รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

องค์ประกอบทางเคมีและการปรับปรุงผลิตภัณฑ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง (*Azadirachta exelsa* Jack.) เพื่อควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linnaeus)

Chemical composition and product improvement of thiam (*Azadirachta exelsa* Jack.) seed oil for controlling the dengue fever mosquito (*Aedes aegypti* Linnaeus)

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ งามผ่องใส[1/]

รองศาสตราจารย์ ดร. สนั่น ศุภธีรสกุล[2/]

รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ[3/]

[1/]คณะทรัพยากรธรรมชาติ [2/]คณะการแพทย์แผนไทย [3/]คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พ.ศ. 2559

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2554-2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

องค์ประกอบทางเคมีและการปรับปรุงผลิตภัณฑ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง (*Azadirachta exelsa* Jack.) เพื่อควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linnaeus)

Chemical composition and product improvement of thiam (*Azadirachta exelsa* Jack.) seed oil for controlling the dengue fever mosquito (*Aedes aegypti* Linnaeus)

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ งามผ่องใส[1/]

รองศาสตราจารย์ ดร. สนั่น ศุภธีรสกุล[2/]

รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพล ศรีชนะ[2/]

[1/]คณะทรัพยากรธรรมชาติ [2/]คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พ.ศ. 2559

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2554-2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554-2555 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกและใช้ครุภัณฑ์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสารอะซาดิแรคตินในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง ขอบคุณภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่อำนวยความสะดวกห้องปฏิบัติการ คุณสุฮัยญา แวยูโซะ และคุณมัสริน วิวัฒน์ ที่ช่วยในการดำเนินการวิจัย เก็บข้อมูล และวิเคราะห์ข้อมูลในการทำการวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ I
บทคัดย่อ VI
Abstract VIII
ความสำคัญและที่มาของการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
ยุงลายและแนวทางการควบคุม 3
สารเคมีสำคัญที่พบในพืช 6
สารออกฤทธิ์ควบคุมแมลงที่สำคัญที่พบในพืช 7
การสกัดสารออกฤทธิ์ในพืช 8
การใช้สารสกัดจากพืชควบคุมยุง 9
วิธีการดำเนินการวิจัย 14
ผลการทดลองและวิจารณ์ 24
สรุป 54
เอกสารอ้างอิง 55
ภาคผนวก 63

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชนิดของพืชต่างๆ ที่มีการศึกษาการออกฤทธิ์ในการควบคุมลูกน้ำยุง.....11
ตารางที่ 2 การออกฤทธิ์แบบต่างๆ ของสารสะเดาอินเดียต่อยุงชนิดต่างๆ.....12
ตารางที่ 3 ชนิด ปริมาณของกรดไขมัน และปริมาณสารอะซาดิแรคติน ในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยและวิธี Soxhlet 24
ตารางที่ 4 ปริมาณสารในส่วนแยกย่อยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย 25
ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน ปริมาณสารอะซาดิแรคติน ที่พบในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย ส่วนแยกย่อยด้วย *n*-hexane, chloroform และ ethyl acetate 26
ตารางที่ 6 ปริมาณของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สกัดด้วยตัวทำละลายนอร์มอลเฮกเซน ด้วยวิธีแช่ยุ่ยและวิธี Soxhlet.....27
ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำยุงลายบ้านและค่า LC_{50} ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ แช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัส หลังทดสอบสารเป็นเวลา 24 48 72 และ 120 ชั่วโมง 29
ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยของลูกน้ำยุงลายบ้านที่เวลาต่างๆ หลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....34
ตารางที่ 9 ค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุย และแบบวิธี Soxhlet ที่ไม่ผสมสาร PBO และที่ผสมสาร PBO ที่อัตราส่วนต่างๆ.....36
ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (MT) น้ำมันตะไคร้หอม (CO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ.....37
ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ST) น้ำมันตะไคร้หอม (CO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ 38
ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (MT) น้ำมันยูคาลิปตัส (EO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ 38
ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ST) น้ำมันยูคาลิปตัส (EO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ...39
ตารางที่ 14 สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่อุณหภูมิ 45, 55 และ.....43
ตารางที่ 15 อัตราการสลายตัวของสารอะซาดิแรคติน (k) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่เก็บรักษา....43
ตารางที่ 16 อายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเมื่อสารอะซาดิแรคตินลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารทั้งหมด 44

ตารางที่ 17 อายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเมื่อกำหนดจุดหมดอายุที่ความเข้มข้นต่ำสุด. ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือ 2,000 ppm 45
ตารางที่ 18 ค่ากรดไขมันของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างก่อนและหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส 46
ตารางที่ 19 ค่าเพอร์ออกไซด์ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างก่อนและหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส 47
ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำที่เวลา 120 ชั่วโมง ของน้ำมันแต่ละอุณหภูมิ.....50

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐานของสารอะซาดิแรคติน 17
ภาพที่ 2 สีของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ก) และแบบ Soxhlet (ข) 27
ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้านหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง 30
ภาพที่ 4 ระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านกัด (protection time) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet เมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....31
ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นดักแด้ของลูกน้ำยุงลายบ้านหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 33
ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวเต็มวัยของลูกน้ำยุงลายบ้านหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 33
ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะซาดิแรคตินของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบ ที่อุณหภูมิ..41
ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาอันดับ 1 ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ก) น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง.... แบบ Soxhlet (ข) และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป (ค) ที่อุณหภูมิ 42
ภาพที่ 9 น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ก) 55 องศาเซลเซียส (ข) และ 45 องศาเซลเซียส (ค) 46
ภาพที่ 10 ผลของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ก) แบบ Soxhlet (ข) แบบสำเร็จรูป (ค).....49
ภาพที่ 11 ผลของน้ำมันแต่ละชนิดและแบคทีเรียต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง…… 51
ภาพที่ 12 ภาพตัดตามยาวทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) แสดงโครงสร้างของไขมัน (adipose fabric) กล้ามเนื้อ (muscle) เซลล์ผนังลำไส้ (epithelial cells) และช่องทางเดินอาหาร (alimentary canal) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X ของลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ตายเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* (ก); น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ข); น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ค); น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป (ง); น้ำมันปิโตรเลียม SK 99® (จ); น้ำมันปาล์ม (ฉ) และชุดควบคุม (น้ำเปล่า) 53

บทคัดย่อ

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linneaus) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet การเสริมฤทธิ์กับสาร piperonyl butoxide (PBO) และการเพิ่มฤทธิ์กับน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัส อายุการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิสูงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ของน้ำมันแบบแช่ยุ่ยและแบบ Sochlet เปรียบเทียบกับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป (น้ำมันแบบแช่ยุ่ย+Tween®+Span®+BHT) นอกจากนี้ ได้ศึกษาผลการขัดขวางการแพร่ของออกซิเจนเข้าสู่ผิวน้ำต่อการตายของลูกน้ำ และความเสียหายของเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนกลางที่ได้รับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างดังกล่าวเปรียบเทียบกับน้ำมันปิโตรเลียม น้ำมันปาล์ม แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) และชุดควบคุมพบว่า น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างมีองค์ประกอบหลักของกรดไขมันไม่อิ่มตัว oleic acid ปริมาณมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดที่พบ ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่พบไม่แตกต่างกันระหว่างน้ำมันแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet แต่พบปริมาณสารอะซาดิแรคตินในน้ำมันแบบแช่ยุ่ย (80.14 มิลลิกรัม/ลิตร) มากกว่าในน้ำมันแบบ Soxhlet (76.23 มิลลิกรัม/ลิตร) ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในส่วนแยกย่อยของ chloroform และ ethyl acetate เท่ากับ 99.68 และ 111.66 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าสารอะซาดิแรคตินเป็นสารมีขั้ว ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากวิธีแช่ยุ่ยคิดเป็น 35 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าการสกัดแบบ Soxhlet ซึ่งได้น้ำมัน 31 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันแบบ Soxhlet ฆ่าลูกน้ำได้ดีกว่าแบบแช่ยุ่ย โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 348.0 ppm และ 407.6 ppm ตามลำดับ น้ำมันแบบแช่ยุ่ยยับยั้งการฟักไข่และไล่ยุงลายบ้านได้ดีกว่าน้ำมันแบบ Soxhlet แต่ให้ผลยับยั้งการพัฒนาเข้าสู่ดักแด้และตัวเต็มวัยไม่แตกต่างกัน น้ำมันตะไคร้หอมฆ่าลูกน้ำได้ดีที่สุดโดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงต่ำสุด เท่ากับ 61.9 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันยูคาลิปตัส สาร PBO ไม่ช่วยเสริมฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง การผสมน้ำมันแบบแช่ยุ่ย+น้ำมันตะไคร้หอม อัตรา 8:2 และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet+น้ำมันยูคาลิปตัส อัตรา 8.5:1.5 เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 431.9 และ 424.8 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 816.5 และ 820 ppm ตามลำดับ

อายุเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของน้ำมันแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet และแบบสำเร็จรูป เท่ากับ 4.7, 3.2 และ 1.3 ปี ตามลำดับ ยิ่งเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิที่สูงขึ้น ยิ่งทำให้สมบัติทางกายภาพของน้ำมันเปลี่ยนแปลงมากขึ้น น้ำมันเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงสุด 70 องศาเซลเซียส ขณะที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และยังคงสีเหลืองเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ปริมาณกรดไขมันและค่าเพอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเก็บรักษาเพิ่มสูงขึ้นแต่ประสิทธิภาพการฆ่าลูกน้ำยุงลดลง ลูกน้ำที่ได้รับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง น้ำมันปิโตรเลียม และ เชื้อ Bti. ตายภายใน 1-3 ชั่วโมง ตรงข้ามกับน้ำมันปาล์มที่ต้องใช้เวลานานถึง

24 ชั่วโมง เซลล์บุผนังลำไส้ส่วนกลาง กล้ามเนื้อและไขมันของลำไส้ส่วนกลางถูกทำลายอย่างเด่นชัดเมื่อลูกน้ำได้รับน้ำมันที่ใช้ทดสอบทุกชนิดในการทดลองครั้งนี้รวมทั้งเชื้อ Bti.

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet วิธีการแรกได้เปรียบกว่าวิธีหลัง เนื่องจากให้ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้มากกว่าและมีอายุการเก็บรักษาที่นานกว่า ในขณะให้ผลควบคุมยุงลายแตกต่างกันไม่เด่นชัดระหว่างการสกัด 2 วิธีดังกล่าว เป็นที่น่าสนใจว่าน้ำมันตะไคร้หอม มีประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านดีมาก ดังนั้นจึงควรนำมาพัฒนาร่วมกับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านเพื่อลดการใช้สารเทมีฟอสต่อไป

Abstract

Two types of thiam seed oils, marcerated-oil and soxhlet-oil were compared in terms of chemical contents, biological activity against *Aedes aegypti* Linneaus. Synergistic and additive effects by mixing those oils with piperonyl butoxide (PBO), citronella oil and eucalyptus oil were also investigated. Their shelf lives under high storage temperature for 6 weeks were determined as compared with the marcerated-oil formulation (marcerated-oil+Tween®+Span®+BHT). Suffocated action on mortality of *Ae. aegypti* larvae and histological damage in midgut exposed to thiam seed oils were compared with petroleum oil, palm oil, bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) and control. The unsaturated fatty acid, oleic acid, was the major content with over 50% of total amount of fatty acid found in thiam seed oils. Type and amount of fatty acid were not different between the marcerated-oil and soxhlet-oil, but the azadirachtin content was detected greater in the marcerated oil (80.14 mg/L) than in the soxhlet oil (76.23 mg/L). Azadirachtin contents in the marcerated-oil eluted with chloroform and ethyl acetate were 99.68 and 111.66 mg/L, respectively, indicating a polar substance of azadirachtin. Product of marcerted-oil was 35%, greater than 31.0% of the soxhlet oil. Larvicidal activity of the soxhlet-oil was better than the marcerated-oil, with the 24 h LC_{50} of 348.0 ppm and 407.6 ppm, respectively. The marcerated-oil showed highly egg-laying inhibition and repelling action as compared to the soxhlet-oil, but there was no different inhibition in development of larvae to pupal and adult stages. Citronella oil showed the best toxic to *Ae. aegypti* larvae with the least 24 h LC_{50} of 61.9 ppm, as compared with thiam seed and eucalyptus oils. PBO did not synergize larvicidal activity of thiam seed oils. Combination mixtures of the marcerated-oil+citronella oil (ratio 8:2) and the soxhlet-oil+eucalyptus (ratio 8.5:1.5) highly inhibited egg hatching with EC_{50} of 431.9 and 424.8 ppm as compared to the marcerated-oil and the soxhlet-oil alone with EC_{50} of 816.5 and 820 ppm, respectively.

Shelf lives under 25ºC storage of the marcerated oil, the soxhlet-oil and the marcerated-oil formulation were 4.7, 3.2 and 1.3 years, respectively. A higher storage temperature a greater change of oil physical properties were performed. Oil color markedly turned dark with the highest storage temperature at 70 ºC, whereas they became brown and still yellow after storage at 45 ºC and 25 ºC, respectively. Fatty acid content and peroxide values also increased with a rise of storage temperature, but the larvicidal activity decreased with an increase of storage temperature. Larvae rapidly died within 1-3 h after exposure to thiam seed oil, petroleum oil and *Bti.*, whereas their mortality delayed up to 24 h after exposure to palm oil. Epithelial cells, muscles and adipose

tissues of *Ae. aegypti* larval midgut were evidently damaged by all kinds of oils tested in the experiment as well as *Bti.*

In a comparison of the marceration and the soxhlet extraction, the former is advantage in terms of oil production and shelf life, whereas the biological activity against *Ae. aegypti* are not significantly different between them. Interestingly, citronella oil posses an excellent action as larvicide. Therefore, it should be further developed in a combination with thiam seed oil as larvicide to reduce temephos application.

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linneaus) เป็นแมลงพาหะนำโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่ (dengue virus) และโรคชิคุนกุนยาที่เกิดจากเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (chikungunya virus; CHIKV) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2543) แนวทางป้องกันการระบาดของโรคคือ การควบคุมยุงพาหะนำโรค ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุง การป้องกันยุงกัดโดยใช้มุ้ง ทายากันยุง การใช้สารฆ่าแมลงแบบพ่นหมอกควันหรือใช้สารฆ่าแมลงเทมีฟอสฆ่าลูกน้ำยุงลาย การใช้สารฆ่าแมลงดังกล่าวได้รับความนิยมในปัจจุบัน ดังเห็นได้จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของกระทรวงสาธารณสุข และองค์การบริหารส่วนท้องถิ่นต่างๆ เช่น เทศบาล องค์การบริหารส่วนตำบล และองค์การบริหารส่วนจังหวัด ได้สั่งซื้อสารฆ่าแมลงคิดเป็นมูลค่านับพันล้านบาทต่อปี ซึ่งสารเคมีดังกล่าวต้องนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบรายงานการสร้างความต้านทานของลูกน้ำยุงลายต่อสารเคมีทั้งในและต่างประเทศ (Saelim *et al.,* 2005; Wirth and Georghiou, 1999; Braga *et al.,* 2004) ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาหาแนวทางอื่นๆ เพื่อเป็นทางเลือกในการควบคุมยุงลายบ้าน จึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากจะช่วยลดปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังช่วยลดการนำเข้าและลดอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นกับมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมได้

อรัญ และคณะ (2552) รายงานว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างซึ่งสกัดด้วย *n*-hexane ด้วยวิธีการแช่ยุ่ย (maceration) สามารถฆ่าลูกน้ำและป้องกันการวางไข่ของยุงลายบ้านได้ดีกว่าสารสกัดหยาบเมล็ดสะเดาช้าง ซึ่งสกัดด้วย methanol นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อนำเนื้อในเมล็ดสะเดาช้างมาสกัดด้วย *n*-hexane ด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น จะได้สารสกัดที่เป็นน้ำมันคิดเป็น 53.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเนื้อในเมล็ดทั้งหมด ส่วนสารสกัดหยาบซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันในตัวทำละลาย methanol จะได้สารสกัดหยาบเพียง 19.3 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ดังนั้นจึงควรศึกษาในเชิงลึกและพัฒนาส่วนของน้ำมันที่สกัดด้วย *n*-hexane เพื่อนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ในการควบคุมยุงลายบ้านต่อไป

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อนำไปผลิตและจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ รวมทั้งการปรับปรุงผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงให้ดีขึ้นและได้มาตรฐานในการขอขึ้นทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดแมลงตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยานั้น การทราบองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณของสารเคมีที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญ สมเดช และคณะ (2552) รายงานว่า สารสกัดหยาบเมล็ดสะเดาช้างซึ่งสกัดด้วย methanol มีสารในกลุ่มลิโมนอยด์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ azadirachtin 7 ชนิด ได้แก่ azadirachtin B, 1-isopentanoic acid-3-acetylazadirachtol, azadirachtin M, azadirachtin L, 11*a*-hydroxyazadirachtin H, 11*b*-hydroxyazadirachtin H และ azadirachtol นอกจากนี้ยังพบฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid ด้วย และสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้แก่สาร azadirachtin B, azadirachtin M และ 11*a*-hydroxyazadirachtin H แต่อย่างไรก็ตาม ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างอาจมีความเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ควบคุมแมลงและยังไม่มีรายงาน

ข้อมูลดังกล่าว ดังนั้นจึงได้ศึกษาองค์ประกอบชนิดและปริมาณของกรดไขมัน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาและปรับปรุงน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมยุงลายแบบต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่ใช้ในการศึกษาที่ผ่านมานั้นเป็นการสกัดด้วยวิธีการแช่ยุ่ยด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane แต่จากรายงานของ Chahad and Boof (1994) พบว่า การสกัดผลพริกไทย (*Piper nigrum*) ด้วยวิธี Soxhlet extraction ให้ผลในการฆ่ายุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ดีกว่าการสกัดด้วยวิธีการแช่ยุ่ย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เปรียบเทียบผลในการควบคุมยุงลายบ้านระหว่างน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธีดังกล่าว เปรียบเทียบกับน้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากพืชที่ใช้ในการควบคุมยุงในปัจจุบัน รวมทั้งการนำน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัสมาผสมกับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 2 แบบดังกล่าวข้างต้นเพื่อทราบว่าให้ผลในการเพิ่มฤทธิ์ (additive effect) หรือไม่ รวมทั้งการนำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างผสมกับสารเสริมฤทธิ์ (synergist) เช่น สาร piperonyl butoxide (PBO) เป็นสิ่งจำเป็นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงลายบ้านเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความเสถียรภาพ (stability) ของผลิตภัณฑ์ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องศึกษาเพื่อทราบว่ามีอายุการเก็บรักษา (shelf-life) ได้นานเพียงใด ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ รวมทั้งผลของสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างอุณหภูมิระหว่างเก็บรักษาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและการออกฤทธิ์ควบคุมแมลงของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว นอกจากนี้สาเหตุการตายที่แท้จริงของลูกน้ำยุงที่ได้รับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างก็ควรได้รับการศึกษาในเชิงลึก ถึงแม้ว่าผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ลูกน้ำที่ตายจากการได้รับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างนั้น อีพิธิเลี่ยนเซลล์ (epithelial cell) ที่บุผนังลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ถูกทำลาย (อรัญ และคณะ, 2552) ซึ่งการทราบกลไกการเข้าทำลายและการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่ถูกต้องเป็นข้อมูลสำคัญในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำให้สูงขึ้น

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาประเด็นต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นเพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเป็นผลิตภัณฑ์ในการควบคุมยุงลายบ้านในเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง
2. เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัดน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างต่อการควบคุมยุงลาย
3. เพื่อศึกษาผลการเสริมฤทธิ์และการเพิ่มฤทธิ์ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างต่อการควบคุมยุงลาย
4. เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างโดยสภาวะเร่ง
5. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อสมบัติทางกายภาพ ปริมาณกรดไขมัน ค่าเพอร์ออกไซด์ และการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

6. เพื่อศึกษากลไกการเข้าทำลายและการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยุงลายและแนวทางการควบคุม

ในประเทศไทย ยุงลายที่เป็นพาหะหลักของไข้เลือดออกคือยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) สันนิษฐานว่ามีกำเนิดในทวีปแอฟริกาแล้วแพร่กระจายไปยังทวีปต่าง ๆ โดยมีรายงานการพบยุงลายชนิดนี้ ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2450 ส่วนในประเทศไทยยังไม่มีรายงานว่าเข้ามาตั้งแต่เมื่อใด คาดว่าอาจเข้ามาโดยเป็นไข่ติดมากับภาชนะดินเผาจากประเทศจีนหรืออาหรับในหลายศตวรรษก่อน ในอดีตจะพบยุงลายชนิดนี้เฉพาะในเขตเมืองใหญ่ ๆ แต่ปัจจุบันปรากฏว่าพบทั้งในเขตเมืองและเขตชนบท ยุงลายบ้านมีขนาดเล็กสีดำ มีลายขาวเห็นได้ชัดที่ขา ท้อง และ ลำตัว โดยเฉพาะบนสันหลังอก จะมีเกล็ดสีขาวเป็นรูปเคียว 1 คู่

ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) สามารถนำโรคไข้เลือดออกได้เช่นกัน แต่เป็นพาหะหลักในการนำโรคชิกุนคุนยา มีกำเนิดในทวีปเอเชีย โดยพบได้ทั่วไปตั้งแต่ประเทศ อินเดีย พม่า ไทย มาเลเซีย จนถึง ญี่ปุ่น ปัจจุบันได้มีการแพร่ระบาดไปยังสหรัฐอเมริกา สันนิษฐานว่าติดไปกับยางรถยนต์เก่า ที่นำเข้าจากทวีปเอเชีย ยุงลายสวนมีขนาดเล็กเท่า ๆ กับยุงลายบ้าน มีสีดำ มีลายขาวที่ขา ท้อง และลำตัว และมีลักษณะที่สำคัญคือ มีเกล็ดสีขาวเป็นขีดยาวอยู่กลางสันหลังอก

วงจรชีวิตของยุงลายเป็นแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) โดยแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ลูกน้ำ ดักแด้หรือตัวโม่ง และตัวเต็มวัย ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโต แตกต่างตามสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ อาหาร ความหนาแน่น ในภูมิอากาศประเทศไทยที่อุณหภูมิประมาณ 28-35 องศาเซลเซียส ยุงลายใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย ประมาณ 9-14 วัน

ไข่ยุงลายบ้านมีลักษณะยาวรี ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร ลักษณะเป็นฟองเดี่ยว ๆ หลังจากวางไข่ใหม่ ๆ มีสีขาว แล้วเปลี่ยนเป็นสีดำในเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ยุงลายชอบวางไข่บนพื้นผิวที่เปียกด้านในของภาชนะขังน้ำเหนือระดับน้ำเล็กน้อย ไข่ที่วางใหม่ ๆ ตัวอ่อนภายในยังไม่เจริญเต็มที่ ต้องอาศัยความชื้นสูงใกล้ๆ ระดับน้ำ เพื่อให้ตัวอ่อนภายในไข่เจริญเติบโตจนครบระยะที่จะฟักออกมาเป็นลูกน้ำ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน ที่อุณหภูมิประมาณ 28-35 องศาเซลเซียส ถ้าไข่แห้งในขณะที่ตัวอ่อนกำลังเจริญเติบโต ตัวอ่อนจะตายได้ แต่ถ้าตัวอ่อนเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ไข่จะสามารถอยู่ในสภาพแห้งได้เป็นเวลาหลายเดือนและจะสามารถฟักออกมาเป็นตัวลูกน้ำได้ เมื่อมีน้ำท่วมไข่

ลูกน้ำยุงลายมี 4 ระยะ ซึ่งจะใช้เวลาเจริญเติบโตประมาณ 7-10 วัน อาหารของลูกน้ำได้แก่ ตะไคร่น้ำ อินทรียสารต่าง ๆ และจุลินทรีย์ในภาชนะขังน้ำ และจะโผล่ขึ้นมาหายใจโดยใช้ท่อหายใจที่ผิวน้ำ ลูกน้ำยุงลายบ้านมีลักษณะที่สำคัญ คือ ถ้านำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็น

หนามแหลมบริเวณอกด้านข้างๆ ละ 2 อันชัดเจน และมีลักษณะการว่ายน้ำเป็นรูปเลข 8 หรือรูปตัว S ระยะลูกน้ำเป็นระยะที่ง่ายต่อการกำจัด เนื่องจากอาศัยอยู่ในภาชนะขังน้ำ ไม่สามารถหนีได้เหมือนตัวเต็มวัย

หลังจากระยะลูกน้ำ ก็จะลอกคราบเป็นตัวโม่ง ซึ่งมีสีน้ำตาลดำ ระยะตัวโม่งเป็นระยะที่ไม่กินอาหาร การเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระยะตัวโม่งเพื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน และมักพบตัวโม่งลอยอยู่บนผิวน้ำเพื่อขึ้นมาหายใจ ยุงลายตัวเต็มวัยทั้ง 2 เพศ จะมีลักษณะแตกต่างกัน ที่หนวด โดยที่ยุงตัวผู้หนวดจะมีลักษณะเป็นพู่ขน (plumose) ส่วนตัวเมียจะไม่มีพู่ขน (pilose) เฉพาะยุงลายเพศเมียเท่านั้นที่ต้องดูดกินเลือดเพื่อนำโปรตีนจากเลือดไปสร้างไข่ ส่วนน้ำหวานยุงลาย ทั้ง 2 เพศ ต้องการเพื่อนำไปสร้างพลังงาน ดังนั้นยุงลายเพศเมียจึงเป็นตัวการสำคัญในการถ่ายทอดเชื้อขณะดูดกินเลือด ทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้เลือดออก โดยหลังจากออกจากตัวโม่งแล้วระยะหนึ่งยุงลายจะเริ่มผสมพันธุ์ หลังจากนั้นยุงลายเพศเมียจะเริ่มออกกินเลือดเพื่อสร้างไข่ต่อไป

เหยื่อที่ยุงลายชอบกัดได้แก่ คน ยุงลายจะสามารถกัดดูดเลือดได้หลายครั้ง และเมื่อไปกัดคนที่มีเชื้อไวรัสเดงกี่ เชื้อจะคงอยู่ตลอดชั่วอายุของยุงนั้น ทำให้ยุงลายเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสได้เป็นอย่างดี ยุงลายบ้านหากินภายในบ้านตั้งแต่เช้าจนถึงเวลาพลบค่ำ โดยเฉพาะในช่วงเวลา 8.00-17.00 น. นอกจากคนแล้ว ยุงลายยังสามารถกินเลือดสัตว์ได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์เลี้ยงภายในบ้าน เช่น สุนัข แมว แต่จะเป็นส่วนน้อย ยุงลายชนิดนี้มีอุปนิสัยอาศัยอยู่ในบ้านเรือน โดยมีแหล่งเพาะพันธุ์เป็นภาชนะขังน้ำบริเวณบ้านพักอาศัย เช่น ตุ่มน้ำ บ่อซีเมนต์กักน้ำ จานรองขาตู้กันมด เป็นภาชนะขังน้ำชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในบ้านเรือน เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ยุงลายชอบมาวางไข่เช่นกัน หรือแม้แต่แจกันที่คนนิยมปลูกต้นไม้ในบ้านเรือน เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายแหล่งหนึ่งที่ประชาชนมักคาดไม่ถึง ส่วนภาชนะขังน้ำที่อยู่นอกบ้าน ในบริเวณรอบ ๆ บ้านทั้งที่เป็นภาชนะเก็บกักน้ำไว้ใช้ หรือภาชนะเก่าที่ทิ้งไว้แล้วมีน้ำขัง เช่น ยางรถยนต์ กระป๋องไห กะลามะพร้าว เหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายได้ทั้งสิ้น

ส่วนยุงลายสวนเป็นยุงที่พบอยู่ตามป่าและในเขตที่มีการปลูกต้นไม้ยืนต้น เช่น สวนยาง สวนมะพร้าว สวนผลไม้ และตามเขตชนบท โดยมีแหล่งเพาะพันธุ์อยู่ตามโพรงต้นไม้ กระบอกไม้ไผ่ เศษใบไม้ที่หล่นตามพื้น รวมทั้งภาชนะที่มนุษย์สร้างขึ้น แต่พบอยู่นอกบ้าน เช่น ยางรถยนต์ กระป๋องน้ำ ดังนั้นยุงลายชนิดนี้จึงเป็นพาหะที่มีบทบาทสำคัญในเขตชนบท

วิธีการควบคุมโรคไข้เลือดออกและโรคชิกุนคุนยาให้ได้ผลดี คือ การควบคุมยุงพาหะนำโรค ซึ่งทำได้ทั้งการกำจัดตัวอ่อนและตัวเต็มวัย การควบคุมทำได้หลายวิธี ผู้ดำเนินการควรเลือกใช้วิธีที่เหมาะสม โดยรัฐและประชาชนควรร่วมมือกัน อย่างจริงจังและต่อเนื่อง เริ่มแรกประชาชนควรดำเนินการป้องกันตนเอง และบุตรหลาน ไม่ให้ป่วยเป็นไข้เลือดออก โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้ถูกยุงกัด โดยเฉพาะเด็กที่ต้องนอนตอนกลางวัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาออกหากินของยุงลายเพศเมีย จึงสามารถ

ป้องกันการถูกยุงกัดได้โดยให้เด็กนอนบริเวณที่มีลมถ่ายเทสะดวก หรือนอนกางมุ้ง การกำจัดลูกน้ำยุงลาย ประชาชนสามารถดำเนินการได้เองอย่างง่าย ๆ เช่น ใช้ฝาปิดภาชนะขังน้ำ เพื่อป้องกันการวางไข่ของยุงลายหมั่นขัดล้างเปลี่ยนถ่ายน้ำในภาชนะต่าง ๆ เพื่อกำจัดไข่และลูกน้ำ ใส่เกลือหรือน้ำส้มสายชูในจานรองขาตู้กันมด หมั่นเปลี่ยนน้ำและตรวจดูลูกน้ำในแจกันที่ปลูกต้นไม้ภายในบ้าน เก็บ คว่ำ หรือทำลายภาชนะขังน้ำที่ไม่ได้ใช้เพื่อไม่ให้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลาย ซึ่งวิธีการเหล่านี้ควรจะได้ทำเป็นประจำอย่างสม่ำเสมอ จะทำให้สามารถลดจำนวนประชากรของยุงลายไปได้มาก

ส่วนการกำจัดยุงลายตัวเต็มวัย สามารถดำเนินการได้หลายวิธีทั้งโดยวิธีกล เช่น การใช้มือตีหรือการใช้อุปกรณ์ไฟฟ้า เช่น อุปกรณ์ตียุงไฟฟ้า การใช้สวิงโฉบ โดยการใช้ผลิตภัณฑ์เคมีกระป๋องฉีดพ่น นอกจากผลิตภัณฑ์เคมีแล้ว อาจใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่ประจำในบ้าน คือ น้ำยาล้างจาน ฉีดพ่นยุงลายตัวเต็มวัย โดยผสมน้ำยาล้างจาน 1 ส่วน ต่อน้ำ 4 ส่วน ใส่ลงในกระบอกฉีด ฉีดพ่นฆ่ายุงให้ห่างจากตัวยุงประมาณ 30-50 เซนติเมตร โดยอาจจะฉีดพ่นไปที่บริเวณแหล่งเกาะพักของยุงลาย เช่น บริเวณเสื้อผ้าที่ใช้แล้ว ห้องน้ำ บริเวณมุมห้องหรือที่อับแสงของบ้าน ซึ่งจะทำให้ยุงตายเนื่องจากเปียกน้ำและ บินไม่ได้ และหลังจากใช้แล้วควรเช็ดถูพื้นที่เปียกเพื่อป้องกันการลื่น

การใช้ตัวห้ำต่าง ๆ กินลูกน้ำยุงลาย เช่น การใช้ปลาหางนกยูง ใส่ลงในตุ่มน้ำใช้ ส่วนภาครัฐสามารถดำเนินการสนับสนุนการควบคุมยุงลายโดยการให้สุขศึกษา และความรู้กับประชาชนเกี่ยวกับยุงลายและไข้เลือดออก ให้การสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการควบคุมยุงลาย ดำเนินการโฆษณาประชาสัมพันธ์ผ่านทางสื่อต่าง ๆ เช่น โปสเตอร์ แผ่นพับ ใบปลิว วีดีโอ วิทยุกระจายเสียง ให้การสนับสนุนสารกำจัดลูกน้ำตามความเหมาะสม เช่น ทรายอะเบท โดยใส่ในอัตราส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ซึ่งจะสามารถควบคุมลูกน้ำยุงลายได้นานประมาณ 3 เดือน หรือใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ที่ อัตราส่วน 1 เม็ด (1 กรัม) ความแรง 500 ITU/mg ต่อน้ำ 200 ลิตร สามารถควบคุมลูกน้ำได้นาน 2 อาทิตย์ ถึง 1 เดือน โดยขึ้นอยู่กับสภาพการใช้น้ำ เพื่อเป็นการป้องกัน หรือยับยั้งการระบาดของไข้เลือดออก หรือ เมื่อต้องการลดปริมาณความชุกชุมของยุงลายโดยฉับพลัน ภาครัฐสามารถสนับสนุนการพ่นสารเคมีกำจัดยุงลายในชุมชนซึ่งโดยทั่วไปการพ่นเคมีจะมีการใช้งานอยู่ 2 แบบ แบบแรกคือ การพ่นหมอกควัน เป็นการพ่นฆ่ายุงโดยใช้สารฆ่าแมลงเจือจาง เช่น malathion 5 %, fenitrothion 2 % ซึ่งจะมีทั้งแบบติดตั้ง บนรถยนต์และชนิดมือหิ้วส่วนแบบที่สองคือ การพ่นละอองฝอยละเอียด เป็นการพ่นโดยใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูง การพ่นแบบนี้มีข้อดีกว่าการพ่นแบบหมอกควันหลายประการ คือ ใช้สารเคมีน้อยเนื่องจากความเข้มข้นสูง เวลาพ่นไม่มีหมอกควันเป็นการลดมลพิษทางอากาศ และการใช้สารเคมีความเข้มข้นสูง ทำให้มีฤทธิ์ตกค้างในการฆ่ายุงหลังการพ่นอีกหลายวัน เมื่อประชาชนได้ตระหนักถึงอันตรายของไข้เลือดออกที่จะเกิดขึ้นกับบุตรหลาน โดยคอยหมั่นตรวจตรากำจัดลูกน้ำในบ้านอย่างต่อเนื่อง ให้ความร่วมมือกับรัฐ ใช้วิธีควบคุม

ดังที่กล่าวมาแล้วตามความเหมาะสมก็จะสามารถลดจำนวนผู้ป่วยด้วยไข้เลือดออกลงได้ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2543)

สารเคมีสำคัญที่พบในพืช

อุษาวดี และคณะ (2546) ได้สรุปกลุ่มของสารเคมีที่พบในส่วนต่างๆ ของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรที่จะนำมาใช้ควบคุมแมลง ออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้ คือ

1. คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ซึ่งได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ พวกที่เป็นน้ำตาล และพวกที่ไม่เป็นน้ำตาล พวกที่เป็นน้ำตาลแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ น้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosacharides) และน้ำตาลเชิงซ้อน (oligosacharides) ส่วนพวกที่ไม่ใช่น้ำตาลจะไม่มีรสหวาน และไม่ละลายน้ำ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ polysacharides ได้แก่แป้งต่างๆ เช่น แป้งข้าวโพด แป้งข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง แป้งสาคู และ polyuronides เช่น กัม

2. โปรตีน (proteins) เกิดจากกรดอะมิโนมาจับกันเป็นโมเลกุลใหญ่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน คือ 1) simple proteins เมื่อถูกย่อยจะให้กรดอะมิโน 2) conjugated proteins ประกอบด้วยโปรตีนที่จับอยู่กับส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน และ 3) derived proteins เป็นสารที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีน

3. ไขมัน (lipids) เป็นเอสเตอร์ที่กรดไขมันโมเลกุลยาวจับกับแอลกอฮอล์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) ไขมันและน้ำมันไม่ระเหย ส่วนใหญ่ได้มาจากเมล็ด มักนำมาใช้เป็นอาหาร และใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม และ 2) ไข เป็นสารที่ใช้เตรียมยาขี้ผึ้ง ครีม

4. น้ำมันหอมระเหย (volatile oils) เป็นของเหลวที่มีกลิ่นเฉพาะตัว ส่วนมากจะมีกลิ่นหอมระเหยได้ที่อุณหภูมิห้อง น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารเคมีที่สำคัญประเภท monoterpenes, sesquiterpenes และ oxygenated derivatives

5. ยางไม้ เป็นของเหนียวที่ได้จากพืช เกิดขึ้นเมื่อกรีดหรือทำให้พืชเป็นแผล

6. เรซิน (resins) และบาลซั่ม (balsams) เรซินเป็นสารประกอบที่มีรูปร่างไม่แน่นอน มักเปราะและแตกง่าย บางชนิดอาจจะนิ่ม เมื่อเผาไฟจะหลอมเหลวได้สารที่ใส ข้น และเหนียว เรซินเกิดจากสารเคมีหลายชนิด เช่น resin acid, rasin alcohol, resene และ ester ส่วนบาลซั่ม เป็น resinous mixture ซึ่งประกอบด้วยกรดซินนามิก (cinamic acid) หรือ กรดเบนโซอิก (benzoic acid) หรือเอสเทอร์ของกรดทั้ง 2 ชนิดนี้

7. แอลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารที่มีรสขม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีคุณสมบัติเป็นด่าง และมักมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

8. กลัยโคไซด์ (glycosides) เป็นสารประกอบที่มี 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone) และส่วนที่ไม่เป็นน้ำตาล (aglycone)

9. แทนนิน (tannins) เป็นสารประกอบพวกโพลี่ฟีนอล มีรสฝาด เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนในหนังสัตว์ ทำให้หนังสัตว์ไม่เปื่อย

10. ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบพวกโพลี่ฟีนอล มักมีสี เช่น สีแดง ม่วง เหลือง หรือน้ำเงิน มักจะพบในรูปกลัยโคไซด์

11. สเตียรอยด์ (steroids) เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมน และยาต้านการอักเสบ

12. ซาโปนิน (saponins) เป็นสารประกอบพวกกลัยโคไซด์ที่มีส่วน aglycone (sapogenin) เป็นสารจำพวกสเตียรอยด์ หรือ ไตรเทอร์ปีนอยด์ ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล น้ำตาลที่พบส่วนใหญ่จะเป็น oligosacharide 1-5 หน่วย ซาโปนินมีคุณสมบัติบางประการคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี

13. แอนทราควิโนน (anthraquinones) เป็นสารประกอบจำพวกควิโนนที่พบมากที่สุด และมีความสำคัญที่สุด พบทั้งในรูปอิสระ และในรูปกลัยโคไซด์ เป็นสารที่มีสีแดงส้ม

สารออกฤทธิ์ควบคุมแมลงที่สำคัญที่พบในพืช

อุยาวดี และคณะ (2546) รายงานว่า ปัจจุบันพบพืชมากกว่า 2,000 ชนิดทั่วโลก ที่มีสารออกฤทธิ์ควบคุมแมลงในรูปแบบต่างๆ เช่น ไล่แมลง (repellents) ดึงดูดแมลง (attractants) ฆ่าตัวเต็มวัย (adulticides) ฆ่าตัวอ่อน (larvicides) ป้องกันการวางไข่ (anti-oviposition) ยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition) เป็นต้น สารออกฤทธิ์ดังกล่าวที่ได้จากพืชที่สำคัญได้แก่

1. อะซาดิแรคติน (azadirachtin) มีฤทธิ์ฆ่าตัวอ่อนแมลง ยับยั้งการกิน ยับยั้งการเจริญเติบโต ยับยั้งการวางไข่ พบสารดังกล่าวในสะเดาอินเดีย สะเดาไทย และสะเดาช้าง

2. นิโคติน (nicotine) เป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่พบในใบยาสูบ ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงทั้งแบบสัมผัสตาย (contact poison) และแบบกินตาย (stomach poison) ควรระมัดระวังในการใช้เนื่องจากระคายเคืองผิวหนัง

3. โรติโนน (rotenone) เป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่พบในพืชหลายชนิด เช่น หางไหลแดง หนอนตายอยาก คราม ป่า ด่านราชสีห์ ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงทั้งแบบสัมผัสตายและแบบกินตาย สลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนแสงแดด เนื่องจากมีพิษสูงต่อปลา การใช้สารชนิดนี้ต้องระวังไม่ให้ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ

4. ปิปเปอรีน (piperine) เป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่พบในพริกไทย สามารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง และไล่แมลง

5. ไพรีทรินส์ (pyrethrins) พบในดอกไพรีทรัม ปัจจุบันใช้สารไพรีทรินส์ผสมในผลิตภัณฑ์ฆ่าแมลงแบบกระป๋องอัดแรงดัน ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้รวดเร็ว มีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ

6. ซาโปนิน (saponins) ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงและไล่แมลง พบในพืชหลายชนิด เช่น ปอกระเจา สลอด และขมิ้นชัน

7. ไซยาโนเจนิค กลัยโคไซด์ (cyanogenic glycosides) ออกฤทธิ์ยับยั้งการกิน ยับยั้งการเจริญเติบโต พบในพืชหลายชนิด เช่น มันสำปะหลัง ชมพูพวง ผกากรอง ผักเสี้ยน

8. แทนนิน (tannins) ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแบบสัมผัสตาย และยับยั้งการกินอาหาร พบในว่านน้ำ และน้อยหน่า

9. ยางขาว (latex) ออกฤทธิ์ฆ่ายุงทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย พบในมะละกอ

10. น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) พบในพืชที่มีเหง้า ใบ หรือผลที่มีกลิ่นหอม เช่น ขมิ้นชัน ข่า ขิง ตะไคร้หอม ไพล พริกไทย แมงลัก ยูคาลิป โหระพา น้ำมันหอมระเหยของพืชแต่ละชนิดจะมีสารหลายชนิดรวมกันอยู่ ซึ่งแต่ละชนิดจะออกฤทธิ์ควบคุมแมลงแตกต่างกันออกไป เช่น ฆ่าแมลง ดึงดูดแมลง หรือไล่แมลง อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยมีข้อจำกัด คือ สามารถระเหยได้เร็วที่อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จึงทำให้มีความคงทนต่ำ ดังนั้นต้องนำมาปรับปรุงผลิตภัณฑ์ให้มีการออกฤทธิ์ควบคุมแมลงได้นานขึ้น

การสกัดสารออกฤทธิ์ในพืช

อุยาวดี และคณะ (2546) กล่าวว่า การสกัด (extraction) เป็นการดึง หรือชะส่วนที่ละลายออกจากส่วนที่ไม่ละลาย (ส่วนที่เหลือ) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ โดยใช้ตัวสกัดที่เหมาะสม ความสามารถของการสกัดขึ้นอยู่กับอัตราการซึมผ่าน (rate of diffusion) ของส่วนที่ละลายผ่านชั้นสัมผัสของของเหลวที่ใช้สกัด (solvent) กับสารที่นำมาสกัด การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่

1. การแช่ยุ่ย (maceration) เป็นกระบวนการสกัดสารจากพืชโดยการนำพืชมาแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสมในภาชนะปิด แช่ไว้ในระยะเวลาที่กำหนด และในระหว่างแช่ให้คนตัวอย่างสกัดด้วย เมื่อครบกำหนดที่ต้องการ ให้รินสารสกัดออก แล้วบีบสารละลายออกจากกาก รวมสารสกัดที่ได้ไปกรอง ทำซ้ำจนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก

2. การแช่ (infusion) เป็นกระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์โดยหมักแช่พืชในน้ำร้อนเป็นเวลาตั้งแต่ 5 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ไม่มีการบีบกาก อุณหภูมิที่ใช้ และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของพืช และชนิดหรือประเภทของสารออกฤทธิ์ที่ต้องการสกัด

3. การชง (percolation) เป็นกระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์โดยใช้ Percolator โดยแช่พืชกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วค่อยๆ บรรจุลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้สูงกว่าตัวอย่างพืชที่สกัด 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วค่อยๆ รินสารสกัดออก

4. การต้ม (decoction) เป็นกระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์โดยการต้มพืชในน้ำเดือดนาน 30 นาที คนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลา จึงนำมากรอง บีบกากเบาๆ

5. การสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่อง Soxhlet (Soxhlet extraction) เป็นกระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำโดยใช้ความร้อนให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุพืชที่ต้องการสกัดไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extraction chamber สูงถึงระดับที่จะไหลลงมา (siphon) สารสกัดจะไหลลงไปใน flask การให้ความร้อนอาจใช้ heating mantle หรือ water bath ตัวทำละลายจะระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ใน flask วนเวียนจนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์

6. การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) เป็นกระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์โดยการปั่นเหวี่ยงทำให้ส่วนที่เป็นของแข็ง (solid) แยกออกจากของเหลว (liquid) จะได้สารสกัดที่ใสโดยไม่ต้องกรอง

7. การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) อาจทำได้หลายวิธี ได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent extraction) เป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เบนซีน หรือ ปิโตรเลียมอีเทอร์

8. การสกัดโดยการบีบ (mechanical extraction) เป็นการสกัดโดยวิธีบีบ เหมาะสำหรับน้ำมันระเหยบางชนิดซึ่งจะสลายตัวเมื่อถูกความร้อน เช่น นำผลส้มไปบีบจะได้ทั้งส่วนของน้ำและน้ำมัน (water-oil emulsion) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำมันออกมา

9.การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ใชสกัดพืชสด โดยผ่านไอน้ำไปบนพืชซึ่งบรรจุไว้ภายใน flask พร้อมกับน้ำ ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยัง condenser แล้วกลั่นตัว หลังจากนั้นทิ้งไว้ น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำ

10.การสกัดโดยการต้ม (water distillation) เป็นการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่แห้งแล้ว และสารออกฤทธิ์จะไม่สลายเมื่อถูกความร้อน โดยนำตัวอย่างพืชที่แห้งแล้วไปต้มกับน้ำ เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยลอยขึ้นไปถึง condenser จะกลั่นตัว แล้วจึงนำไปแยกชั้นออกจากน้ำ

11.การสกัดโดยวิธี thermomicrodistillation เป็นการสกัดโดยใช้เครื่อง thermomicro analysis and separation ovens (TAS oven) เป็นการสกัดสารซึ่งมีปริมาณน้อยมาก โดยนำสารใส่ลงใน cartridge ซึ่งข้างหนึ่งปิด (seal) อีกข้างหนึ่งเป็น capillary เมื่อใส่เข้าไปใน oven ความร้อนจะทำให้สารกลายเป็นไอออกมากทาง capillary รองรับสารด้วยแผ่น TLC แล้วจึงนำไปตรวจสอบ

การใช้สารสกัดจากพืชควบคุมยุง

มีรายงานการใช้น้ำมันในธรรมชาติเป็นสารเคมีฆ่าลูกน้ำยุงเก่าแก่ที่สุด สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้หลายชนิด โดยทำให้ลูกน้ำยุงไม่สามารถหายใจได้เนื่องจากไม่สามารถแทงทะลุผ่านฟิมล์น้ำมันที่เคลือบอยู่บนผิวน้ำได้ (สุชาติ และคณะ, 2526) สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ทุกระยะ รวมทั้งดักแด้ และตัวเต็มวัยที่เพิ่งออกจากดักแด้ นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการวางไข่ของยุงได้อีกด้วย อภิวัฏ และคณะ (2540) ได้อธิบายถึงผลของน้ำมันที่เคลือบผิวน้ำมีผลต่อการตายของดักแด้มากกว่าลูกน้ำ เนื่องจากดักแด้จำเป็นต้องรับออกซิเจนจากอากาศเหนือผิวน้ำโดยผ่านท่อหายใจที่เรียกว่า trumpet

