



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2563

Vol. 62 No. 4 October - December 2020



ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ
ศึกษาด้านบริหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
นพ.ศุภกิจ ศิริลักษณ์
นพ.พีเชฐ บุญยัติ
นพ.สมฤกษ์ จิงสมาน

ที่ปรึกษาด้านวิชาการ

นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.สุมล ปิตรานนท์
ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.เดือนถนนม พรหมชาติแก้ว
ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ

บรรณาธิการ

รองบรรณาธิการ

ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน ดร.เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ
ดร.ประไพ วงศ์สินคณัน
นางสิริภากร แสงกิจพร

คณะบรรณาธิการ

ศ.เกียรติคุณ ดร.ไพโรจน์ พุฒินันท์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร.दनัย ทิวาเวช มหาวิทยาลัยนเรศวร
ภญ.สุวรรณา จารุณช มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ดันติมาวานิช มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
รศ.ดร.พญ.ชนิตรา ฐาจิตร มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.พญ.พัฒนทิพย์ พงษ์เพชร นักวิชาการอิสระ
ดร.อุษาวดี ถาวรระ นักวิชาการอิสระ
นายสุธน วงษ์ศรี นักวิชาการอิสระ
นางวิษชุดา จริยะพันธุ์ นักวิชาการอิสระ
ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา นักวิชาการอิสระ
ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ดร.วันทนา ปิณฑิตติพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ฝ่ายจัดการ

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวประสาน จุลวงษ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวอภิมน จิรพงศ์ธร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นายนาวิ ศรีธรรมย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กำหนดออก

อัตราสมาชิก

ราย 3 เดือน
ในประเทศปีละ 200.- บาท
ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา

สำนักงานวารสาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000
โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297

พิมพ์ที่

บริษัท ธนอรุณการพิมพ์ จำกัด
457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200
โทร. 0-2282-6033-4

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2563

Vol. 62 No. 4 October - December 2020

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การตรวจจีโนมหัตถ์เป็ดตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์โดยวิธี **real-time PCR** ด้วยคูไพรเมอร์ **CDY-1** 284
นวลจันทร์ วัชรณจินดา วิมาลา อินอุ้นโชติ สุกัญญา วัฒนาโกศลกิจ ไทเชะ มุขิโรตะ และสุริศเมธ มหาศิริมงคล
- ความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของน้ำมันจระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 297
ผสมกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker)
ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar
อมร ประดับทอง ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว จินดาวรรณ สิริพันธ์วณิช สุดาวรรณ เขยชมศรี และวิน เขยชมศรี
- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา 305
ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง
สดุดี รัตนจรัสโรจน์ วารุณี จิรวัดนาพงศ์ ณัฐพร พลแสน นิธิดา พลโคตร ยุวดี เมตตาเมธา ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง และประภม ทองศรีรักษ์
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงสูตลดและประสิทธิภาพ 330
การใช้เพื่อควบคุมยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์ธรรมชาติ
พื้นที่ชายแดนไทย
อุรุณากร จันทรแสง นิตยา เมธาวณิชพงศ์ จิตติ จันทรแสง นันทพร ผลสุวรรณ
พรธิดา เพชรสุวรรณ พรชัย วิริยะศรานนท์ ดนพร สารพฤกษ์ และบัลลังก์ อุปพงษ์
- ประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดยุงลายบ้านโดยการปล่อยละอองแบบกึ่งภาคสนาม 343
จิราภรณ์ เสวะนา บุษราคัม สีนาคม และบุญเสริม อ่วมอ่อง
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ต้านทานต่อสารเคมี 352
กำจัดแมลงจากน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไมโครอิมัลชัน
ภาณุกิจ กันหาจันทร์ ศรีสุดา สมัยใหม่ จักรวาล ชมภูศรี สรียา เรืองพัฒน์พงศ์ พายุ ภักดีนวน
ชญาดา ขำสวัสดิ์ นาวิ ศรีธรรมย์ และเกรียงศักดิ์ ฤทธาศวัต

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

สำรวจการปนเปื้อนพยาธิในผักสดและผลไม้สดจากตลาดสด 5 ภูมิภาคของประเทศไทย ชั้นทอง เพ็ชรนอก และกนกวรรณ ตุ่นสกุล	372
การปลอมปนสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรในจังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ระหว่าง พ.ศ. 2559-2562 สมฤดี บุญมี และพิมลดา ไชยรัตน์	384

บทความพิเศษ

เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพต่องานบริการห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข วัลลวีรัตน์ พบศิริ	395
ดัชนีชี้วัดผู้จำหน่าย	401
ดัชนีชี้วัดเรื่อง	409

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2563

Vol. 62 No. 4 October - December 2020

CONTENTS

Page

Original Articles

- Human Gender Genotyping Using real-time PCR with *CDY-1* Primers** 284
Nuanjun Wichukchinda Wimala Inunchot Sukanya Wattanapokayakit
Taisei Mushiroda and Surakameth Mahasirimongkol
- Acute Oral Toxicity of Mixed *Crocodylus siamensis* Oil and *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker in Wistar Rats** 297
Amon Praduptong Passaraporn Srimangkornkaew Jindawan Siruntawinetti
Sudawan Chaeychomsri and Win Chaeychomsri
- Antioxidative and Neuroprotective Activities of *Oroxylum indicum* Stem Bark Extracts in Mouse Neuroblastoma Cells** 305
Sadudee Rattanajarasroj Warunee Jirawattanapong Nattaporn Polsan
Nithida Phonkot Yuwadee Mettametha Sakwichai Ontong and Pratom Tongsrirak
- Development of the Tablet Bacterial Larvicide Formulation and the Effectiveness against Thai-border Population Strains of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*** 330
Uruyakorn Chansang Nittaya Methawanitpong Chitti Chansang
Nuntaporn Phonsuwan Porntida Petsuwan Pornchai Wiriyasaranont
Danaporn Saraprug and Ballang Uppapong
- Efficacy of Insecticides for *Aedes aegypti* Control by Ultra-Low-Volume Application in Semi-field Condition.** 343
Jiraporn Sevana Bussarakum Sinakom and Boonserm Aumaung
- Development of Essential Oils-based Microemulsion Larvicide Product for Control of Insecticide-resistant Strain of *Aedes aegypti* Mosquito Larvae** 352
Phanukit Kunhachan Srisuda Samaimai Jakkrawarn Chompoosri
Sareeya Reungpatthanaphong Payu Bhakdeenuan Chayada Khumsawad
Navy Srivarom and Kriangsak Ruchusatsawat

Laboratory Findings

- A Survey on Parasitic Contamination in Fresh Vegetables and Fresh Fruits from 5 Regional Markets of Thailand** 372

Kuntong Pednog and Kanogwan Toonsakool

- Adulteration of Traditional and Herbal Medicines with Steroids in Krabi, Phang-nga and Phuket During 2016-2019** 384

Somruedee Boonmee and Pimollada Chairat

Special Article

- Quality Function Deployment for Services in Public Health Laboratory** 395

Vallerut Pobkeeree

- Author Index** 401

- Title Index** 409



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้ เป็นฉบับประจำปีี่ 62 ฉบับที่ 4 ส่งท้ายปีพุทธศักราช 2563 โดยได้มีการปรับเปลี่ยนกองบรรณาธิการเนื่องจากมีนักวิชาการผู้ทรงคุณวุฒิประจำกองบรรณาธิการและที่ปรึกษาหลายท่านเกษียณอายุราชการ ซึ่งคณะกองบรรณาธิการผู้มารับหน้าที่ใหม่จะได้สืบสานการจัดทำวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ให้มีคุณภาพทางวิชาการในระดับสูงสำหรับการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิชาการทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไป นอกจากนี้ยังได้มีการปรับปรุงรูปแบบหน้าปกของวารสารให้มีความสดใสและสอดคล้องกับเนื้อหาสาระทางวิชาการที่ตีพิมพ์ภายในฉบับ โดยมีเนื้อหาของบทความวิชาการที่เป็นนิพนธ์ต้นฉบับ ได้แก่ การตรวจจีโนมหัตถ์ตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์โดยวิธี real-time PCR ความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของน้ำมันจะเข้ผสมกระชายดำ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมยุงลายพาหะโรคไข้เลือดออกรายงานทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการสำรวจการปนเปื้อนพยาธิในผักสดและผลไม้จากตลาด และการปลอมปนสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพร รวมทั้งบทความพิเศษเกี่ยวกับเทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพต่องานบริการห้องปฏิบัติการชั้นสูตรมาตรฐานสุข

กองบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ส่งบทความมาให้พิจารณาตีพิมพ์ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้พิจารณาบทความ (Peer reviews) และให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขบทความวิจัยต่างๆ ให้มีความถูกต้องทางวิชาการและขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนในการจัดทำวารสารฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์หวังเป็นอย่างยิ่งว่า วารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่านทุกท่าน และขอขอบคุณที่ท่านผู้อ่านได้ให้ความสนใจติดตามวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์อย่างต่อเนื่องมาตลอด “เราจะสานต่องานสรรหาความรู้ที่มีคุณค่าทางวิชาการมาให้คุณผู้อ่านตลอดไป แล้วพบกันใหม่ฉบับหน้าครับ”

ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การตรวจจีโนทัยป์เพศตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ โดยวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1*

นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา¹ วิมาลา อินอุ้นโชติ¹ สุกัญญา วัฒนาโกคยกิจ¹ ไทเชะ มุชิโรตะ² และสุรค์เมธ มหาศิริมงคล¹

¹กองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นครบุรี 11000

²Laboratory for Pharmacogenomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama 230-0045 Japan

บทคัดย่อ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมกับลักษณะการแสดงออก (genotype-phenotype association study) เช่น การเกิดโรค ความรุนแรงของโรค การตอบสนองต่อยา มักใช้เทคนิคการตรวจทางพันธุกรรมที่มีขั้นตอนซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง ซึ่งการตรวจเหล่านี้ไม่สามารถระบุการสลับตัวอย่างหรือการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างที่อาจเกิดขึ้นโดยเฉพาะขั้นตอนที่ทำโดยมนุษย์ การตรวจจีโนทัยป์เพศของตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อยืนยันว่าตรงกับบันทึกข้อมูลเพศของบุคคลในฐานข้อมูล เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความมั่นใจในคุณภาพผลการศึกษา จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจจีโนทัยป์เพศด้วยเทคนิค real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ของยีน *CDY-1* บนโครโมโซม Y ผลการทดสอบประสิทธิภาพในตัวอย่างดีเอ็นเอ 377 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลตรวจจีโนทัยป์เพศตรงกับบันทึกในฐานข้อมูลบุคคลร้อยละ 100 วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจเพศในตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพัฒนาให้การตรวจนี้สามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยจะทำให้ได้วิธีตรวจที่นำไปใช้ประโยชน์ได้สมบูรณ์ขึ้น

