibited greater repellency than ethanolic extracts and essential oils of the same plant. The highest repellency was established from *L. sinense* rhizome hexane extract (LHE), with

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

a median complete-protection time of 6.5 (5.0-8.0) hr, which was comparable to that of the standard chemical repellent, *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide (DEET: 6.25, 5.0-6.5 hr). Therefore, LHE is considered to be the most effective repellent as a candidate for further investigations, including repellent testing against various mosquitoes, with more volunteers under laboratory and field conditions; analysis of chemical composition; and physical and biological stability tests.

Laboratory repellent investigations against two mosquito species, with more volunteers, revealed that 25% LHE and 25% DEET, with and without 5% vanillin added, effectively repelled both *Ae. aegypti* and *Anopheles minimus*. Furthermore, vanillin extended the protection times of 25% LHEv and 25% DEETv against *Ae. aegypti* from 6.5 (5.5-9.5) hr to 11.0 (7.0-13.5) hr and 8.0 (5.0-9.5) hr to 8.75 (7.5-11.0) hr, respectively; and against *An. minimus* from 11.5 (9.0-14.0) hr to 12.5 (9.0-16.0) hr and 11.5 (10.5-15.0) hr to 14.25 (11.0-18.0) hr, respectively. The best repellent samples; 25% LHEv and 25% DEETv, were selected for field repellent trials performed in the hot season from April to May 2013, at Sunpesua subdistrict, Muang district, Chiang Mai province, northern Thailand. The 25% LHEv and 25% DEETv, demonstrated similarly strong repellency, with complete protection (100%) against a wide range of natural mosquito populations belonging to five genera, i.e., *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex*, and *Mansonia*. From a total of 5,306 adult female mosquitoes, comprising 13 species collected during the field study, the most predominant were *Armigeres subalbatus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Culex vishnui*, which made up 42.76%, 41.27%, and 9.69%, respectively. No local skin reaction such as rash, swelling, irritation, or other allergic responses was observed during both laboratory and field study periods.

The chemical composition achieved by a qualitative GC/MS analysis showed that the main components of LHE were 3-n-Butylphthalide (31.46%), 2, 5-Lutidin (21.94%), and Linoleic acid (16.41%), constituting 69.81% of all the volatile constituents. The minor constituents of LHE were 4-Hydroxyindole (7.05%), Butylidene phthalide (6.25%), Bis (2-ethylhexyl) phthalate (4.84%), and *β*-Selinene (2.41%). Physical and biological stability of LHE was investigated after it had been kept at various temperatures [4 °C, ambient temperature (21-35 °C), and 45 °C] for different durations

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1, 2, and 3 months). From the results obtained, it appeared that physical characteristics, such as appearance, color, and odor of all samples kept at 4 °C for 1, 2, and 3 months, were similar to those of the fresh sample. Although the samples stored at ambient temperature and 45 °C for 1, 2, and 3 months were still viscous, with a pleasant aromatic odor, their color had changed from light- to dark-brown. Repellent activities against *Ae. aegypti* of the stored LEH samples were presented for a period of at least 3 months. Most samples stored at each temperature for 2 and 3 months offered insignificantly lower repellency than the fresh sample and those kept for 1 month.

Therefore, LHE products with proven repellent efficacy, rather physical and biological stable, and no irritant side effects are potential candidates for the development of a new natural alternative to DEET, or an additional weapon used together with other chemicals/measures for integrated vector control.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved