การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการควบคุมยุงพาหะนำโรค

Application of Thai medicinal plants for controlling mosquito vectors

*อนุลักษณ์ จันทร์คำ**
*Anuluck Junkum**

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

** ผู้รับผิดชอบบทความ*
** Corresponding author*

Abstract

Mosquito-borne diseases continue to be a major public health problem causing not only high level morbidity and mortality, but also great socio-economical loss worldwide, particularly in tropical countries with a favorable climate for mosquito breeding and development, such as Thailand. Nowadays, substances of natural origin are increasing of attention as an attractive alternative in mosquito management, due to the environment and food safety, and the increasing resistance rates and public unacceptability of conventional synthetic insecticides. Plants and their products show great promise regarding discovery and development of new botanical insecticides. Despite some attempts being made, mosquitocidal properties of Thai indigenous plants have not been studied systematically. Therefore, the aim of this article is to serve as guidelines for insecticidal research of local medicinal plants or herbs. A review of the current stage of knowledge on mosquitoes and their medical importance, selection and preparation of plant samples, extraction processes, chemical analysis of plant-extracted substances, activity testing of plant products on mosquitoes, and production and development of plant-based insecticides used for controlling mosquitoes is presented. Scientific research by our team on the plant potential against mosquitoes also is reviewed.

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยยังคงเผชิญกับสถานการณ์ของโรคติดเชื้อต่าง ๆ ที่นำโดยแมลง ซึ่งแมลงพาหะสำคัญทางการแพทย์ที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย คือ ยุง ซึ่งนำโรคร้ายแรงหลายชนิดมาสู่คนและสัตว์ ได้แก่ โรคมาลาเรีย โรคเท้าช้าง โรคไข้เลือดออก โรคไข้สมองอักเสบ โรคไข้ซิคุนกุนยา และโรคพยาธิหัวใจสุนัข ฯลฯ โรคต่าง ๆ เหล่านี้นอกจากจะทำให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิตแล้ว ยังก่อให้เกิดผลกระทบและสร้างความสูญเสียอย่างมากในทางเศรษฐกิจและสังคม แนวทางหนึ่งในการป้องกันและควบคุมโรคดังกล่าวคือการป้องกันและกำจัดยุงพาหะ โดยมาตรการในอดีตที่ผ่านมามุ่งเน้นไปที่การใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงและได้ผลรวดเร็ว จึงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีอย่างผิดวิธีและต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน นอกจากมีผลทำให้ยุงสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีแล้ว ยังก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ตามมา ได้แก่ ความเป็นพิษต่อผู้ใช้ทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายและชีวิต รวมไปถึงการปนเปื้อนสะสมของสารพิษที่อาจก่อให้เกิดมลภาวะสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันจากกระแสโลกาภิวัฒน์ที่ทำให้ประชากรทั่วโลกหันกลับมาสนใจสิ่งแวดล้อม และดูแล

เอาใจใส่สุขภาพของตนเองในลักษณะที่กลับคืนสู่ความเป็นธรรมชาติมากขึ้น จึงมีการสนับสนุนและส่งเสริมการอุปโภคและบริโภคพืชสมุนไพรซึ่งมีสารเคมีตามสภาพธรรมชาติที่น่าจะมีความปลอดภัยมากกว่า

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสมุนไพรจำนวนมาก ที่ผ่านมามีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการป้องกันและกำจัดยุงพาหะที่สำคัญทางการแพทย์กันบ้างแล้ว แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จและยังไม่เป็นที่แพร่หลายเท่าที่ควร ส่วนใหญ่ยังเป็นการใช้ตามภูมิปัญญาของท้องถิ่นนั้น โดยไม่มีรูปแบบและทิศทางที่เหมาะสม ไม่ได้มีการพัฒนาต่อยอดหรือประยุกต์ใช้อย่างเป็นรูปธรรม รวมทั้งยังขาดข้อมูลความรู้ทางวิชาการหรือผลวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่น่าเชื่อถือมารองรับ ดังนั้นเพื่อให้สามารถนำพืชสมุนไพรไปใช้ให้เกิดประโยชน์และได้ผลคุ้มค่าในการป้องกันและกำจัดยุงมากยิ่งขึ้น จึงควรส่งเสริมการศึกษาและพัฒนางานวิจัยสมุนไพรในประเทศอย่างต่อเนื่องและจริงจัง โดยเฉพาะการนำสมุนไพรที่มีพื้นฐานการใช้ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นหรือที่ได้มีการศึกษาวิจัยเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ในการป้องกันและกำจัดแมลงมาศึกษาและพัฒนาต่อไปในเชิงลึกทางวิทยาศาสตร์ให้มากยิ่งขึ้น

ในที่นี้ผู้วิจัยและทีมงานได้ประมวลความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแมลงโดยเฉพาะ “ยุง” ที่เป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ รวมถึงการศึกษาในรายละเอียดที่สำคัญของพืชสมุนไพร วิธีการสกัดสารสำคัญที่พบในสมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดยุง วิธีการทดสอบฤทธิ์ต่อยุงพาหะ ตลอดจนงานวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ป้องกันกำจัดยุง และการพัฒนาเป็นตำรับหรือผลิตภัณฑ์เพื่อประยุกต์เป็นรูปแบบที่น่าใช้และใช้สะดวก ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากสมุนไพรได้อย่างมีประสิทธิภาพ และคาดว่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหา ป้องกัน และกำจัดโรคที่นำโดยยุงพาหะได้ดียิ่งขึ้น อันจะนำมาซึ่งคุณภาพชีวิตที่ดีต่อไป

ยุง (Mosquitoes)

ยุงเป็นแมลงที่จัดอยู่ในอันดับ (order) Diptera, **วงศ์** (family) Culicidae และไฟลัม (phylum) Arthropoda ประมาณ 85% ของสิ่งมีชีวิตในโลกนี้จัดอยู่ในไฟลัมดังกล่าว[1] ยุงเป็นแมลงที่พบได้ทั่วโลก โดยพบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ปัจจุบันพบว่าในโลกนี้มียุงประมาณ 3,450 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานพบอย่างน้อย 412 ชนิด แต่ที่เป็นพาหะนำโรคร้ายมาสู่คนมีอยู่ประมาณ 35 ชนิด[2] ชนิดที่รู้จักแพร่หลายและเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์แบ่งออกเป็น 2 วงศ์ย่อย (subfamily)[3] คือ

1. Subfamily Culicinae เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด ยุงใน subfamily นี้ หลายชนิดมีความสำคัญทางการแพทย์ เช่น ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และ ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก (dengue haemorrhagic fever) ยุงลายสวนยังเป็นพาหะนำโรคไข้ชิคุนกุนยา (chikungunya) หรือโรคไข้ปวดข้อยุงลายอีกด้วย ยุงลาย *Aedes niveus* subgroup เป็นพาหะนำโรคเท้าช้างชนิด *Wuchereria bancrofti* บริเวณชายแดนไทย-พม่า ยุงเสือ (*Mansonia* spp.) เป็นพาหะนำโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ทางภาคใต้ของประเทศไทย และยุงรำคาญ (*Culex* spp.) เช่น *Cx. tritaeniorhynchus* เป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบ (Japanese encephalitis) เป็นต้น

2. Subfamily Anophelinae ยุงในกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ คือ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย (malaria) โดยยุงพาหะหลักที่สำคัญได้แก่ *Anopheles dirus*, *An. baimii*, *An. minimus* และ *An. maculatus* เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียบริเวณพื้นที่ป่าเขา จากการรายงานปี พ.ศ. 2553 ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข[3] พบว่าในประเทศไทยมีผู้ป่วยเป็นโรคไข้เลือดออก 116,947 ราย เสียชีวิต 139 ราย โรคมาลาเรีย 25,639 ราย เสียชีวิต 34 ราย โรคไข้สมองอักเสบ 40 ราย เสียชีวิต 2 ราย โรคไข้ชิคุนกุนยา 1,565 ราย และโรคเท้าช้าง 9 ราย นอกจากนำโรคร้ายมาสู่มนุษย์แล้วยังก่อให้เกิดความรำคาญ สูญเสียเลือด หรือในบางรายอาจมีอาการแพ้โปรตีนในน้ำลายยุงอย่างรุนแรงทำให้เกิดตุ่มหรือแผลพุพองบริเวณผิวหนังได้ ในปัจจุบันโรคต่าง ๆ เหล่านี้มีเพียงโรคไข้สมองอักเสบเท่านั้นที่สามารถผลิตวัคซีนป้องกันได้ ส่วนโรคอื่น ๆ ยังไม่มีวัคซีนป้องกันการติดเชื้อและการดูแลรักษาส่วนใหญ่ยังคงเป็นเพียงการรักษาตามอาการเท่านั้น ดังนั้นการควบคุมและกำจัดยุงพาหะจึงถือเป็นทางเลือกที่ดีและคุ้มค่าที่สุดในการป้องกันโรคเหล่านี้

การควบคุมประชากรของยุงพาหะในช่วงเวลาที่เหมาะสมเป็นอีกหนึ่งในหลายมาตรการที่จะลดหรือหยุดการแพร่ระบาดของโรคที่นำโดยยุงได้ วิธีการหลัก ๆ ได้แก่ การใช้สารเคมีฆ่าลูกน้ำยุงในแหล่งเพาะพันธุ์ การใช้สารเคมีฆ่ายุงระยะตัวเต็มวัย และการใช้สารขับไล่ยุงชุบเสื้อผ้า มุ้ง หรือทาบริเวณแขน ขา หรือลำตัวเพื่อป้องกันยุงตัวเต็มวัยกัด สารเคมีเหล่านี้แม้สามารถกำจัดยุงได้ดี ใช้สะดวก มีประสิทธิภาพสูง และราคาไม่แพง แต่ปัญหาที่ตามมา คือ มีรายงานว่ายุงบางชนิด และ/หรือบางสายพันธุ์ มีการดื้อต่อสารเคมีหลายชนิด นอกจากนั้น สารเคมีเหล่านี้ยังมีฤทธิ์ตกค้างที่เป็นพิษทำให้เกิดมลภาวะต่อสภาพแวดล้อม และทำอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เป้าหมายในการควบคุมรวมถึงมนุษย์ด้วย

การใช้สารขับไล่แมลง (repellents) เป็นอีกวิธีหนึ่งในการป้องกันยุงกัด สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ขับไล่แมลงและสัตว์ขาข้อต่าง ๆ ไม่ให้รบกวน กัดดูดเลือดหรือไต่ตอมคนและสัตว์เลี้ยง โดยสารขับไล่แมลงที่วางขายตามท้องตลาดส่วนใหญ่มีองค์ประกอบหลักที่สำคัญ คือ สารเคมีสังเคราะห์ *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide หรือ DEET แม้ว่าสารไล่ยุงกลุ่มนี้จะยังคงมีประสิทธิภาพสูงและใช้ได้ผลดีอยู่ แต่จากข้อเสีย เช่น มีกลิ่นค่อนข้างฉุน มักทำให้เกิดความรู้สึกมันและเหนียวเหนอะหนะบริเวณผิวหนังที่ทาสาร และอาจทำลายหรือทำความเสียหายแก่วัสดุบางประเภท เช่น พลาสติก ยางสังเคราะห์และเส้นใยผ้า ทำให้ผู้บริโภคไม่เต็มใจและมักหลีกเลี่ยงการใช้สารขับไล่ยุงดังกล่าว จึงทำให้ลดโอกาสในการป้องกันอันตรายจากยุงหรือแมลงดูดเลือดอื่น ๆ นอกจากนั้นหากมีการใช้สารผิดวิธีหรือใช้ในความเข้มข้นสูงติดต่อกันเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษได้[4]

จากข้อเสียของสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ในการควบคุมยุงดังกล่าวข้างต้น ทำให้การป้องกันและกำจัดยุงในปัจจุบันต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของมนุษย์ สิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ และสิ่งแวดล้อมเป็นอันดับแรก โดยทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจคือการใช้สมุนไพรที่มีสารเคมีตามธรรมชาติซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่า นอกจากนั้น การศึกษาวิจัยพืชสมุนไพรที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและหลากหลายชนิดในประเทศ ย่อมมีโอกาสค้นพบประสิทธิผลของสารสำคัญจากสมุนไพรและมีโอกาสพัฒนาเป็นตำรับหรือรูปแบบที่น่าใช้ได้มากยิ่งขึ้น และคาดว่าแนวโน้มในการนำสมุนไพรมาใช้ในการป้องกันกำจัดยุงที่สำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทยจะมีประโยชน์มากขึ้นในอนาคต อย่างไรก็ตามการพิจารณาเลือกใช้สมุนไพรชนิดใดควรระมัดระวังให้มีความถูกต้องและเหมาะสมในการใช้ รวมถึงต้องพิจารณาข้อมูลทางวิชาการหรือผลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่น่าเชื่อถือมาสนับสนุนการใช้ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นต่าง ๆ ด้วย

การคัดเลือกพืชสมุนไพร

1. คุณสมบัติเบื้องต้น คัดเลือกพืชสมุนไพรที่สามารถกินเป็นอาหาร หรือมีสรรพคุณเป็นยากินพื้นบ้านหรือยาแผนโบราณ (folk medicine, herbal remedies) ซึ่งถือว่าเป็นกลุ่มพืชสมุนไพรที่ค่อนข้างมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง

2. คุณสมบัติเฉพาะ คัดเลือกพืชในวงศ์ (family) เดียวกันหรือในวงศ์ที่ใกล้เคียงกันกับพืชที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต่อยุงหรือแมลงต่าง ๆ

ประเภทของพืช[5]

1. พืชสด (Fresh plant material) โดยมากใช้ในยาแผนโบราณ แต่งกลิ่นอาหาร และผลิตภัณฑ์น้ำหอม โดยมากใช้ตัวอย่างพืชสดเพื่อรักษาคุณสมบัติที่สำคัญ เช่น ไทม์ (thyme) สด มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ แต่หากตัวอย่างของพืชแห้งจะมีผลทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานี้หมดไป โดยทั่วไปการสกัดจะได้ผลดีเมื่อสามารถสกัดสารจากพืชสด โดยการนำพืชสดที่เก็บมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเอนไซม์ก่อนการสกัด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีต่าง ๆ ภายในพืช

2. พืชแห้ง (Dried plant material) ส่วนใหญ่พืชประเภทนี้จะได้มาจากร้านสมุนไพร แต่หากต้องเก็บพืชสดมาทำให้แห้งเอง ต้องใช้วิธีที่เหมาะสม วิธีการทำตัวอย่างพืชให้แห้งมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและสารสำคัญในพืช โดยเฉพาะพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย (volatile oil, essential oil) จะต้องระวังมาก เพราะที่อุณหภูมิสูงปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะลดลง

แหล่งของพืช

มีที่มาหลักอยู่ 2 แหล่ง คือ

1. เก็บจากแหล่งที่พืชเจริญเติบโตโดยตรง ควรเก็บในช่วงเวลาที่เหมาะสมและพยายามควบคุมให้มีน้ำอยู่น้อยกว่า 5% เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์

2. ซื้อจากร้านสมุนไพรที่มีมาตรฐานและทราบถึงแหล่งที่มาของสมุนไพร

การวินิจฉัยชนิดของพืช

ก่อนการศึกษาต้องส่งตัวอย่างพืชไปวินิจฉัยและตรวจสอบชื่อชนิดตามหลักอนุกรมวิธานพืช (species identification) จากผู้เชี่ยวชาญ จากนั้นแบ่งพืชส่วนหนึ่งเก็บไว้เป็นตัวอย่างอ้างอิง (voucher specimen) ที่คลังสมุนไพร โดยข้างกล่องบรรจุตัวอย่างอ้างอิงต้องเขียนระบุรายละเอียดของตัวอย่างพืชตามรูปแบบมาตรฐานที่กำหนดในลักษณะเดียวกันไว้เพื่อเป็นหลักฐานอ้างอิง เพราะในการสกัดสารสำคัญจากพืชแต่ละครั้ง อาจได้สารสกัดที่แตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิดของสารเคมี อันเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการที่เกี่ยวข้องกับพืชดังกล่าว เช่น ความแตกต่างของสายพันธุ์ แหล่งและสภาวะในการเพาะพันธุ์พืช การเก็บรักษาและการเตรียมตัวอย่างพืช ฯลฯ

การทำสมุนไพรให้แห้ง[5]

วิธีการทำให้แห้งสามารถคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงอาจทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไป การทำสมุนไพรให้แห้งอาจทำได้โดย

- การทำให้แห้งในอากาศ (air drying) เช่น ทำให้แห้งในที่ร่ม (shade drying) หรือตากแดด (sun drying)
- การทำให้แห้งโดยอาศัยความร้อนจากแหล่งพลังงานอื่น (artificial heat) เช่น พลังงานไฟฟ้า โดยการเข้าตู้อบ ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและอากาศที่ผ่านเข้าออกได้ วิธีนี้ดีกว่า เนื่องจากที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอน

การแตกย่อยเนื้อเยื่อ (Disintegration of tissue)[5]

เป็นการทำให้ตัวอย่างพืชมีขนาดเล็กลง เพื่อให้ตัวสกัด เช่น ตัวทำละลายหรือไอน้ำแทรกซึมผ่านเซลล์พืชได้ทั่วถึง สามารถสกัดสารสำคัญจากพืชได้ผลดี วิธีการแตกย่อยเนื้อเยื่อ ได้แก่