คำสำคัญ การตรวจจีโนทัยป์เพศ, ดีเอ็นเอมนุษย์, เรย์ลโทมัส พีซีอาร์

Corresponding author E-mail: nuanjun.w@dmsc.mail.go.th

Received: 28 January 2020

Revised: 23 June 2020

Accepted: 4 August 2020

บทนำ

การเตรียมตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA; gDNA) สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม (genotyping) เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตในการวิจัยทางพันธุศาสตร์ มีขั้นตอนตั้งแต่การเก็บตัวอย่าง เช่น เลือด น้ำลาย เยื่อบุกระพุ้งแก้มของบุคคล การติดฉลากรหัสตัวอย่าง การแบ่งตัวอย่างเพื่อแยกเก็บรักษา การสกัดและการเจือจาง gDNA แต่ละขั้นตอนมีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้ โดยเฉพาะจากคนทำงาน (human error) เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่มีคุณภาพ สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจจีโนทัยป์กับลักษณะที่แสดงออกของผู้ป่วย (genotype-phenotype analysis) และได้ผลการศึกษามีความถูกต้องแม่นยำ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจคุณภาพและปริมาณ gDNA ก่อนการศึกษานี้ ทางห้องปฏิบัติการ เช่น ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ gDNA โดยประมาณ ทราบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีในช่วงคลื่น 260/280 นาโนเมตร^(1,2) การใช้สารเรืองแสงที่จับจำเพาะกับดีเอ็นเอสายคู่ เช่น PicoGreen หรือ Hoechst H33258 หรือ SYBR Green^(3,4) จะทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน ส่วนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) จะทำให้ทราบความสมบูรณ์ (integrity) ของ gDNA ว่ายังคงสภาพเป็นสายยาวโดยปรากฏเป็นแถบหนามากกว่า 30 kb⁽⁵⁾ ไม่ขาดเป็นท่อนสั้น ๆ ซึ่งจะเห็นเป็นแถบป็น (smearing pattern) ปัจจุบันมีเครื่องอัตโนมัติที่สามารถตรวจคุณภาพและปริมาณ gDNA เช่น เครื่องที่ใช้หลักการ microfluidic electrophoresis (Tape Station System, Agilent) หรือ capillary electrophoresis (Fragment Analyzer System, Agilent) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นพร้อมค่าความสมบูรณ์ของสายดีเอ็นเอ (DNA Integrity Number; DIN)

การตรวจคุณภาพและปริมาณดังกล่าวเป็นการตรวจแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ไม่สามารถระบุบุคคลของตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA identification) หรือการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างได้ ซึ่งเป็นข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นได้บ่อยจากคนทำงาน โดยเฉพาะในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ในการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งจีโนม (whole genome sequencing) หรือทั้ง exome (whole exome sequencing) หรือการวิเคราะห์ความหลากหลายแบบนิวคลีโอไทป์เดี่ยวทั้งหมด (whole single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping) สามารถระบุเพศของบุคคลจากการวิเคราะห์ผลจีโนทัยป์ (gender genotyping) ได้ เพื่อนำมาตรวจสอบกับข้อมูลเพศที่บันทึกในฐานข้อมูลบุคคล ซึ่งเป็นขั้นตอนการตรวจคุณภาพข้อมูลก่อนการศึกษาต่อไป^(6,7) ตัวอย่างที่มีผลจีโนทัยป์เพคไม่ตรงกับฐานข้อมูลจะมีการทวนสอบการบันทึกข้อมูลและขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการตั้งแต่การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ หากยังไม่ตรงกัน ตัวอย่างนั้นจะถูกตัดออกจากการวิเคราะห์ ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากให้ผลไม่ตรงกัน จะทำให้สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจระดับจีโนมที่มีราคาสูง ซึ่งหากเป็นการศึกษาพันธุกรรมเฉพาะตำแหน่ง จะไม่สามารถตรวจสอบความผิดพลาดเหล่านั้นได้ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอว่าถูกต้องตรงตัวบุคคลก่อนการนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปศึกษาด้วยเทคนิคขั้นสูงต่างๆ ในงานวิจัยทางพันธุศาสตร์ เพื่อให้ได้ผลการศึกษามีคุณภาพน่าเชื่อถือ ลดความเสี่ยงการเกิดความผิดพลาดและการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจที่ไม่สามารถนำผลมาใช้ประโยชน์ได้

การตรวจจีโนทัยป์เพค (gender genotyping) เป็นวิธีการระบุเพศโดยอาศัยการตรวจด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล มีการใช้กันมากโดยเป็นส่วนหนึ่งของการตรวจ genetic markers ชนิด short tandem repeats (STRs) หรือ microsatellites หรือ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ในการตรวจยืนยันบุคคล (person identification) และงานพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลทางนิติเวช (Forensic Sciences) โดยเฉพาะกรณีที่เกิดอุทกภัยเป็นชิ้นส่วนของร่างกายหรืออวัยวะ^(8,9) นอกจากนี้ยังใช้ในการยืนยันเพศของนักกีฬาหญิงว่าไม่มีโครโมโซม Y ซึ่งอาจทำให้ได้เปรียบในการแข่งขันกีฬายานกีฬา หรือในเวชศาสตร์การกีฬา (Sport Sciences)⁽¹⁰⁾ ยีนที่มีการนำมาใช้ตรวจจีโนทัยป์เพค ได้แก่ *Amelogenin*⁽¹¹⁾ หรือ Zinc Finger Protein X-linked/Zinc Finger Protein Y-linked (ZFX/ZFY)⁽¹²⁾ ซึ่งมีอยู่บนทั้งโครโมโซม -X และ -Y ด้วยขนาดที่ไม่เท่ากัน ยีน *DYS390* *DYS438* *DYA439* และ *sex-determination region Y (SRY)* บนโครโมโซม Y การตรวจยีนเหล่านี้ใช้เทคนิค

PCR เพิ่มขยายยีนก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์หาขนาดท่อนยีนด้วย capillary electrophoresis โดยใช้เครื่องมือและซอฟต์แวร์จำเพาะ เช่น Fragment Analyzer หรือ Genetic Analyzer^(13,14,15,16) มีรายงานการใช้เทคนิค multiplex PCR ในการเพิ่มขยายยีน *SRY* โดยมีคูไพรเมอร์ยีน *Alastin GTPase1 (ATL1)* บนโครโมโซม 14 เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)⁽¹⁷⁾

ห้องปฏิบัติการกองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้การตรวจจีโนมที่เป็ผลด้วยวิธี PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ยีน *Chromodomain Y-linked 1 (CDY-1)* บนโครโมโซม Y และคูไพรเมอร์ *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1)* บนโครโมโซม X แบบแยกหลอด ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับถ่ายทอดจากความร่วมมือกับ RIKEN Center for Integrative Medical Sciences ประเทศญี่ปุ่น (Mushiroda T. ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่) สามารถระบุการสลับระหว่างตัวอย่างต่างเพศกัน หรือมีการสลับตัวอย่างจำนวนมาก แต่ไม่สามารถระบุการสลับตัวอย่างระหว่างดีเอ็นเอจากเพศเดียวกัน วิธีการทำ PCR เป็นแบบแยกยีนคนละหลอด และอ่านผลด้วยการทำ agarose gel electrophoresis เป็นข้อจำกัดในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีตรวจจีโนมที่รวดเร็วด้วยเทคนิค duplex-PCR และ real-time PCR เพื่อลดการใช้ทรัพยากรและเวลา สามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมาก สำหรับใช้ตรวจเพศของตัวอย่างดีเอ็นเอก่อนการตรวจวิเคราะห์อื่นๆ ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

เลือกยีน *TIMP-1* บนโครโมโซม X และยีน *CDY-1* บนโครโมโซม Y เป็นเป้าหมายในการพัฒนาการตรวจจีโนมที่เป็ผล โดยตรวจสอบลำดับเบสและปรับเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ให้อยู่ในบริเวณที่ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอ้างอิงลำดับเบสจากฐานข้อมูล (www.ncbi.nlm.nih.gov; *TIMP-1* reference ID: NG_012533 และ *CDY-1* reference ID: G_011754) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบส ขนาด ตำแหน่ง และ melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์

Primer Name	Sequence (5' to 3')	Length (bp)	Postion*	T_m^{**} (°C)	PCR product size (bp)
<i>TIMP-1_F</i>	AGT TTC TCA TTG CTG GTG AGG CAC CGT CC	29	8027-8055	73.20	817
<i>TIMP-1_R</i>	AGC CAT CAG GGA ACA GGC TTG GAC TAG CC	29	8843-8815	67.23	
<i>CDY-1_F</i>	GCA CAA ACG CTT CAG AGA C	19	7422-7440	53.96	817
<i>CDY-1_R</i>	CCT AAA TCT GCA CAT TCC AC	20	7708-7689	50.98	

*อ้างอิงตำแหน่งจาก *TIMP-1* reference ID: NG_012533 และ *CDY-1* reference ID: NG_011754)

** คำนวณด้วยวิธี Nearest Neighbor โดย Oligonucleotide Properties Calculator⁽¹⁸⁾

Duplex PCR

การเพิ่มขยายยีน *TIMP-1* และ *CDY-1* ใช้คูไพรเมอร์ของทั้งสองยีนในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน (duplex PCR) โดยในน้ำยาปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ในบัฟเฟอร์สำเร็จรูป (KAPA 2G Fast Multiplex Mix Kit, Wilmington, Massachusetts, USA) ที่มี 200 nM

ของแต่ละไพรเมอร์ และตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร (5–50 นาโนกรัม) ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (ABI 9700, GeneAmp PCR system, Forster, USA) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส (°C) นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ที่ 95°C นาน 10 วินาที ที่ 60°C นาน 15 วินาที และที่ 72°C นาน 15 วินาที ตรวจผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 817 bp ของยีน *TIMP-1* และขนาด 287-bp ของยีน *CDY-1* โดยการเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) ใน 1.5% agarose ภายหลังการทำ electrophoresis

real-time PCR

ทำในปริมาตรรวม 5 ไมโครลิตร โดยใช้รีเอเจนต์ real-time PCR ที่มีเอ็นไซม์ DNA polymerase และสารเรืองแสงชนิด SYBR ในบัฟเฟอร์ (KAPA SYBR Fast qPCR, Massachusetts, USA) และใช้ 200 nM ของไพรเมอร์แต่ละเส้น โดยทำเป็นแบบแยกหลอดคู่ไพรเมอร์ของยีน *TIMP-1* และ *CDY-1* และแบบรวมหลอดของไพรเมอร์ทั้งสองคู่ (duplex real-time PCR) ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร (2.5–50 นาโนกรัม) ใส่ในเครื่อง real-time PCR (ABI 7900 HT real-time, Forster City, USA) ตั้งการทำงานที่อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที ตามด้วย 35 รอบ ที่ 95°C นาน 5 วินาที และที่ 60°C นาน 45 วินาที จากนั้นทำ melting curve analysis โดยตั้งอุณหภูมิที่ 95°C นาน 15 วินาที และ 60°C นาน 15 นาที ก่อนเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ (2% ramp rate) ไปที่ 95°C นาน 15 วินาที วิเคราะห์ผลด้วย 7900 HT Sequence Detection System software v2.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 817 bp ของยีน *TIMP-1* และขนาด 287-bp ของยีน *CDY-1* โดยการทำ electrophoresis เช่นเดียวกับวิธี PCR

การหาลำดับเบส

นำผลผลิตพีซีอาร์ไม่จำเพาะ (non-specific product) ซึ่งเกิดขึ้นในหลอดปฏิกิริยาชุดไพรเมอร์ *CDY-1* กับตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง ขนาดประมาณ 450-bp มาหาลำดับเบส โดยย่อยทำลายไพรเมอร์ *CDY-1* และ dNTP ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาด้วยเอ็นไซม์ Exonuclease I และ Alkaline phosphatase ตามคู่มือของรีเอเจนต์ ExoProStar (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) จากนั้นนำ 1 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยาแบบ dideoxy chain termination ด้วย *CDY-1* forward primer หรือ *CDY-1* reverse primer แบบแยกหลอดปฏิกิริยา โดยใช้รีเอเจนต์ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดรีเอเจนต์ D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit (NimaGenBV, Nimagen, NL) จึงนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง 3500XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

