

หัวข้อขุณยภินิพนธ์	การพัฒนาผลิตภัณฑ์พืชธรรมชาติเพื่อเป็นสารขับไล่ยุง ทางเลือก	
ผู้เขียน	นางสาวคนิตา จำปาแก้ว	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปรสดีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ.ดร.เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร.อุดม ชัยทอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ.ดร.อัญริยา จิตต์ภักดี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร.อนุลักษณ์ จันทร์คำ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

การตรวจคัดกรองฤทธิ์ไล่ยุงเบื้องต้นของพืชจำนวน 33 ชนิดกับยุงลาย *Aedes aegypti* ภายใต้ห้องปฏิบัติการ พบว่าน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดเอทานอลจากส่วนเหง้าและรากของโกฐเชียง (*Angelica sinensis*) มีประสิทธิภาพในการขับไล่ยุงได้ดีที่สุด โดยมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัดเท่ากับ 7.0 (6.0-7.5) และ 2.5 (2.0-2.5) ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อสกัดโกฐเชียงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เรียงตามคุณสมบัติความมีขี้และไม่ขี้ที่แตกต่างกัน สารสกัดที่ได้ทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ขับไล่ยุงแตกต่างกันไป สารสกัดเฮกเซนโกฐเชียง (AHE) มีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัดเท่ากับ 7.5 (6.5-8.5) ชั่วโมง ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดเอทานอลโกฐเชียง (AEE: 2.5, 2.0-2.5 ชั่วโมง), สารสกัดอะซิโตนโกฐเชียง (AAE: 1.75, 0.5-2.5 ชั่วโมง), และสารสกัดเมทานอลโกฐเชียง (AME: 0.5, 0-1.0 ชั่วโมง) ถือได้ว่า AHE มีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยโกฐเชียง (AEO: 7.0, 6.0-7.5 ชั่วโมง) และสารเคมีไล่ยุงมาตรฐาน คือ *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide (DEET: 6.25, 5.0-6.5 ชั่วโมง) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี gas chromatography/mass spectrometry พบว่าองค์ประกอบหลักทางเคมีของสารสกัดชนิดต่าง ๆ จากโกฐเชียงมีความคล้ายคลึงกันจัดอยู่ในกลุ่ม phthalides หรือ phthalates ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่ม phthalides ที่พบปริมาณสูง ได้แก่ 3-*N*-butylphthalide, butylidenephthalide, และ ligustilide พบใน AHE 83.33%, AEO 78.44%, AME 42.78%, และ AEE 39.03% ในขณะที่ AAE พบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่ม phthalates เช่น di-iso-octyl phthalate ปริมาณสูงที่สุด 56.47% หลังจากนั้นเตรียมผลิตภัณฑ์ขับไล่ยุงสูตรต่าง จาก

สารสกัดที่มีฤทธิ์ไล่ยุงดีที่สุดคือ AHE ดังนั้น สารละลายเอทานอลของ AHE (AHE-ES) และนาโนอิมัลชันของ AHE (AHE-NE) ที่ผสมและไม่ผสม vanillin ผลการทดสอบฤทธิ์ขับไล่ยุงลาย *Ae. aegypti* ของผลิตภัณฑ์จาก AHE ดังกล่าว พบว่าผลิตภัณฑ์จะมีฤทธิ์ไล่ยุงนานขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์และเติม vanillin ในขณะที่ 5-25% AHE-ES มีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงลาย *Ae. aegypti* กัดอยู่ในช่วง 2.0-6.5 ชั่วโมง และเมื่อนำ 5-25% AHE-ES มาเติม 5% vanillin (AHEv-ES) พบว่าระยะเวลาในการป้องกันยุงนานขึ้นเป็น 4.0-8.5 ชั่วโมง สอดคล้องกับสารละลายเอทานอลของ 5-25% DEET ที่ผสม 5% vanillin (DEETv-ES) ที่มีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงลาย *Ae. aegypti* กัดนานขึ้นจาก 2.25-7.25 ชั่วโมง เป็น 4.25-8.25 ชั่วโมง นอกจากนี้ฤทธิ์ไล่ยุงที่เพิ่มขึ้นยังพบในสารทดสอบ 5-25% AHE-NE ที่ผสม 5% vanillin (AHEv-NE) โดยขยายระยะเวลาป้องกันยุงลาย *Ae. aegypti* กัดจาก 3.25-5.75 ชั่วโมง เป็น 4.0-7.75 ชั่วโมง จากนั้นพัฒนาผลิตภัณฑ์ขับไล่ยุงจาก AHE ให้มีรูปแบบที่ง่าย เพื่อผลิตและจัดจำหน่ายในท้องตลาดต่อไป โดยได้เตรียมผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันจาก AHEv-NE ให้อยู่ในรูปแบบของเจล (AHEv-NEG) และทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงกับยุงพาหะ 3 สายพันธุ์ ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันเจลโกฐเชียงที่ความเข้มข้น 10% (10% AHEv-NEG) ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลาย *Ae. aegypti*, ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus*, และยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* กัด โดยมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัดเท่ากับ 4.5 (4.0-6.0), 7.75 (6.5-11.5), และ 11.0 (9.5-12.0) ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับนาโนอิมัลชันเจลที่เตรียมจากสารเคมีไล่ยุงมาตรฐาน (DEET) ความเข้มข้น 10% ที่ผสม 5% vanillin (10% DEETv-NEG) โดยมีระยะเวลาป้องกันยุงกัดเท่ากับ 7.5 (6.5-9.0), 10.5 (9.5-16.0), และ 12.0 (10.0-12.5) ชั่วโมง ตามลำดับ