เพียงทางเดียวเท่านั้น จึงมีโอกาสสัมผัสกับน้ำมันซึ่งเคลือบอยู่บริเวณผิวน้ำได้มาก ในขณะที่ลูกน้ำนอกจากจะหายใจรับออกซิเจนจากอากาศผ่านทางท่อหายใจที่เรียกว่า siphon แล้วยังสามารถหายใจเอาออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำ (dissolved oxygen) ผ่านทางอวัยวะหายใจข้างลำตัว (posterior spiracle) ได้อีกด้วย Awad and Shimaila (2003) รายงานว่า สารเคมีที่มีผลการฆ่าลูกน้ำยุงก้นปล่องคือ น้ำมันเชื้อเพลิงและน้ำมันก๊าด ในทำนองเดียวกัน ยุวดี (2547) ได้ทดสอบผลของน้ำมันชนิดต่างๆ ต่อลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 4 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันก๊าดสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ 100 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนน้ำมันเครื่องใหม่และน้ำมันเครื่องเก่าฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญได้ 78 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันพืชฆ่าลูกน้ำยุงได้ต่ำเพียง 18 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาการใช้น้ำมันและสารสกัดหยาบจากพืชชนิดต่างๆ ในการควบคุมลูกน้ำยุง ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีสังเคราะห์ได้ Silva และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของน้ำมันจากต้นพืช *Copaifera reticulata* ต่อยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* โดยใช้น้ำมันจากพืชดังกล่าวละลายในตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) อัตรา 0.4 มิลลิลิตร/น้ำ 24.6 มิลลิลิตรพบว่า สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงชนิดนี้ได้ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่า LC_{50} ของน้ำมันดังกล่าวในลูกน้ำยุงระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 0.4, 0.9, 39.0 และ 80.0 ppm. ตามลำดับ และค่า LC_{99} มีค่าเท่ากับ 15.0, 15.0, 50.0 และ 180.0 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้ Tripathi และคณะ (2004) รายงานว่า สาร piperitenone oxide ที่สกัดได้จากน้ำมันพืช *Mentha spicata* L. variety *viridis* สามารถฆ่าลูกน้ำยุงก้นปล่อง *Anopheles stephensi* (Liston) ได้ โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 61.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในลูกน้ำยุงระยะที่ 4 และสารดังกล่าวมีพิษฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีกว่าน้ำมันสกัดหยาบ (crude oil) ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 82.9 ไมโครกรัม/มิลลิลตร และพบว่า ทั้งสาร piperitenone oxide และน้ำมันสกัดหยาบ มีผลยับยั้งการวางไข่ของยุงชนิดดังกล่าว โดยน้ำมันสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 60.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทำให้ยุงตัวเมียวางไข่น้อยกว่าชุดควบคุม 42 เท่า ในขณะที่สาร piperitenone oxide สามารถยับยั้งการวางไข่ได้สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร piperitenone oxide ที่ความเข้มข้น 75.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการฟักออกจากไข่ได้สมบูรณ์ Albuquerque และคณะ (2004) ได้ทดสอบน้ำมันที่สกัดจากรากของสาบเสือ (*Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker) พบว่า มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่ายุงลายบ้านได้ พืชชนิดอื่นๆ ที่มีการศึกษาผลการออกฤทธิ์ในการควบคุมลูกน้ำแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของพืชต่างๆ ที่มีการศึกษาการออกฤทธิ์ในการควบคุมลูกน้ำยุง

ชนิดของพืช	ส่วนของพืชที่ใช้	ชนิดของยุงที่ศึกษา	เอกสารอ้างอิง
Annona squamosa	ทุกส่วนของพืช	*An. stephensi*	Saxena *et al*. (1993)
Polyalthia longifolia	ใบ	*Cx. quinquefasciatus*	Murty *et al*. (1997)
Ageratum conyzoides	ทุกส่วนของพืช	*An. stephensi*	Saxena *et al.* (1992)
Tagetes minuta	ทุกส่วนของพืช	*Ae. aegypti*	Perich *et al.* (1994)
Mentha piperita	สารสกัดน้ำมัน	*Cx. quinquefasciatus*	Ansari *et al*. (1999)
Ocimum sanctum	สารสกัดน้ำมัน	*Cx. quinquefasciatus*	Pathak *et al.* (2000)
		Ae. aegypti	
		An. stephensi	
Dalbergia sisoo Roxb.	สารสกัดน้ำมัน	*Cx. quinquefasciatus*	Ansari *et al*.(2000)
Citrus spp.	น้ำมันจากเปลือกผล	*Cx. quinquefasciatus*	Ezeonu *et al*. (2001)
Solanum nigrum Linn.	สารสกัดหยาบจากใบ	*An. culicifacies*	Singh *et al.* (2002)
		Cx. quinquefasciatus	
		Ae. aegypti	

ส่วนการศึกษาสารสกัดจากสะเดาชนิดต่างๆ ในการควบคุมลูกน้ำยุงพบว่า มีผลในการควบคุมลูกน้ำยุงได้ Su and Mulla (1999) ได้ทดสอบสารอะซาดิแรคติน (azadirachtin) ที่สกัดได้จากสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica* A. Juss) โดยใช้สารอะซาดิแรคติน 2 ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน คือ แบบผงเปียกน้ำ Azad® WP10 (WP) และแบบน้ำมันเข้มข้น Azad® EC 4.5 (EC) ต่อการวางไข่ของยุงรำคาญ 2 ชนิด คือ *Culex tarsalis* Coquillett และ *Cx. quinquefasciatus* Say พบว่า สาร Azad® EC 4.5 (EC) ทำให้ยุง *Cx. tarsalis* วางไข่ลดลง ส่วนสาร Azad® WP10 (WP) ทำให้ยุงทั้ง 2 ชนิดดังกล่าววางไข่ลดลง โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารอะซาดิแรคตินที่ยับยั้งการวางไข่ของยุงรำคาญ *Cx. tarsalis* เท่ากับ 5.0 ppm ในขณะที่ค่าดังกล่าวเท่ากับ 10.0 ppm ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* โดยสามารถยับยั้งการวางไข่ได้นาน 1-4 วัน Awad and Shimaila (2003) รายงานว่า ลูกน้ำยุงหลายชนิดรวมทั้งยุงลาย (*Aedes* spp.) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) อ่อนแอต่อสารสกัดจากสะเดาและพบว่า น้ำมันสะเดาสามารถควบคุมลูกน้ำยุง *Anopheles* spp. ได้นาน 2 สัปดาห์ และในประเทศที่กำลังพัฒนาหลายประเทศใช้สารสกัดจากสะเดาใส่ในบ่อหรือสระน้ำ (Prakash and Rao, 1996)

นอกจากสารสกัดจากสะเดาอินเดียออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงแล้ว ยังออกฤทธิ์ในลักษณะอื่นทั้งในระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัย เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโต ขับไล่ และยับยั้งการวางไข่ เป็นต้น มีรายงานการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสะเดาที่มีต่อยุงชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การออกฤทธิ์แบบต่างๆ ของสารสะเดาอินเดียต่อยุงชนิดต่างๆ

ผลิตภัณฑ์	ชนิดของยุงที่ศึกษา	ลักษณะการออกฤทธิ์	เอกสารอ้างอิง
Neem oil	*Cx. quinquefasciatus*	ฆ่าลูกน้ำ	Ansari *et al*. (2000)
Oil water emulsion	*An. stephensi*	ควบคุมการเจริญเติบโต	Batra *et al*. (1998)
On wood scrappings	*Ae. aegypti*	ยับยั้งการเข้าดักแด้	Nagpal *et al.* (1995)
Neem oil volatiles	*An. culicifacies*	ยับยั้งการวางไข่	Dhar *et al*. (1996)
	An. stephensi		
Deoiled neem cake	*Culex* spp.	ฆ่าลูกน้ำ	Rao *et al*. (1992)
powder	*Anopheles* spp.	ควบคุมการเจริญเติบโต	
2% neem oil mixed	*An. culicifacies*	ขับไล่	Sharma *et al*. (1993a)
with coconut/mustard	*An. fluviatilis*		Kant and Bhatt (1994)
oil as topical	*An. annularis*		Mishra *et al*. (1995)
application	*An. stephensi*		Sharma *et al*. (1995)
	Ae. aegypti		Sharma *et al*. (1996)
	Cx. quinquefasciatus		Moore *et al.* (2002)
	An. darlingi		
5% neem oil in a	*Ae. aegypti*	ขับไล่	Dua *et al*. (1995)
cream base-topical	*Ae. albopictus*		Singh *et al*. (1996)
application	*Anopheles* spp.		Nagpal *et al*. (2001)
	Culex spp.		
5-10% neem oil-	*An. culicifacies*	ขับไล่	Sharma *et al*. (1993b)
impregnated on mats	*An. annularis*		
(vapours)	*An. stephensi*		
	Culex spp.		
1% neem oil in	*An. culicifacies*	ขับไล่	Sharma and Ansari
kerosene (smoke)	*An. annularis*		(1994)
	Culex spp.		Ansari and Razdan
			(1996)

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียที่สกัดจากเอทานอล มีปริมาณสารอะซาดิแรคติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมันจากเมล็ดสะเดาอินเดียที่สกัดจากนอร์มอล เฮกเซน ต่อยุงลายบ้านและยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) พบว่า ทั้งสารสกัดและน้ำมันสะเดาอินเดียสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญได้ โดยสารสกัดสะเดา และน้ำมันสะเดาอินเดียที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้ลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีผลออกฤทธิ์ควบคุมในสภาพห้องปฏิบัติการได้นาน 6 วัน (มานิต, 2543)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

นำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธี คือวิธีการแช่ยุ่ย และวิธี Soxhlet ไปหาองค์ประกอบทางเคมี โดยวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆ และได้แยกน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยออกเป็นส่วนแยกย่อย ด้วย silica gel column chromatography โดยชะ column ด้วย *n*-hexane, chloroform และ ethyl acetate จำนวนอย่างละ 2,000 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทำการแยกย่อยจำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ใช้น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างจำนวน 15.18 กรัม และ 15.01 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงระเหยตัวทำละลายออก ภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง vacuum evaporator นำส่วนที่ได้จากการระเหยที่ชะด้วย n-hexane, chloroform และ ethyl acetate จากการแยกครั้งที่ 1 และ 2 รวมกัน จากนั้นนำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและส่วนแยกย่อยด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไปหาสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography – Flame Ionization Detector (FID) (Gas Chromatography, 6850A, Hewlett Packard, USA)โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ของเครื่องดังนี้

Helium flow 1.0 ml/min @ split rate 50 : 1	Detector temp: 300°C
Inlet temp: 290°C	Hydrogen flow: 30 ml/min
Initial temperature 210°C, hold for 12 minutes	Air flow: 300 ml/min
Ramp to 250°C at 20°C/min, hold for 8 minutes	Makeup flow: 25 ml/min

Column: Select Biodiesel for FAME length 30 m., 0.32 mm I.D, film thickness 0.25 um

นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณสารอะซาดิแรคตินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยส่วนแยกย่อยของ chloroform และ ethyl acetate ด้วยเครื่อง HPLC ดังรายละเอียดในการวิเคราะห์หัวข้อ 4

2. การศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อการควบคุมยุงลาย

ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง 2 วิธี คือ วิธีการแช่ยุ่ย และวิธี Soxhlet หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบผลต่อการฆ่าลูกน้ำ การฟักไข่ การไล่ยุง และการยับยั้งการเจริญเติบโตของลูกน้ำโดยมีรายละเอียดการทดสอบในหัวข้อ 7 ส่วน รายละเอียดในการสกัดทั้ง 2 วิธีมีดังนี้

2.1 การเตรียมเมล็ดสะเดาช้างเพื่อนำไปสกัดสาร

นำผลสุกของสะเดาช้างมาแยกเอาเนื้อผลออกให้เหลือเฉพาะเมล็ด นำไปตากแดด 2- 3 วัน เพื่อลดความชื้นและทำให้เมล็ดแห้ง หลังจากนั้นกะเทาะเปลือกออก แล้วนำเนื้อในเมล็ดไปชั่งน้ำหนักก่อนนำไปปั่นหยาบด้วยเครื่องปั่นผลไม้ และชั่งน้ำหนักอีกครั้งหลังจากผ่านการปั่นหยาบเรียบร้อยแล้ว

2.2 การสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ย

นำเนื้อในเมล็ดที่ปั่นหยาบแล้วใส่ในขวดแก้วขนาด 20 ลิตร เติมตัวทำละลาย *n*-hexane ลงไปจนท่วมตัวอย่าง ปิดปากขวดให้สนิทด้วยจุกยางที่หุ้มกระดาษตะกั่ว (foil) ทิ้งไว้ 7 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองแบบหยาบ และระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) นำสารที่ได้ไปใส่ในจานขนาดเล็ก (evaporator dish) ก่อนนำไประเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใน water bath อีกครั้งเพื่อแยกตัวทำละลายที่อาจหลงเหลืออยู่ออกให้หมด ส่วนตัวทำละลายที่แยกออกมาได้นำกลับไปแช่กากเนื้อในเมล็ดสะเดาช้างอีกครั้งเพื่อสกัดน้ำมันที่ยังเหลืออยู่ ทำซ้ำแบบนี้ 7 ครั้ง

2.3 การสกัดด้วยวิธี Soxhlet

นำเนื้อในเมล็ดที่ปั่นหยาบแล้วไปสกัดในตัวทำละลาย *n*-hexane โดยวิธี Soxhlet ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง กรอง และระเหยให้แห้งด้วย vacuum evaporator นำสารที่ได้ไปใส่ในจานขนาดเล็ก (evaporator dish) ก่อนนำไประเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใน water bath อีกครั้งเพื่อแยกตัวทำละลายที่อาจหลงเหลืออยู่ออกให้หมด

3. การศึกษาการเสริมฤทธิ์และการเพิ่มฤทธิ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างต่อการควบคุมยุงลาย

นำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธีดังกล่าวข้างต้นไปผสมกับสารเสริมฤทธิ์และผสมกับสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ เพื่อดูผลการเสริมฤทธิ์และการเพิ่มฤทธิ์ หลังจากนั้นนำสารผสมที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ควบคุมยุงลายแบบต่างๆ การผสมสารเสริมฤทธิ์และสารเพิ่มฤทธิ์มีรายละเอียดดังนี้

3.1 การศึกษาการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect)

นำสารเสริมฤทธิ์ที่นิยมใช้ได้แก่สาร piperonyl butoxide (PBO) มาผสมกับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างในอัตราส่วนต่างๆ ระหว่างสาร PBO:น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง ได้แก่ 10:1 15:1 20:1 และ 25:1 หาค่า LC_{50} ที่ทำให้ลูกน้ำตายที่ 24 ชั่วโมงของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง และสารผสมดังกล่าว แล้วไปคำนวณค่า synergistic ratio (SR) จากสูตร SR=ค่า LC_{50}ของสารผสม/ค่า LC_{50}ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง ของสารผสมสูตรต่างๆ

3.2 การศึกษาการเพิ่มฤทธิ์ (additive effect)

นำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้งแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet มาผสมกับสารสกัดจากพืชชนิดอื่นที่มีจำหน่ายในท้องตลาดได้แก่น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัส ในอัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง:น้ำมันตะไคร้หอม หรือน้ำมันยูคาลิปตัส เท่ากับ 8:2 8.5:1.5 9:1 และ 9.5:0.5 นำไปทดสอบผลต่อการฟักไข่ของลูกน้ำยุงลายบ้าน ดังรายละเอียดของการทดสอบในหัวข้อ 13.7 คำนวณค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ยับยั้งการฟักไข่ได้ 50 และ 95% (effecive concentration, EC_{50} หลังจากทดสอบเป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำค่า EC_{50} ไปคำนวณค่า additive ratio (AR) ของสารผสมต่างๆ จากสูตร AR = ค่า EC_{50} ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง/ค่า EC_{50}ของสารผสม

4. การศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างโดยวิธีสภาวะเร่ง

การวิเคราะห์นี้ดัดแปลงจากวิธีของ Yakkundi และคณะ (1995), รติยา และคณะ (2546), Jadeja และคณะ (2011), วริษฎา และคณะ (2551) และจิรดา และนุชนาฏ (2556) โดยวิธีการวิเคราะห์มีรายละเอียดดังนี้

1. นำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบต่างๆ คือ น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป (น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยผสมกับสารอิมัลซิฟายเออร์ (Tween®และ Span®) และสารต้านออกซิเดชั่น BHT) ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอะซาดิแรคตินโดยวิธีสภาวะเร่ง โดยเก็บน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวในขวดแก้วเล็ก (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ18 ขวด รวมตัวอย่างน้ำมันทั้งหมด 54 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างน้ำมันที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ตัวอย่างละ 3 ขวด มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสารอะซาดิแรคตินโดยใช้เครื่อง HPLC โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดังนี้คือ

- Column: C_{18} (4.6 mm × 150 mm, Symmetry ™ 5 μm, Thermo scientific)
- เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase; โดยใช้ methanol : water) 70 : 30
- อัตราการไหล (flow rate) 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที
- ตัวรับรังสียูวี (UV detector) ที่ความยาวคลื่น 227 นาโนเมตร
- injection volume 100 ไมโครลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซาดิแรคติน (CHEM SERVICE, Inc.PO BOX 599, WEST CHESTER) ซึ่งเป็นของแข็งสีขาวทึบ จุดหลอมเหลว 155-158 องศาเซลเซียส มวลโมเลกุลเท่ากับ 720.7 และสูตรโครงสร้างเป็น $C_{35}H_{44}O_{16}$ ทำเป็น azadirachtin stock โดยชั่งสารมาตรฐานอะซาดิแรคติน 1,000 ไมโครกรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วยไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) 1,000 ไมโครลิตร เป็นความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารมาในปริมาตร 100, 200, 300 และ 400 ไมโครลิตร เติมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ให้ครบ 1,000 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้นที่ 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

3. สร้างกราฟมาตรฐานโดยพลอตระหว่างความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานอะซาดิแรคติน (แกน X) และ peak area (แกน Y) สร้างสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (ดังสมการที่ 1)

$$\mathbf{y = ax+b} \qquad (1)$$

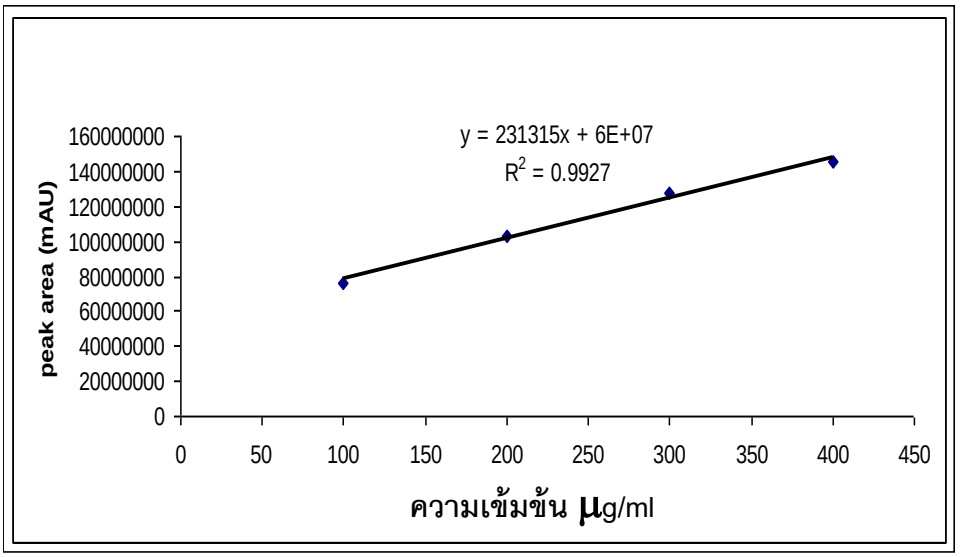
เมื่อ x = ความเข้มข้นของสารอะซาดิแรคตินในสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

y = peak area ของสารละลายตัวอย่าง

a = slope ของเส้นกราฟสารละลายมาตรฐาน และ

b = y-intercept ของเส้นกราฟสารละลายมาตรฐาน

4. เตรียมตัวอย่างเพื่อคำนวณหาสารอะซาดิแรคติน โดยสุ่มตัวอย่างน้ำมันมาตัวอย่างละ 3 ขวด ปิเปตในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายด้วยไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ 950 ไมโครลิตร เป็นความเข้มข้น 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และดูดสารจากตัวอย่างข้างต้น 50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย mobile phase ให้ครบ 1,000 ไมโครลิตร เป็นความเข้มข้น 2.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร แล้วกรองผ่านตัวกรองไซรินจ์ (syringe filter) วิเคราะห์หาปริมาณสารอะซาดิแรคติน ด้วยครื่อง HPLC ตามสภาวะข้างต้น คำนวณหาปริมาณสารอะซาดิแรคติน โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 1) และเทียบปริมาณสารอะซาดิแรคตินเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐานของสารอะซาดิแรคติน

5. ประเมินอายุการเก็บรักษาโดยใช้เกณฑ์การลดลงของสารสำคัญในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง โดยนำค่าอะซาดิแรคตินที่ได้มาทำนายอายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างโดยคำนวณจากปฏิกิริยาจลนพลศาสตร์ (kinetic reaction) ร่วมกับการใช้สมการของอาร์รีเนียส (arrhenius equation) ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียสและทำนายอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2548)

6. ประเมินอายุการเก็บรักษาโดยใช้เกณฑ์การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivity) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างโดยนำค่าความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านโดยคำนวณจากปฏิกิริยาจลนพลศาสตร์ (kinetic reaction) ร่วมกับการใช้สมการของอาร์รีเนียส (arrhenius equation) ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียสและทำนายอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อสมบัติทางกายภาพ ปริมาณกรดไขมัน ค่าเพอร์ออกไซด์ และการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

5.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ

ศึกษาการเปลี่ยนสีของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส

5.2 การวิเคราะห์หาค่ากรดไขมัน

วิเคราะห์หาค่ากรดไขมันก่อนและหลังการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น โดยมีรายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย 2 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ให้เป็นกลางโดยการเติมฟีนอฟทาลีน 5 หยดและปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล หยดด่างทีละหยด พร้อมทั้งเขย่า จนได้สารละลายแอลกอฮอล์เป็นสีชมพูอ่อนถาวร

3. เติมเอธิลแอลกอฮอล์ที่เป็นกลาง 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในแอลกอฮอล์

4. หยดสารละลายฟีนอฟทาลีนประมาณ 5 หยด

5. ไตเตรทกับสารละลายตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ขณะไตเตรทต้องเขย่า จนกระทั่งได้สารละลายสีชมพูคงที่อยู่ประมาณ 1 นาที

6. คำนวณค่ากรดจากสูตร

$$\text{ค่ากรด} = \frac{\text{ปริมาตรด่างที่ใช้ (มล.)} \times \text{ความเข้มข้นด่าง (มล.)} \times 56.1 \text{ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

5.3 การวิเคราะห์หาค่าเพอร์ออกไซด์

วิเคราะห์หาค่าเพอร์ออกไซด์ก่อนและหลังการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น โดยมีรายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย 2 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายแอซิติก-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร) 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย

3. เตรียมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ ปริมาณมากเกินพอในน้ำกลั่นต้มใหม่แล้วเก็บในที่มืด ทดสอบก่อนใช้โดยนำมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอซิติก-คลอโรฟอร์ม ปริมาณ 25-30 มิลลิลิตร แล้วหยดน้ำแป้งลงไป 3 หยด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินให้ทิ้งแล้วเตรียมใหม่

4. เติมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกพร้อมเขย่านาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ในที่มืด

5. เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

6. ไตเตรทหาปริมาณไอโอดีนที่ถูกปล่อยออกมาด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.01 นอร์มอล เขย่าอย่างแรงจนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้งเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร

7. ไตเตรทต่อไปจนสีน้ำเงินหมดไป

8. เตรียมและไตเตรทแบลงก์เช่นเดียวกับตัวอย่าง

9. คำนวณค่าเพอร์ออกไซด์จากสูตร

$$\text{ค่าเพอร์ออกไซด์} = \frac{(a-b) \times N \times 1000}{W}$$

เมื่อ a = ปริมาตร (มล.) ของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

b = ปริมาตร (มล.) ของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทแบลงก์

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

5.4 การทดสอบผลต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน

ทดสอบผลต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบ คือ น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ทรีทเมนต์ประกอบด้วยอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา 25, 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส แต่ละทรีทเมนท์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ การทดสอบผลต่อการตายนั้นใช้ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง 2,000 ppm คือความเข้มข้นที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (อรัญ และคณะ, 2552) ใส่สารทดสอบในถ้วยพลาสติกทดสอบที่มีน้ำ 200 มิลลิลิตร และลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 จำนวน 20 ตัว บันทึกผลการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านโดยสังเกตเมื่อลูกน้ำไม่ขยับตัว และจมสู่ก้นภาชนะที่ใช้ทดสอบ ที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT)

6. การศึกษากลไกการเข้าทำลายและการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายของผลิตภัณฑ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

6.1 การศึกผลต่อการหายใจ (suffocation action)

สืบเนื่องจากเมื่อหยดน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างลงบนผิวน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ของน้ำมันบนผิวน้ำ ซึ่งอาจจะส่งผลทำให้ลูกน้ำไม่สามารถแทงท่อหายใจขึ้นมารับออกซิเจนเหนือผิวน้ำได้ ทำให้ลูกน้ำตายเนื่องจากขาดออกซิเจน ดังนั้นเพื่อทราบว่ากลไกดังกล่าวว่ามีผลต่อการตายของลูกน้ำมากน้อยเพียงใดจึงดำเนินการศึกษารายละเอียดดังนี้

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม น้ำมันปิโตรเลียมที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร (SK 99®) น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) และชุดควบคุม (น้ำประปาที่ระเหยคลอรีนออกแล้ว) แต่ละทรีทเมนต์ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

การทดสอบทำโดยนำหลอดทดลองขนาดกลาง 16×150 มิลลิเมตร ใส่น้ำปริมาตร 25 มิลลิลตร และใส่ลูกน้ำยุงวัยที่ 3 จำนวน 5 ตัว/หลอด หลังจากนั้นจึงหยดน้ำมันที่ใช้ทดสอบต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นจำนวน 5 มิลลิลตร ลงบนผิวน้ำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มของน้ำมันเคลือบผิวน้ำภายในหลอดทดลอง หลังจากทดสอบเป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ จึงตรวจนับจำนวนลูกน้ำที่ตาย นำจำนวนลูกน้ำที่ตายมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี DMRT ส่วนทรีทเมนต์ของเชื้อแบคทีเรียนั้น ใส่ในหลอดทดลองที่มีลูกน้ำ (ให้ลูกน้ำกิน) เพื่อเปรียบเทียบระดับความเสียหายเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วนกลาง

6.2 การศึกษาผลต่อระบบทางเดินอาหาร

นำลูกน้ำที่ตายจากการได้รับน้ำมันชนิดต่างๆ จากการทดลองข้างต้นรวมทั้งลูกน้ำที่ตายจากการทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet มาศึกษาทางเนื้อเยื่อ (histological study) ที่ระบบทางเดินอาหารบริเวณลำไส้ส่วนกลาง ตามวิธีการของปิยากร (2550) รวมทั้งเปรียบเทียบกับยุงที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ *Bti*.