- การย่อยด้วยเครื่องมือ (mechanical disintegration) เป็นวิธีการทำให้ตัวอย่างพืชมีขนาดเล็กลงโดยอาศัยเครื่องมือที่เหมาะสม เช่น การบด (grinding) ด้วยครกหรือเครื่องบด, การหั่น (slicing) ด้วยมีด, การปั่นด้วยเครื่องปั่น (blender) ฯลฯ
- การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic disintegration) เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอนไซม์สำหรับย่อย pectin และ cellulose เป็นต้น
- การย่อยด้วยสารเคมี (chemical disintegration) เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้สารเคมี เช่น dimethyl formide, cholic, deoxycholic acid, sodium dodecylsulfate, pyridine, urea และ phenol ฯลฯ เพื่อให้เซลล์แตก

การสกัดสารสำคัญจากพืช (Plant extraction)[5]

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ฯลฯ แต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันไป วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชที่สำคัญแบ่งออกเป็น 5 วิธี ได้แก่

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)
2. การสกัดด้วยเครื่องมือ (mechanical extraction)
3. การสกัดด้วยการกลั่น (distillation)
4. การสกัดด้วยการดูดซับ (resorption)
5. การสกัดด้วยการบีบ (expression)

ในที่นี้จะอธิบายเพียง 2 วิธีการ ที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดเพื่อการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพร คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) และ การสกัดด้วยการกลั่น (distillation)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)[5]

เป็นการสกัดสารสำคัญจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ความสามารถของการสกัดกับอัตราการซึมผ่าน (rate of diffusion) ของส่วนที่ละลายได้ผ่านชั้นสัมผัสของของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นตัวสกัด (solvent) กับสารตั้งต้นที่นำมาสกัด โดยขั้นตอนในการสกัดอาจผ่านกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้

การหมัก (Marceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ โถแก้ว และถังพลาสติก ฯลฯ ภายในระยะเวลาที่กำหนด (ประมาณ 2-7 วัน) โดยในระหว่างการหมักต้องหมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เพื่อให้ตัวอย่างพืชได้สัมผัสกับตัวทำละลายมากที่สุด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินสารสกัดออกและพยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ จากนั้นรวมสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดนำไปกรอง (filtration) เพื่อแยกเอากากสมุนไพรออกไป การสกัดด้วยวิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentrated extraction) หลังจากสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักเจือจางและมีปริมาตรมาก การแยกส่วนหรือการศึกษาต่อไปทำได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องแยกตัวทำละลายออกไปเพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้น (concentrated extract) และปราศจากตัวทำละลาย โดยการระเหยด้วยการกลั่นในสูญญากาศ (distillation in vacuo) เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงจนเกือบเป็นสูญญากาศ การกลั่นโดยวิธีนี้ต้องอาศัยการทำงานของเครื่องมือหลัก 3 ชนิด ประกอบกัน (รูปที่ 1) ได้แก่ 1. เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) 2. เครื่องทำน้ำหล่อเย็น (cool ace) และ 3. เครื่องดูดอากาศเพื่อทำสูญญากาศ (vacuum pump, aspirator) ในส่วนของเครื่อง rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ ขวดกลั่น (distillation flask) เป็นภาชนะที่บรรจุสารสกัดที่ต้องการทำให้เข้มข้น หลอดควบแน่น (condenser) เป็นแหล่งทำความเย็นเพื่อให้ไอระเหยของตัวทำละลายกลั่นตัวเป็นของเหลวและขวดรับตัวทำละลาย (receiving flask) ในการทำงานขวดกลั่นที่บรรจุสารสกัดจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำและหมุนอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ความร้อนกระจายไปได้อย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ เมื่อสารละลายในขวดกลั่นเดือด (อุณหภูมิ

Figure 1 The rotary evaporator apparatus

ประมาณ 100-120°C) จะระเหยเป็นไอผ่านไปยังหลอดควบแน่นแล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวลงสู่ขวดรับตัวทำละลาย ทำการกลั่นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งสารสกัดเกือบแห้ง เทใส่ในขวดสีชานำไประเหยตัวทำละลายที่อาจตกค้างออกให้หมดบนเครื่องทำความร้อน (hot plate) โดยใช้ระดับความร้อนต่ำ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เครื่องมือที่ใช้ในการทำสารสกัดให้เข้มข้นที่ดีต้องมีระบบการทำสูญญากาศที่ดี ระยะระหว่างขวดกลั่น และหลอดควบแน่นสั้น และมีระบบทำความเย็นของหลอดควบแน่นที่ดี

การแช่แข็ง (Freezing) การแช่แข็งทำให้สารสกัดกลายเป็นของแข็ง หากเป็นสารที่สกัดด้วยน้ำหรือมีน้ำปนมาด้วยหลังจากแช่แข็งแล้วจะนำไปกำจัดน้ำออกด้วยเครื่อง lyophilizer แต่หากเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่เป็นของแข็งที่สามารถแยกออกจากสารสกัดโดยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation)

การสกัดด้วยการกลั่น (Distillation)[2,5,6]

เป็นวิธีดั้งเดิมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากอารยธรรมอียิปต์โบราณ เมโสโปเตเมียและอินเดียโบราณ การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งาน ลักษณะและคุณภาพของพืช และคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการ เช่น ปริมาณและชนิดของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย วิธีการสกัดที่แตกต่างกันทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพแตกต่างกันด้วย เนื่องจากการสกัดแต่ละวิธีมีประสิทธิภาพในการแยกสารองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากเซลล์พืชไม่เท่ากัน ทั้งยังมีผลให้น้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวกันมี olfactive properties แตกต่างกันได้ วิธีที่นิยมใช้คือ

การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation, Dry steam distillation) เครื่องมือสำหรับการกลั่นโดยวิธีนี้ ประกอบด้วย 6 ส่วนสำคัญ (รูปที่ 2) ได้แก่ 1. เครื่องทำความร้อน (electromantle) 2. ขวดกลั่นรูปชมพู่ (erlenmeyer distillation flask) เป็นภาชนะสำหรับบรรจุน้ำ 3. หลอดสกัดสาร (extraction column) เป็นภาชนะสำหรับบรรจุสมุนไพรที่ต้องการสกัด 4. หลอดควบแน่น (condener) 5. เครื่องทำน้ำหล่อเย็น (cool ace) 6. ขวดรับน้ำมันหอมระเหย (receiving flask) ในการกลั่นด้วยไอน้ำให้บรรจุสมุนไพรและน้ำแยกภาชนะกัน โดยต้มน้ำในขวดกลั่นรูปชมพู่ให้เดือดเพื่อให้น้ำระเหยเป็นไอผ่านไปยังสมุนไพรที่บรรจุอยู่ในหลอดสกัดสาร ไอน้ำจะพาไอของน้ำมันหอมระเหยออกมา ผ่านหลอดควบแน่นแล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวไหลลงสู่ขวดรับน้ำมันหอมระเหย เมื่อทิ้งไว้น้ำมันหอมระเหยจะแยกตัวออกจากน้ำ วิธีนี้มีข้อดี คือ เหมาะสมกับพืชเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะพืชที่สร้างน้ำมันหอมระเหยใน hair gland แต่ควรหลีกเลี่ยงพืชที่ใช้ดอกชนิด delicate flower วิธีนี้มีข้อควรระวังคือ ต้องควบคุมอุณหภูมิและปริมาณของไอน้ำให้เหมาะสมตลอดการทำงาน เพราะหากอุณหภูมิสูงเกินไปในระหว่างการกลั่นอาจมีผลทำให้องค์ประกอบบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยถูกย่อย (hydrolyses) ทำให้เกิดการสลายตัวได้ นอกจากนั้นไม่ควรแตกย่อยพืชให้เป็นชิ้นเล็กเกินไปหรือบรรจุอัดแน่นเกินไป จะทำให้ไอน้ำผ่านได้ไม่สม่ำเสมอและ

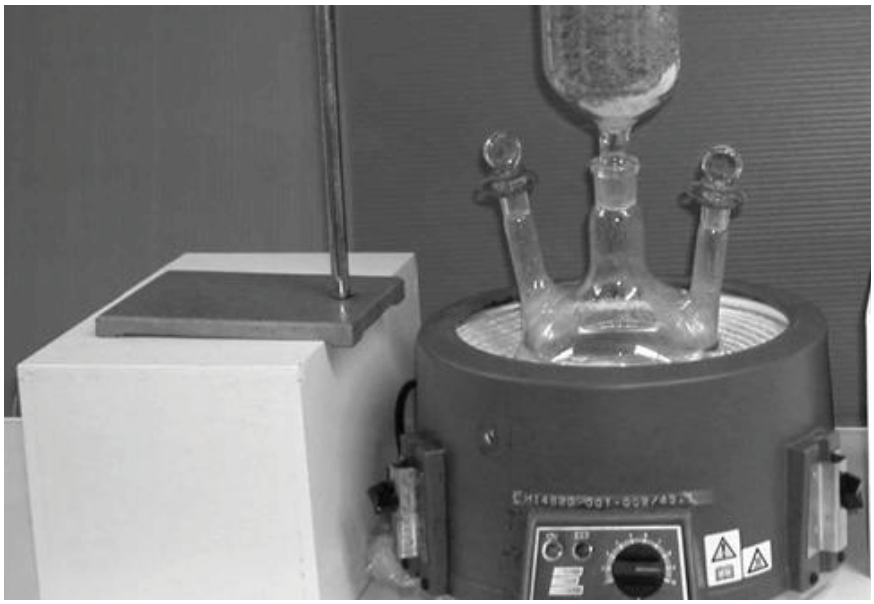

Figure 2 The steam distillation apparatus

ได้ผลผลิตต่ำ การกลั่นที่ดีควรทำให้ไอน้ำกระจายตัวแทรกเข้าไปในเซลล์พืชมากที่สุด แต่ทำให้เกิดการสลายตัวของสารต่าง ๆ น้อยที่สุด