การทดสอบประสิทธิภาพวิธีการตรวจ

เปรียบเทียบวิธีตรวจจีโนมที่พัฒนาขึ้นกับข้อมูลเพศของอาสาสมัครที่บันทึกไว้ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 377 ตัวอย่าง ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดอาสาสมัครโครงการวิจัยเพื่อหาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดจอประสาทตาเสื่อมในผู้สูงอายุ⁽¹⁹⁾ ที่ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยโรงพยาบาลราชวิถี เลขที่ 001/2556 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายจำนวน 180 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอเพศหญิง 197 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจคุณภาพ (A260/A280 ratio) และปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Germany)

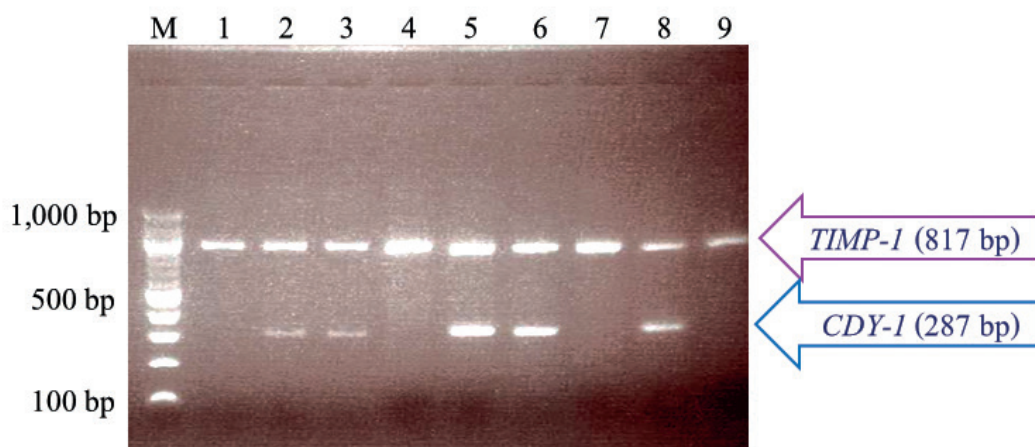
การทดสอบความไวของการตรวจการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอ

ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย (20 ng/ul) ลงในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง (20 ng/ul) เพื่อเตรียมเป็น ดีเอ็นเอผสม (M-DNA/F-DNA) ที่อัตราส่วน 1/5 โดยผสมดีเอ็นเอเพศชาย 1 ส่วนผสมกับดีเอ็นเอเพศหญิง 4 ส่วน จากนั้นเจือจาง 5 เท่าด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงต่อไปอีก 4 หลอด ได้ดีเอ็นเอผสมที่มีอัตราส่วน M-DNA/F-DNA เท่ากับ 1/25, 1/125, 1/625 และ 1/1,325 ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอผสมทั้ง 5 หลอด และดีเอ็นเอเพศชายและเพศหญิงจากหลอดที่ไม่มีการผสม โดยวิธี real-time PCR ด้วยคูไพรเมอร์ *CDY-1*

ผล

Duplex PCR

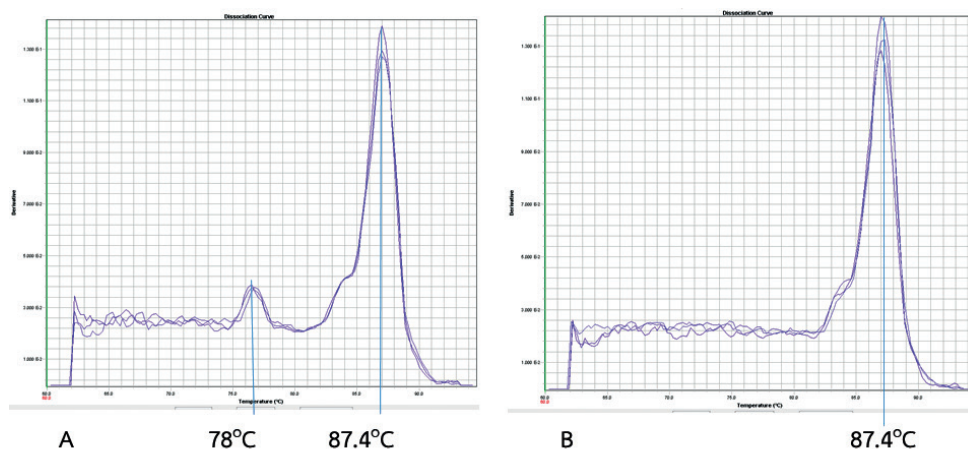
การผสมคูไพรเมอร์ของยีน *TIMP-1* และ *CDY-1* ลงในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน โดยปรับอุณหภูมิ annealing temperature ให้คูไพรเมอร์ทั้งสองจับกับยีนเป้าหมาย พบว่าที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการเพิ่มขยายยีน สามารถเห็นผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 817 bp สำหรับยีน *TIMP-1* และขนาด 287 bp สำหรับยีน *CDY-1* ได้ชัดเจนภายหลังการทำ gel electrophoresis โดยตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายพบผลผลิตทั้งสองขนาด ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงพบเฉพาะผลผลิตขนาด 817 bp ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 gel electrophoresis ผลการตรวจจีโนทัยป์เพศด้วยวิธี duplex PCR แสดงผลผลิตพีซีอาร์ด้วยคูไพรเมอร์ *TIMP-1* มีขนาด 817 bp และจากคูไพรเมอร์ *CDY-1* มีขนาด 287 bp Lane M: DNA Ladder, ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงใน Lane 1, 4, 7 และ 9 ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย ใน Lane 2, 3, 5, 6 และ 8

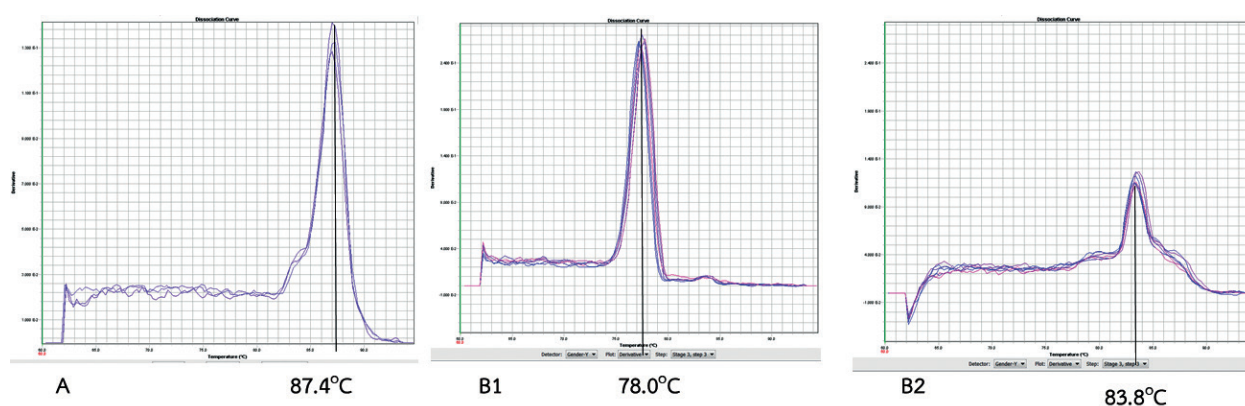
real-time PCR

ในการทำ real-time PCR ด้วยคูไพรเมอร์ที่ออกแบบ พบว่าสามารถใช้อุณหภูมิตามคำแนะนำในคู่มือ น้ำยาและเครื่องตั้งรายละเอียดที่แสดงในวัสดุและวิธีการ การทดลองทำ duplex real-time PCR โดยใส่ไพรเมอร์ของทั้งสองยีนในหลอดเดียวกัน และอ่านค่า melting temperature (T_m) จากการทำ melting curve analysis ผลตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายพบผลผลิตจากคูไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด คือ *TIMP-1* มี $T_m = 87.4^\circ\text{C}$ และ *CDY-1* มี $T_m = 78.0^\circ\text{C}$ โดยผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *TIMP-1* มีความสูงของพีคมากกว่าผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *CDY-1* อย่างมาก ดังแสดงในภาพที่ 2A ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงพบเฉพาะผลผลิตคูไพรเมอร์ *TIMP-1* ที่มี $T_m = 87.4^\circ\text{C}$ เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 2B

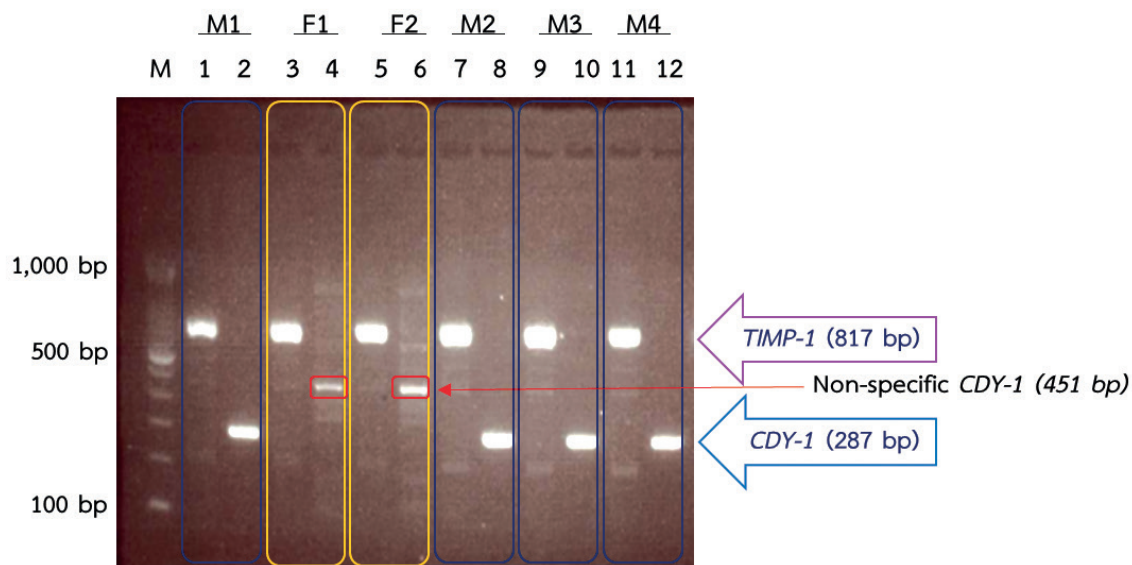


ภาพที่ 2 melting curve analysis ผล duplex real-time PCR แสดง T_m ของผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายมีผลผลิตยีน *CDY-1* ที่มี $T_m = 78.0^\circ\text{C}$ และ *TIMP-1* ที่มี $T_m = 87.4^\circ\text{C}$ (A) ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงมีผลผลิตยีน *TIMP-1* ที่มี $T_m = 87.4^\circ\text{C}$ (B)