7 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณยุงลายและการทดสอบการออกฤทธิ์แบบต่างๆ

a. *การเลี้ยงเพิ่มปริมาณยุงลาย*

เลี้ยงเพิ่มปริมาณยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการทางกีฏวิทยา ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเก็บลูกน้ำมาจากชุมชนที่มียุงลายชุกชุม ใน จังหวัดสงขลา นำมาเลี้ยงตามขั้นตอนดังนี้

1. นำลูกน้ำยุงลายบ้านที่เก็บมาจากชุมชนดังกล่าวใส่กระบะและใส่น้ำประปาที่ผ่านการระเหยสารคลอรีนออกแล้วในกระบะในปริมาณครึ่งหนึ่งของกระบะให้อาหารเลี้ยงไก่สำเร็จรูปสำหรับลูกน้ำ และเปลี่ยนน้ำในกระบะทุกๆ 2 วัน เพื่อทำให้ลูกน้ำโตเร็วขึ้น จนกระทั่งลูกน้ำกลายเป็นดักแด้ จึงดูดใส่ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30x30x30 เซนติเมตร

2. หลังจากดักแด้ออกมาเป็นตัวเต็มวัย นำสำลีซึ่งพันกับไม้ชุบน้ำหวานไปวางในกรงสำหรับเป็นอาหารของยุงตัวเต็มวัยและเปลี่ยนน้ำหวานทุกๆ 2 วัน หลังจากกลายเป็นยุงตัวเต็มวัยได้ 7 วัน ยุงจะเริ่มผสมพันธุ์ ดังนั้นจึงปล่อยให้ผสมพันธุ์กันเป็นเวลา 2 วัน จึงให้เลือดของหนูตะเภาเป็นอาหารสำหรับยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย เพื่อนำโปรตีนที่อยู่ในเลือดไปสร้างไข่ต่อไป

3. นำถ้วยอาหารแบบพลาสติกมาใช้เป็นภาชนะสำหรับให้ยุงลายบ้านวางไข่ โดยนำกระดาษที่มีสีคล้ายภาชนะเครื่องปั้นดินเผามาชุบน้ำและพันรอบด้านในถ้วย ใส่น้ำให้อยู่ในระดับครึ่งหนึ่งของกระดาษ (ยุงลายบ้านมักวางไข่ในภาชนะดินเผาที่มีน้ำขัง) นำถ้วยดังกล่าวไปวางไว้ในกรงเพื่อให้ยุงมาวางไข่ ปล่อยทิ้งไว้ 2 วัน จึงนำถ้วยออกมา จะพบกลุ่มไข่ที่ยุงลายบ้านวางไว้เป็นวงกลมบริเวณขอบด้านบนของกระดาษเหนือระดับน้ำเล็กน้อย

4. นำกระดาษที่ยุงลายบ้านวางไข่แล้วมาผึ่งให้แห้ง ลงบันทึก วัน เดือน ปี ที่เก็บไข่ไว้บนกระดาษ นำมารวบรวมไว้ในกล่องที่แห้งสนิท ไม่มีความชื้น และปิดฝาอย่างมิดชิด ไข่ที่ได้เป็นไข่รุ่นที่ 1 ซึ่งจะนำไปใช้ในทุกการทดสอบ เนื่องจากลูกน้ำ ดักแด้ และตัวเต็มวัยที่ฟักออกมาจากไข่รุ่นที่ 1 มีสัญฐานวิทยา สรีรวิทยา และพฤติกรรมใกล้เคียงกับรุ่นพ่อและแม่ที่เก็บมาจากสภาพแวดล้อมจริงมากที่สุด เมื่อถึงเวลาทดสอบ นำไข่ไปฟักในกระบะเลี้ยงลูกน้ำ โดย 1 กระบะ จะฟักลูกน้ำประมาณ 200 ตัว เพื่อทำให้ลูกน้ำมีขนาดใหญ่และโตเร็วขึ้น

7.2 การทดสอบการออกฤทธิ์แบบต่างๆ

7.2.1 การทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลาย

ทดสอบผลการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet เปรียบเทียบกับน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัส ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก อุษาวดี และคณะ (2546) โดยใช้ลูกน้ำวัยที่ 3 ทดสอบ โดยการเติมสารทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100, 300, 500, 800, 1,000, 1,500 และ 2,000 ppm ลงในถ้วยทดสอบซึ่งปากถ้วยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร ลึก 6 เซนติเมตร (มีปริมาตร 550 มิลลิลิตร) ซึ่งมีน้ำประปาที่ผ่านการระเหยคลอรีนเรียบร้อยแล้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร และมีลูกน้ำยุงลายบ้านอยู่ในถ้วย จำนวน 20 ตัว/ถ้วย ในแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 5 ถ้วย เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ดำเนินการเช่นเดียวกันกับกลุ่มทดลองแต่ไม่ได้เติมสารทดสอบลงไป) อีก 1 ชุด บันทึกจำนวนลูกน้ำที่ตายหลังการทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกผลดังกล่าวต่อไปหลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการอยู่รอดและพัฒนาเป็นวัยถัดไปจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย ในระหว่างการทดลองให้อาหารไก่สำเร็จรูปเป็นอาหารของลูกน้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณเพื่อหาค่าความเป็นพิษ (LC_{50}) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีโพรบิท (probit analysis) โดยมีเงื่อนไขว่า เปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำในชุดควบคุมจะต้องน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จึงจะใช้อัตราการตายจริงในการคำนวณค่า LC_{50} และถ้าเปอร์เซ็นต์การตายของชุดควบคุมอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์ จะปรับอัตราการตายด้วย Abbott's

formula ก่อนแล้วจึงนำมาคำนวณค่า LC_{50} แต่ถ้าเปอร์เซ็นต์การตายของชุดควบคุมมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จะยกเลิกผลการทดลองแล้วทำการทดสอบใหม่ (อุษาวดี และคณะ, 2546)

7.2.2 การทดสอบผลยับยั้งการเจริญเติบโต

ทดสอบผลยับยั้งการเจริญเติบโตของน้ำยุงลายบ้านวัยที่ 3-4 ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet เปรียบเทียบกับน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัส โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 300 และ 500 ppm (ความเข้มข้นที่ไม่ทำให้ลูกน้ำตายทั้งหมด) โดยวิธีการทดสอบและจำนวนลูกน้ำที่ใช้ทดสอบเหมือนกับการทดสอบผลการฆ่าลูกน้ำดังกล่าวข้างต้น แต่ละความเข้มข้นทำ 5 ซ้ำ นับจำนวนดักแด้และตัวเต็มวัยที่เจริญและพัฒนามาจากลูกน้ำที่ใช้ทดสอบ หลังจากทดสอบเป็นเวลา 5 วันต่อเนื่องกันไปทุกวันจนกระทั่งกลายเป็นตัวเต็มวัยทั้งหมดเป็นเวลา 20 วัน คำณวนเปอร์เซนต์การเข้าดักแด้และพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย และระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาเข้าสู่ระยะดักแด้และตัวเต็มวัยของสารทดสอบดังกล่าวข้างต้น

7.2.3 การทดสอบผลต่อการฟักไข่

ทดสอบผลการฟักไข่ยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet เปรียบเทียบกับน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัส โดยนำไข่แช่ในสารทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 300 และ 500 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นของสารทดสอบทำซ้ำ 5 ครั้ง ในแต่ละซ้ำใช้ไข่ไม่น้อยกว่า 100 ฟอง นับจำนวนดักแด้และตัวเต็มวัยที่พัฒนามาจากไข่และลูกน้ำ ตามลำดับหลังจากทดสอบเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

7.2.4 การทดสอบผลการขับไล่

การทดสอบผลการไล่ยุงลายบ้านใช้วิธีทดสอบตามวิธีมาตรฐานของการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และมาตรฐานการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมยาทากันยุง กระทรวงอุตสาหกรรม (อุษาวดี และคณะ, 2546) โดยใช้สารทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 50, 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1,000, 1,500, 2,000 และ 3,000 ppm ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ทาลงบนผิวหนังแขนด้านบนที่ใช้เป็นพื้นที่ทดสอบในช่วงระหว่างข้อมือถึงข้อศอกในพื้นที่ขนาด 3x10 ตารางเซนติเมตร อาสาสมัครผู้ทดสอบอาจเป็นหญิงหรือชายก็ได้ อายุระหว่าง 20-60 ปี เมื่อเริ่มทดสอบ อาสาสมัครจะปิดผิวหนังส่วนที่ไม่ได้ทาสารทดสอบ โดยการสวมถุงแขนซึ่งเจาะรูเปิดช่องขนาด 3x10 ตารางเซนติเมตร ที่พอดีกับบริเวณพื้นที่ทดสอบ แล้วจึงสอดแขนเข้าไปในกรงยุง 30x3x0 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งบุด้วยผ้าไนล่อนสีขาว ในกรงนี้จะมียุงลายบ้านเพศเมียจำนวน 250 ตัว อายุ 4-5 วันซึ่งไม่เคยกินเลือดมาก่อนและยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์ ผู้ทดสอบในแขนในกรงนาน 3 นาที ในระหว่างนั้นสังเกตบริเวณพื้นที่ที่ใช้ทดสอบและนับจำนวนยุงที่ลงกัดในแต่ละครั้ง เมื่อครบเวลาจึงเอาแขนออกและนำแขนเข้ากรงทดสอบทุกๆ 30 นาที บันทึกเวลาตั้งแต่เริ่มยื่นแขนเข้าไปในกรงยุงครั้งแรกจนถึงช่วงเวลาซึ่งมียุงลายบ้านลงกัดในพื้นที่ทดสอบเป็นตัวที่ 2 ช่วงเวลาดังกล่าวกำหนดให้

เป็นระยะเวลาป้องกันยุงกัด (protection time) ในการทดสอบแต่ละครั้งจะใช้อาสาสมัครทดสอบ 3 คน ระยะเวลาป้องกันยุงกัดของสารทดสอบ คำนวณจากค่าเฉลี่ยของอาสาสมัครทดสอบ 3 คน ดำเนินการทดสอบกับยุงลายบ้านระหว่างเวลา 8.00-16.00 น. ในห้องปฏิบัติการที่มีแสงสว่างอยู่ในช่วง 300-500 Lux ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาป้องกันยุงกัดของสารทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในนำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet แสดงในตารางที่ 3 น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างประกอบด้วยกรดไขมัน 12 ชนิด โดยมีองค์ประกอบของกรดไขมันสำคัญ 4 ชนิดรวมกันมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ คือ oleic acid, linoleic acid, palmitic acid และ steric acid โดย 2 ชนิดแรกเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ส่วน 2 ชนิดหลังเป็นกรดไขมันอิ่มตัว ปริมาณของ oleic acid มีสูงสุดประมาณ 52.1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) การมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จะทำปฏิกริยากับออกซิเจนบริเวณตำแหน่งพันธะคู่ระหว่างอะตอมของคาร์บอน เกิดเป็นสารเพอร์ออกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นแอลดีไฮด์และกรดไขมันโมเลกุลขนาดเล็กที่ระเหยง่ายและมีกลิ่นเหม็นที่เรียกว่าเหม็นหืน ปัญหาดังกล่าวแก้ได้โดยเก็บน้ำมันไว้ในภาชนะที่สะอาดและแห้งในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำและไม่ถูกแสงสว่าง หรืออาจเติมสารกันหืน เช่น BHA, BHT (บุญรอด, 2008) ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet ไม่แตกต่างกัน ส่วนปริมาณสารอะซาดิแรคตินในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยสูงกว่าแบบ Soxhlet (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิด ปริมาณของกรดไขมัน และปริมาณสารอะซาดิแรคติน ในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยและวิธี Soxhlet

		ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง (เปอร์เซ็นต์)	
ชนิดของกรดไขมัน	สูตรโมเลกุล	แบบแช่ยุ่ย	แบบ Soxhlet
Lauric acid	$C_{12}H_{24}O_2$	0.04	0.04
Myristic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	0.09	0.09
Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	13.25	13.29
Palmitoleic acid	$C_{16}H_{30}O_2$	0.18	0.18
Steric acid	$C_{18}H_{36}O$	10.45	10.31
Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	52.10	52.34
Linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	21.00	20.59
Linolenic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	0.83	0.79
Arachidic acid	$C_{20}H_{40}O_2$	0.93	0.91
Eicosenoic acid	$C_{20}H_{38}O_2$	0.12	0.10
Behenic acid	$C_{22}H_{44}O$	0.22	0.22
Lignoceric acid	$C_{24}H_{48}O_2$	0.12	0.12
Azadirachtin	$C_{35}H_{44}O_{16}$	80.14 mg/mL	76.23 mg/mL

เมื่อนำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยไปแยกเป็นส่วนย่อยๆ ได้ปริมาณสารของส่วนแยกย่อยด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane, chloroform และ ethyl acetate ดังแสดงในตารางที่ 4 ปริมาณสารที่ได้รวมทั้ง 2 ครั้ง ส่วนใหญ่ได้จากการใช้ chloroform เป็นตัวทำละลายคิดเป็น 77.22 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารที่ได้จาก ethyl acetate คิดเป็น 23.35 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ *n*-hexane เป็นตัวทำละลาย สกัดสารได้น้อยมากคิดเป็น 0.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีสาเหตุมาจากในกระบวนการสกัดน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *n*-hexane เป็นตัวทำละลาย และสกัดซ้ำ 7 ครั้ง ทำให้ส่วนของสารที่ละลายใน *n*-hexane ถูกสกัดสกัดออกไปในกระบวนการดังกล่าวแล้ว

ตารางที่ 4 ปริมาณสารในส่วนแยกย่อยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย

ชนิดของตัวทำละลาย	ปริมาณสารส่วนแยกย่อย (กรัม)/% ของปริมาณสารทั้งหมด		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	รวม
n-hexane	0.03/0.24	0.05/0.47	0.07/0.47
chloroform	5.47/49.42	7.81/76.22	13.28/76.22
ethyl acetate	5.57/50.33	2.39/23.35	7.96/23.35
รวม	11.0612/100.00	10.25/100.00	21.31/100.00

เมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในส่วนแยกย่อยต่างๆ พบว่า ไม่แตกต่างจากน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยซึ่งสกัดด้วย *n*-hexane โดยพบกรดไขมัน 4 ชนิดแรกในปริมาณที่สูงได้แก่ oleic acid, linoleic acid, palmitic acid และ stearic acid (ตารางที่ 5) ส่วนปริมาณสารอะซาดิแรคตินตรวจพบในส่วนแยกย่อยของ ethyl acetate มากที่สุด 111.66 mg/mL รองลงมาได้แก่ ส่วนแยกย่อย chloroform ปริมาณ 99.68 mg/mL (ตารางที่ 5) ส่วนน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สกัดด้วย *n*-hexane มีปริมาณสารอะซาดิแรคตินต่ำสุด 80.14 mg/mL และ 76.23 mg/mL เมื่อสกัดแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ชี้ให้เห็นว่าสารอะซาดิแรคตินละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว ซึ่งความเป็นขั้วจากน้อยไปหามากของตัวทำละลายที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้คือ *n*-hexane > chloroform > ethyl acetate ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ EPA (1991) ที่ว่าสารอะซาดิแรคตินเป็นสารมีขั้ว เนื่องจากละลายในน้ำได้ 2,100 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่ละลายได้ใน octanol ได้เพียง 610 มิลลิกรัม/ลิตร และรายงานของ Umar และคณะ (2006) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเนื้อในเมล็ดสะเดาอินเดียแบบผงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในการฆ่าดักแด้ยุงลายบ้าน ปรากฏว่า สารสกัดเนื้อในเมล็ดสะเดาอินเดียแบบผงที่สกัดด้วย ethyl acetate, acetone, benzene, *n*-hexane และ propanol มีค่า LC_{50} ต่อดักแด้ยุงลายบ้านที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 600, 2,900, 8,200, 31,300 และ 76,300 ppm ตามลำดับ

สารอะซาดิแรคตินในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet ต่ำกว่าแบบแช่ยุ่ยนั้น น่าจะมีสาเหตุมาจากการสกัดแบบ Soxhlet ต้องใช้ความร้อนตลอดเวลา งามผ่องและขวัญชัย (2539) กล่าวว่าการเก็บน้ำมันเมล็ดสะเดาไทยในตู้เย็นมีการสลายตัวของสารอะซาดิแรคตินช้ากว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง 2 เท่า เนื่องจากสารอะซาดิแรคตินเป็นสารที่ไม่เสถียรและมีจุดเดือดต่ำ สลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ โดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (Ermel และคณะ, 1987) ขวัญชัยและคณะ (2540) พบว่า ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสารสกัดหยาบเมล็ดสะเดาไทยลดลงเมื่อใช้เครื่องสกัดแบบใช้ความร้อน นอกจากนี้ อัญชลี (2541) รายงานว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการอบแห้งเมล็ดสะเดาสูงขึ้น ทำให้ปริมาณสารอะซาดิแรคตินลดลง

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน ปริมาณสารอะซาดิแรคติน ที่พบในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย ส่วนแยกย่อยด้วย *n*-hexane, chloroform และ ethyl acetate

ชนิดของกรดไขมัน	จำนวน C ในโมเลกุล	ปริมาณกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์)			
		น้ำมันสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย	ส่วนแยกย่อย *n*-hexane	ส่วนแยกย่อย chloroform	ส่วนแยกย่อย ethyl acetate
Caprylate	C8: 0	-	-	0.03	-
Caprate	C10: 0	-	-	0.07	0.11
Laurate	C12: 0	0.04	-	0.09	0.26
Myristate	C14: 0	0.09	-	0.12	0.19
Palmitate	C16: 0	13.25	-	15.61	15.78
Palmitoleate	C16: 1	0.18	-	0.26	0.33
Stearate	C18: 0	10.45	-	12.21	11.40
Oleate	C18: 1	52.10	-	54.67	47.33
Linoleate	C18: 2	21.00	-	9.64	9.75
Linolenate	C18: 3	0.83	-	0.17	0.22
Arachidate	C20: 0	0.93	-	1.08	0.96
Eicosenoate	C20: 1	0.12	-	0.90	2.45
Behenate	C22: 0	0.22	-	0.22	0.19
Erucate	C22: 1	-	-	0.06	0.16
Linocerate	C24: 0	0.12	-	0.17	0.16
Nervonate	C24: 1	-	-	-	-
Azadirachtin			-	99.68 mg/mL	111.66 mg/mL

2. การศึกษาผลของวิธีการสกัดน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างต่อการควบคุมยุงลาย

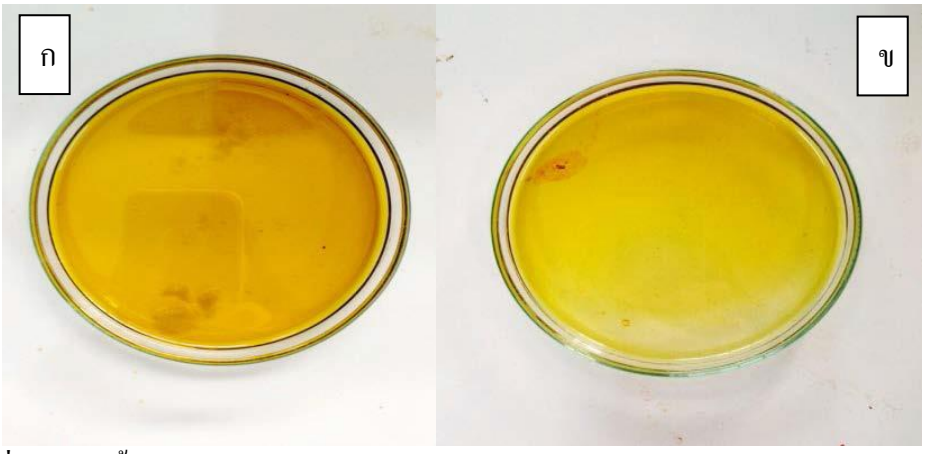
2.1 ปริมาณน้ำมันสะเดาช้างที่สกัดได้จากวิธีการแช่ยุ่ยและวิธี Soxhlet

หลังจากกะเทาะเปลือกเมล็ดสะเดาช้าง 80 กิโลกรัม ได้เนื้อในเมล็ด 27 กิโลกรัม คิดเป็น 34.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ดทั้งหมด ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ของการสกัดแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet คิดเป็น 35.0 และ 31.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธีดังกล่าว มีลักษณะคล้ายกัน มีกลิ่นฉุน สีเหลืองปนน้ำตาล แต่น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet มีสีอ่อนกว่าแบบแช่ยุ่ย (ภาพที่ 1)

ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ในการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาแม้ว่าวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาเหมือนกัน โดยปริมาณน้ำมันที่สกัดได้คิดเป็น 43.2, 41.0, 40.9 และ 53.4 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเนื้อในเมล็ดสะเดาช้างทั้งหมด (สนั่น และคณะ, 2543; สุนทร, 2548; วิภาวดี, 2548; อรัญ และคณะ, 2552) ซึ่งสาเหตุของความแตกต่างกัน ดังกล่าวเป็นไปได้ว่าแหล่งที่มาและช่วงฤดูกาลของเมล็ดสะเดาช้างที่ใช้แตกต่างกัน

ตารางที่ 6 ปริมาณของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สกัดด้วยตัวทำละลายนอร์มอลเฮกเซน ด้วยวิธีแช่ยุ่ยและวิธี Soxhlet

วิธีการสกัด	น้ำหนักเมล็ดสะเดาช้าง	ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้	
	(กิโลกรัม)	น้ำหนัก (กรัม/กิโลกรัม)	น้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)
แบบแช่ยุ่ย	13.5	349.0	35.0
แบบ Soxhlet	13.5	330.0	31.0



ภาพที่ 2 สีของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ก) และแบบ Soxhlet (ข)

2.2 ผลต่อการควบคุมยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet

2.2.1 ผลต่อการตายของลูกน้ำ

น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet มีพิษสูงกว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย เนื่องจากมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 348.0 ppm ต่ำกว่าของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 407.6 ppm และเปอร์เซ็นการตายเฉลี่ยของลูกน้ำยุงลายบ้านที่เวลาต่างๆ ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet สูงกว่าแบบแช่ยุ่ย (ตารางที่ 7) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chahad และ Boof (1994) ที่พบว่า สารสกัดผลพริกไทยแบบ Soxhlet ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญดีกว่าการสารสกัดแบบแช่ยุ่ย เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันทั้ง 3 ชนิด ปรากฏว่าน้ำมันตะไคร้หอมฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันยูคาลิปตัส ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

Murugan และ Parimelazhagan (2014) สกัดสารกลุ่มฟีโนล (phenol) แทนนิน (tannin) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จากพืช *Osbeckia parvifolia* Arn. ด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าการสกัดแบบแช่ยุ่ยให้ปริมาณสารแทนนินมากที่สุด ส่วนการสกัดแบบ Soxhlet ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุด แต่ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ของสารที่สกัดแบบ Soxhlet ดีกว่าสารสกัดแบบแช่ยุ่ย

มีรายงานระดับความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากสะเดาอินเดียที่แตกต่างกันในการศึกษาที่ผ่านมา ค่า LC_{50} ของผลิตภัณฑ์ทางการค้า Neemazal®, ANSKE®, AZT-VR-K-E® และ MTB® เท่ากับ 8.4, 78.2, 18.1 และ 5.9 ppm ตามลำดับ (WHO, 1981) ในทำนองเดียวกัน Naqvi และคณะ (1991) รายงานค่าดังกล่าวของสารสกัดสะเดา (NFD) เท่ากับ 0.58 ppm ในขณะที่ค่า LC_{50} ของสาร RBu-9, RB-b และ Margosan-O™ เท่ากับ 380.0, 490.0 และ 340.0 ppm ตามลำดับ (Naqvi et al., 1994) ในเวลาต่อมา Raymond และคณะ (2007) รายงานค่า LC_{50} ของผลิตภัณฑ์สารสกัดสะเดาอินเดีย 3 แบบ คือ 1% Suneem, 1% Formulated neem oil และ Neem powder เท่ากับ 2.0, 8.0 และ 3.0 ppm ตามลำดับ มานิตย์ (2543) รายงานความเข้มข้นของน้ำมันและสารสกัดเนื้อในเมล็ดสะเดาอินเดียที่ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 2,000 ppm และ 200 ppm ตามลำดับ

เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีกว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย ในทางตรงข้ามกลับพบว่ามีปริมาณสารอะซาดิแรกตินน้อยกว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ตารางที่ 3) ชี้ให้เห็นว่า นอกจากสารอะซาดิแรกตินแล้วอาจมีสารชนิดอื่นที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบของเมล็ดสะเดาช้าง โดย สมเดช และคณะ (2552) พบว่า มีสารในกลุ่มลิโมนอยด์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารอะซาดิแรคติน 7ชนิด ได้แก่ azadirachtin B, 1-isopentanoic acid-3-acetylazadirachtol, azadirachtin M, azadirachtin L, 11a-hydroxyazadirachtin H, 11b-hydroxyazadirachtin H และ azadirachtol

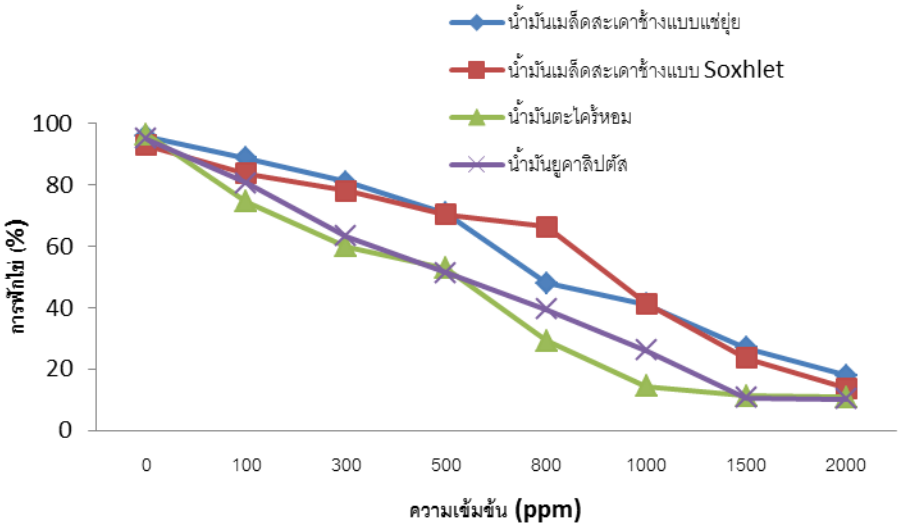
ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำยุงลายบ้านและค่า LC_{50} ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัส หลังทดสอบสารเป็นเวลา 24 48 72 และ 120 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (ppm)	เวลาหลังทดสอบ (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การตาย (mean±SD)[1/]			
		น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย	น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet	น้ำมันตะไคร้หอม	น้ำมันยูคาลิปตัส
100	24	19.0±8.2	23.0±7.6	69.0±6.5	14±6.5
	48	41.0±8.2	45.0±6.1	73.0±4.5	18±8.4
	72	56.0±5.5	53.0±5.7	83.0±5.7	24±9.6
	96	68.0±5.7	67.0±4.5	83.0±5.7	26±10.8
	120	79.0±5.5	73.0±7.6	87.0±5.7	30±10.0
300	24	32.0±5.7	40.0±6.1	88.0±9.7	20±6.1
	48	49.0±4.2	50.0±3.5	92.0±5.7	28±4.5
	72	70.0±7.9	70.0±9.4	98.0±2.7	32±4.5
	96	79.0±4.2	72.0±5.7	99.0±2.2	35±9.4
	120	85.0±3.5	78.0±4.5	100±0.0	43±6.7
500	24	50.0±9.4	53.0±8.4	100±0.0	46±8.9
	48	62.0±5.7	61.0±6.5	100±0.0	54±4.2
	72	77.0±7.6	67.0±9.1	100±0.0	65±7.1
	96	86.0±10.8	71.0±5.5	100±0.0	72±7.6
	120	92.0±9.1	79.0±4.2	100±0.0	75±3.5
800	24	65.0±10.0	71.0±8.2	100±0.0	81±12.9
	48	76.0±8.2	76.0±8.9	100±0.0	89±11.4
	72	88.0±5.7	81.0±10.8	100±0.0	98±2.7
	96	95.0±5.0	89.0±8.2	100±0.0	99±2.2
	120	98.0±4.5	94.0±6.5	100±0.0	100±0.0
1,000	24	75.0±13.2	79.0±8.2	100±0.0	91±8.9
	48	86.0±7.4	83.0±5.7	100±0.0	95±7.1
	72	97.0±4.5	91.0±6.5	100±0.0	100±0.0
	96	98.0±4.5	97.0±4.5	100±0.0	100±0.0
	120	100.0±0.0	99.0±2.2	100±0.0	100±0.0
1,500	24	95.0±5.5	92.0±7.6	100±0.0	100±0.0
	48	99.0±2.2	99.0±2.2	100±0.0	100±0.0
	72	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
	96	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
	120	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
2,000	24	99.0±2.2	98.0±2.7	100±0.0	100±0.0
	48	99.0±2.2	99.0±2.2	100±0.0	100±0.0
	72	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
	96	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
	120	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
LC_{50} (ppm) (24 ชั่วโมง)		407.6	348.0	61.9	410.3

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

2.2.2 ผลต่อการฟักไข่

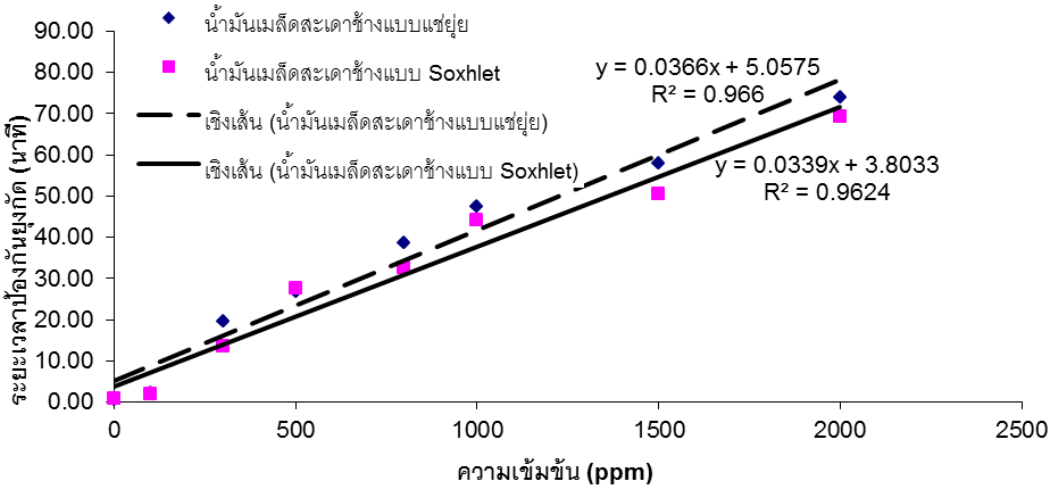
เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้านหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัส ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 3 ปอร์เซ็นต์การฟักไข่ลดลงตามความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น น้ำมันตะไคร้หอมยับยั้งการฟักไข่ดีที่สุด รองลงมาได้แก่น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet ตามลำดับ (ภาพที่ 3) โดยค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการฟักไข่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 378.3, 475.9, 816.5 1 และ 869. มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10, 11, 12)



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้านหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง

2.2.3 ผลต่อการไล่ยุง

ระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านกัดหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet แสดงในภาพที่ 4 น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยมีประสิทธิภาพในการไล่ยุงได้ดีกว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet เมื่อพิจาณาความเข้มข้นที่สามารถป้องกันยุงลายบ้านกัดเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง (มาตรฐานขั้นต่ำที่จะขอจดทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยได้) โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงพบว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet ต้องใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 1,501.2 ppm และ 1,657.7 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านกัด (protection time) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet เมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2.2.4 ผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของลูกน้ำ

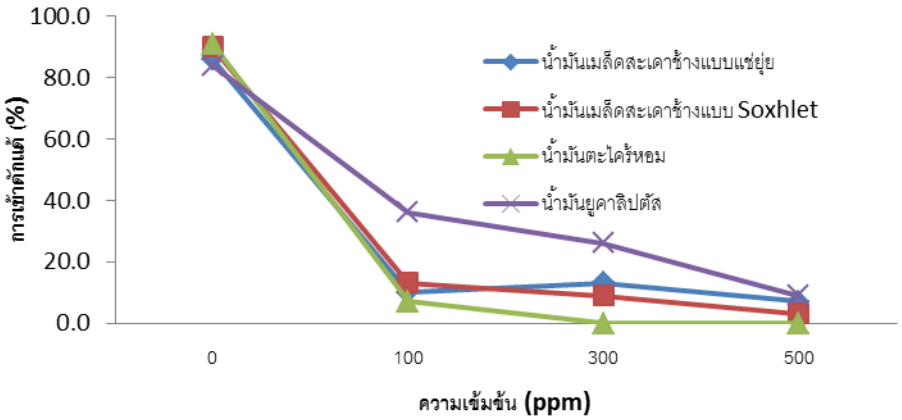
เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยของลูกน้ำยุงลายบ้านหลังจากได้รับสารทดสอบของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย และแบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 5 และภาพที่ 6 ตามลำดับ สารทดสอบทุกชนิดยับยั้งการฟักเป็นดักแด้และฟักเป็นตัวเต็มวัยของลูกน้ำยุงลายบ้านได้และขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ น้ำมันตะไคร้หอมมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งดังกล่าว รองลงมาได้แก่ น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง และน้ำมันยูคาลิปตัส ตามลำดับ ส่วนน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet ให้ผลใกล้เคียงกันในการยับยั้งการฟักเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน

เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและพัฒนาเข้าสู่ระยะดักแด้และระยะตัวเต็มวัยดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า ลูกน้ำยุงที่ทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 2 แบบ น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัส ที่ระดับความเข้มข้น 100, 300 และ 500 ppm ใช้เวลาในการฟักเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยนานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 ppm) ซึ่งลูกน้ำเข้าดักแด้ 84-90 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลานาน 5-8 วัน แต่เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นดักแด้ลดลงอย่างเด่นชัดระหว่าง 0-36 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลายาวนานขึ้น 8-11 วัน หลังทดสอบด้วยสารทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 8) ส่วนการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยนั้น ลูกน้ำที่ใช้ทดสอบในชุดควบคุมพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ 75-78 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลา 10-13 วัน ส่วนลูกน้ำที่ได้รับสารทดสอบมีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยน้อยมาก 0-14 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้เวลานานขึ้น 15-20 วัน ชี้ให้เห็นว่าทั้งน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัส ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของลูกน้ำยุงลายบ้านเพื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะถัดไป ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อรัญ และคณะ (2552) ว่าน้ำมัน

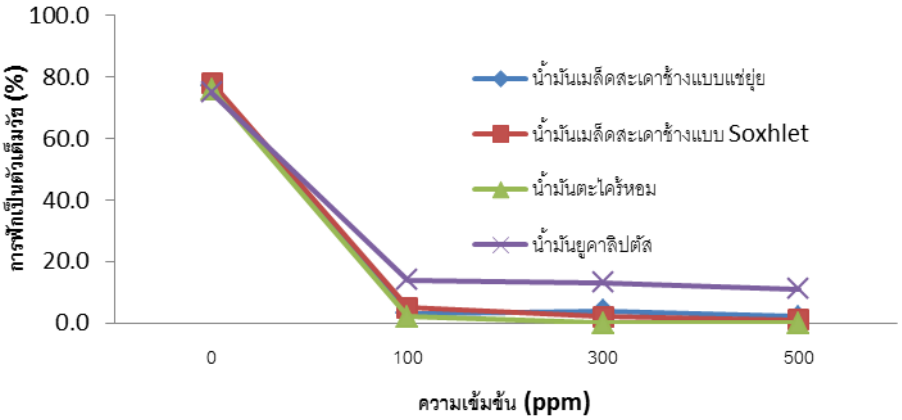
เมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูปยับยั้งการเจริญเติบโตของลูกน้ำยุงลายบ้านเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ให้ช้าลง และมีเปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ความเข้มข้น 200 ppm ลูกน้ำฟักเป็นดักแด้ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ สารอะซาดิแรคตินที่อยู่ในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างไปขัดขวางการทำงานของฮอร์โมน ecdysone ซึ่งใช้ในการลอกคราบของลูกน้ำ ทำให้การเจริญเติบโตล่าช้าและผิดปกติ (Raymond *et al*., 2007) นอกจากนี้ Naqvi และคณะ (1991) พบว่า สารสกัดจากสะเดาอินเดียส่งผลให้การพัฒนารูปร่างของลูกน้ำยุงลายบ้านเข้าสู่ระยะดักแด้ช้าและผิดปกติ หลังจากนั้น Naqvi และคณะ (1994) ได้ทดสอบผลของสารสกัดสะเดาในชื่อผลิตภัณฑ์ RBu-9, RB-b และ Margosan-O™ ต่อการพัฒนารูปร่างของลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 4 ปรากฏว่า ตัวเต็มวัยที่พัฒนามาจากลูกน้ำซึ่งรอดตายจากสารทดสอบดังกล่าว มีขาที่ยาวยับย่น พันกันผิดปกติ และยังมีลำตัวเล็กลงอย่างเด่นชัด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mitchell และคณะ (1996) ซึ่งได้ทดสอบผลของสารอะซาดิแรคติน ซาลานิน นิมบิน และ 6-desacetynimbin ที่สังเคราะห์ได้จากเนื้อในเมล็ดสะเดาอินเดีย ต่อการพัฒนารูปร่างของยุงลายบ้านระยะที่ 3 พบว่า สารทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-1,000 ppm สามารถชะลอการลอกคราบของลูกน้ำระยะที่ 3 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

นอกจากยุงลายบ้านแล้ว สารสกัดจากเมล็ดสะเดายังสามารถชะลอการพัฒนารูปร่างของยุงชนิดอื่นได้อีก โดย Ping Jin และคณะ (1994) รายงานว่าผลิตภัณฑ์สารสกัดเนื้อในเมล็ดสะเดาอินเดีย (AZAL-S®) ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 ppm ชะลอการเจริญเติบโตของลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) นอกจากนี้น้ำมันสะเดาอินเดียในรูปอีมัลชั่นและผลิตภัณฑ์สารสะเดา Neemarin® ชะลอการพัฒนารูปร่างของลูกน้ำและชะลอการฟักเป็นตัวเต็มวัยของยุงก้นปล่อง (*An. stephensi*) (Batra *et al*., 1998; Vatandoost and Vaziri, 2004)

เมื่อพิจารณาชนิดของน้ำมันและความเข้มข้นที่ ใช้ทดสอบในการป้องกันไม่ให้ลูกน้ำพัฒนาเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยซึ่งเป็นระยะสำคัญที่เป็นพาหะนำโรค พบว่า น้ำมันตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 300 ppm ป้องกันลูกน้ำพัฒนาเป็นยุงตัวเต็มวัยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 2 แบบ และน้ำมันยูคาลิปตัส ที่ความเข้มข้น 500 ppm ป้องกันลูกน้ำพัฒนาเป็นยุงตัวเต็มวัยได้ 99 เปอร์เซ็นต์ และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นดักแด้ของลูกน้ำยุงลายบ้านหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวเต็มวัยของลูกน้ำยุงลายบ้านหลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยของลูกน้ำยุงลายบ้านที่เวลาต่างๆ หลังจากทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของสารทดสอบ	ความเข้มข้น (ppm)	การฟักเป็นดักแด้ (เปอร์เซ็นต์)					*การฟักเป็นตัวเต็มวัย (เปอร์เซ็นต์)*								
		เวลาหลังทดสอบ (วัน)													
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	18	19	20
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย	0	49	84	90			*44*	*73*	*77*	*78*					
	100				6		12						*2*	*3*	*5*
	300				6		12	16						*2*	
	500				2			3					*1*		
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet	0	57	79	85	86		*61*	*71*	*77*						
	100		7	10							*1*	*2*			*3*
	300					7	9	13					*1*	*3*	*4*
	500					2	6	7				*1*			

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ชนิดของสารทดสอบ	ความเข้มข้น (ppm)	การฟักเป็นดักแด้ (เปอร์เซ็นต์)					*การฟักเป็นตัวเต็มวัย (เปอร์เซ็นต์)*							
		เวลาหลังทดสอบ (วัน)												
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	18	19	20
น้ำมันตะไคร้หอม	0	34	65	71	77		*34*	*65*	*71*	*77*					
	100					4		7						*1*	*2*
	300														
	500														
น้ำมันยูคาลิปตัส	0	65	78	84			*32*	*58*	*68*	*75*					
	100				1	24	31	36					*2*	*10*	*14*
	300					6	21	26				1	*2*	*7*	*11*
	500					2	5	9					*1*		*2*

3. การศึกษาการเสริมฤทธิ์และการเพิ่มฤทธิ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างต่อการควบคุมยุงลาย

3.1 การศึกษาการเสริมฤทธิ์

ค่า LC_{50} และค่า Synergistic ratio (SR) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และสารผสมระหว่างน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 2 แบบดังกล่าว กับสาร PBO ในอัตราส่วนต่างๆ ที่ทำให้ลูกน้ำตายที่ 24 ชั่วโมงแสดงในตารางที่ 9 สาร PBO ไม่ช่วยเสริมฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 2 แบบ เนื่องจากค่า LC_{50} ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเดี่ยวๆ มีค่าต่ำกว่าที่ผสมสาร PBO มีรายงานการเสริมฤทธิ์ของสาร PBO กับสารอะซาดิแรกติน เมื่อผสมในอัตราส่วนของ PBO:สารอะซาดิแรคติน เท่ากับ 10:1 ทำให้การตายของด้วง Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) เพิ่มสูงขึ้น และยับยั้งการกินอาหารของตัวอ่อนและตัวเต็มวัยได้ดี (Zehnder and Warthen, 1988)

ตารางที่ 9 ค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุย และแบบวิธี Soxhlet ที่ไม่ผสมสาร PBO และที่ผสมสาร PBO ที่อัตราส่วนต่างๆ

สารทดสอบ	อัตราส่วนผสม	ค่า LC_{50} (ppm)/SR[1/]	
		สกัดด้วยวิธีแช่ยุย	สกัดด้วยวิธี Soxhlet
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง	1	407.6 /1	348.0/1
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง+PBO	1:5	826.3/2.0	998.0/2.9
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง+PBO	1:10	1,086.1/2.7	1,037.7/3.0
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง+PBO	1:15	1,409.2/3.5	1,469.2/4.2
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง+PBO	1:20	1,517.0/3.7	1,809.6/5.2
น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง+PBO	1:25	2,213.9/5.4	2,493.8/7.2

SR[1/] = ค่า LC_{50}ของสารผสม/ค่า LC_{50}ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

3.2 การศึกษาการเพิ่มฤทธิ์

เมื่อนำน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet ไปผสมกับน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัสในอัตราส่วนต่างๆ แล้วทดสอบผลต่อการฟักไข่ของยุงลายบ้านพบว่า การผสมน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัสกับน้ำมันสะเดาช้างทั้ง 2 แบบ ช่วยยับยั้งการฟักไข่ได้ดีกว่ากว่าการใช้น้ำมันสะเดาช้างเพียงอย่างเดียว โดยอัตราส่วนผสมที่ดีที่สุดระหว่างน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง:น้ำมันตะไคร้หอม เท่ากับ 8:2 เนื่องจากทำให้การยับยั้งการฟักไข่สูงสุด 2.2 เท่า และ 1.9 เท่าของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet เพียงอย่างเดียว ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และตารางที่ 11) ส่วนอัตราส่วนผสมที่ดีที่สุดระหว่างน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง:น้ำมันยูคาลิปตัส เท่ากับ 8.5:1.5 โดยทำให้ยับยั้งการฟักไข่สูงขึ้น 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันสะเดาช้างเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 12 และตารางที่ 13)