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืช (Chemical analysis of plant extract)[5]

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืชสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. โครมาโตกราฟีผิวบาง (Thin layer chromatography: TLC) เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ใช้วิเคราะห์สารได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ แต่เป็นวิธีที่ไม่เฉพาะเจาะจง

2. แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography: GC) วิธีนี้มีความสำคัญและนิยมกันมากในการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบที่ระเหยได้ง่าย เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูง แสดงผลการวิเคราะห์ในรูปภาพพิมพ์ลายนิ้วมือ (fingerprint) ปัจจุบันนิยมใช้ sampling technique ที่เรียกว่า headspace analysis method เพื่อให้ได้ true odor และลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

3. แก๊สโครมาโตกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography/Mass spectrometry: GC/MS) วิธีนี้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์และปริมาณของสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ง่ายและระเหยได้ปานกลางในตัวอย่างสารผสม ให้การวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะสูง รวดเร็วและสมบูรณ์กว่าวิธีอื่น นิยมใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยมากที่สุด เนื่องจากสามารถแปลข้อมูลจากสเปกตรัมของสารตัวอย่างนั้นได้โดยตรง จึงมีประโยชน์มากในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและส่วนประกอบของธาตุต่าง ๆ ในสารผสม

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยต่อยุงพาหะนำโรค (Activity testing on mosquito vector)[2,6]

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อยุงพาหะที่นิยมทำการศึกษาวิจัย แบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลัก ได้แก่

1. การทดสอบฤทธิ์ต่อระยะตัวอ่อนของยุง ได้แก่ ฤทธิ์ฆ่าและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของระยะตัวอ่อน ได้แก่ ไข่ ลูกน้ำ และตัวโม่ง

2. การทดสอบฤทธิ์ต่อยุงตัวเต็มวัย ได้แก่ ฤทธิ์ฆ่ายุงตัวเต็มวัย ฤทธิ์ป้องกันการวางไข่ยุง และฤทธิ์ไล่ยุงหรือฤทธิ์ป้องกันยุงกัด

3. การทดสอบฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของยุงในทุกระยะ

ในที่นี้ขอเสนอวิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารทดสอบในส่วนของฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ฤทธิ์ฆ่ายุงตัวเต็มวัย และฤทธิ์ป้องกันยุงกัด โดยวิธีการทั้งหมดเป็นการทดสอบเฉพาะในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง (Larvicidal bioassay)

การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงมีมากมายหลายวิธี ในที่นี้จะเสนอวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก[7] โดยการคัดลูกน้ำยุงที่ต้องการทดสอบ เช่น ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) ยุงลาย (*Aedes* spp.) ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) และยุงเสือ (*Mansonia* spp.) ในระยะต่าง ๆ ซึ่งลูกน้ำยุงที่

นิยมใช้ในการคัดกรองเบื้องต้น มักมีอายุอยู่ในช่วงระยะที่ 3 ตอนปลายหรือระยะที่ 4 ตอนต้น ใส่ลูกน้ำในถ้วยที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิตร จำนวน 25 ตัว/ถ้วย ปล่อยให้ยุงปรับตัวอยู่ในสภาพนี้ประมาณ 1 ชั่วโมง ในช่วงนี้หากพบยุงที่มีลักษณะหรืออาการที่ผิดปกติให้คัดออกและใส่ตัวใหม่ที่มีสภาพปกติดีเข้าไปแทน จากนั้นเตรียมสารทดสอบโดยนำสารสกัดจากพืชที่ต้องการทดสอบฤทธิ์มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น ethanol, acetone และ dimethylsulphoxide (DMSO) เพื่อเตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ประมาณ 4-6 ความเข้มข้น ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในเบื้องต้น (screening test) แล้วว่ามีผลทำให้ลูกน้ำยุงตายในช่วง 0-100% เติมสารทดสอบที่เตรียมไว้ในความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในถ้วยที่ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 224 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเข้ากัน สังเกตสภาพของสารละลายโดยดูที่สี กลิ่น ความขุ่น และการเกิดฝ้า ฯลฯ บันทึกผลไว้ หลังจากนั้นเทลูกน้ำยุงที่เตรียมไว้ใส่ลงในสารละลายดังกล่าว คนเบา ๆ ให้เข้ากัน สังเกตอาการของลูกน้ำยุงในแต่ละกลุ่มตั้งแต่เริ่มใส่สาร จากนั้นดูเป็นช่วงเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 30, 60 นาที, 2, 3, 4, 5, 7 ชั่วโมง หลังจากใส่สารทดสอบแล้วตรวจสอบและบันทึกผลอีกครั้งหนึ่งเมื่อครบ 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งนับอัตราการตาย (percent mortality) ของลูกน้ำในแต่ละกลุ่ม

ในการศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงนอกจากกลุ่มทดสอบแล้ว ยังมีกลุ่มควบคุมที่ดำเนินการในลักษณะเดียวกับกลุ่มทดสอบ แต่ลูกน้ำยุงในกลุ่มนี้ไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารทดสอบเลย โดยกลุ่มควบคุมจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใส่เฉพาะตัวทำละลายและอีกกลุ่มหนึ่งที่ไม่ใส่สารอะไรเลย มีเพียงลูกน้ำยุงในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เท่านั้น สำหรับกลุ่มควบคุมทำกลุ่มละ 4 ชุด เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำที่ทดสอบเท่ากับ 100 ตัว/กลุ่ม ส่วนกลุ่มทดสอบในแต่ละความเข้มข้นก็ทำ 4 ชุด เช่นกัน เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำที่ทดสอบเท่ากับ 100 ตัว/ความเข้มข้น ในการทดลองต้องควบคุมสภาพแวดล้อมให้อยู่ในสภาวะเดียวกัน เช่น อุณหภูมิของสภาพแวดล้อม และหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับแสงแดด นอกจากนั้นควรทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง พร้อมทั้งคำนวณหาอัตราการตายเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม

การประเมินประสิทธิภาพของสารทดสอบต้องนำผลที่ได้จากการทดลองคือ อัตราการตายของลูกน้ำยุงในแต่ละความเข้มข้นของสารทดสอบไปพิจารณาถึงความถูกต้องหรือความน่าจะเป็น โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อน คือ ถ้าอัตราการตายในกลุ่มควบคุมน้อยกว่า 5% ให้ใช้อัตราการตายตามจริงของกลุ่มทดสอบได้เลย แต่หากอัตราการตายในกลุ่มควบคุมอยู่ในช่วง 5-20% ต้องปรับอัตราการตายของกลุ่มทดสอบด้วย Abbott's formula[8] ในกรณีที่อัตราการตายในกลุ่มควบคุมมากกว่า 20% ถือว่าผลการทดสอบผิดพลาด ต้องทำการทดลองใหม่

นำผลการทดลองที่ได้ไปประเมินระดับความเป็นพิษหรือฤทธิ์ของสารทดสอบ โดยทั่วไปใช้ค่าลีทัลโดส (lethal dose: LD) หรือลีทัลคอนเซนเทรชัน (lethal concentration: LC) เป็นดัชนีแสดง ที่นิยมมากที่สุดคือการใช้ LD_{50} หรือมีเดียลลีทัลโดส (median lethal dose) ที่หมายถึงปริมาณของสารที่สัตว์ทดลองแต่ละตัวได้รับและมีผลทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง (50%) เป็นเกณฑ์บอกระดับความเป็นพิษ โดยสามารถคำนวนค่าลีทัลโดสในระดับต่าง ๆ เช่น LD_{50}, LD_{95} และ LD_{99} รวมทั้งค่า 95% confidence interval (95% CI) จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่าง ๆ เช่น Probit analysis (Harvard programming; Hg 1, 2) ได้ ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทดสอบแต่ละชนิดจะพิจารณาและเปรียบเทียบค่า lethal doses และค่า 95% CI ของสารทดสอบแต่ละชนิด

การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่ายุงตัวเต็มวัย (Adulticidal bioassay)