ในการทดลองแบบแยกหลอดปฏิกิริยา พบว่าไพรเมอร์ *TIMP-1* ให้ผลผลิตที่มี $T_m = 87.4^\circ\text{C}$ ทั้งในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงและเพศชาย โดยมีค่าจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณ (Cycle threshold: Ct) ประมาณ 17-20 ส่วนไพรเมอร์ *CDY-1* นอกจากให้ผลผลิตที่มี $T_m = 78.0^\circ\text{C}$ มีค่า Ct ประมาณ 18-20 ในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายแล้ว ยังพบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงให้ผลผลิตที่มี $T_m = 83.8^\circ\text{C}$ โดยมีค่า Ct สูงกว่าดีเอ็นเอเพศชาย (Ct ประมาณ 26-28) ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อนำผลผลิต real-time PCR ไปทำ gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายให้ผลผลิตขนาด 817 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *TIMP-1* และขนาด 287 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *CDY-1* ส่วนตัวอย่างเพศหญิงนอกจากให้ผลผลิตขนาด 817 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *TIMP-1* แล้ว ยังให้ผลผลิตไม่จำเพาะขนาดประมาณ 450 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *CDY-1* ด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 Melting curve analysis ของผลผลิตพีซีอาร์จากการทำ real-time PCR โดยแยกไพรเมอร์ *TIMP-1* และ *CDY-1* คนละหลอดปฏิกิริยา โดยผลผลิตยีน *TIMP-1* พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายและหญิง มี $T_m = 87.4^\circ\text{C}$ (A) ผลผลิตยีน *CDY-1* พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย มี $T_m = 78.0^\circ\text{C}$ (B1) และผลผลิตยีน *CDY-1* พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง มี $T_m = 83.8^\circ\text{C}$ (B2)



ภาพที่ 4 gel electrophoresis ผลผลิตพีซีอาร์จากการตรวจจีโนทัยป์เพศด้วย real-time PCR แบบแยกคู่ไพรเมอร์ *TIMP-1* และ *CDY-1* คนละหลอดปฏิกิริยา Lane M: DNA ladder ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย M1, M2, M3 และ M4 ใน Lane 1 & 2, 7 & 8, 9 & 10 และ 11 & 12 ตามลำดับ และตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง F1 และ F2 ใน Lane 3 & 4 และ 5 & 6 ตามลำดับ

จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้เทคนิค real-time PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* สามารถตรวจจีโนทัยป์เพศชายและเพศหญิงได้โดยการวิเคราะห์ค่า T_m กล่าวคือ ตัวอย่างที่มี $T_m = 78^\circ\text{C}$ เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย ส่วนตัวอย่างที่มีค่า $T_m = 83.8^\circ\text{C}$ เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง วิธีนี้ใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียว อ่านผลได้ง่าย เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย จึงเลือกวิธีการนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

การหาลำดับเบส

การหาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ไม่จำเพาะขนาดประมาณ 450 bp ของตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงที่เกิดขึ้นในหลอดปฏิกิริยาที่มีคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* นำไปเทียบความเหมือน (blast search) กับฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่ามีลำดับเบสที่อยู่ระหว่างคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ขนาด 412 bp ตรงกับดีเอ็นเอที่แปลรหัสได้เป็นโปรตีน APCDD1-like precursor บนโครโมโซมคู่ที่ 20 (Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p12 Primary Assembly Sequence ID: NC_000020.11 Length: 64444167) โดยมีความเหมือนกันร้อยละ 99.76 (411/412 bp) ลำดับเบสของชิ้นส่วนนี้ที่มีความยาวรวม 451 bp พร้อมตำแหน่งที่จับกับไพรเมอร์ *CDY-1_F* และ *CDY-1_R* ดังแสดงในภาพที่ 5

ความไวของวิธีการ real-time PCR ในการตรวจการปนเปื้อนระหว่างดีเอ็นเอเพศหญิงและเพศชาย

การทดสอบความไวในการตรวจการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายและหญิงของวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* พบว่าตัวอย่าง M-DNA/F-DNA ที่ 1/5 พบผลผลิตที่มี $T_m = 78^\circ\text{C}$ เท่านั้น และที่ 1/25 พบผลผลิต 2 ชนิด ที่มี $T_m = 78^\circ\text{C}$ และ 87.4°C โดยพีคของผลผลิต T_m ที่ 87.4°C ค่อนข้างต่ำมาก และค่อยๆ มีความสูงเพิ่มขึ้น ในขณะที่พีคของผลผลิตที่ $T_m = 78^\circ\text{C}$ ค่อยๆ ลดลงในหลอด M-DNA/F-DNA ที่ 1/125 และ 1/625 ส่วนที่ 1/1,325 พบเฉพาะผลผลิตที่ $T_m = 87^\circ\text{C}$ เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 6

Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p12 Primary AssemblySequence ID: **NC_000020.11** Length: **64444167** Number of Matches: **1**Range 1: **58479826 to 58480276** [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
810 bits(897)	0.0	450/451(99%)	0/451(0%)	Plus/Plus

Features: [protein APCDD1-like isoform 1 precursor](#)[protein APCDD1-like isoform 2](#)

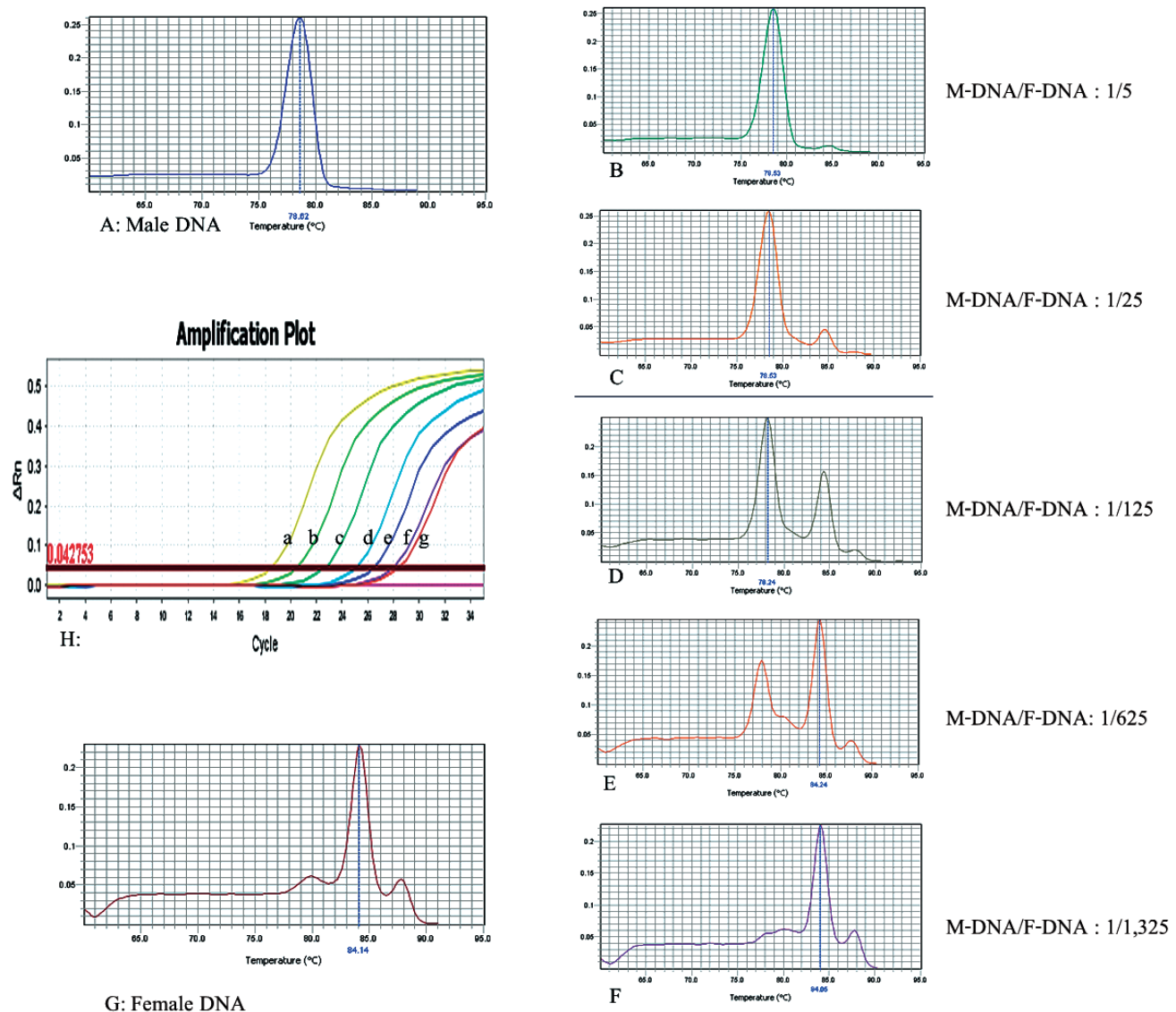
		GCACAAACGCTTCAGAGAC	
Query	1	GCCATTAAGCTTCAGAGACCGGCTGTGGAAATGGAGCCATTCCAGCACTGCTGCAGCCAA	60
Sbjct	58479826	GCCATTAAGCTTCAGAGACCGGCTGTGGAAATGGAGCCATTCCAGCACTGCTGCAGCCAA	58479885
Query	61	AGATGTACTTTCCAATGAAGTCACTGCACAAAAGGCATGCAGGGTTTGCACCAGAACACC	120
Sbjct	58479886	AGATGTACTTTCCAATGAAGTCACTGCACAAAAGGCATGCAGGGTTTGCACCAGAACACC	58479945
Query	121	CCCAGAAGGCTGCAGATTGGATGCTATGACTGGATGCTGCATCAACAAACACAGAAATAT	180
Sbjct	58479946	CCCAGAAGGCTGCAGATTGGATGCTATGACTGGATGCTGCATCAACAAACACAGAAATAT	58480005
Query	181	GAAGACACACTTTGCATTCTAAGAAGCCACCTCCAACCTCTGGTGTGAATGGCTGGTCC	240
Sbjct	58480006	GAAGACACACTTTGCATTCTAAGAAGCCACCTCCAACCTCTGGTGTGAATGGCTGGTCC	58480065
Query	241	TCAGATACCTCACATGTCTCTCATTTGGCTATAATGGAATCTCCTCATCCACCTAATCCG	300
Sbjct	58480066	TCAGATACCTCACATGTCTCTCATTTGGCTATAATGGAATCTCCTCATCCACCTAATCCG	58480125
Query	301	AGAATCTTCGTGTTTCAGGGCTGGCAGGCAAGTTGGGGAATGGGTTGGACTTTGCTACCTT	360
Sbjct	58480126	AGAATCTTCGTGTTTCAGGGCTGGCAGGCAAGTTGGGGAATGGGTTGGACTTTGCTACCTT	58480185
Query	361	GGGAAACACAGAAATGATATGCTCTAAACAAAGCACCTCCACCCGCCGAGCCTTCAGC	420
Sbjct	58480186	GGGAAACACAGAAATGATATGCTCTAAACAAAGCACCTCCACCCGCCGAGCCTTCAGC	58480245
Query	421	ATCCCAGCCCTGTGGAATGTGCCCTCCTCTG	451
Sbjct	58480246	ATCCCAGCCCTGTGGAATGTGCCCTCCTCTG	58480276
		CACCTTACACGCTCTAAATCC	