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (MT) น้ำมันตะไคร้หอม (CO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้าน (เปอร์เซ็นต์)[1/]					
	MT	CO	อัตราส่วนผสมระหว่าง MT:CO			
			8:2	8.5:1.5	9:1	9.5:0.5
0	95.8	96.4	96.7	95.1	96.7	95.3
100	88.7	74.6	77.8	82.7	82.4	90.3
300	81.1	59.9	69.5	70.6	76.0	78.3
500	70.8	52.9	50.6	54.4	57.6	68.7
800	48.0	29.1	29.0	39.8	46.7	50.1
1,000	41.1	14.4	24.4	34.5	36.8	39.3
1,500	26.9	11.2	11.0	24.8	29.1	24.9
2,000	17.8	10.8	7.9	16.6	17.6	17.6
EC_{50} (mg/L)	816.5	378.3	431.9	609.4	676.6	803.3
AR			2.2	1.3	1.2	1.0

[1/] เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ; AR= ค่า EC_{50} ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง /ค่า EC_{50}ของสารคู่ผสม

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ST) น้ำมันตะไคร้หอม (CO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้าน (เปอร์เซ็นต์)[1/]					
	ST	CO	อัตราส่วนผสมระหว่าง ST:CO			
			8:2	8.5:1.5	9:1	9.5:0.5
0	92.9	94.0	94.9	93.6	94.2	95.6
100	83.8	71.0	79.4	81.1	83.5	83.1
300	78.1	55.6	71.5	72.3	78.1	79.0
500	70.3	49.4	47.6	49.3	68.2	69.8
800	64.4	32.9	27.8	36.5	58.7	62.0
1,000	41.3	23.4	27.1	28.5	36.2	38.0
1,500	23.6	13.9	14.1	21.1	21.5	23.6
2,000	13.7	9.8	7.4	10.4	12.2	13.1
EC_{50} (mg/L)	869.1	384.3	464.5	547.0	765.0	787.5
AR			1.9	1.6	1.1	1.1

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (MT) น้ำมันยูคาลิปตัส (EO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้าน (เปอร์เซ็นต์)[1/]					
	MT	EO	อัตราส่วนผสมระหว่าง MT:EO			
			8:2	8.5:1.5	9:1	9.5:0.5
0	95.6	95.1	97.2	96.7	96.9	96.9
100	86.4	80.6	80.5	77.8	78.9	80.8
300	80.0	63.3	74.5	61.2	67.8	77.8
500	68.3	51.4	65.9	54.3	64	67.1
800	50.5	39.5	48.9	41.8	46.7	50.2
1,000	44.7	26.1	33.3	25.3	36.1	37.1
1,500	28.4	10.6	16.6	8.0	15.7	19.2
2,000	15.1	10.1	13.3	5.3	12.8	14.4
EC_{50} (mg/L)	815.2	475.9	614.3	436.8	573.2	671.4
AR			1.3	1.9	1.4	1.2

[1/] เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ; AR= ค่า EC_{50} ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง /ค่า EC_{50}ของสารคู่ผสม

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้านหลังทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ST) น้ำมันยูคาลิปตัส (EO) และส่วนผสมของน้ำมันดังกล่าวที่สัดส่วนต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของยุงลายบ้าน (เปอร์เซ็นต์)[1/]					
	ST	EO	อัตราส่วนผสมระหว่าง ST:EO			
			8:2	8.5:1.5	9:1	9.5:0.5
0	95.0	93.2	94.8	94.5	92.2	96.4
100	82.7	77.1	78.3	75.2	78.6	81.4
300	79.1	61.2	72.0	62.7	64.5	72.4
500	70.2	52.7	61.6	50.1	62.2	62.0
800	58.0	40.7	43.3	37.6	43.3	45.9
1,000	41.1	23.7	32.0	23.0	32.3	34.9
1,500	25.2	11.9	14.1	7.9	12.9	24.1
2,000	15.8	10.0	12.7	6.8	9.8	14.0
EC_{50} (mg/L)	820.0	473.4	576.2	424.8	565.2	631.4
AR			1.4	1.9	1.5	1.3

[1/] เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ; AR= ค่า EC_{50} ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง/ค่า EC_{50}ของสารคู่ผสม

4. การศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างโดยวิธีสภาวะเร่ง

จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างโดยวิธีสภาวะเร่งพบว่า การเพิ่มระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา ทำให้ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบ มีแนวโน้มลดลง (ภาพที่ 7) โดยปริมาณสารอะซาดิแรคตินเริ่มต้นในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย แบบ Soxhlet และแบบสำเร็จรูป เท่ากับ 213.6, 213.9 และ 228.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วันสุดท้ายของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยมีปริมาณสารอะซาดิแรคตินอยู่ในช่วง 82.1 - 114.2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet อยู่ในช่วง 95.3 - 119.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูปอยู่ในช่วง 76.8 - 123.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณสารอะซาดิแรคตินลดลงตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ งามผ่อง และขวัญชัย (2539) ที่พบว่าการเก็บน้ำมันเมล็ดสะเดาไทยในตู้เย็นจะมีการสลายตัวของสารออกฤทธิ์ช้ากว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง 2 เท่า เนื่องจากสารอะซาดิแรคตินนั้นเป็นสารที่ไม่เสถียร มีจุดเดือดต่ำ อีกทั้ง Ermel และคณะ (1987) รายงานว่าสารอะซาดิแรคตินเป็นสารที่สลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติโดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส ขวัญชัย และคณะ (2540) รายงานว่าปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสารสกัดหยาบเมล็ด

สะเดาไทยลดลงเมื่อใช้เครื่องสกัดแบบใช้ความร้อน นอกจากนี้ อัญชลี (2541) พบว่า เมื่ออุณหภูมิในการอบแห้งเมล็ดสะเดาอินเดียสูงขึ้น ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดลดลง

เมื่อนำปริมาณสารอะซาดิแรคตินที่ลดลงไปหาค่าลอการิทึม แล้วนำข้อมูลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของสารอะซาดิแรคตินกับระยะเวลาการเก็บ (วัน) เพื่อหาอันดับของปฏิกิริยา พบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอะซาดิแรคตินเป็นปฏิกิริยาอันดับ 1 (ภาพที่ 8) เพราะมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และอัตราการสูญเสียสารอะซาดิแรคติน (k) สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 14 และ 15 และมีสมการอันดับปฏิกิริยาดังนี้

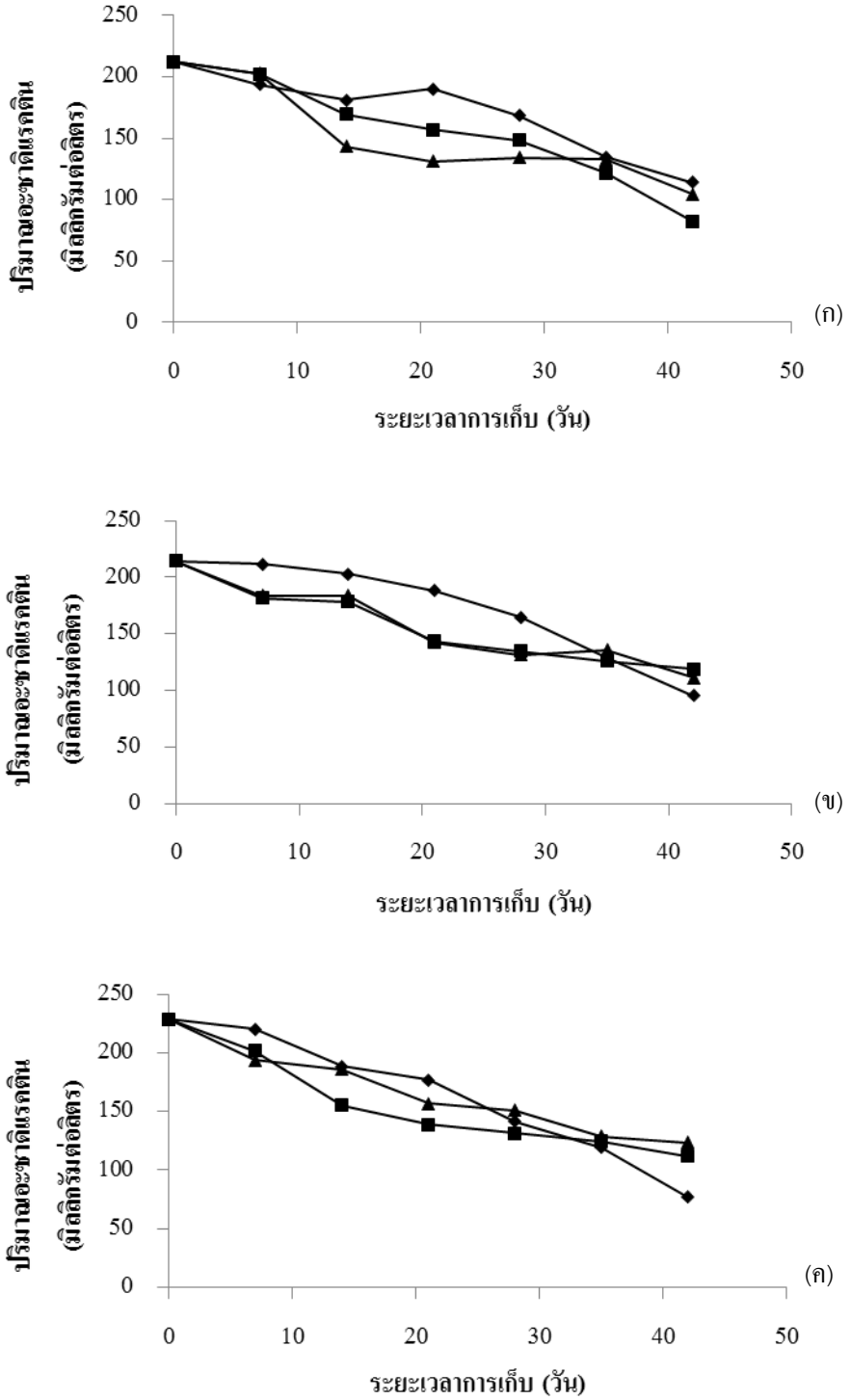
$$\ln C = \ln C_0 - kt \qquad (2)$$

เมื่อ C = ค่าอะซาดิแรคตินที่เกิดขึ้น

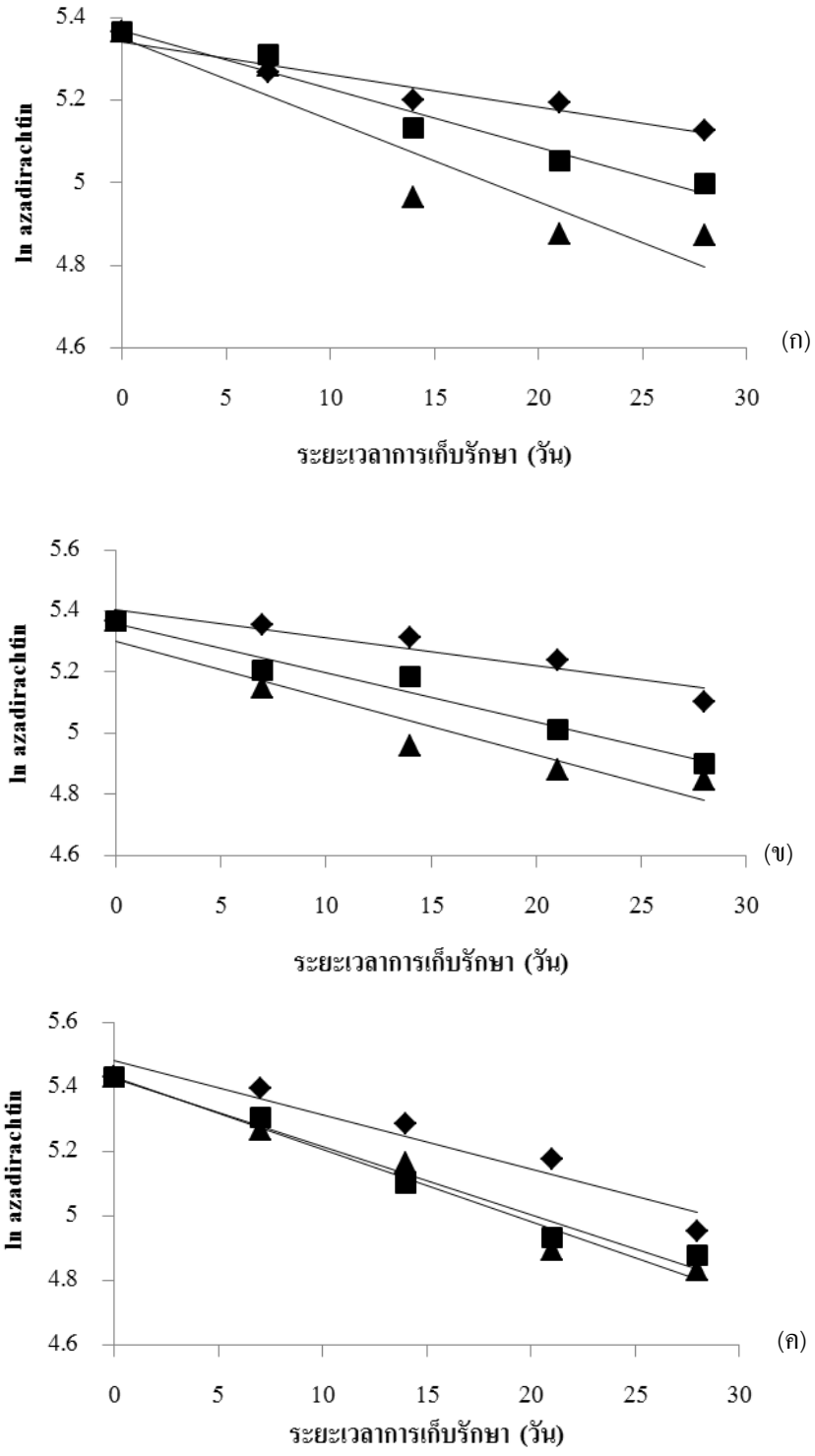
C_0 = ค่าอะซาดิแรคตินที่จุดเริ่มต้น

k = อัตราปฏิกิริยา (reaction rate constant)

และจากตารางที่ 15 พบว่าเมื่ออุณหภูมิการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น อัตราการสลายตัวของสารอะซาดิแรคติน (k) มีค่าเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะซาดิแรคตินของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบ ที่อุณหภูมิต่างๆ (ก) น้ำมันสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ข) น้ำมันสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ค) น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (◆) 55 องศาเซลเซียส (■) และ 70 องศาเซลเซียส (▲)



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาอันดับ 1 ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ก) น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ข) และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป (ค) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (◆ 55 องศาเซลเซียส (■ และ 70 องศาเซลเซียส (▲)

ตารางที่ 14 สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส

น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง	สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	45	55	70
แบบแช่ยุ่ย	0.9325	0.9598	0.8814
แบบ Soxhlet	0.8814	0.9669	0.9099
สำเร็จรูป	0.9299	0.9719	0.9695

ตารางที่ 15 อัตราการสลายตัวของสารอะซาดิแรคติน (k) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส

น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง	อัตราการสลายตัวของสารอะซาดิแรคติน (k) (1/วัน)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	45	55	70
แบบแช่ยุ่ย	0.0078	0.0141	0.0198
แบบ Soxhlet	0.0091	0.0160	0.0187
สำเร็จรูป	0.0168	0.0212	0.0224

นำค่า k จากตารางที่ 15 มาแทนในสมการ (3) เพื่อคำนวณหาอายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 16

$$t_{10\ เปอร์เซ็นต์} = 0.105/ k \qquad (3)$$

เมื่อ $t_{10\ เปอร์เซ็นต์}$ หมายถึง อายุการเก็บรักษาของน้ำมันแต่ละอุณหภูมิเมื่อสารสำคัญลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณสารทั้งหมด

k หมายถึง อัตราปฏิกิริยาของแต่ละอุณหภูมิ

จากนั้นนำค่าลอการิทึมของอัตราการสูญเสียสารอะซาดิแรคติน (ln K) ไปสร้างกราฟอาร์รีเนียสกับส่วนกลับของอุณหภูมิสัมบูรณ์ (1/T) มีหน่วยเป็นองศาเคลวิน ได้สมการดังนี้

$$\ln K = (-E_A / RT) + \ln K_0 \qquad (4)$$

ใช้สมการดังกล่าวคำนวณอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิห้อง พบว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป มีอายุการเก็บรักษา 29, 20 และ 8 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 อายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเมื่อสารอะซาดิแรคตินลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารทั้งหมด

น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง	อายุการเก็บรักษา (วัน)			
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	25	45	55	70
แบบแช่ยุ่ย	29	14	8	5
แบบ Soxhlet	20	12	7	6
สำเร็จรูป	8	6	5	4

เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง 2,000 ppm ซึ่งฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 24 ชั่วโมง (อรัญ และคณะ, 2552) มากำหนดจุดหมดอายุการเก็บรักษา โดยนำความเข้มข้นของน้ำมันไปแทนค่าในสมการที่ (2) จะได้อายุการเก็บรักษาดังตารางที่ 17 จากนั้นนำอายุการเก็บไปหาค่าลอการิทึม แล้วนำข้อมูลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของอายุการเก็บ ($\ln \Theta s$) กับส่วนกลับของอุณหภูมิสัมบูรณ์ (องศาเคลวิน) เพื่อทำนายอายุการเก็บของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้สมการดังนี้

$$\ln \Theta s = k\,(1/T) + \ln \Theta s_0 \qquad (5)$$

เมื่อ Θs = อายุการเก็บ (วัน)

Θs_0 = อายุการเก็บเริ่มต้น (วัน)

การใช้ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ในการประเมินอายุการเก็บนั้น พบว่าอายุการเก็บของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่ได้จากการแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างจากการสกัดด้วยวิธี Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป มีอายุการเก็บรักษา 1,705, 1,168 และ 457 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 17) ซึ่งพบว่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ งามผ่อง และขวัญชัย (2539) ที่รายงานว่า น้ำมันสะเดาไทยที่เก็บในตู้เย็นสามารถใช้งานได้เป็นระยะเวลา 3 ปี ซึ่งการใช้วิธีนี้ในการทำนายอายุการเก็บน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง บอกถึงระยะเวลาในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างยาวนานถึง 5 ปี เมื่อเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่สกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์นานที่สุด เนื่องจากวิธีการสกัดดังกล่าวสัมผัสความร้อนน้อยกว่าวิธีอื่น ทำให้อัตราการลดลงของสารออกฤทธิ์น้อยกว่า ส่วนน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูปที่ผสมสารอิมัลซิฟายเออร์ มีอายุการเก็บน้อย

เนื่องจากตัวอิมัลซิฟายเออร์ที่เติมลงไปไม่ทนที่อุณหภูมิสู (สุวิมล และคณะ, 2554) นอกจากนี้มีรายงานสภาพการทนต่อความร้อนของสารอะซาดิแรคตินเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 14 วัน พบว่า สารอะซาดิแรกตินลดลงจาก 23.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 22.5 เปอร์เซ็นต์ (EPA, 1991)

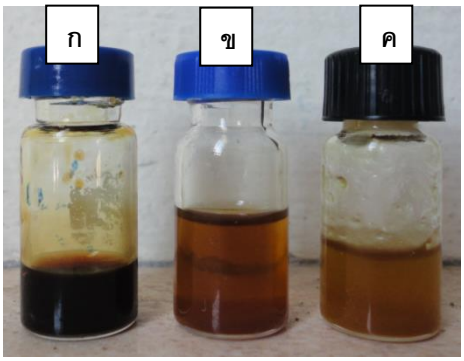
ตารางที่ 17 อายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเมื่อกำหนดจุดหมดอายุที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือ 2,000 ppm

น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง	อายุการเก็บรักษา (วัน)			
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	25	45	55	70
แบบแช่ยุ่ย	1,705	797	441	314
แบบ Soxhlet	1,168	682	388	332
สำเร็จรูป	457	370	293	277

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อสมบัติทางกายภาพ ปริมาณกรดไขมัน (acid value) ค่าเพอร์ออกไซด์ (peroxide value) และการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

5.1 การเปลี่ยนทางกายภาพ (สี) ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

จากการทดสอบอายุการเก็บรักษาของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบ ได้แก่ น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป โดยเก็บรักษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา ทำให้น้ำมันทั้ง 3 เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สีของน้ำมันเข้มขึ้น น้ำมันที่เก็บที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีสีเข้มที่สุด ส่วนน้ำมันที่เก็บที่อุณหภูมิ 55 และ 45 องศาเซลเซียส สีเข้มรองลงมาตามลำดับ (ภาพที่ 9) เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันส่งผลให้น้ำมันเกิดการเปลี่ยนสี กลไกของปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะไปกระตุ้นให้คาร์บอนตำแหน่งพันธะคู่ของน้ำมันสูญเสียไฮโดรเจนอะตอม ทำให้เกิดไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอนุมูลอิสระ หลังจากนั้นออกซิเจนจะเข้าไปจับกับอนุมูลอิสระที่ตำแหน่งพันธะคู่ ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมาก หลังจากนั้นอนุมูลอิสระเกิดการรวมตัวกันทำให้เกิดสารใหม่ (secondary product) เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนสีของน้ำมัน (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, ม.ป.ป.) ดังนั้นอุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าอุณหภูมิต่ำ และเมื่อปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นมาก อนุมูลอิสระมีมากขึ้น ส่งผลให้น้ำมันมีสีเข้มมากขึ้น (ชาตรี และภาราได, 2550)



ภาพที่ 9 น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ก) 55 องศาเซลเซียส (ข) และ 45 องศาเซลเซียส (ค)

5.2 การวิเคราะห์หาค่ากรดไขมันก่อนและหลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการวิเคราะห์หาค่ากรดไขมันของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง มีค่ากรดไขมันเริ่มต้นเท่ากับ 106.3 มิลลิกรัม เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีค่ากรดไขมันเพิ่มขึ้นเป็น 120.1 มิลลิกรัม (ตารางที่ 18) ซึ่งใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ของอรัญ และคณะ (2552) ที่น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างมีค่ากรดไขมันเท่ากับ 151 มิลลิกรัมจากน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างจำนวน 5 กรัม ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไขมันหรือน้ำมัน คือการที่น้ำทำลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ ให้เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2548) จากการทดลองข้างต้นพบว่าหลังจากเก็บรักษาน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ค่ากรดไขมันคงที่ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากน้ำในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างมีเพียงเล็กน้อย หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ นั้นทำให้น้ำเกิดการระเหยออกจากน้ำมัน โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (กีรตินาฏ และคณะ, 2553)

ตารางที่ 18 ค่ากรดไขมันของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างก่อนและหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิการเก็บรักษา (องศาเซลเซียส)	ค่ากรดไขมัน (มิลลิกรัม) ก่อนการทดสอบ	ค่ากรดไขมัน (มิลลิกรัม) หลังการทดสอบ
45	106.3	120.1
55	106.3	120.1
70	106.3	120.1

5.3 การวิเคราะห์หาค่าเพอร์ออกไซด์ก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการวิเคราะห์ค่าเพอร์ออกไซด์ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง โดยค่าเพอร์ออกไซด์เริ่มต้นเท่ากับ 1.3 มิลลิกรัมสมมูล และหลังจากเก็บรักษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าค่าเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเป็น 2.6, 3.0 และ 3.25 มิลลิกรัมสมมูล ตามลำดับ (ตารางที่ 19) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ สรรพสิทธิ์ (2550) ซึ่งพบว่าค่าเพอร์ออกไซด์ของน้ำมันอยู่ในช่วง 0-12 มิลลิกรัมสมมูล เมื่อใช้น้ำมัน 2 กรัมในการวิเคราะห์ ทั้งนี้ค่าเพอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของออกซิเจนกับน้ำมันที่ตำแหน่งพันธะคู่ และค่าเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะกระตุ้นกรดไขมันที่เหลือให้เกิดปฏิกิริยาต่อไป (นิธิยา, 2548)

ตารางที่ 19 ค่าเพอร์ออกไซด์ของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างก่อนและหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิการเก็บรักษา (องศาเซลเซียส)	ค่าเพอร์ออกไซด์ (มิลลิกรัมสมมูล)
ก่อนการทดสอบ	1.3
หลังทดสอบที่ 45 องศาเซลเซียส	2.6
หลังทดสอบที่ 55 องศาเซลเซียส	3.0
หลังทดสอบที่ 70 องศาเซลเซียส	3.3