การทดสอบฤทธิ์ฆ่ายุงตัวเต็มวัยมีหลายวิธี ในที่นี้เสนอการทดสอบโดยวิธี Topical application ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก[9] โดยคัดเลือกยุงตัวเต็มวัยเฉพาะเพศเมียอายุประมาณ 2-5 วัน ที่ยังไม่ได้กินเลือด จากนั้นสลบยุงด้วย 5% CO_2 เป็นเวลา 5 นาที นำยุงที่สลบแล้วใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่แช่ไว้ในถังน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 3-5 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป การทดลองทำภายใต้กล้อง dissecting microscope โดยดูดยุงจากหลอดทดลองครั้งละ 1 ตัว วางลงบนกระดาษกรองที่อยู่บนแท่นน้ำแข็ง จากนั้นหยดสารทดสอบที่ละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น acetone ในความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณสันหลังของส่วนอกยุง (pronotum) โดยใช้ Hamilton Digital Microsyringe™ (Hamilton; USA) จากนั้นดูดยุงที่ได้รับสารทดสอบเรียบร้อยแล้วกลับไปใส่ไว้ในกล่องพลาสติก และนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 ± 2°C โดยวางสำลีชุบน้ำหวาน (10% w/v sucrose + 10% multivitamin syrup) ไว้ด้านบนกล่องเพื่อเป็นอาหารสำหรับยุง สำหรับยุงกลุ่มควบคุมดำเนินการในลักษณะเดียวกับกลุ่มทดสอบ แต่ยุงจะไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารทดสอบ โดยจะหยดเฉพาะสารที่ใช้เป็นตัวทำละลาย เช่น acetone เท่านั้น

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูและจดบันทึก

จำนวนยุงที่ตายและรอดชีวิตในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม นำผลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการตาย (percent mortality) ของยุงในแต่ละกลุ่ม ในการทดลองใช้ยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย จำนวน 25 ตัว ต่อสารทดสอบในแต่ละความเข้มข้น (ประมาณ 5-6 ความเข้มข้น) คิดเป็นจำนวนยุงทั้งหมดประมาณ 125-150 ตัว

ในการทดลองต้องควบคุมสภาพแวดล้อมให้อยู่ในสภาวะเดียวกัน เช่น อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมเดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด และควรทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง พร้อมทั้งคำนวณหาอัตราการตายเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม ส่วนการประเมินประสิทธิภาพหรือฤทธิ์ในการฆ่ายุงตัวเต็มวัยของสารทดสอบทำในลักษณะเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น

การทดสอบฤทธิ์ป้องกันยุงกัดในห้องปฏิบัติการ (Laboratory repellent bioassay)

วิธีนี้ปฏิบัติตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก[9] โดยทดสอบกับยุงต่าง ๆ เช่น ยุงลาย (*Ae. aegypti*) ซึ่งเป็นยุงที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ไล่ยุง เนื่องจากเป็นยุงพาหะนำโรคที่สำคัญ และเป็นยุงที่เลี้ยงง่ายในห้องปฏิบัติการ มีความดุ และกัดเก่ง การทดลองคัดเฉพาะยุงเพศเมียที่ยังไม่เคยกินเลือดมาก่อน อายุ 5-7 วัน จำนวน 250 ตัว ใส่ในกรงเลี้ยงยุงขนาดมาตรฐาน (30x30x30 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ที่บุด้วยผ้าไนล่อนสีขาว ปล่อยให้ยุงปรับตัวอยู่ในสภาพนี้ประมาณ 1 ชั่วโมง ในช่วงนี้หากพบยุงที่มีลักษณะหรืออาการที่ผิดปกติให้คัดออกและใส่ตัวใหม่ที่มีสภาพปกติดีเข้าไปแทน จัดเตรียมความพร้อมของอาสาสมัคร (เพศชายและหญิง, อายุระหว่าง 18-60 ปี, จำนวน 4-6 คน) โดยทำเครื่องหมายสี่เหลี่ยมผืนผ้าพื้นที่ขนาด 3x10 ตารางเซนติเมตร ลงบนผิวหนังบริเวณท้องแขนในช่วงระหว่างข้อมือถึงข้อศอกของแขนทั้งสองข้าง จากนั้นพันส่วนแขนดังกล่าวด้วยแผ่นพลาสติกที่เจาะช่องขนาด 3x10 ตารางเซนติเมตร ไว้ โดยให้ช่องนี้เปิดพอดีกับบริเวณพื้นที่ทดสอบบนผิวหนังของอาสาสมัครที่ทำเครื่องหมายไว้ จากนั้นให้ปกปิดพื้นที่ส่วนอื่นของแขนทั้งสองข้าง เช่น ใส่ถุงมือและใส่เสื้อแขนยาว โดยให้เปิดเฉพาะตรงบริเวณพื้นที่ทดสอบเท่านั้น ทาสารปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หรือปริมาณ 0.1 กรัม ลงบนแขนทั้งสองข้างของอาสาสมัครในบริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ เกลี่ยให้ทั่วจนครอบคลุมพื้นที่ดังกล่าว ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 2 นาที โดยแขนด้านที่ใช้เป็นตัวทดสอบทาด้วยสารทดสอบที่ละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการในตัวทำละลายที่เหมาะสม ส่วนแขนอีกข้างหนึ่งที่ใช้เป็นตัวควบคุมทาด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารทดสอบ หลังจากนั้นให้อาสาสมัครสอดแขนข้างควบคุมเข้าไปในกรงยุงที่เตรียมไว้ โดยการเหยียดแขนให้ตรงเพื่อเปิดพื้นที่ที่ทาสารให้ยุงสามารถสัมผัสได้เต็มที่ ซึ่งหากมียุงมาเกาะในบริเวณพื้นที่ทดสอบอย่างน้อย 2 ตัว ให้เอาแขนออก และใส่แขนข้างทดสอบเข้าไปแทนโดยทำในลักษณะเดียวกัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ระหว่างนี้ให้สังเกตและนับจำนวนยุงที่ลงเกาะในพื้นที่ทดสอบ เมื่อครบ 3 นาที หากยังไม่มียุงมาเกาะให้เอาแขนออก ทำการทดสอบในลักษณะเดิมโดยนำแขนเข้ากรงทดสอบทุก ๆ 30 นาที โดยยื่นแขนควบคุมเข้าไปก่อนเสมอ ทำการทดลองในลักษณะนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งมียุงมาเกาะในพื้นที่ที่ทาสารของแขนข้างทดสอบอย่างน้อย 2 ตัว ให้หยุดการทดลองทันที

ระยะเวลาป้องกันยุงกัด (protection time) ของสารทดสอบนับตั้งแต่เวลาที่เริ่มยื่นแขนเข้าไปในกรงยุงครั้งแรกจนถึงเวลาที่มียุงมาเกาะบริเวณพื้นที่ทาสารทดสอบเป็นตัวที่ 2 ซึ่งเป็นเวลาที่ถือว่าสารหมดฤทธิ์ป้องกันยุงแล้ว ในอาสาสมัครแต่ละคนทำการทดสอบอย่างน้อย 2 ครั้ง โดยสลับแขนซ้าย-ขวา ระยะเวลาป้องกันยุงของสารทดสอบจะดูภาพโดยรวมที่ได้จากอาสาสมัครทุกคน และบันทึกเป็นช่วงเวลา (range)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารทดสอบต่อยุงลาย *Ae. aegypti* จะทำการทดลองในช่วงเวลากลางวัน (08.00-16.00 น.) เนื่องจากยุงลายชอบออกหากินในช่วงเวลานี้ นอกจากนั้นในการทดลองต้องควบคุมสภาพแวดล้อมให้อยู่ในสภาวะเดียวกันเสมอ เช่น ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 27-30°C และความชื้นสัมพัทธ์ 60-80% สำหรับการควบคุมคุณภาพการทดสอบนั้นอาจกำหนดให้มีตัวควบคุมบวก (positive control) ด้วย โดยใช้อาสาสมัครอีก 1 คน เป็นผู้ทดสอบกับสารทากันยุงอ้างอิง (reference repellent) เช่น DEET ที่ได้ทดสอบหาค่าอ้างอิง (mean ± S.D.) ไว้เรียบร้อยแล้ว จากนั้นดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น ควบคู่ไปกับอาสาสมัครอื่น ๆ โดยระยะเวลาป้องกันยุงกัดของสารทากันยุงอ้างอิงต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ จึงจะถือว่าผลการทดสอบที่ได้จากอาสาสมัครอื่น ๆ นั้นใช้ได้

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยามีข้อกำหนดร่วมกันว่าผลิตภัณฑ์สารทาป้องกันยุงที่ขอจดทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยนั้น จะต้องสามารถป้องกันการกัดของยุงลายซึ่งทดสอบตามวิธีการดังกล่าวได้ไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง

สมุนไพรไทยกับฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง

เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์ และคณะ[10] ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในพืชสมุนไพรจำนวน 10 ชนิด ที่นำมา สกัดด้วยแอลกอฮอล์ (95% ethanol) พบมีพืชจำนวน 3 ชนิดคือ เหง้าเปราะหอม (*Kaempferia galanga*) ผลโป๊ยกั๊ก (*Illicium vernum*) และ ต้นผักกาดหัวแหวน (*Spilanthes acmella*) มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 50.54, 54.11 และ 61.43 ppm ตามลำดับ โดยที่เหง้าเปราะหอมมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากเหง้าเปราะหอมออกฤทธิ์ที่ anal papillae ของลูกน้ำยุงทำให้เกิดความผิดปรกติทางด้านกายภาพและสรีรวิทยาของลูกน้ำยุง[11] ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 เวช ชูโชติ และคณะ[12] สกัดเหง้าเปราะหอมด้วยตัวทำละลายอีกหลายชนิด ได้แก่ เฮกเซน (hexane), ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) และเมธานอล (methanol) พบว่าสารสกัดจากเฮกเซนมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงมากที่สุด โดยให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 42.33 ppm นอกจากนั้น สารสกัดเฮกเซนจากเปราะหอมยังมีฤทธิ์ในการป้องกันยุงกัดอีกด้วย จากนั้นในปี พ.ศ. 2548 คณะผู้วิจัยเดียวกันนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากเหง้าว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*) ต่อลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากว่านนางคำมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง (LC_{50}: 36.30 ppm) สูงกว่าสารสกัดเฮกเซนจากว่านนางคำ (LC_{50}: 57.15 ppm)[13] ในปี พ.ศ. 2549 อุดม ชัยทอง และคณะ[14] ได้นำสารสกัดจากแอลกอฮอล์ของพืช 3 ชนิด คือ ผลดีปลี (*Piper longum*) เปลือกสะค้าน (*Piper ribesoides*) และต้นชะพลู (*Piper sarmentosum*) มาทดสอบกับลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* พบว่าผลดีปลีมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายสูงที่สุด รองลงมาคือ ต้นชะพลู และเปลือกสะค้าน โดยให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 2.23, 4.06 และ 8.13 ppm ตามลำดับ

ในปี พ.ศ. 2550 เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์ และคณะ[15] ได้ศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด คือ เมล็ดยี่หร่า (*Carum carvi*) เมล็ดขึ้นฉ่าย (*Apium graveolens*), ผลเทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum vulgare*) ผลมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) และเหง้าขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) ต่อยุงลาย *Ae. aegypti* และยุงก้นปล่อง *An. dirus* B พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงทั้งสองชนิด โดยมีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* ที่ให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 54.62, 42.07 49.32, 24.61 และ 31.87 ppm ตามลำดับ และมีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง *An. dirus* B โดยให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 72.28, 59.44, 35.27, 57.22 และ 29.69 ppm ตามลำดับ และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นมีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* สูงที่สุด ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง *An. dirus* B สูงที่สุด

ในปีเดียวกัน ดรุณา จำปาแก้ว และคณะ[16] ได้ศึกษาและสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*) พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* โดยให้ค่า LC_{50} และ LC_{99} เท่ากับ 33.45 และ 83.39 ppm ตามลำดับ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นอ้อยพบว่ามีสาร β-tumerone (19.88%) รองลงมาคือ 1,8-cineole (8.93%) และ α-zingiberene (7.84%)[16] การที่น้ำมันหอมระเหยขมิ้นอ้อยมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าลูกน้ำยุง ผู้วิจัยจึงได้นำน้ำมันหอมระเหยขมิ้นอ้อยมาผลิตเป็นตำรับหรือผลิตภัณฑ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยขมิ้นอ้อยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อท้องถิ่นว่า ขมิ้นเจดีย์ ว่านเหลือง ขมิ้นหัวขึ้น สากกะเบือละว้า และเลเมียด (เขมร) ลักษณะทั่วไปของขมิ้นอ้อยเป็นพืชจำพวกเหง้า (รูปที่ 3) เหง้าของขมิ้นอ้อยใช้เป็นเครื่องเทศในอาหารหลายชนิด และมีสรรพคุณใช้เป็นยาแผนโบราณสามารถรักษาโรคผิวหนัง แผลพุพอง แก้อาการแพ้เนื่องจากแมลงมีพิษกัดต่อย แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ และจุกเสียดแน่น แก้ครั่นเนื้อครั่นตัว สมานลำไส้ แก้ระดูขาว ขับปัสสาวะ แก้ฟกบวม แก้อักเสบ แก้พิษโลหิต แก้ลม รักษามะเร็งปากมดลูก มะเร็งในรังไข่ มะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งต่อมไธรอยด์ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง เนื้องอกธรรมดาของกล้ามเนื้อมดลูก รักษาอาการเลือดคั่ง เลือดลมไหลเวียนไม่สะดวก รักษาอาการระดูมาไม่ปกติ เหง้าสดตำผสมกับการบูรเล็กน้อย ดองน้ำฝนกลางหาว รินเอาน้ำหยอดตา แก้ตาแดง ตาแฉะ ตามัว ตาพิการ[17]

ผลิตภัณฑ์ “ทรายขมิ้นอ้อย” ที่ได้จากการเคลือบเม็ดทรายด้วยน้ำมันหอมระเหยขมิ้นอ้อยถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* โดยเปรียบเทียบกับสารเคมีมาตรฐานคือ “ทรายอะเบท (Abate®)” พบว่าทรายขมิ้นอ้อยที่ใช้ในความเข้มข้น 10 เท่าของ LC_{99} มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง 100% เป็นเวลานาน 9 วัน และอัตราการตายของลูกน้ำยุงลดลงน้อยกว่า 50% คือ 15.2, 3.2 และ 0.2% ในสัปดาห์ที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ในขณะที่ทรายอะเบทความเข้มข้น 0.1 และ 1 ppm มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง 100% เป็นเวลา 6 วัน และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ และอัตราการตายของลูกน้ำยุงลดลงน้อยกว่า 50% ในวันที่ 18 และสัปดาห์ที่ 11 ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความคงตัวทางชีวภาพของทรายขมิ้นอ้อยหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C, 45 °C และที่อุณหภูมิห้อง (23-30 °C) เป็นเวลานาน 1 และ 2 เดือน พบว่าทรายขมิ้นอ้อยที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้นานที่สุด

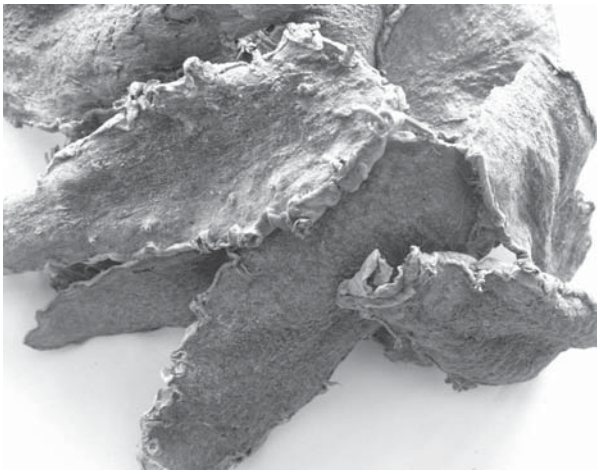

Figure 3 Rhizomes of Curcuma zedoaria Roscoe

รองลงมาคือทรายขมิ้นอ้อยที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C โดยมีอัตราการตายของลูกน้ำยุง 100% เป็นเวลานาน 9, 8 และ 6 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ทรายขมิ้นอ้อยที่เก็บไว้ในแต่ละอุณหภูมิเป็นเวลานาน 1 เดือน ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำยุงสูงกว่าทรายขมิ้นอ้อยที่เก็บไว้นาน 2 เดือน โดยตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ให้ผลใกล้เคียงกับทรายขมิ้นอ้อยที่เตรียมเสร็จใหม่ (fresh sample)

ในปี พ.ศ. 2553 ณฐยา สัทธานนท์ และคณะ[18] ได้นำน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด คือ ผิวมะกรูด (*Citrus histrix*) ผิวส้มจีน (*Citrus reticulata*) เหง้ากระทือ (*Zingiber zerumbet*) ดอกตูมของกานพลู (*Eugenia caryophyllata*) และเหง้าเปราะหอม (*K. galanga*) มาทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* สายพันธุ์ที่ดื้อและสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงทั้งสองสายพันธุ์ได้ โดยน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มจีนมีฤทธิ์สูงที่สุด รองลงมาคือ ผิวมะกรูด เหง้ากระทือ เหง้าเปราะหอม และดอกตูมของกานพลู ตามลำดับ โดยพบว่าค่า LC_{50} ในการทดสอบกับลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์ที่ดื้อต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์จะสูงกว่าในยุงลายสายพันธุ์ที่ไวเล็กน้อย