ภาพที่ 5 ลำดับเบสของผลผลิตขนาด 451 bp จากไพรเมอร์ *CDY-1* จากตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง APCDD1-like precursor บนโครโมโซมคู่ที่ 20 (Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p12 Primary Assembly Sequence ID: NC_000020.11 Length: 64444167) ลำดับเบสระหว่างไพรเมอร์มีความเหมือนกัน ร้อยละ 99.76 (411/412 bp)

หมายเหตุ: ลูกศรไปและกลับแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ *CDY-1_F* และ *CDY-1_R* ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการ real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ *CDY-1*

ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอในโครงการวิจัยเพื่อหาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดจอประสาทตาเสื่อมในผู้สูงอายุจำนวน 377 ตัวอย่าง ผลจีโนทัยป์เพศพบเป็นดีเอ็นเอเพศชายจำนวน 180 ตัวอย่าง และเป็นดีเอ็นเอเพศหญิง 197 ตัวอย่าง ตรงกับข้อมูลเพศของอาสาสมัครที่บันทึกไว้ร้อยละ 100



ภาพที่ 6 ผล real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการผสมระหว่างดีเอ็นเอเพศชาย (M-DNA) และดีเอ็นเอเพศหญิง (F-DNA) แสดง amplification plot (H) ของ M-DNA (a), ส่วนผสมระหว่าง M-DNA/F-DNA ในอัตราส่วน 1/5 (b), 1/25 (c), 1/125 (d), 1/615 (e), 1/1326 (f) และของ F-DNA (g) พร้อม melting curve analysis ของ M-DNA (A) และ F-DNA (G) และ melting curve analysis ของ M-DNA/F-DNA ที่อัตราส่วนต่างๆ ดังกล่าว ดังรูป B C D E และ F ตามลำดับ

วิจารณ์

การตรวจสอบจีโนไทป์เพศในตัวอย่างดีเอ็นเอโดยวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่สิ้นเปลืองแรงงานและทรัพยากร โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดียวในปฏิกิริยาปฏิกิริยารวมเพียง 5 ไมโครลิตร และการวิเคราะห์ค่า T_m ที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอเพศชายและเพศหญิง โดยดีเอ็นเอเพศชายมีค่า $T_m = 78^\circ\text{C}$ ส่วนดีเอ็นเอเพศหญิงมีค่า $T_m = 83.8^\circ\text{C}$ เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ตรวจจีโนไทป์เพศตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถตรวจสอบจีโนไทป์เพศของตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนมากถึง 384 ตัวอย่างต่อรอบ ในกรณีที่ใช้เครื่อง real-time PCR ที่สามารถใช้กับ 384-well plate ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ 384-well plate

และ 96-well plate กับเครื่องรุ่นอื่น (QuantStudio6, Thermo-Fisher, USA) และเครื่องรุ่นที่ใช้ได้เฉพาะ 96-well plate (QuantStudio5, Thermo-Fisher, USA) พบว่าให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในการนำเทคนิคนี้ไปใช้กับน้ำยา หรือเครื่อง real-time PCR รุ่นอื่นหรือยี่ห้ออื่น อาจมีค่า T_m ที่เปลี่ยนแปลงไปจากค่านี้ จึงควรทดสอบอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาและค่า T_m ก่อนนำไปใช้งาน

ในการทำ real-time PCR แบบแยกคู่ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ *TIMP-1* ให้ผลผลิตที่มี $T_m = 87^\circ\text{C}$ ทั้งในดีเอ็นเอเพศหญิงและเพศชาย โดยมี C_t ประมาณ 17-20 ในช่วงความเข้มข้นดีเอ็นเอ 2.5-50 ng/ μl ส่วนคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* สามารถเข้าจับกับเป้าหมายบนโครโมโซม-Y ในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายได้อย่างจำเพาะ เกิดผลผลิตที่มี $T_m = 78^\circ\text{C}$ และมีค่า C_t ประมาณ 18-20 ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงมี non-specific product ขนาด 451 bp จากยีน *protein APCDD1-like precursor* เกิดขึ้นที่ C_t ประมาณ 26-28 ซึ่งช้ากว่าผลผลิตจำเพาะที่พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายประมาณ 8-10 รอบ การวิเคราะห์ลำดับเบสส่วนปลายของท่อนผลิตผลพีซีอาร์ที่คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* เข้าจับ พบว่ามีความเข้าคู่กัน (complementary) ที่ปลายด้าน 3' ยาวติดต่อกัน 11 bp (ร้อยละ 58 ของความยาวไพรเมอร์) สำหรับ *CDY-1* Forward primer และ 13 bp (ร้อยละ 55 ของความยาวไพรเมอร์) สำหรับ *CDY-1* Reverse primer การที่ไพรเมอร์มีส่วนปลาย 5' ไม่เหมือนเป้าหมายแต่มีส่วนปลาย 3' มีความเหมือนมากกว่าร้อยละ 50 ของความยาวไพรเมอร์ทั้งหมดนี้ทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับยีนดังกล่าวได้ มีการประยุกต์ใช้ออกแบบไพรเมอร์ชนิด 5' tagging portion และ 3' specific portion เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจ การต่อตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme recognition site) หรือการต่อบาร์โค้ดเพื่อรวมหลายตัวอย่างการหาลำดับเบสในระบบ next generation sequencing^(20,21,22) สภาวะการทำปฏิกิริยาที่มีองค์ประกอบของน้ำยาและอุณหภูมิที่ใช้และค่อยๆ เกิดผลผลิตสะสมจนตรวจวัดได้เมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาไปมากกว่า 25 รอบ ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* เข้าจับกับเป้าหมายจำเพาะบนโครโมโซม-Y ได้อย่างสมบูรณ์และเกิดผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนไม่เกิด non-specific product คุณลักษณะการเกิด non-specific product แบบล่าช้านี้พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงทุกตัวอย่าง และไม่พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย ทำให้สามารถใช้เฉพาะคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ในการตรวจจีโนทัยป์เพศชายและหญิงได้ นอกจากนี้การพบผลผลิต T_m ที่ 83.8°C และ C_t ประมาณ 26-28 รอบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง สามารถใช้เป็นการควบคุมภายใน (internal control) ที่แสดงว่าองค์ประกอบการทำปฏิกิริยา มีความปกติตั้งแต่การเตรียมน้ำยา การเติมดีเอ็นเอ และการทำงานของเครื่อง real-time PCR

วิธี duplex PCR เพื่อตรวจจีโนทัยป์เพคเป็นวิธีที่ต้องการเพียงเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้งานในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล การใส่คู่ไพรเมอร์ของยีน *CDY-1* และ *TIMP-1* ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลา ทำให้สะดวกมากขึ้นกว่าวิธีเดิมที่เคยทำแบบแยกหลอดปฏิกิริยาของแต่ละยีน อีกทั้งยังช่วยประกันผลการตรวจกรณีที่คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ให้ผลลงว่าเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงจริง เพราะยังคงเห็นผลผลิตจากคู่ไพรเมอร์ *TIMP-1* ขนาด 817 bp ไม่ได้เกิดจากความผิดปกติในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ อย่างไรก็ตามขั้นตอนการทำ gel electrophoresis ก็ยังคงเป็นข้อจำกัดในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ต้องมีการอ่าน บันทึก และลงผลในตารางด้วยมือ จึงเหมาะสำหรับงานวิจัยที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอไม่มาก

วิธีการตรวจจีโนทัยป์เพคด้วยที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถประยุกต์ใช้งานการตรวจทางวิทยาศาสตร์การกีฬา หรือตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ที่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากตัวอย่างที่ไม่เสียหายมาก เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* มีขนาด 287 bp หรือ 451 bp และ *TIMP-1* มีขนาด 817 bp ซึ่งค่อนข้างใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่มีขนาดเล็กกว่า 100 bp⁽⁹⁾

สรุป

การตรวจจีโนไทป์เพศด้วยวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* สามารถใช้ระบุเพศของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ก่อนการนำไปตรวจด้วยวิธีวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยประกันความถูกต้องของตัวอย่างดีเอ็นเอและความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัย การพัฒนาต่อยอดให้เป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดปริมาณ (quantitative method) จะช่วยให้การนำวิธีนี้ไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Teisei Mushiroda หัวหน้าทีมวิจัยเภสัชพันธุศาสตร์ จาก RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama ประเทศญี่ปุ่น ในการให้คำปรึกษาแนะนำในที่ใช้ตรวจเพศ

เอกสารอ้างอิง

1. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
2. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995; 18: 62-3.
3. Armbrrecht M, Gloe J, Goemann W. Determination of nucleic acid concentrations using fluorescent dyes in the Eppendorf BioSpectrometer[®] fluorescence. In: Eppendorf application note 271. Hamburg, Germany: Eppendorf AG.; 2013. p.1-10.
4. Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem* 1999; 276: 59-64.
5. Piovesan A, Pelleri MC, Antonaros F, Strippoli P, Caracausi M, Vitale Lorenza, et al. On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res Notes* 2019; 12: 106. (7 pages).
6. Turner S, Armstrong LL, Bradford Y, Carlson CS, Crawford DC, Crenshaw AT, et al. Quality control procedures for genome-wide association studies. *Curr Protoc Hum Genet* 2011; 68: 1.19.1-18.
7. Tischfield JA, DiCola M, Van Hummelen P, Wang Q, Brooks AI. High-throughput DNA quality control: allelic discrimination panel for determining sample contamination, gender and ethnicity in a biorepository setting. Hawaii, USA: American Society of Human Genetics; 2009.
8. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 179-92.
9. Boonyarit H, Mahasirimongkol S, Chavavechakul N, Aoki M, Amitani H, Hosono N, et al. Development of a SNP set for human identification: a set with high powers of discrimination which yields high genetic information from naturally degraded DNA samples in the Thai population. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: 166-73.
10. Simpson JL, Ljungqvist A, de la Chapelle A, Ferguson-Smith MA, Genel M, Carlson AS, et al. Gender verification in competitive sports. *Sports Med* 1993; 16: 305-15.

11. Mannucci A, Sullivan KM, Ivanov PL, Gill P. Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int J Legal Med* 1994; 106: 190-3.
12. Aasen E, Medrano JF. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Nat Biotechnol.* 1990; 8: 1279-81.
13. Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redd AJ, Hammer MF. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Sci Int* 2002; 129: 10-24.
14. Ayub Q, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi SQ, et al. Identification and characterization of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: e8. (5 pages).
15. Gilson A, Syvanen M, Levine K, Banks J. Deer gender determination by polymerase chain reaction: validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *Calif Fish Game* 1998; 84: 159-69.
16. Kupfer DM, Jenkins M, Burian D, Canfield DV. Use of alternative primers for gender discrimination in human forensic genotyping. [online]. 2008; [cited 2020 Jul 7]; [14 screens]. Available from: URL: https://www.faa.gov/data_research/research/med_humanfacs/oamtechreports/2000s/media/200808.pdf.
17. Osman J, Murad NAA, Chin SF, Jamal R. Highly sensitive and reliable human sex determination using multiplex PCR. *Asia Pac J Mol Med* 2014; 4: 1-4.
18. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 2007; 35 (Web Server issue): W43-6.
19. Ruamviboonsuk P, Tadarati M, Singhanetr P, Wattanapokayakit S, Kunhapan P, Wanitchanon T, et al. Genome-wide association study of neovascular age-related macular degeneration in the Thai population. *J Hum Genet* 2017; 62: 957-62.
20. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif* 2017; 14: 19-28.
21. Choi SY, Ro H, Yi H. Designing PCR primer for cloning. In: *DNA cloning: a hands-on approach*. Springer Nature B.V; 2019. p. 41-43.
22. Mir K, Neuhaus K, Bossert M, Schober S. Short barcodes for next generation sequencing. *PLoS ONE* 2013; 8: e82933. (8 pages).