เมื่อเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าเพอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เพิ่มสูงขึ้น (กีรตินาฏ และคณะ, 2553) การเพิ่มขึ้นของค่ากรดไขมันและค่าเพอร์ออกไซด์ เป็นตัวบ่งบอกว่าเกิดการเสื่อมคุณภาพของน้ำมัน ดังนั้นปัจจัยสำคัญในการเร่งความเสื่อมของน้ำมัน คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษานอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ระยะเวลาในการเก็บ ภาชนะที่ใส่น้ำมัน เป็นต้น

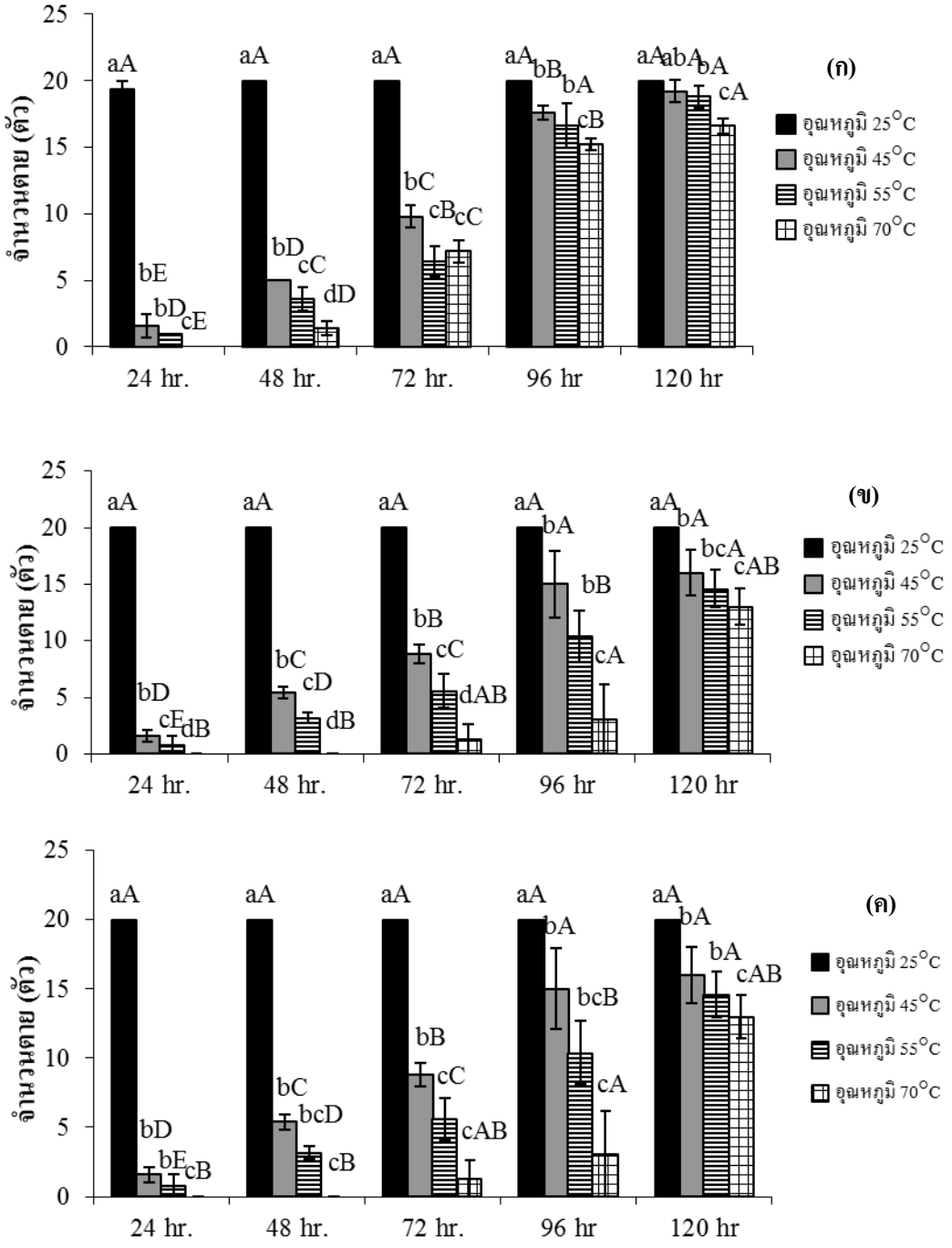
5.4 ผลของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่างๆ ต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน

จำนวนลูกน้ำยุงลายบ้านที่ตายหลังจากทดสอบด้วย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ภายใต้อุณหภูมิ 25, 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 10 น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) มีประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำได้ดีกว่าที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลูกน้ำตายทั้งหมดจากจำนวนที่ใช้ทดสอบ 20 ตัว ภายในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย

ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ส่วนน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบ ที่เก็บที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส ฆ่าลูกน้ำได้น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 72 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตาม ที่เวลา 96 และ 120 ชั่วโมง ลูกน้ำตายเพิ่มขึ้นโดยเฉพะอย่างยิ่งน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยที่พบจำนวนลูกน้ำตายมากกว่าแบบสำเร็จรูปและแบบ Soxhlet ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ซึ่งการตายของลูกน้ำดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารอะซาดิแรคตินที่ลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็นเวลา 42 วัน (ภาพที่ 7)

น้ำเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูปออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำได้เร็วกว่าแบบอื่นๆ เนื่องจากน้ำมันดังกล่าวคือ น้ำมันสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยผสมสารอิมัลซิฟายเออร์ (Tween®และ Span®) และสารต้านออกซิเดชั่น BHT โดยสารอิมัลซิฟายเออร์ ช่วยทำให้น้ำมันกระจายตัวได้ดีในน้ำทำให้ลูกน้ำมีโอกาสได้รับน้ำมันเข้าสู่ลำตัวได้เร็วขึ้น ส่วนสารต้านออกซิเดชั่น BHT ช่วยให้น้ำมันและสารอะซาดิแรคตินมีความคงตัวมากขึ้น ภัทรวรรณ และคณะ (2553) กล่าวว่าสารอิมัลซิฟายเออร์ Tween®และ Span® ที่ผสมกับน้ำมันกานพลู ทำให้อนุภาคของน้ำมันไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุการเก็บรักษา และยังมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียได้ดีกว่า เนื่องจากโครงสร้างของอิมัลชันเกิดการเรียงตัวรอบอนุภาคของน้ำมัน ทำให้เกิดความเสถียร นอกจากนี้ รมย์นลิน และคณะ (2556) กล่าวว่าน้ำมันสะเดาไทยที่ผสมกับสารอิมัลซิฟายเออร์และบีดส์ สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ทั้งหมดที่เวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

ถึงแม้ว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างทั้ง 3 แบบ ที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส ฆ่าลูกน้ำในช่วงแรกของการทดสอบได้ต่ำก็ตาม แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 120 ชั่วโมง จำนวนลูกน้ำตายเพิ่มขึ้นโดยในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยฆ่าลูกน้ำได้ในช่วง 83-96 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet อยู่ในช่วง 55-85 เปอร์เซ็นต์และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป อยู่ในช่วง 65-80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 20) ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมห้อง 25 องศาเซลเซียสดังกล่าวข้างต้น หรือกล่าวได้ว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยทนต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป ตามลำดับ



ภาพที่ 10 ผลของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ก) แบบ Soxhlet (ข) แบบสำเร็จรูป (ค) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน

หมายเหตุ: ABC เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ ($P<0.05$) ระหว่างชุดการทดลองในแต่ละทรีทเมนต์

abc เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ ($P<0.05$) ระหว่างทรีทเมนต์

(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากผลการทดลอง 5 ซ้ำ)

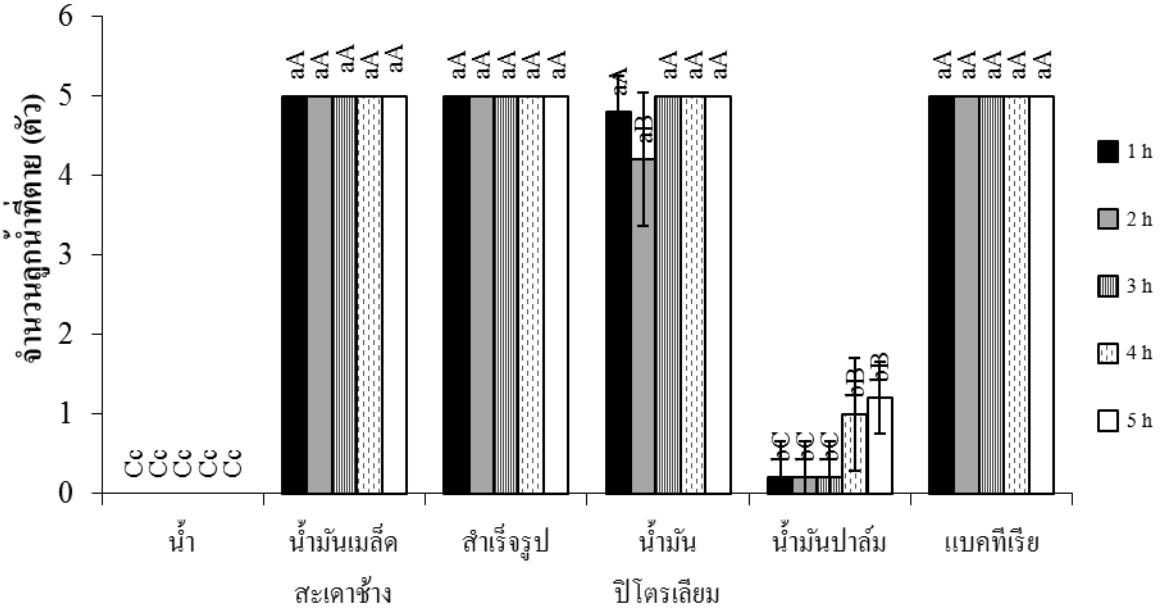
ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำที่เวลา 120 ชั่วโมง ของน้ำมันแต่ละอุณหภูมิ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำในน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง		
	แบบแช่ยุ่ย	แบบ Soxhlet	สำเร็จรูป
25	100	100	100
45	96	85	80
55	94	83	73
70	83	55	65

6. การศึกษากลไกการเข้าทำลายและการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายของผลิตภัณฑ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง

จากการทดสอบผลต่อการหายใจโดยการขัดขวางการการแพร่กระจายของออกซิเจนจากอากาศเข้าสู่ผิวน้ำด้วยชั้นของน้ำมันชนิดต่างๆ ต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* และชุดควบคุม (น้ำเปล่า) พบว่า น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป และแบคทีเรีย ทำให้ลูกน้ำยุงลายบ้านตายทั้งหมดอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 1 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่น้ำมันปิโตรเลียม พบลูกน้ำตายหมดภายในเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนน้ำมันปาล์มพบจำนวนลูกน้ำที่ตายน้อยมากภายใน 5 ชั่วโมงแรกของการทดลอง แต่พบว่า เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบลูกน้ำตายเกือบทั้งหมด ส่วนในชุดควบคุมไม่พบการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านแต่อย่างใด (ภาพที่ 11) ชี้ให้เห็นว่า กลไกหลักที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายบ้านตายของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันปิโตรเลียม ไม่ใช่การขัดขวางการรับออกซิเจนของชั้นน้ำมันที่เคลือบผิวน้ำ ในทางตรงข้ามกับน้ำมันปาล์มที่ทำให้ลูกน้ำตายเกือบทั้งหมดหลังจากทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง น่าจะเกิดจากการขาดออกซิเจนเป็นสาเหตุหลัก โดยชั้นของน้ำมันปาล์มที่เคลือบผิวน้ำส่งผลให้ลูกน้ำไม่สามารถแทงท่อหายใจขึ้นมารับออกซิเจนเหนือน้ำได้ ขณะเดียวกันเมื่อลูกน้ำพยายามแทงท่อหายใจขึ้นมาผ่านชั้นของน้ำมัน อาจทำให้น้ำมันอุดตันท่อหายใจ จึงไม่สามารถรับออกซิเจนได้และตายในที่สุด อภิวัฏ และคณะ (2540) กล่าวว่า น้ำมันซึ่งสกัดมาจากพืชมีลักษณะเหลว สีเหลืองอำพัน ไม่ละลายน้ำ สามารถฆ่าลูกน้ำและดักแด้ได้ด้วยกลไกการลดแรงตึงผิว (oil surfactant) ที่ทำให้ท่อหายใจของลูกน้ำ (siphon) และท่อหายใจของดักแด้ (trumpet) เสียคุณสมบัติในการป้องกันน้ำ คือ จากสภาพไม่ชอบน้ำ (hydrophobia) กลายเป็นสภาพชอบน้ำ (hydrophilia) และส่งผลต่อตัวโม่งมากกว่าลูกน้ำ เนื่องจากตัวโม่งจำเป็นต้องหายใจผ่านทาง trumpet ทางเดียวเท่านั้น (Kettle, 1984 และสุชาติ และคณะ, 2526) ผลการทดลองครั้งนี้ น้ำมันปาล์มให้ประสิทธิภาพต่ำสุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของยุวดี (2547) ที่ได้ทดสอบผลของน้ำมันชนิด

ต่างๆ ต่อลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 4 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันก๊าด สามารถฆ่าลูกน้ำได้ 100 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนน้ำมันเครื่องใหม่และน้ำมันเครื่องเก่าฆ่าลูกน้ำ 78 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันพืชฆ่าลูกน้ำยุงได้ต่ำเพียง 18 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น



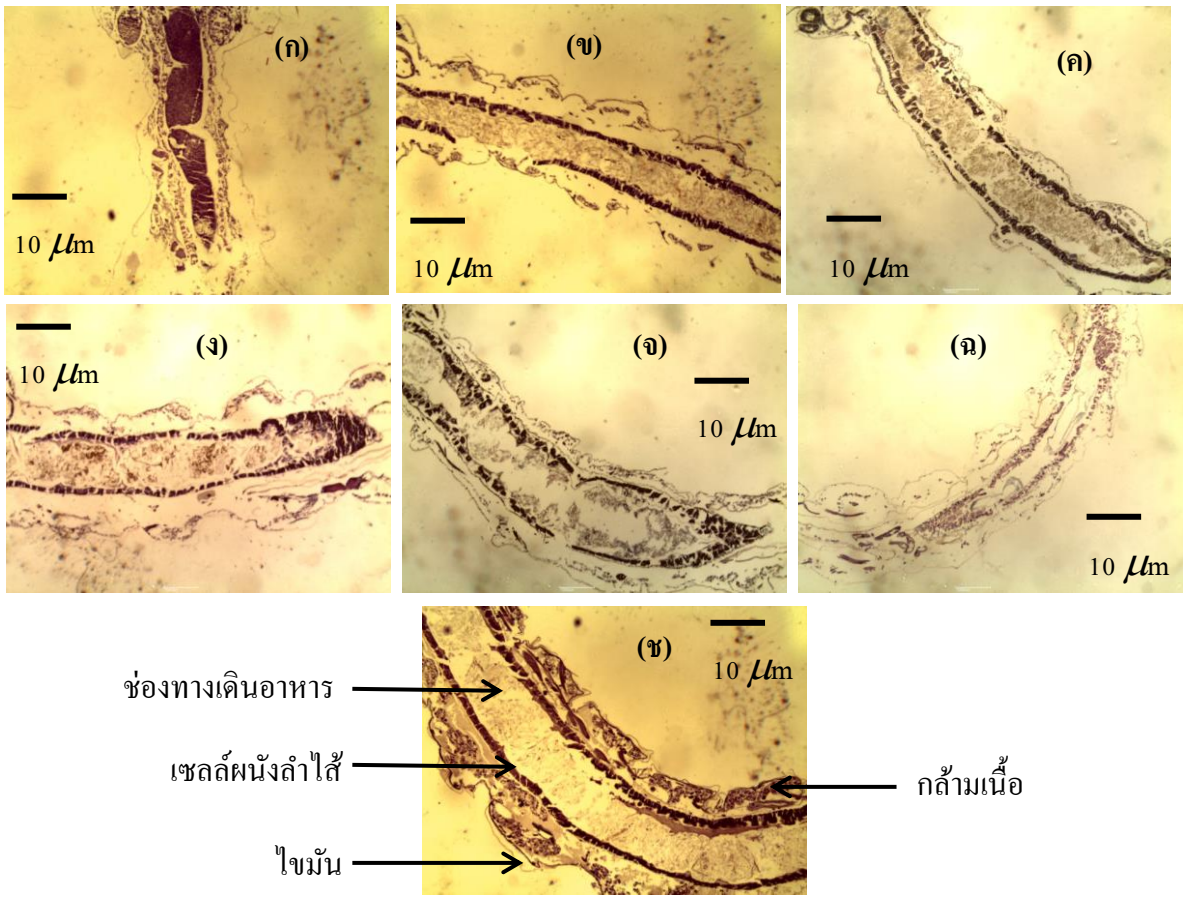
ภาพที่ 11 ผลของน้ำมันแต่ละชนิดและแบคทีเรียต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ABC เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ ($P<0.005$) ระหว่างชุดการทดลองในแต่ละทรีทเมนต์
abc เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ ($P<0.005$)ระหว่างทรีทเมนต์
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากผลการทดลอง 5 ซ้ำ)

เมื่อนำลูกน้ำที่ตายจากการได้รับสารทดสอบดังกล่าวข้างต้นรวมทั้งน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet ไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วนกลาง พบว่า สารทดสอบทุกชนิดทำให้โครงสร้างเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนกลางเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียนเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 12) โดยการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญได้แก่ เซลล์ผนังลำไส้ (epithelial cells) หลุดออกไม่เรียงตัวเหมือนปกติ โครงสร้างที่เป็นส่วนของกล้ามเนื้อและไขมันเปลี่ยนไป กรณีของลูกน้ำที่ตายจากน้ำมันปาล์มที่ตายช้ากว่าน้ำมันชนิดอื่นๆ แต่โครงสร้างของลำไส้ส่วนกลางเปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกันกับน้ำมันชนิดอื่นๆ จึงเป็นไปได้ว่าสาเหตุการตายที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลาอันสั้นของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันปิโตรเลียม น่าจะเกี่ยวข้องกับระยะเวลาที่ทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อ หรืออาจมีกลไกอย่างอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

น้ำมันต่างๆ ที่ใช้ทดสอบสามารถเข้าสู่ลำตัวลูกน้ำยุงลายบ้านได้หลายทาง เช่น อาจซึมเข้าทางผนังลำตัว (cuticle) เข้าทางท่อหายใจด้านท้ายลำตัวหรือลูกน้ำอาจกลืนกินน้ำมันเข้าไป หากได้รับโดยผ่านการกินเข้าไปจะเข้าไป ในเบื้องต้นจะเข้าทำลายเซลล์ผนังลำไส้ หากซึมผ่านผนังลำตัวจะเข้าสู่ช่องว่างในลำตัว น้ำมันจะถูกหมุนเวียนผ่านระบบเลือดเข้าสู่ลำไส้ส่วนกลาง เบื้องต้นกล้ามเนื้อและไขมันที่เป็นโครงสร้างของลำไส้ส่วนกลางจะถูกทำลาย หากซึมผ่านท่อหายใจ น้ำมันจะแทรกซึมผ่านระบบท่อลมเข้าสู่ลำไส้ส่วนกลาง ซึ่งเบื้องต้นกล้ามเนื้อและไขมันที่เป็นโครงสร้างของลำไส้ส่วนกลางจะถูกทำลาย ดังแสดงในภาพที่ 12 จึงกล่าวได้ว่า น้ำมันที่ใช้ทดสอบจึงมีโอกาสเข้าสู่ลำตัวลูกน้ำยุงได้พร้อมกันทั้ง 3 ช่องทางดังกล่าว

เอกราช (2552) พบว่าลูกน้ำที่สัมผัสกับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างมีลำไส้แคบลง การจัดเรียงตัวของเซลล์ผนังลำไส้เริ่มไม่เป็นระเบียบ เนื่องจากมีเซลล์บางเซลล์เปลี่ยนรูปทรงจากแท่งเป็นลูกบาศก์ และแตกออกจากกันในที่สุด เป็นสาเหตุให้ส่วนของไซโตพลาสมิกหลุดเข้ามาในช่องทางเดินอาหาร Raymond และคณะ (2007) รายงานว่าสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาอินเดียเข้าไปรบกวนการไหลของของเหลวภายในช่องทางเดินอาหารหลังจากที่เซลล์ผนังทางเดินอาหารแตก จนเป็นสาเหตุให้ลูกน้ำตาย นอกจากนี้ Koua และคณะ (1998) พบว่าสารสกัดจากพืช (*Persea americana*) ทำให้เซลล์ผนังลำไส้ของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางยุงก้นปล่องขยายตัวและแตก



ภาพที่ 12 ภาพตัดตามยาวทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) แสดงโครงสร้างของไขมัน (adipose fabric) กล้ามเนื้อ (muscle) เซลล์ผนังลำไส้ (epithelial cells) และช่องทางเดินอาหาร (alimentary canal) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X ของลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ตายเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (ก); น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย (ข); น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet (ค); น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป (ง); น้ำมันปิโตรเลียม SK 99® (จ); น้ำมันปาล์ม (ฉ) และชุดควบคุม (น้ำเปล่า)

สรุป

น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยและน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet มีองค์ประกอบของ oleic acid เป็นหลักซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว จะเหม็นหืนเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนหรือมีน้ำผสมอยู่ ดังนั้นหากจะพัฒนาน้ำมันดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมแมลง จะต้องเก็บไว้ในภาชนะที่สะอาดและแห้งในสภาพอุณหภูมิต่ำและไม่ถูกแสงสว่าง หรืออาจเติมสารกันหืน เช่น BHA หรือ BHT ลงไป แม้ว่าองค์ประกอบของชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำมันแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในน้ำมันแบบ Soxhlet ต่ำกว่าแบบแช่ยุ่ย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการสกัดดังกล่าวต้องผ่านความร้อนอยู่ตลอดเวลา แต่อย่างไรก็ตาม น้ำมันแบบ Soxhlet ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ดีกว่า ส่วนน้ำมันแบบแช่ยุ่ยยับยั้งการฟักไข่และไล่ยุงตัวเต็มวัยได้ดีกว่า ส่วนการยับยั้งการเจริญเติบโตเข้าสู่ดักแด้และตัวเต็มวัยของน้ำมันทั้ง 2 แบบดังกล่าวให้ผลใกล้เคียงกัน สาร piperonyl butoxide (PBO) ไม่ช่วยเสริมฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันทั้งแบบแช่ยุ่ยและแบบ Soxhlet แต่น้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัสช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่ยุงลายบ้านของน้ำมันทั้ง 2 แบบ การผสมน้ำมันแบบแช่ยุ่ยกับน้ำมันตะไคร้หอม สัดส่วน 8:2 ช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่มากกว่าการผสมกับน้ำมันแบบ Soxhlet ในทางตรงกันข้าม หากผสมน้ำมันแบบ Soxhlet กับน้ำมันยูคาลิปตัส สัดส่วน 8.5:1.5 ช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่มากกว่าการผสมกับน้ำมันแบบแช่ยุ่ย

ส่วนการทดสอบอายุการเก็บรักษาโดยสภาวะเร่ง สามารถเรียงลำดับอายุการเก็บรักษาจากมากไปหาน้อย คือ น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ย > น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบ Soxhlet > น้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูป และเมื่อเก็บรักษาน้ำมันทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำให้น้ำมันมีสีเข้มขึ้น ปริมาณกรดไขมันและค่าเพอร์ออกไซด์สูงขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น ในทางตรงข้าม ผลการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เมื่อใส่น้ำมันแบบแช่ยุ่ยและแบบสำเร็จรูป และน้ำมันปิโตรเลียมเป็นชั้นหนาบนผิวน้ำ ทำให้ลูกน้ำตายอย่างรวดเร็วภายใน 1-3 ชั่วโมง ส่วนน้ำมันปาล์มทำให้ลูกน้ำตายช้า ดังนั้นการขัดขวางการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศเข้าสู่ผิวน้ำของน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างและน้ำมันปิโตรเลียม ไม่ใช่เป็นกลไกหลักต่อการตายของลูกน้ำ แต่ลูกน้ำที่ได้รับน้ำมันดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด รวมทั้งแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ทำให้เซลล์ผนังลำไส้และโครงสร้างที่เป็นส่วนของกล้ามเนื้อและไขมันของลูกน้ำยุงลายบ้านเปลี่ยนแปลงไป

โดยสรุปการสกัดน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างแบบแช่ยุ่ยน่าจะดีกว่าการสกัดแบบ Soxhlet แม้ว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงลายบ้านไม่แตกต่างอย่างเด่นชัดกับการสกัดแบบแช่ยุ่ยก็ตาม แต่มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานกว่าอย่างเด่นชัด เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างสำเร็จรูปซึ่งผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพ Tween® และสาร BHT ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมยุงลาย แต่มีอายุการเก็บรักษาสั้นที่สุด จากการประเมินโดย

สภาวะเร่งซึ่งต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูงภายในระยะเวลาจำกัด ดังนั้นควรศึกษาเพิ่มเติมอายุการเก็บรักษาของน้ำมันสำเร็จรูปในสภาพอุณหภูมิห้องปกติที่ใช้เวลานานอย่างน้อย 2 ปี เพื่อทราบอายุการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้องอย่างแท้จริง นอกจากนี้ น้ำมันน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันยูคาลิปตัส ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อไล่ยุง มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านร่วมกับน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างเพื่อลดการใช้สาร temephos หรือทรายอะเบท® ซึ่งมีรายงานการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวของลูกน้ำยุงลายบ้านในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2543. ไข้เลือดออกและการควบคุมยุงพาหะนำโรค. กลุ่มงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และ ฝ่ายประชาสัมพันธ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. [Online]. Available from: http://www.a4s-thai.com/mcontents/marticle.php?headtitle=mcontents&id=38743&Ntype=1. Accessed on 23/09/05.