ทำการศึกษาฤทธิ์ขับไล่ยุงในภาคสนามทั้งหมด 2 ครั้ง ในพื้นที่เดียวกันของจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงฤดูร้อน และฤดูฝนของปี พ.ศ. 2556 และ พ.ศ. 2559 ในการทดสอบครั้งแรกศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงของสาร 2 ชนิด คือ 25% AHEv-ES และ 25% DEETv-ES พบว่าสารไล่ยุงทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพสูงสามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติกัดได้ 100% ยุงที่จับได้ทั้งหมด 5,718 ตัว จัดอยู่ใน 5 สกุล ได้แก่ ยุงลาย (*Aedes*), ยุงก้นปล่อง (*Anopheles*), ยุง *Armigeres*, ยุงรำคาญ (*Culex*), และยุงลายเสือ (*Mansonia*) จากยุงทั้งหมด 13 ชนิด พบยุงรำคาญชนิด *Cx. quinquefasciatus*, ยุง *Armigeres subalbatus*, และ *Culex vishnui* เป็นจำนวนมาก คิดเป็น 41.47%, 41.13%, และ 10.53% ตามลำดับ ในการทดสอบครั้งที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงของผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันเจล 2 ชนิด คือ 10% AHEv-NEG และ 10% DEETv-NEG ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า 10% AHEv-NEG สามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติได้ดีกว่า 10% DEETv-NEG เล็กน้อย โดย 10% DEETv-NEG ป้องกันยุงได้ 99.9% ส่วน 10% AHEv-

NEG สามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติได้ถึง 100% ยุงที่จับได้ทั้งหมด 13,161 ตัว จัดอยู่ใน 6 สกุล ได้แก่ ยุงลาย (*Aedes*), ยุงก้นปล่อง (*Anopheles*), ยุง *Armigeres*, ยุงรำคาญ (*Culex*), ยุงลายเสือ (*Mansonia*), และยุง *Lutzia* จากยุงทั้งหมด 19 ชนิด พบยุงรำคาญชนิด *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. vishnui*, ยุงลาย *Aedes vexans*, *Cx. gelidus*, และ *Ar. subalbatus* เป็นจำนวนมาก คิดเป็น 24.91%, 24.15%, 17.47%, 10.81%, และ 7.81% ตามลำดับ ซึ่งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงภายใต้ห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม ไม่พบอาการผิดปกติของผิวหนัง เช่น ผื่นแดง บวม ระคายเคือง หรืออาการแพ้อื่น ๆ ในอาสาสมัครที่ทดสอบ