สมุนไพรไทยกับฤทธิ์ในการฆ่ายุงตัวเต็มวัย

ปี พ.ศ. 2549 เวช ชูโชติ และคณะ[19] ได้นำสารสกัดแอลกอฮอล์จากพืชในวงศ์พริกไทยจำนวน 3 ชนิด คือ ผลดีปลี (*P. longum*) เปลือกสะค้าน (*P. ribesoides*) และต้นชะพลู (*P. sarmentosum*) มาทดสอบกับยุงลาย *Ae. aegypti* ตัวเต็มวัยเพศเมีย พบว่าสารสกัดจากต้นชะพลูมีฤทธิ์ฆ่ายุงลายระยะตัวเต็มวัยสูงที่สุด รองลงมาคือ เปลือกสะค้าน และผลดีปลี โดยให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 0.14, 0.15 และ 0.26 µg/female ตามลำดับ ในปีเดียวกัน ดนา ไชยสิทธิ์ และคณะ[20] ศึกษาฤทธิ์ฆ่ายุงตัวเต็มวัยของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด คือ เมล็ดคื่นฉ่าย (*A. graveolens*) เมล็ดยี่หร่า (*C. carvi*) เหง้าขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*) ผลดีปลี (*P. longum*) และผลโป๊ยกั๊ก (*I. vernum*) ต่อยุงลาย *Ae. aegypti* ตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการและสายพันธุ์ที่จับจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์ฆ่ายุงลาย *Ae. aegypti* ตัวเต็มวัยเพศเมียทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยยุงสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยมากกว่ายุงสายพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ฆ่ายุงตัวเต็มวัยของน้ำมันหอมระเหยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผลยี่หร่า มีฤทธิ์สูงสุด รองลงมาได้แก่ เหง้าขมิ้นอ้อย เมล็ดคื่นฉ่าย ผลดีปลี และผลโป๊ยกั๊ก โดยมีค่า LD_{50} ในยุงสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการเท่ากับ 5.44, 5.94, 5.96, 6.21 และ 8.52 µg/mg female ตามลำดับ และมีค่า LD_{50} ในยุงสายพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติเท่ากับ 5.54, 6.02, 6.14, 6.35 และ 8.83 µg/mg female ตามลำดับ

สมุนไพรไทยกับฤทธิ์ในการป้องกันยุงกัด

ในปี พ.ศ. 2542 เวช ชูโชติ และคณะ[12] ได้นำเหง้าเปราะหอมมาสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน (hexane), ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) และเมธานอล (methanol)

พบว่าสารสกัดเฮกเซนจากเปราะหอมมีฤทธิ์ป้องกันยุงกัดภายใต้ห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับการทดลองในภาคสนามพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากเปราะหอมสามารถป้องกันยุงได้หลากหลายชนิด เช่น *Armigeres subalbatus*, *An. barbirostris*, *An. aconitus*, *Mn. uniformis*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. gelidus*, *Cx. tritaeniorhynchus* และ *Ae. aegypti* ในการทดลองนี้ไม่พบว่าสารสกัดเฮกเซนจากเปราะหอมมีผลเสียหรือก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัครที่ทาสารแต่อย่างใด ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์ และคณะ[21] ศึกษาฤทธิ์ป้องกันยุงกัดของสารสกัดแอลกอฮอล์จากเหง้าว่านมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa*) เหง้าว่านนางคำ (*C. aromatica*) และ เหง้าว่านชักมดลูก (*C. xanthorrhiza*) ต่อยุงลาย *Ae. togoi* พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากเหง้าว่านนางคำสามารถป้องกันยุงกัดภายใต้ห้องปฏิบัติการได้นาน 3.5 ชั่วโมง และสามารถป้องกันยุงในภาคสนามได้หลายชนิด เช่น *Ar. subalbatus*, *Cx. quinquefasciatus* และ *Cx. tritaeniorhynchus* โดยสารสกัดนี้ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัครอีกด้วย

การศึกษาศักยภาพต่อยุงพาหะของสารสกัดแอลกอฮอล์จากเมล็ดคื่นฉ่าย (*A. graveolens*) โดย เวช ชูโชติ และคณะ ในปี พ.ศ. 2547[22] พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากเมล็ดคื่นฉ่ายมีฤทธิ์ต่อยุงลาย *Ae. aegypti* ทั้งระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัย โดยมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่มีค่า LC_{50} และ LC_{95} เท่ากับ 81.0 และ 176.8 ppm ตามลำดับ และมีฤทธิ์ฆ่ายุงตัวเต็มวัยที่มีค่า LC_{50} และ LC_{95} เท่ากับ 6.6 และ 66.4 mg/cm^2 ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดยังมีฤทธิ์ในการป้องกันยุงกัดภายใต้ห้องปฏิบัติการนาน 3 ชั่วโมง โดยไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัคร ในปีเดียวกัน เบญจวรรณ ตื้อตัน และคณะ[23] นำเมล็ดคื่นฉ่าย (*A. graveolens*) มาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเธน และเมธานอล เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันยุงกัดต่อยุงลาย *Ae. aegypti* ภายใต้ห้องปฏิบัติการ พบว่าสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดคื่นฉ่ายมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถป้องกันยุงกัดได้นาน 3.5 ชั่วโมง และเมื่อนำสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดคื่นฉ่ายมาผสมกับสารเสริมฤทธิ์คือ 5% vanillin พบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดได้นานถึง 5 ชั่วโมง นอกจากนั้นการทดลองในภาคสนามยังพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดคื่นฉ่ายสามารถป้องกันยุงได้หลากหลายชนิด ได้แก่ *Ae. gardnerii*, *Ae. lineatopennis*, *Ar. subalbatus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* group, *Cx. quinquefasciatus* และ *Mn. uniformis* การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดคื่นฉ่ายพบว่ามีสาร 3-*n*-butyl-tetrahydrophthalide (92.48%) เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ β-selinene (5.10%) และ β-selinene (0.68%)[24] จากประสิทธิภาพในการป้องกันยุงที่ดีของสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดคื่นฉ่าย ผู้วิจัยได้นำสารสกัดดังกล่าวมาผลิตเป็นตำรับหรือผลิตภัณฑ์ไล่ยุง โดยผสมกับส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ ตัวทำละลาย (solvent) สารปรุงแต่ง (additive) สารเสริมฤทธิ์ (synergist) และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ฯลฯ

คื่นฉ่ายเป็นพืชจำพวกผัก มีชื่อเรียกท้องถิ่นว่า ผักข้าวปีน ผักปีน ผักปืม (ไทยภาคเหนือ) ฮั่งขึ่ง (แต้จิ๋ว) ฉินฉ่าย และฮั่นฉิน (จีนกลาง) จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae ส่วนใบและลำต้นของคื่นฉ่ายสามารถนำมารับประทานสด หรือใช้ปรุงอาหารทำให้มีรสชาติอร่อยมากขึ้น นอกจากคื่นฉ่ายยังมีสรรพคุณเป็นยาแผนโบราณ โดยลำต้นสดใช้ลดความดันโลหิต ขับนิ่ว แก้ปัสสาวะเป็นเลือด แก้ฝีฝักบัว ลดจำนวนอสุจิในน้ำเชื้อผู้ชาย เมล็ดคื่นฉ่าย (รูปที่ 4) มีสรรพคุณขับลม เจริญอาหาร บำรุงประสาท แก้นอนไม่หลับ และขับปัสสาวะ[17]

ผลิตภัณฑ์ไล่ยุงของสารสกัดเฮกเซนจากเมล็ดคื่นฉ่ายมีอยู่ 2 รูปแบบด้วยกัน คือ แบบสารละลาย (solution) และเจล (gel)[24-26] เมื่อนำมาทดสอบกับยุงลาย *Ae. aegypti* โดยเปรียบเทียบกับสารไล่ยุงมาตรฐานคือ DEET และสารไล่ยุงตามท้องตลาดชนิดต่าง ๆ พบว่าผลิตภัณฑ์รูปแบบสารละลายมีประสิทธิภาพป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 0-3.5 ชั่วโมง ซึ่งมีฤทธิ์ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์รูปแบบเจลที่มีประสิทธิภาพป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 2-4.5 ชั่วโมง โดยพบว่าผลิตภัณฑ์รูปแบบเจลที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและสามารถป้องกันยุงกัดภายใต้ห้องปฏิบัติการได้นานถึง 4.5 (4.5-5) ชั่วโมง คือ เจลสูตรที่ 10 (G10) ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ DEET (4.5-5.5 ชั่วโมง) ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงหรือสูงกว่าสารไล่ยุงในท้องตลาดอื่น ๆ (0-4.5 ชั่วโมง) ดังนั้นจึงได้นำ G10 ไปทดสอบกับยุงจากแหล่งธรรมชาติในภาคสนาม โดยเปรียบเทียบกับ DEET และ Insect Block 28 ซึ่งเป็นสารไล่ยุงในท้องตลาดที่มีประสิทธิภาพป้องกันยุงสูงสุดภายใต้ห้องปฏิบัติการ (4.5 ชั่วโมง) จากการศึกษาพบว่า G10 มีฤทธิ์ป้องกันยุงได้สูงสุดเทียบเท่ากับ Insect Block 28 โดยสามารถป้องกันยุงในแหล่งธรรมชาติได้หลากหลายชนิด และสามารถป้องกันได้ถึง 100% ส่วนสารละลาย 25% DEET มีฤทธิ์ป้องกันยุงได้ 99.68%