กีรตินาฏ พูลเกษร, อนุวัตร แจ้งชัด และกมลวรรณ แจ้งชัด. 2553. การประเมินอายุการเก็บรักษาของสารป้องกันการเกาะติดโดยใช้วิธีเร่งสภาวะ. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2553. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ขวัญชัย สมบัติศิริ, กมล โรจน์ประสิทธิพร และวิธิตา เลิศมงคล. 2540. ผลของเครื่องสกัดสะเดาที่ใช้และไม่ใช้ความร้อนต่อการได้สารอะซาดิแรคติน และการป้องกันกำจัดเพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii*). รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 26 สาขาพืช 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

งามผ่อง คงคาทิพย์ และขวัญชัย สมบัติศิริ. 2539. ปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของอะซาดิแรคตินในสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 34 สาขาวิทยาศาสตร์, วิศวกรรมศาสตร์, อุตสาหกรรมเกษตร, คหกรรมศาสตร์, การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม, ศึกษาศาสตร์, สังคมศาสตร์, เศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิรดา สิงขรรัตน์ และนุชนาฏ เสือเล็ก. 2556. การวิเคราะห์ปริมาณของแคทเทชินในน้ำมันเมล็ดชาจากต้นคาเมลเลียโอเลเฟราเอเบล. วารสารวิชาการเทคโนโลยีอุตสาหกรรม 9: 59-67.

ชาตรี เอี้ยพิณ และภาราได แจ่มจำรูญ. 2550. ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อสมบัติการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของหัวหอมใหญ่อบแห้ง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 38: 139-142.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2548. วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

บุญรอด วงษ์สวาท. 2015. การเหม็นหืน. [ออนไลน์] จาก: http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/radicy.htm. (20 พฤษภาคม 2559).

ปิยกร บุญยัง. 2550. การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ. ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์. สงขลา.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. Lipid oxidation. [ออนไลน์] จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/395/lipid-oxidation. (13 ธันวาคม 2556).

ภัทรวรรณ หมกทอง, พาสวดี ประทีปะเสน, สุเมธ ตันตระเธียร และสุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์. 2553. ผลของตัวอิมัลชันต่อความเสถียรและประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2553. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มานิต นาคสุวรรณ. 2543. ประสิทธิ์ภาพของสารสกัดสะเดาและน้ำมันสะเดาต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ. *ว. กีฏ. สัตว.*, 22: 138-150.

ยุวดี ช้างแก้ว. 2547. ประสิทธิภาพของน้ำมันชนิดต่างๆ ในการกำจัดลูกน้ำและตัวโม่งของยุงรำคาญ. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 19 หน้า.

รติยา คูเขตพิทักษ์วงศ์, สังวาล สมบูรณ์, สุภาณี พิมพ์สมาน และวัชรี คุณกิตติ. 2546. การเปรียบเทียบปริมาณสาร azadirachtin และฤทธิ์การยับยั้งการกินของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาสามชนิดต่อหนอนใยผัก. วารสารวิจัยมหาวิยาลัยขอนแก่น 8: 11-17.

รมย์นลิน เขียนจูม, วงเดือน ปั้นดี, สุภาวดี บุญชื่น, สุเทพ ศิลปานันทกุล และขวัญชัย สมบัติศิริ. 2556. ประสิทธิภาพและความคงทนของน้ำมันสะเดาไทยต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30 สาขาพืช 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2553. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2548. การประเมินอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารในสภาวะเร่ง. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วริษฎา ศิลาอ่อน, ศิริมา สังคพัฒน์, จิรณา อนันต์สุชาติกุล และวรรณพร วัฒนวงษ์. 2551. การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของยาน้ำเชื่อมมอร์ฟีนซัลเฟต. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 4: 134-139.

วิภาวดี ชำนาญ. 2548. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาช้างเพื่อไล่ยุงรำคาญ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สนั่น ศุภธีรสกุล, สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์, ปาริชาต ปาลินทร และทิวา บุตรผา. 2543. การศึกษาฤทธิ์ของพืชบางชนิดในท้องถิ่นภาคใต้ประเทศไทยต่อการตายของหนอนใยผัก. วารสารสงขลานครินทร์ 22: 447-455.

สมเดช กนกเมธากุล ขวัญใจ กนกเมธากุล และถิรดา ประจวบสุข. 2553. องค์ประกอบทางเคมีจากเนื้อในเมล็ดสะเดาช้าง. (ออนไลด์). สืบค้นจาก: http://www.scisoc.or.th/stt/28/web/content/C_03/C23.htm. (ค้นเมื่อ 21 สิงหาคม 2553).

สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า. 2550. คู่มือปฏิบัติการความปลอดภัยอาหาร 2. เอกสารประกอบการเรียน คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ.

สุชาติ อุปถัมภ์, สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, วนิดา นาควัชระ, เนาวรัตน์ ศุขพันธุ์, ปัทมาภรณ์ กิตยารักษ์ และ ชูศักดิ์ ประสิทธิสุข. 2526. กีฏวิทยาทางการแพทย์ (Medical Entomology). กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. 578 หน้า.

สุนทร พิพิธแสงจันทร์, สนั่น ศุภธีรสกุล และสุจิรัตน์ ศรีตังนันท์. 2548. การขับไล่และยับยั้งการวางไข่ในแมลงวันแตง (*Bactocera cucurbitae* Coq., Diptera : Tephritidae) ของน้ำมันและสารสกัดหยาบเมล็ดสะเดาช้าง. วารสารสงขลานครินทร์ 28: 121-135.

สุวิมล อริยะประกาย, ธนโชติ ลิมปโชติ และพาสวดี ประทีปปะเสน. 2554. ผลของกระบวนการเกี่ยวเนื่องกับความร้อนต่อสมบัติอิมัลชั่นน้ำกะทิที่ใช้ซูโครสเอสเตอร์เป็นอิมัลซิไฟเออร์เปรียบเทียบกับทวิน. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 49 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร 1 - 4 กุมภาพันธ์ 2554. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิวัฏ ธวัชสิน, อุษาวดี ถาวระ และ ประคอง พันธ์อุไร. 2540. การกำจัดลูกน้ำและตัวโม่งของยุงพาหะโดยใช้น้ำมันลดแรงตึงผิว (Oil Surfactant). *ว. กระทรวงสาธารณสุข,* 16:75-82.

อรัญ งามผ่องใส สนั่น ศุภธีรสกุล และธีระพล ศรีชนะ. 2552. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันและสารสกัดหยาบเมล็ดสะเดาช้างเพื่อควบคุมยุงลายบ้าน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะทรัพยากรธรรมชาติและคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา.

อัญชลี สงวนพงษ์. 2541. การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาจากการใช้อุณหภูมิอบแห้งระดับต่างๆ. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 36 สาขาพืช. 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2541. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุษาวดี ถาวระ, อภิวัฏ ธวัชสิน, ฤทัยรัตน์ ศรีธมรัตน์, ปณวรรณ ปุโรทกานนท์. 2546. สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. กระทรวงสาธารณสุข. 72 หน้า.

เอกราช แก้วนางโอ. 2552. การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันและสารสกัดหยาบเนื้อในเมล็ดสะเดาช้าง (*Azadirachta excels* Jack.) เพื่อควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linnaeus). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Albuquerque, M.R.J.R.; Silveira, E.R.; Uchoa, D.E. de A.; Lemos, T.L.G.; Souza, E.B.; Santiago, G.M.P.; Pessoa, O.D.L.; 2004. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from Eupatorium betonicaeforme (D.C.) Baker (Asteraceae). *Journal of agricultural and food chemistry,* 52: 6708-6711.

Ansari, M.A. and Razdan, R.K. 1996. Operational feasibility of malaria control by burning neem oil in kerosene lamp in Beel Akbarpur village, distric Ghaziabad. *Indian J. Malariol.* 33: 81.

Ansari, M.A., Razdan, R.K., Tandon, M. and Vasudevan, P. 2000. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sisoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. *Bioresource Technol.,* 73: 207.

Ansari, M.A., Vasudevan, P., Tandon, M. and Razdan, R.K. 1999. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha* piperita) oil. *Bioresource Technol.,* 71: 267.

Awad, O.M. and Shimaila, A. 2003. Operational use of neem oil as alternative anopheline larvicide. Part A: laboratory and field efficacy. *Eastern Mediterranean Health Journal,* 9:637-645.

Batra, C.P., Mittal, P.K., Adak, T. and Sharma, V.P. 1998. Efficacy of neem-water emulsion against mosquito immatures. *Indian J. Malariol.,* 35: 15.

Braga, I.A., Lima, J.B.P., Soares, S.S. and Valle, D. 2004. *Aedes aegyptei* Resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro. 99: 199-203.

Chahad, S. and Boof, M.I.C. 2004. Effect of black-pepper extracts on the larvae of *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), *An Soc Entomol Bras* 23: 13–18.

Dhar, R., Dawar, H., Garg, S.S., Basir, F. and Talwar, G.P. 1996. Effect of volatiles from neem and other natural products on gonotrophic cycle and oviposition of *Anopheles stephensi* and *An. culicifacies. J. Med. Entomol.,* 33: 257.

Dua, V.K., Nagpal, B.N. and Sharma, V.P. 1995. Repellent action of neem cream against mosquitoes. *Indian J. Malariol.* 32: 47.

EPA. 1991. Azadirachtin Biochemical Pesticide. Response to Product Chemistry Data Deficiencies. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-121701_12-Nov-91_21.pdf.

Ermel, K., E. Pahlich and Schmutterer, H. 1987. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity and lights. In H. Schmutterer and K.R.S.Ascher (Ed.). Proc. 3rd Int.

Ezeonu, F.C., Chidume, G.I. and Udedi, S.C. 2001. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Bioresource Technol.,* 76: 273.

Jadeja, G.C., Maeshwari, R.C. and Naik, S.N. 2011. Extraction of natural insecticide azadirachtin from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernels using pressurized hot solvent. Journal of Superfluids 56: 253-258.

Kant, R. and Bhat, R. M. 1994. Field evaluation of mosquito repellent action of neem oil. *Indian Journal Malariology*, 31: 122-125.

Kettle, D.S. 1984. Medical and Veterinary Entomology. Croom Helm Ltd., Kent.

Koua, H.K., Han, S.H. and Almeida, M.A. 1998. Histopathology of *Anopheles gambiae* subjected to the larvicidal activity of the aqueous extract of *Persea americana* Miller. Bulletin of Society Pathology Exotic 3: 252-256.

Marugan, R. and Parimelazhagan, T. 2014. Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – An *in vitro* approach. Journal of King Saud University - Science.26: 267-275.

Mishra, A.K., Singh, N. and Sharma, V.P. 1995. Use of neem oil as a mosquito repellent in tribal villages of Mandla distt. Of Madhya Pradesh. *Indian J. Malariol.,* 32: 99.

Mitchell, M. J., Smith, S. L., Johnson, S. and Morgan, E. D. 1996. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35: 199-209.

Moore, S.A., Lenglet, A. and Hill, N. 2002. Field evaluation of three plants based insect repellents against malaria vectors in VACA diE2 Province of the Bollivian Amazon. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.,* 18:107.

Murty, U.S., Sriram, K. and Kaiser, J. 1997. Effect of leaf extract of *Polyalthia longifolia* (Fimaly: Annonaceae) on mosquito larvae and pupae of *Culex quinquefasciatus* (diptera: Culicidae) of different habitats. *Int. Pest Cont.,* 39:52.

Nagpal, B.N., Srivastava, A. and Sharma, V.P. 1995. Control of mosquito breeding using wood scrappings treated with neem oil. *Indian J. Malariol.,* 32: 64.

Nagpal, B.N., Srivastava, A., Valecha, N. and Sharma, V.P. 2001. Repellent action of neem cream against *An. culicifacies* and *Culex quinquefasciatus. Curr. Sci.,* 80:1270.

Naqvi, S. N. H., Ahmed, S. O. and Mohammad, F. A. 1991. Toxicity and IGR effect of two neem products against *Aedes aegypti* (PCSIR strain). *Pakistan Journal Pharmacy Science*, 1: 71-76.

Naqvi, S. N. H., Temuri, K. H., Nurulain, S. M., Tabassum, R. and Ahmad, I. 1994. Toxicity and IGR effect of Neem Fractions in *Aedes aegypti* (PCSIR Strain). *Pakistan Journal Entomology*, 2: 83-90.

Pathak, N., Mittal, P.K., singh, O.P., Sagar, V. and Vasudevan, P. 2000. Larvicide action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston) *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypte* (L.). *Int. Pest Cont.,* 42:53.

Perich, M.J., Wells, C., Bertsch, W. and Tredway, K.E. 1994. Toxicity of extracts from three Tagetes species against adults and larvae of yellow fever mosquito and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.,* 31:834.

Ping, J., Xiaojun, P. and Shanhuan, Z. 1994. Toxicity and growth-regulating activity of a neem seed kernel extract (AZAL-S) to the larvae of *Culex quinquefasciatus*. *Insect Science*, 2: 64-69.

Prakash, A. and Rao, J. 1996. Botanical Pesticides in Agriculture. Lewis Publisher, New York.

Rao, D.R., Reuben, R., Venugopal, M.S., Nagasampgi, B.A. and Schmutterer, H. 1992. Evaluation of neem-*Azadirachta indica* with and without water management for the control of culicine mosquito larvae in rice field. *Med. Vet. Entomol.,* 6: 318.

Raymond, D. N., Faye, O., Ndiaye, M., Dieye, A. and Afoutou, J. M. 2007. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *African Journal of Biotechnology*, 6: 2,846-2,854.

Saelim, V., Kankaew, P and Sithiprasasna, R. 2005. Temephos resistance by bottle and biochemical assays in *Aedes aegypti* in Thailand. Pattani Provincial Public Health Office, Muang District, Pattani, Thailand. [Online]. Available from: http://esa.confex.com/esa/2004/techprogram/paper_14849.htm. Accessed on 11/09/05.

Saxena, R.C., Dixit, O.P. and Sukumaran, P. 1992. Laboratory assessment of indigenous plant extracts for anti-juvenile hormone activity in *Culex quinquefasciatus, Indian J. Med. Res.,* 95:204.

Saxena, R.C., Harshan,V., Saxena, A., Sukumaran, P., Sharma, M.C. and Lakshmana Kumar, M. 1993. Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi. J. Am. Mosq. Cont. Assoc.,* 9:84

Sharma, S.K., Dua, V.K. and Sharma, V.P. 1995. Field studies of the repellent action of neem oil. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.,* 26:180.

Sharma, S.K., Thomas, T.G., Rahman, S.J. and Dutte, K.K. 1996. Laboratory and field evaluation of oil of neem plant, *Azadirachta indica* as a repellent against *Aedes aegypti* mosquito. *J. Basic Appl. Biomed.,* 4:35.

Sharma, V.P. and Ansari, M.A. 1994. Personal protection from mosquitoes (Diptera: Culicidae) by burning neem oil in kerosene. *J. Med. Entomol.,* 31: 505.

Sharma, V.P., Ansari, M.A. and Razdan, R.K. 1993a. Mosquito repellent action of neem (*Azadirachta indica*) oil. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.,* 9: 359.

Sharma, V.P., Nagpal, B.N. and Srivastava, A. 1993b. Effectiveness of neem oil mats in repelling mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* 87: 626.

Silva, I.G., Zanon, V.O.M. and Silva, H.H.G. 2003. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae). *Neotropical entomology,* 32: 729-732.

Singh, N., Mishra, a.K. and Saxena, A. 1996. Use of neem cream as a mosquito repellent in tribal areas of central India. *Indian J. Malariol.* 33: 99.

Singh, S.P., Raghavendra, K., Singh, R.K. and Subbarao, S.K. 2002. Studies on larvicidal properties of leaf extract of *Solanum nigrum* Lin. (Family: Solanaceae). *Curr. Sci.,* 81: 1529.

Su, T. and Mulla, M.S. 1999. Oviposition bioassay responses of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus., Entomologia experimentalis et applicata,* 91: 337.

Tripathi, A.K.; Prajapati, V.; Ahmad, A.; Aggarwal, K.K.; Khanuja, S.P.S. 2004. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector Anopheles stephensi (Diptera: Anophelinae). *Journal of medical entomol*ogy, 41: 691-698.

Umar, A., Kela, S. L., Ogidi, S. L. and Asadabe, J. 2006. Susceptibility of *Aedes aegypti* pupae to neem seed kernal extracts. *Animal Research International*, 1: 403-406.

Vatandoost, H. and Vaziri, V. M. 2004. Larvicidal activity of a neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 10: 573-581.

WHO. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insect development inhibitors. Geneva. 812 p.

Wirth, M.C. and Ceorghiou, C.P. 1999. Selection and characterization of temephos resistance in a population of Aedes aegypti from Tortola, British Virgin Islands. J Am Mosq Control Assoc., 15:315-20.

Yakkundi, S.R., Thejavathi, R. and Ravindranath, B. 1995. Variation of azadirachtin content during growth and storage of neem (*Azadirachta indica*) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43: 2517-2519.

Zehnder, G. and Warthen, J. D. 1988. Feeding inhibition and mortality effects of neem-seed extract on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae).
DOI: http://dx.doi.org/10.1093/jee/81.4.1040 .

ภาคผนวก

1. วิธีการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อยุงลายบ้าน (ปิยกร บุญยัง, 2550)

วิธีการทดลอง

1. การดองตัวอย่าง (fixation) ดองตัวอย่างลูกน้ำที่จะนำไปทำสไลด์ด้วยฟอร์มาลีน ร้อยละ 10 เพื่อรักษาเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพเดิมและถาวร

2. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (tissue processing) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

-การเอาน้ำออก (dehydration) ใช้เอธิลแอลกอฮอล์เข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์เนื้อเยื่อของลูกน้ำยุงลายบ้าน

- การทำให้ใส (clearing) ทำเนื้อเยื่อให้ใสด้วยไซลีน เนื่องจากไซลีนสามารถเข้าไปแทนที่เอธิลแอลกอฮอล์ในเซลล์เนื้อเยื่อได้ดี

- การฝังตัวอย่างลูกน้ำลงบล็อก (embedding and blocking) ทำการฝังตัวอย่างลูกน้ำลงพาราพลาสเพื่อเสริมให้เนื้อเยื่อมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น

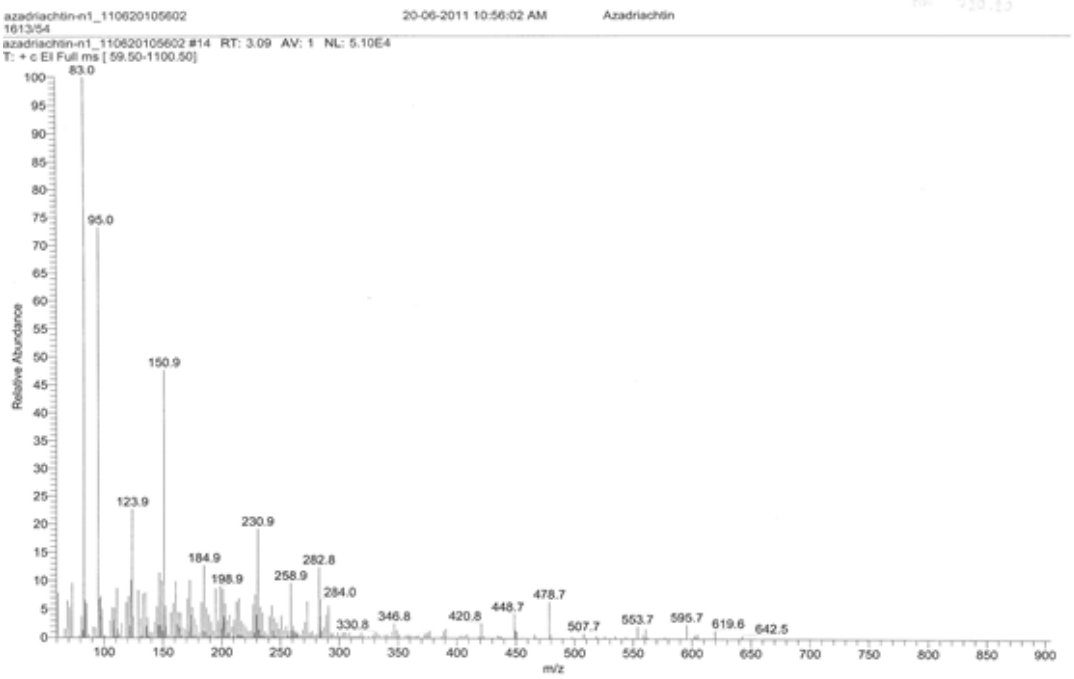
3. การตัดให้บางด้วยเครื่องไมโครโตม (sectioning by microtome) เตรียมหน้าบล็อกตัวอย่างให้พร้อม แล้วนำมาตัดให้บางประมาณ 5-7 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโตม

4. การย้อมสี (staining) ใช้สีฮีมาโตไซลิน (hematocylin) และอิโอซิน (eosin) ในการย้อมสไลด์ เมื่อได้สไลด์นำไปส่องใต้กล้องเพื่อเปรียบเทียบความเสียหายระบบทางเดินอาหารของลูกน้ำยุงลายบ้าน

2. การเตรียมข้อมูลสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 1 Peak area ของสารอะซาดิแรกตินมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นสารอะซาดิแรคติน	Peak area ของสารอะซาดิแรกตินที่วิเคราะห์ด้วย HPLC			
(μg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
100	73925527	72507701	82797516	76410248
200	101903230	111367942	96909254	103393475
300	125470295	129239411		127354853
400	150715224	152540728	133328093	145528015



ภาพผนวกที่ 1 แมสสเปกตรัมของสารอะซาดิแรคตินมาตรฐาน เป็นของแข็ง สีขาวทึบ มีสูตรโมเลกุล $C_{35}H_{44}O_{16}$ และมวลโมเลกุล 720.7 กรัมต่อโมล