Human Gender Genotyping Using real-time PCR with *CDY-1* Primers

Nuanjun Wichukchinda¹ Wimala Inunchot¹ Sukanya Wattanapokayakit¹

Taisei Mushiroda² and Surakameth Mahasirimongkol¹

¹*Division of Genomic Medicine and Innovation Support, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand*

²*Laboratory for Pharmacogenomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, 230-0045 Japan*

ABSTRACT In genotype-phenotype association study such as disease susceptibility and/or progression and drug responsibility, genomic DNA (gDNA) quantification and qualification are necessary steps prior to genotyping application. An individual DNA sample checking cannot identify miss-handling (labeling or samples mixed-up) which could especially occur from human error at any steps of gDNA preparation. Gender genotyping becomes useful for confirmation with records in participant database, leading to quality of genetic analysis results. We, therefore, developed the gender genotyping method by amplifying *CDY-1* in Y-Chromosome with real-time PCR. Efficiency testing of this method with DNA samples (n = 377) showed 100% concordance with clinical data record of individual participant. This novel gender genotyping method is rapid, inexpensive, and usable to apply for genetic studies with high numbers of samples. Further development on quantitation of the amount of DNA will possibly fulfill utilization of our developed method.

Keywords: gender genotyping, human gDNA, real-time PCR

Acute Oral Toxicity of Mixed *Crocodylus siamensis* Oil and *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker in Wistar Rats

Amon Praduptong^{1,4} Passaraporn Srimangkornkaew^{1,5} Jindawan Siruntawineti²
Sudawan Chaeychomsri³ and Win Chaeychomsri²

¹Interdisciplinary Graduate Program in Bioscience, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Bangkok 10900

²Department of Zoology, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Bangkok 10900

³Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

⁴Thailand Center of Excellence for Life Sciences (Public Organization), Bangkok 10400

⁵National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT *Crocodylus siamensis* oil and *Kaempferia parviflora* (black ginger) have traditionally been used as folk medicine to promote health. A new formulation, consisting of *C. siamensis* oil and black ginger extract, is developed as an alternative health product. Toxicological studies of this formulation have not been evaluated. This study was to determine acute oral toxicity of mixed *C. siamensis* oil and black ginger in Wistar rats. Our study was conducted in a stepwise procedure according to OECD Guidelines for the testing of chemicals 423, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (2001). After oral administration with 300 and 2,000 mg/kg body weight of mixed *C. siamensis* oil and black ginger, all animals were not shown any signs of toxic effects, moribund and mortality. The results indicated that mixed *C. siamensis* oil and black ginger was grouped in Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemical as category 5 or unclassified and the LD₅₀ is at 5,000-∞ mg/kg body weight. Our study suggested that the mixture of *C. siamensis* oil and black ginger is safe for oral administration and support its use as food supplements or other industrial applications.

Keywords: Acute Oral Toxicity, Crocodile Oil, *Crocodylus siamensis*, *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker

Corresponding author E-mail: fsciwcc@ku.ac.th

Received: 26 May 2020

Revised: 16 June 2020

Accepted: 23 June 2020

Introduction

Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) oil contains high levels of essential fatty acids omega-3, omega-6 and omega-9. It has been known that omega-3 fatty acid could support the brain and nervous system while omega-6 and omega-9 fatty acids could decrease level of high-density lipoprotein, increase level of low-density lipoprotein, reduce inflammation and have beneficial effects on human skin.^(1, 2)

Kaempferia parviflora Wall. Ex. Baker (Black Ginger), commonly known as Krachai Dum, Thai Ginseng, Black Turmeric, and Black Galingale (Black Ginger), belongs to Zingiberaceae family. Quantitative analysis of *K. parviflora* using a gas chromatographic method revealed 11 flavonoid constituents of which 5, 7, 4'-trimethoxyflavone and 5,7-dimethoxyflavone were major constituents.⁽³⁾ Additionally, analysis of methoxyflavones in *K. parviflora* ethanolic extract using high-performance liquid chromatography indicated that 3, 5, 7, 3', 4'-pentamethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone and 5,7-dimethoxyflavone were major components.⁽⁴⁾ Pharmacological activities of *K. parviflora* have been reported including anti-inflammatory, antioxidant, aphrodisiac, anti-gastric ulcer effect, anti-plasmodia, antifungal, and antibacterial activities.⁽⁵⁾

Owing to reports on pharmacological activities, a mixture of *C. siamensis* oil and black ginger could be a new food supplement. Safety data has not been conducted. Therefore, the present study was to investigate an acute oral toxicity of mixed *C. siamensis* oil and black ginger in Wistar rats in accordance with OECD Guidelines for the testing of chemicals, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (2001).⁽⁶⁾

Materials and Methods

C. siamensis Oil Extraction:

A total of 1 kilogram of Siamese crocodile (*C. siamensis*) fat were collected from *C. siamensis* at Thai crocodile farm, Sri-Ayuthaya Gold Medal Company Limited, Nong Khanak, Tha Ruea District, Phra Nakhon Si Ayutthaya Province, Thailand. The fat was thoroughly cleaned and freezed at -20°C.

A non-chemical method was used to extract Siamese crocodile oil using an extraction machine (Henny Penny BCS-10, MB Food Equipment, USA) and an oil press machine extractor (KDTQ, ZZKD, China).⁽¹⁾ After extraction, a liquid fraction of fat was segregated by centrifugation (Suprema 21, Tomy digital biology, Japan) at 6,000 g 4°C for 10 minutes. The oil was kept at 4°C until further use. Physical and chemical properties of oil were tested at Faculty of Sciences, Kasetsart University, Thailand. Microbial contamination was done by laboratory of National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand.

Extraction of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker:

Black Ginger (*K. parviflora* Wall. Ex. Baker) was collected from Phetchabun province and its rhizome was clean, cut into small pieces and air-dried for 3 days. The dried rhizome was

ground and further extracted at SK Herb Company Limited, Krathum Baen District, Samut Sakhon Province, Thailand. Briefly, the dried powder was extracted with 70% ethanol at 1:40 w/v by the ultrasonic processor (UP100H, Hielscher, Germany) for 20 minutes and evaporated for further preparation. Physical and chemical properties of the extract were tested at Faculty of Sciences, Kasetsart University, Thailand. Microbial contamination was done by laboratory of National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand.

Dose Preparation:

The mixed *C. siamensis* oil and black ginger was freshly prepared at doses of 300 and 2,000 mg/kg body weight prior to administration. The dose administration was not exceeded 1 ml per 100 g of animal body weight.

Preparation of Animals:

Female Wistar rats (*Rattus norvegicus* species, Mlac: WR) with weights ranging from 189 to 209 gram (g) were obtained from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. The animals were kept under standard conditions of 12 hours light, 12 hours dark at $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ and 30–70% relative humidity. All were housed in stainless steel cages with food (082, Perfect Companions, Thailand), 5–7 ppm chlorinated water *ad libitum* and environmental enrichment. They were acclimatized for 5 days prior to study.⁽⁷⁾

The study was approved by National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC), Mahidol University; Thailand, code RA2018–37.

Dose Administration:

The acute oral toxicity test was conducted using OECD Guidelines for the testing of chemicals 423, Acute Oral Toxicity–Acute Toxic Class Method (2001) (Figure 1). It is a stepwise procedure with the use of 3 female Wistar rats for each step. Doses of 300 and 2,000 mg/kg body weight of mixed *C. siamensis* oil and black ginger were used for this study. All animals were fasted for 15–18 hours prior to administration and further 3–4 hours after administration. All animals were observed for toxic effects after administration at the first 30 minutes, 4, 6 and 24 hours. Changes in skin and fur, eye and mucous membranes, respiratory, circulatory, autonomic and central nervous systems, somatomotor activity and daily behavioral pattern were observed for 14 days. Additionally, observations of tremors, convulsions, gasping, cyanosis, vocalization, salivation, diarrhea, lethargy, sleep and coma were determined. Survived animals were generally clinically observed once daily for a total of 14 days.⁽⁶⁾ Body weights, feed and drinking water consumptions of the survivals were recorded.

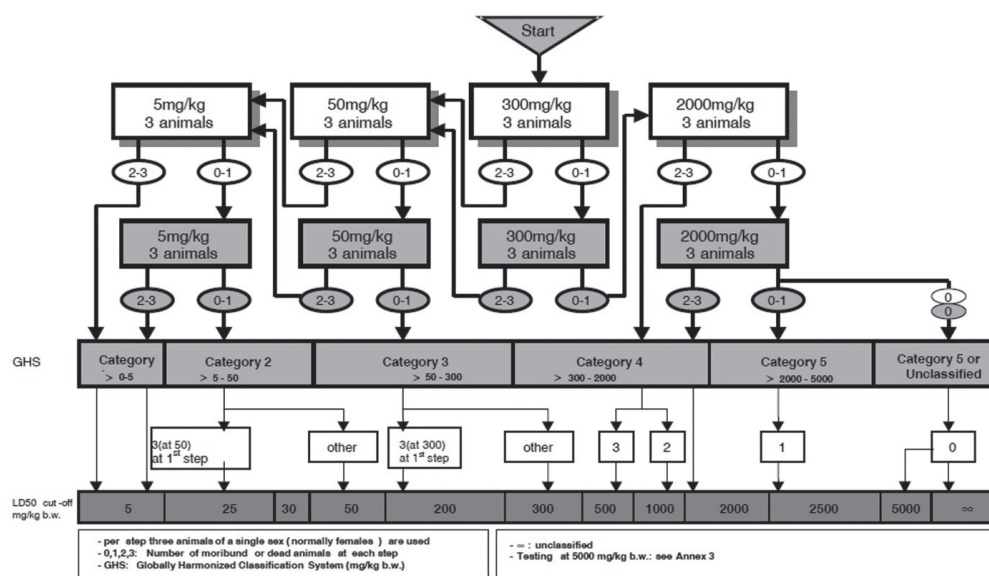


Fig.1 OECD Guidelines for the testing of chemicals 423, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (2001)

Necropsy Examination:

After 14 days, all survived animals were euthanized using CO₂ inhalation.⁽⁸⁾ Gross pathological changes including positions, shapes, sizes and colours of internal organs were examined.⁽⁹⁾

Results

Characteristics of *C. siamensis* oil and *K. parviflora* Extracts:

The extract of crocodile oil was light yellow color with pH 5.9. Its major components were Palmitic acid, Oleic acid and Linoleic acid. Microbial examinations of the extract showed a total plate count was <100 colony forming unit/gram (CFU/g) and was negative for *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. and *Escherichia coli* (data not shown).

The extract of *K. parviflora* was dark brown color with pH 6.0. Its major component was 5,7-dimethoxyflavone. A total plate count of the extract was <100 CFU/g. In addition, yeast and mold was < 100 CFU/g (data not shown).