สำหรับการทดสอบความคงตัวทางชีวภาพของ G10 ที่ได้จากการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันใน 2 ลักษณะ คือแบบเร่งอุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิต่ำและสูงสลับกัน และแบบที่เก็บรักษาภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มี

Figure 4 Seeds of Apium graveolens Linn

ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บแตกต่างกันพบว่า G10 ที่ผ่านสภาวะแบบเร่งอุณหภูมิทุกตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพคงเดิมและมีฤทธิ์ไล่ยุงเทียบเท่ากับผลิตภัณฑ์ที่เตรียมใหม่ๆ โดยสามารถป้องกันยุงกัดได้นาน 4.5 (4.5-5) ชั่วโมง ส่วน G10 ที่ผ่านการเก็บรักษาในสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันพบว่า G10 ในบางตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพบางอย่างเปลี่ยนแปลงไปและมีฤทธิ์ในการป้องกันยุงลดลงคือ อยู่ในช่วง 2.5-3 ชั่วโมง

จากงานวิจัยเกี่ยวกับศักยภาพต่อยุงพาหะของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ผ่านมาพบว่า นอกจากสารสกัดจากคื่นฉ่ายแล้วยังมีน้ำมันหอมระเหยจากพืชอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการป้องกันยุงกัด เช่น พริกหอม (*Zanthoxylum piperitum*)[27,28] โหระพา (*Ocimum basilicum*)[29] ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*)[30,32] กานพลู (*Syzygium aromaticum*)[31] และฝรั่ง (*Psidium guajava*)[32] ซึ่งพืชต่างๆ เหล่านี้อาจเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาศึกษาในเชิงลึกทางวิทยาศาสตร์และศึกษาต่อยอดเพื่อสามารถผลิตเป็นตำรับหรือผลิตภัณฑ์ไล่ยุงที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันยุงกัด และสามารถใช้ทดแทนสารเคมีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้เป็นอย่างดี

พืชสมุนไพรเป็นผลผลิตจากธรรมชาติที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ เพื่อรักษาโรคภัยไข้เจ็บตั้งแต่โบราณกาล แต่หลังจากที่ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์มีการพัฒนาเจริญก้าวหน้ามากขึ้น มีการสังเคราะห์และผลิตยาจากสารเคมีในรูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้ง่าย สะดวกสบายในการใช้มากกว่าสมุนไพร ทำให้ความนิยมในการใช้ยาสมุนไพรลดลงอย่างมาก เป็นเหตุให้ความรู้และวิทยาการด้านสมุนไพรขาดการพัฒนาและไม่เจริญก้าวหน้าเท่าที่ควร ในปัจจุบันทั่วโลกได้ยอมรับแล้วว่าผลิตผลที่ได้จากสมุนไพรให้คุณประโยชน์ดีกว่ายาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ ประกอบกับในประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติอันอุดมสมบูรณ์มีพืชต่างๆ ที่ใช้เป็นสมุนไพรได้มากมายนับหมื่นชนิด ยังขาดแต่เพียงการค้นคว้าวิจัยในทางที่เป็นวิทยาศาสตร์มากขึ้นเท่านั้น ความตื่นตัวที่จะพัฒนาความรู้ด้านพืชสมุนไพรจึงได้เริ่มใหม่และมีการศึกษาอย่างจริงจังและต่อเนื่องมากยิ่งขึ้น ดังนั้นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพรที่สามารถใช้เป็นสารควบคุมยุง ไม่ว่าจะใช้ในการฆ่าลูกน้ำยุง ฆ่ายุงตัวเต็มวัย และ/หรือใช้ในการขับไล่ยุงหรือป้องกันยุงกัด ที่ตั้งเป็นตำรับมาจากพืชสมุนไพรที่ปลอดภัย ได้เน้นให้เห็นถึงขุมทรัพย์อันมีค่าที่ถูกชี้แนะไว้โดยบรรพบุรุษของการวิจัย คือภูมิปัญญาท้องถิ่นที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างเหมาะสมเพื่อประชาคมโลกที่ปลอดภัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. สมชาย จงวุฒิเวศย์, อุษา ทิสยากร. มาลาเรีย. กรุงเทพฯ: ธราเพรส, 2549.
2. จารีย์ บันสิทธิ์, ธิดารัตน์ บุญรอด, ประไพ วงค์สินคงมั่น, และคณะ. สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์ 2 น้ำมันหอมระเหย. นนทบุรี: สถาบันวิจัยสมุนไพร และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2548.
3. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. Annual epidemiological surveillance report. นนทบุรี: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์ (สำนักกิจการโรงพิมพ์), 2553.
4. เวช ชูโชติ, อัจฉรียา จิตต์ภักดี, เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์, ผ่องศรี ทิพวังโกศล, ดวงรัตน์ ริยอง. กีฏวิทยาทางการแพทย์ (Medical entomology). เชียงใหม่: อนรรฆนงค์, 2549.
5. ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์, นันทวัน บุณยะประภัศร, พรรนิภา ชุมศรี, และคณะ. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2534.
6. อุษาวดี ถาวระ, อภิวัฏ ธวัชสิน, ฤทัยรัตน์ ศรีธมรัตน์, ปณวรรณ ปุโรทกานนท์. สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2546.
7. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. Geneva: WHO, 1981.
8. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 1925; 18: 265-6.
9. World Health Organization. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/WHOPES/IC/96.1, Control of Tropical Diseases Division, Geneva: WHO, 1996.
10. Pitasawat B, Choochote W, Kanjanapothi D, et al. Screening for larvicidal activity of ten carminative plants. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1998; 29: 660-2.
11. Insun D, Choochote W, Jitpakdi A, et al. Possible site of action of *Kaempferia galanga* in killing *Culex quinquefasciatus* larvae. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30: 195-9.
12. Choochote W, Kanjanapothi D, Panthong A, et al. Larvicidal, adulticidal and repellent effects of *Kaempferia galanga*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30: 470-6.
13. Choochote W, Chaiyasit D, Kanjanapothi D, et al. Chemical composition and anti-mosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol 2005; 30: 213-24.
14. Chaithong U, Choochote W, Kamsuk K, et al. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol 2006; 31: 138-44.
15. Pitasawat B, Champakaew D, Choochote W, et al. Aromatic plant-derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. Fitoterapia 2007; 78: 205-10.
16. Champakaew D, Choochote W, Pongpaibul Y, et al. Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 2007; 100: 729-37.
17. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์, 2540.

18. Sutthanont N, Choochote W, Tuetun B, et al. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and -resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol 2010; 35: 106-15.
19. Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, et al. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera Culicidae) of three *Piper* spp. Rev Inst Med Trop S Paulo 2006; 48: 33-7.
20. Chaiyasit D, Choochote W, Rattanachanpichai E, et al. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. Parasitol Res 2006; 99: 715-21.
21. Pitasawat B, Choochote W, Tuetun B, et al. Repellency of aromatic turmeric *Curcuma aromatica* under laboratory and field conditions. J Vector Ecol 2003; 28: 234-40.
22. Choochote W, Tuetun B, Kanjanapothi D, et al. Potential of crude seed extract of celery, *Apium graveolens* L., against the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol 2004; 29: 340-9.
23. Tuetun B, Choochote W, Rattanachanpichai E, et al. Mosquito repellency of the seeds of celery (*Apium graveolens* L.). Ann Trop Med Parasitol 2004; 98: 407-17.
24. Tuetun B, Choochote W, Pongpaibul Y, et al. Celery-based topical repellents as a potential natural alternative for personal protection against mosquitoes. Parasitol Res 2008; 104: 107-15.
25. Tuetun B, Choochote W, Kanjanopothi D, et al. Repellent properties of celery, *Apium graveolens* L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions. Trop Med Int Health 2005; 10: 1190-8.
26. Tuetun B, Choochote W, Pongpaibul Y, et al. Field evaluation of G10, a celery (*Apium graveolens*)-based topical repellent, against mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Chiang Mai province, northern Thailand. Parasitol Res 2009; 104: 515-21.
27. Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, et al. Chemical components and repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Fitoterapia 2007; 78: 359-64.
28. Kamsuk K, Choochote W, Chaithong U, et al. Effectiveness of *Zanthoxylum piperitum*-derived es sential oil as an alternative repellent under laboratory and field applications. Parasitol Res 2007; 100: 339-45.
29. Chokechaijaroenporn O, Boonyapraphatsara N, Kongchuensin S. Mosquito repellent activities of *Ocimum* volatile oils. Phytomedicine 1994; 1: 135-9.
30. Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, et al. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. J Vector Ecol 2001; 26: 76-82.
31. Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Krisadaphong P, Apiwathnasorn C. Laboratory and field trial of developing medicinal local Thai plant products against four species of mosquito vectors. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004; 35: 325-33.
32. Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Thavara U, et al. Repellency of essential oils extracted from plants in Thailand against four mosquito vectors (Diptera: Culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37: 915-31.