การศึกษาฤทธิ์ก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ 25% AHE-ES หรือ 10% AHEv-NEG ในอาสาสมัครจำนวน 30 คน พบว่าสารดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัคร การทดสอบความเสถียรทางกายภาพและชีวภาพของผลิตภัณฑ์ขับไล่ยุงจากโกฐเชียง 2 ชนิด คือ AHE และ 10% AHEv-NEG โดยการเก็บไว้ในสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บแตกต่างกัน และ/หรือการทดสอบแบบเร่งอุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง หลังจากเก็บสารตัวอย่าง AHE ไว้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 4 °C, อุณหภูมิสภาพแวดล้อม (21-35 °C), และ 45 °C เป็นเวลา 1, 3, และ 6 เดือน พบว่าทุกตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพ เช่น ลักษณะ สี และกลิ่น คล้ายคลึงกับ AHE ที่สกัดใหม่ นอกจากนั้นทุกตัวอย่างยังคงมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลาย *Ae. aegypti* กัดได้อย่างน้อย 6 เดือน โดยมีระยะเวลาป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 4.5-10.0 ชั่วโมง ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 10% AHEv-NEG ที่เก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 4 °C, อุณหภูมิสภาพแวดล้อม (16-30 °C), และ 45 °C เป็นเวลา 1, 2, 3, และ 6 เดือน พบว่ามีลักษณะทางกายภาพบางอย่างเปลี่ยนแปลงไปและมีฤทธิ์ป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 3.5-5.25 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 10% AHEv-NEG ที่ผ่านการทดสอบแบบเร่งอุณหภูมิจำนวน 2 และ 4 รอบ ยังคงมีลักษณะทางกายภาพ สี และกลิ่นใกล้เคียงกับ 10% AHEv-NEG ที่เตรียมใหม่ โดยมีค่ามัธยฐานของระยะเวลาป้องกันยุงกัดเท่ากับ 4.50 (4.0-4.5) ชั่วโมง และ 3.75 (3.5-4.5) ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ 10% AHEv-NEG ที่เตรียมใหม่เล็กน้อย (5.50, 5.0-6.0 ชั่วโมง) จากการที่ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันยุงกัด มีความคงสภาพค่อนข้างดีและไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง จึงถือว่าผลิตภัณฑ์ขับไล่ยุงจาก AHE นี้มีศักยภาพสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ขับไล่ยุงจากธรรมชาติชนิดใหม่ โดยอาจเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่นำมาทดแทนสารเคมีไล่ยุง (DEET) ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

<b>Dissertation Title</b>	Development of Natural Plant Products as an Alternative Mosquito Repellent	
<b>Author</b>	Ms. Danita Champakaew	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
<b>Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Benjawan Pitasawat	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Atchariya Jitpakdi	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Anuluck Junkum	Co-advisor

## ABSTRACT

Preliminary laboratory screening tests for repellency of herbal products derived from 33 plant species against *Aedes aegypti* clearly demonstrated essential oil and ethanolic extract of *Angelica sinensis* rhizome and root as the most effective repellent, with the median complete protection times (MPTs) of 7.0 h (6.0-7.5) and 2.5 h (2.0-2.5), respectively. Subsequent extractions of *A. sinensis* with different organic solvents of increasing polarity provided four extractants with varying degrees of repellency against *Ae. aegypti*. The hexane extract of *A. sinensis* provided MPT of 7.5 (6.5-8.5) h, which was greater than that of ethanol extract (AEE: 2.5, 2.0-2.5 h), acetone extract (AAE: 1.75, 0.5-2.5 h), and methanol extract (AME: 0.5, 0-1.0 h). Significant protection afforded by *A. sinensis* hexane extract (AHE), which was the most effective sample, compared favorably with that of its essential oil (AEO: 7.0, 6.0-7.5 h) and the standard synthetic repellent, *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide (DEET: 6.25, 5.0-6.5 h). Chemical analysis by using qualitative gas chromatography/mass spectrometry demonstrated that the compositions in these *A. sinensis* products were almost similar because phthalides or phthalates were principal constituents. A high percentage of phthalides, including 3-*N*-butylphthalide, butylidenephthalide, and ligustilide was found in AHE (83.33%), AEO