Safety evaluation of acute oral toxicity:

After oral administration with 300 and 2,000 mg/kg body weight of mixed *C. siamensis* oil and black ginger, all animals showed no signs of toxicity, no moribund and no mortality. The body weights of all animals were continued to gain throughout the study (Table 1). Animal feed and drinking water consumptions were normal (Table 2). The necropsy results of all animals were not found any lesions on external and internal organs (data not shown). Taken together, the mixed *C. siamensis* oil and black ginger was categorized in GHS category: category 5 or unclassified and the LD₅₀ is 5,000-∞ mg/kg body weight.⁽¹⁰⁾

Table 1 Animal Body Weights (g)

Dose Level (mg/kg body weight)	No.	Body Weight (g)				Body Weight Change (%)
		Day 0	Day 7	Day 14	Terminate	
300	1	198	216	225	232.12	17.23
	2	200	214	216	222.88	11.44
	3	208	217	218	224.52	7.94
300	4	198	215	224	232.93	17.64
	5	198	208	221	222.39	12.32
	6	207	216	232	237.06	14.52
2,000	7	194	210	219	211.81	9.18
	8	201	218	225	228.49	13.68
	9	208	219	225	229.41	10.29
2,000	10	189	200	212	218.44	15.58
	11	202	210	221	229.60	13.66
	12	209	219	222	232.12	11.06

Table 2 Animal Feed and Drinking Water Consumptions (g)

Dose Level (mg/kg body weight)	No.	Feed Consumption (g)		Water Consumption (g)	
		Week 1	Week 2	Week 1	Week 2
300	1	12	15	35	47
	2	15	12	31	36
	3	12	11	24	28
300	4	14	13	33	40
	5	14	13	32	31
	6	16	11	30	24
2,000	7	11	12	26	41
	8	12	11	30	24
	9	12	12	25	28
2,000	10	13	13	23	22
	11	11	16	23	30
	12	13	11	27	26

Discussion

Results on acute oral toxicity studies indicated that neither Siamese crocodile oil nor black ginger demonstrated any signs of toxic effects to animals.^(11,12) A mixture of Siamese crocodile oil and black ginger (*K. parviflora* Wall. Ex. Baker) extract was developed as a new formulation in order to boost human health. Therefore, it was necessary to assess its safety data prior to given to human.

Our findings showed no remarkable lesions in all external and internal organs when orally given the mixture at the doses of 300 and 2,000 mg/kg body weight to the Wistar rats. No signs of toxicity were demonstrated. Feed and drinking water consumptions were normal. In regards to OECD Guidelines for the testing of chemicals 423, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (2001), it could suggest that *C. siamensis* oil and *K. parviflora* mixture was safe.

Conclusion

Safety evaluation of mixed *C. siamensis* oil and *K. parviflora* administered orally at doses of 300 and 2,000 mg/kg body weight did not reveal acute toxicity in Wistar rats. The mixture of *C. siamensis* oil and *K. parviflora* was, therefore, classified in GHS category 5 or unclassified with the LD₅₀ was 5,000-∞ mg/kg body weight.

Acknowledgements

The authors were grateful to Sri-Ayuthaya Gold Medal crocodile farm; C S G Products (Thailand) Co., Ltd.; Department of Zoology, Faculty of Sciences, Kasetsart University; Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University (Kamphaengsaen Campus); National Laboratory Animal Center, Mahidol University; and Thailand Center of Excellence for Life Sciences (public organization). This study was financially supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) as graduate scholarship of fiscal year 2018 and Interdisciplinary Graduate Program in Bioscience, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Thailand.

References

1. Praduptong A, Srimangkornkaew P, Intana W, Siruntawinetti J, Chaeychomsri S, Thitipramote N, et al. Primary skin irritation test of siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) oil in New Zealand white rabbit. Biosci Discov 2018; 9(4): 478-84.
2. Venter T. Characterisation, toxicology and clinical effects of crocodile oil in skin products. [online]. 2012; [cited 2020 May 11]; [248 screens]. Available from: URL: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1030.4409&rep=rep1&type=pdf>.
3. Sutthanut K, Sripanidkulchai B, Yenjai C, Jay M. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. J Chromatogr A 2007; 1143(1-2): 227-33.

4. Tuntiyasawasdikul S, Limpongsa E, Jaipakdee N, Sripanidkulchai B. Transdermal permeation of *Kaempferia parviflora* methoxyflavones from isopropyl myristate-based vehicles. AAPS PharmSciTech 2014; 15(4): 947-55.
5. Pitakpawasutthi Y, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Quality evaluation of *Kaempferia parviflora* rhizome with reference to 5, 7-dimethoxyflavone. J Adv Pharm Technol Res 2018; 9(1): 26-31.
6. OECD/OCDE. OECD guidelines for the testing of chemicals test no. 423: acute oral toxicity–acute toxic class method. [online]. 2001; [cited 2020 May 11]; [14 screens]. Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd_gl423.pdf.
7. National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
8. Office of Animal Care and Use, NIH. Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates. [online]. 2000; [cited 2020 May 16]; [3 screens]. Available from: URL: https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/b4_rodent_euthanasia_pup.pdf.
9. Srimangkornkaew P, Praduptong A, Siruntawineti J, Chaeychomsri S, Chaeychomsri W. The evaluation of acute oral toxicity testing of siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) bile in sprague dawley rats in compliance with OECD guideline 423. Biosci Discov 2018; 9(4): 469-73.
10. U.S. Environmental Protection Agency. Chemical hazard classification and labeling: comparison of Opp requirements and the GHS. [online]. 2004; [cited 2020 May 16]; [22 screens]. Available from: URL: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/ghscriteria-summary.pdf>.
11. Praduptong A, Siruntawineti J, Chaeychomsri S, Srimangkornkaew P, Chaeychomsri W. Acute oral toxicity testing of siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) oil in wistar rats. Biosci Discov 2018; 9(3): 409-15.
12. Chivapat S, Chavalittumrog P, Attawish A, Punyamong S, Phadungpat S, Chansuvanich N, et al. Acute and chronic toxicity study of *Kaempferia parviflora* wall. ex. bak powder. J Thai Tradit Altern Med 2004; 2(2): 3-16.

ความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของน้ำมันจระเข้ (*Crocodylus siamensis*) ผสมกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker) ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar

อมร ประดับทอง^{1,4} ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว^{1,5} จินดาวรรณ สิริันทวินเติ² สุดาวรรณ เชยชมศรี³
และวิน เชยชมศรี²

¹หลักสูตรสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร 10900

²ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร 10900

³ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตกำแพงแสน, จังหวัดนครปฐม 73140

⁴ศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ (องค์การมหาชน), กรุงเทพมหานคร 10400

⁵ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล, จังหวัดนครปฐม 73170

บทคัดย่อ น้ำมันจระเข้เป็นน้ำมันจากสัตว์ที่นิยมใช้เพื่อดูแลสุขภาพ ส่วนกระชายดำถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในยาแผนโบราณของไทย สูตรผสมน้ำมันจระเข้และกระชายดำได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ดูแลสุขภาพ แต่ยังไม่มียารายงานการศึกษาพิษวิทยาของสารผสมดังกล่าว จึงได้ทำการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของสารผสมน้ำมันจระเข้และกระชายดำในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ในขนาดของสารผสมน้ำมันจระเข้และกระชายดำที่ 300 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ตามวิธีการมาตรฐาน OECD Guideline หมายเลข 423 หลังจากได้รับสารผสมน้ำมันจระเข้และกระชายดำที่ 300 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง พบว่าสัตว์ทดลองไม่แสดงอาการพิษ ไม่แสดงความผิดปกติ และไม่ทำให้เกิดการตาย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารผสมน้ำมันจระเข้และกระชายดำจัดอยู่ในระบบการจัดกลุ่มสารเคมี การติดฉลากและการแสดงรายละเอียดบนเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสากลหมวดที่ 5 หรือไม่ถูกจัดหมวด และมี LD₅₀ ที่ 5,000–∞ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารผสมน้ำมันจระเข้และกระชายดำมีความปลอดภัยในการบริโภค และอาจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้

คำสำคัญ: กระชายดำ, ความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก, น้ำมันจระเข้

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

สุดดี รัตนจริโรจน์ วารุณี จิรวินนาพงศ์ ณัฐพร พลแสน นิธิดา พลโคตร ยุวดี เมตตาเมธา ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง และประถม ทองศรีรักษ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ภาวะเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาท เปลือกต้นเพกาประกอบด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และอาจใช้บรรเทาภาวะ oxidative stress ได้ จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดด้วยน้ำ (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E) จากเปลือกต้นเพกาต่อความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ประสาท N1E-115 ผลการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ พบว่าสารสกัด OI-W และ OI-E สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ การสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัด OI-W หรือ OI-E และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถปกป้องการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ N1E-115 จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ขณะที่ทั้ง 2 สารสกัดไม่แสดงผลปกป้องการตายของเซลล์จากพิษของกลูตาเมต การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกามีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยกลไกการออกฤทธิ์อย่างน้อยอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน ควรมีการศึกษาต่อไปในเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงต่อพยาธิสภาพ หรือทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องให้ชัดเจน ก่อนนำไปพัฒนาเป็นยาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท

คำสำคัญ: เพกา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

Corresponding author E-mail: sadudee.r@dmasc.mail.go.th

Received: 20 November 2019

Revised: 25 August 2020

Accepted: 16 September 2020

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) ที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical) จัดเป็นอนุมูลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก ความเสียหายที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระหรือสารออกซิไดส์แรงสูง (reactive oxygen species, ROS) และสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการทำลายแบบออกซิเดชัน (oxidative damage) ต่อชีวโมเลกุลภายในร่างกาย เช่น การทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) การทำลายสภาพโปรตีน (protein denaturation) การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid peroxidation) ทำให้ชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหายที่การทำงาน⁽¹⁾ เป็นต้น

ภาวะ oxidative stress เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคเมเร็ง โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท และโรคอื่น ๆ รวมทั้งกระบวนการชรา⁽¹⁾ นอกจากนี้ภาวะ oxidative stress ยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease การสะสม ROS ในเซลล์ประสาทส่วนใหญ่นั้นเป็นซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ส่งผลให้เกิด lipid peroxidation มีการทำลายดีเอ็นเอและโปรตีน เกิดการตายของเซลล์ประสาทและก่อให้เกิดโรคทางระบบประสาท^(2,3) จากรายงานวิจัยพบว่าสาร antioxidants สามารถยับยั้งการเกิด ROS และอาจป้องกันการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทอันเป็นผลมาจาก oxidative stress ได้⁽⁴⁾ ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามที่จะค้นหาสารที่สามารถป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท

เพกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oroxylum indicum* (L.) Kurz จัดอยู่ในวงศ์ Bignoniaceae เป็นไม้ยืนต้น ขนาดกลาง เนื้อไม้อ่อน แตกกิ่งก้านน้อย ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก 3-4 ชั้น เรียงตรงกันข้าม ใบย่อยรูปไข่หรือรูปไข่แกมวงรี ปลายใบแหลม ดอกเป็นช่อแบบกระจาย ออกที่ปลายยอด ดอกย่อยมีขนาดใหญ่ มีสีม่วงแดง ผลเป็นฝักรูปดาบแบน ขนาดใหญ่ สีนํ้าตาล เมื่อแก่จะแตกตามยาว ภายในมีเมล็ดแบนสีขาว มีปีกบาง เพกาเป็นต้นไม้ที่มีการกระจายพันธุ์กว้าง พบตั้งแต่ภูมิภาคเอเชียใต้ จีนตอนใต้จนถึงภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย โดยพบขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในป่าดิบชื้นและพื้นที่โล่งทั่วไป (ภาพที่ 1)^(5,6)