(78.44%), AME (42.78%), and AEE (39.03%), whereas AAE (56.47%) showed the highest amount of phthalates such as di-iso-octyl phthalate. The most effective product, AHE, was selected for preparations of AHE-based repellent products, including AHE-ethanol solution (AHE-ES) and AHE nanoemulsion (AHE-NE), with and without vanillin supplementation. The repellent test of these AHE-based products against *Ae. aegypti* demonstrated improved repellency in a dose-dependent manner when vanillin was added. While 5-25% AHE-ES alone provided MPTs of 2.0-6.5 h against *Ae. aegypti*, 5-25% AHE-ES added with 5% vanillin (AHEv-ES) generated prolonged MPTs of 4.0-8.5 h. Correspondingly, 5-25% DEET ethanol solution combined with 5% vanillin (DEETv-ES) also extended MPTs from 2.25-7.25 h to 4.25-8.25 h against *Ae. aegypti*. Increased repellency also was observed in 5-25% AHE-NE added with 5% vanillin (AHEv-NE), with expanded MPTs from 3.25-5.75 h to 4.0-7.75 h against *Ae. aegypti*. In order to transform AHE-based repellents for exploitable commercial production, AHEv-NE was subjected to preparation into gel form (AHEv-NEG), which was tested subsequently for repellency against three mosquito vectors. It was found that 10% AHEv-NEG afforded remarkable repellency against *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles minimus*, with MPTs of 4.5 (4.0-6.0), 7.75 (6.5-11.5) and 11.0 (9.5-12.0) h, respectively, which was comparable to that of 10% DEET-vanillin nanoemulsion gel (10% DEETv-NEG: 7.5 (6.5-9.0), 10.5 (9.5-16.0), and 12.0 (10.0-12.5) h, respectively).

Field repellent evaluations were conducted twice; once each in Field I and Field II, at the same location in Chiang Mai province during the hot and rainy seasons of 2013 and 2016, respectively. In Field I, 25% AHEv-ES and 25% DEETv-ES produced similarly strong repellency by minimizing bites with a 100% protection against a wide range of field mosquito populations. A total of 5,718 adult female mosquitoes belonging to five genera; *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex*, and *Mansonia*, were collected during the field study. Among 13 mosquito species collected, *Cx. quinquefasciatus*, *Armigeres subalbatus*, and *Culex vishnui* were the most prominent, which made up 41.47%, 41.13%, and 10.53%, respectively. In Field II, two nanoemulsion gel products; 10% AHEv-NEG and 10% DEETv-NEG were evaluated for repellency, and the former was slightly stronger than the latter against a wide range of natural mosquito populations. While 10%

DEETv-NEG was effective in reducing bites, with 99.9% protection, the protective effect of 10% AHEv-NEG appeared to be complete (100% protection). A total of 13,161 adult female mosquitoes belonging to six genera; *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex*, *Mansonia*, and *Lutzia*, were captured during the field study. Among 19 mosquito species captured, the most prominent were *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. vishnui*, *Ae. vexans*, *Cx. gelidus*, and *Ar. subalbatus* which made up 24.91%, 24.15%, 17.47%, 10.81%, and 7.81%, respectively. No local skin reactions such as rash, swelling, irritation or other allergic responses were observed in either laboratory or field study periods.

Evaluation of skin irritation in 30 human volunteers revealed no potential irritant from 25% AHE-ES or 10% AHEv-NEG. Determination of physical and biological stability of AHE-based repellent products, such as AHE and 10% AHEv-NEG, was carried out after they were kept under conditions of a varying temperature and time storage and/or a heating/cooling cycle. After storage at 4 °C, ambient temperature (21 to 35 °C), and 45 °C for 1, 3, and 6 months, all stored AHE samples exhibited similar characteristics, with an aromatic odor similar to that of fresh preparation. Repellency of the stored AHE samples against *Ae. aegypti* was present for a period of at least 6 months, with varied efficacy (MPTs = 4.5-10.0 h). The stored samples of 10% AHEv-NEG exhibited some changes in appearance and differing degrees of repellency, with MPTs ranging between 3.5-5.25 h, after keeping at 4 °C, ambient temperature (16 to 30 °C), and 45 °C for 1, 2, 3, and 6 months. However, 10% AHEv-NEG samples demonstrated similarity in appearance and physical property between those kept for 2 and 4 heating/cooling cycles, which provided MPTs of 4.50 (4.0-4.5) and 3.75 (3.5-4.5) h, respectively, when compared to that of 5.50 (5.0-6.0) h in fresh preparation. According to their highly effective repellency, rather physical and biological stability, with no irritant side effects, AHE-based products are potential candidates for developing new natural commercial repellent products that may be an alternative to DEET.