ภาพที่ 1 ต้นและเปลือกต้นเพกา (*Oroxylum indicum* (L.) Kurz)

ส่วนต่าง ๆ ของเพกาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน มีสรรพคุณใช้รักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ ตามตำรายาไทยพบว่าเปลือกต้นเพกามีรสฝาด ขม เย็น ช่วยสมานแผล ดับพิษกาฬ แก้อ่อนใน แก้อ่อนใน ทำให้น้ำเหลือง เป็นปกติ ดับพิษโลหิต บำรุงโลหิต แก้เสมหะจุกคอ ขับเสมหะ แก้บิด แก้อาการจุกเสียด แก้ไข้รากสาด แก้ฝี รักษาเมรั้งเพลิง ขับเหงื่อ แก้ไขข้ออักเสบชนิดเฉียบพลัน ช่วยเจริญอาหาร⁽⁷⁾ จากบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ใช้เปลือก เพกาพร้อมกับสมุนไพรอื่นในตำรับ ได้แก่ ตำรับ “ยาเหลืองปิดสมุทร” มีสรรพคุณบรรเทาอาการท้องเสียชนิดที่ไม่เกิด จากการติดเชื้อ เช่น อุจจาระไม่เป็นมูกหรือมีเลือดปน และท้องเสียชนิดที่ไม่มีไข้ และตำรับ “ยาเลื้อดงาม” มีสรรพคุณ บรรเทาอาการปวดประจำเดือน ช่วยให้ประจำเดือนมาเป็นปกติ แก้มุตกิด⁽⁸⁾ มีรายงานว่าสารเคมีที่พบในเปลือก ต้นเพกา คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เช่น oroxylin A, baicalein, chrysin, scutellarein^(9,10) เป็นต้น และการศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัด จากเปลือกต้นเพกามีฤทธิ์ต่าง ๆ ได้แก่ ด้านอักเสบ^(11,12,13,14) ด้านอาการปวด^(11,15) ปกป้องเซลล์ตับ^(16,17) ด้านเชื้อ จุลชีพ^(13,18,19,20) ด้านท้องเสีย^(13,15,20,21) ด้านการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์⁽²²⁾ ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง⁽²³⁾ ลดไขมัน⁽²⁴⁾ ยับยั้งการสร้างเซลล์ไขมัน⁽²⁵⁾ ด้านเบาหวาน⁽²⁶⁾ เร่งการหายของแผล⁽²⁷⁾ และต้านอนุมูลอิสระ^(12,24,26,27,28)

เปลือกต้นเพกาเป็นแหล่งของสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) ที่มีคุณสมบัติต้าน ออกซิเดชัน^(24,26,27,28) และมีหลักฐานสนับสนุนว่าสาร antioxidants อาจป้องกันการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อม ของเซลล์ประสาทอันเป็นผลมาจาก oxidative stress ได้⁽⁴⁾ ดังนั้นการลดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ประสาท จึงเป็นเป้าหมายหลักที่น่าสนใจในการป้องกันและรักษา neurodegenerative diseases สารสกัดที่ได้จากเปลือกต้น เพกาอาจสามารถป้องกันหรือลดการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท ทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาท ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดเพกาในการปกป้องเซลล์ประสาท จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยประเมินการดักจับ (scavenge) อนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ และศึกษาฤทธิ์ ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress จำนวน 2 โมเดล โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma cells แล้วประเมินความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยการตรวจวัด 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction และ การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane damage) หรือการตายของเซลล์ (cell death) ด้วยการตรวจวัด lactate dehydrogenase (LDH) release

วัสดุและวิธีการ

วัตถุดิบ

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพกาจากพื้นที่จังหวัดจันทบุรี เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการศึกษา และตรวจ ระบุชนิดพร้อมส่วนของเปลือกต้นตามหลักอนุกรมวิธานพืช^(5,6) เพื่อจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง (voucher specimen) เก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑสถาน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMSC Herbarium) โดยมีหมายเลข พรรณไม้ของพิพิธภัณฑสถาน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ DMSC 5188

การเตรียมสารสกัดเปลือกเพกา

แยกชิ้นเปลือกต้นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบดเป็นผงหยาบ และเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทก่อนนำไปเตรียมสารสกัด

การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ

นำผงสมุนไพรแห้งของเปลือกต้นของเพกาตั้งต้นปริมาณ 100 กรัม มาเตรียมเป็นสารสกัดโดยการต้มกลั่นในน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไปทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator (Rotary vacuum evaporator, Büchi, Japan) จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer ได้สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นของเพกา (OI-W) โดยมีร้อยละของปริมาณสารที่สกัดได้เท่ากับ 24 (%yield, wt/wt)

การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล

นำผงสมุนไพรแห้งของเปลือกต้นของเพกาตั้งต้นปริมาณ 100 กรัม มาต้มกลั่นในเอทานอล 95% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นของเพกา (OI-E) โดยมี %yield, wt/wt เท่ากับ 25

การควบคุมคุณภาพสารสกัด

การควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (Thin layer chromatography; TLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน baicalein, chrysin ตรวจสอบลักษณะของโครมาโทแกรม (chromatogram) ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทำปฏิกิริยากับสารละลาย NP-Polyethylene glycol (NP-PEG) แล้วตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี hydroxyl radical scavenging assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล โดยดัดแปลงจากวิธีของ Halliwell และคณะ⁽²⁹⁾ ดังนี้ reaction mixture ประกอบด้วย deoxyribose (1 มิลลิโมลาร์) 100 ไมโครลิตร สารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 ไมโครโมลาร์) 10 ไมโครลิตร H_2O_2 (100 ไมโครโมลาร์) 10 ไมโครลิตร ascorbic acid (Sigma-aldrich, USA) (100 ไมโครโมลาร์) 100 ไมโครลิตร และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 20–400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสารมาตรฐาน trolox (Sigma-aldrich, USA) 40–400 ไมโครโมลาร์ ผสมสารให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย butylate hydroxytoluene (100 มิลลิโมลาร์) 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาทำ Thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS assay) โดยเติม trichloroacetic acid (2.8%) 0.5 มิลลิลิตร และ thiobarbituric acid (1%) 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ครั้ง (duplicate)

ผลการทดลองที่ได้นำไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (ร้อยละการเกิด TBARS) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐาน การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจะพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (Inhibitory concentration at 50%, IC_{50}) และค่า Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความแรงของสารสกัดสมุนไพรในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นจำนวนเท่าเมื่อเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี (trolox) ต่อกรัมของตัวอย่างสารสกัด โดยสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ตึ้นนั้นจะมีค่า IC_{50} ในระดับต่ำ และค่า TEAC ในระดับสูง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี superoxide radical scavenging assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nishikimi และคณะ⁽³⁰⁾ ดังนี้ reaction mixture ประกอบด้วย nitroblue tetrazolium (Sigma-aldrich, USA) 258 ไมโครโมลาร์ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 996 ไมโครโมลาร์ และ phenazine methosulfate (PMS) 16.2 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 50 ไมโครลิตร และสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐาน gallic acid (Sigma-aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 50, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมสารทุกตัวใน phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) ซึ่งประกอบด้วย disodium phosphate และ monosodium phosphate ผสมสารให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (SynergyTM HT, Biotex, USA) ที่ 562 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าร้อยละของ activity เทียบกับกลุ่มที่เกิดปฏิกิริยา 100% (full oxidation) คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) แล้วนำมา plot กราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma cells, N1E-115 (Cat. No. CRL-2263) (American Type Culture Collection (ATCC), USA) passage number 24-34 ซึ่งเป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ CO_2 5% ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-high glucose; Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร fetal bovine serum 10% (FBS; Hyclone, USA) และยาปฏิชีวนะ penicillin G sodium (100 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นาน 5-7 วัน หลังจากนั้นย่อยเซลล์ด้วย trypsin-EDTA 0.25% ให้ได้ cell suspension แล้วนำไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Sorval RT7, USA) ด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ cell pellet มาเติม DMEM ที่มี FBS 10% และทำเป็น cell suspension นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย hemocytometer โดยวิธี trypan blue exclusion และนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (passage) โดยการแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน และเพาะเลี้ยงขยายดังที่กล่าว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนประมาณ 80-90% ของพื้นที่ขวด

การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาท

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate (flat-shape) โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO_2 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีซีรัม ซึ่งประกอบด้วย DMEM-high glucose (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะ และ N2 supplement ได้แก่ sodium selenite (Na_2SeO_3) 30 นาโนโมลาร์ human transferrin 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร bovine insulin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร progesterone 20 นาโนโมลาร์ และ putrescin 100 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ไปใช้ในการทดลองหลังจากอายุได้ 48 ชั่วโมง

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากกลูตาเมต: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate (flat-shape) ที่เคลือบด้วยสาร poly-D-lysine 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM-high glucose (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร FBS 0.5% และยาปฏิชีวนะ แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 1.5% ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ได้ภายใต้สภาวะที่มีซีรัมต่ำ และมี DMSO^(31,32) เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกจนครบ 96 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองได้

การทดสอบในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

เจือจางสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% (เทียบเท่ากับ 9.794 โมลาร์) ด้วย Phosphate Buffered Saline (DPBS; Sigma-Aldrich, USA) ที่มี MgCl_2 0.100 กรัม/ลิตร (DPBS ประกอบด้วย KCl 0.200 กรัม/ลิตร NaCl 8.000 กรัม/ลิตร KH_2PO_4 0.200 กรัม/ลิตร และ Na_2HPO_4 (anhydrous) 1.150 กรัม/ลิตร) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม PBS ในปริมาณเท่ากัน หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

ละลายสารสกัด OI-W ใน sterile distilled water และละลายสารสกัด OI-E ใน DMSO บริสุทธิ์ แล้วเจือจางด้วย sterile distilled water เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติม OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E พร้อมกับเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุม และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 ไมโครโมลาร์ และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction assay หากพบว่าสารสกัดสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะประเมินการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรวจวัดด้วยวิธี LDH release assay

การทดสอบในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากกลูตาเมต

การทดสอบความเป็นพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ละลายกลูตาเมตและไกลซีนใน sterile PBS (DPBS ที่ปราศจาก $MgCl_2$) แล้วเจือจางด้วย PBS เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ พร้อมกับเติมไกลซีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม PBS ในปริมาตรเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงปกติ

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาตรเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาตรเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมต

นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาตรเท่ากันในการทดสอบผลของสารสกัด OI-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาตรเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด OI-E พร้อมกับเติมกลูตาเมต 50 มิลลิโมลาร์ และไกลซีน 2 มิลลิโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุม และเติม PBS ในปริมาตรเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ก่อนเติมกลูตาเมตและไกลซีน และเติม PBS ในปริมาตรเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability โดยตรวจวัดด้วยวิธี MTT reduction กรณีที่พบว่าสารสกัดสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตจะประเมินการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยตรวจวัดด้วยวิธี LDH release assay

การประเมินคุณภาพ และการตรวจวัดความอยู่รอดและการตายของเซลล์

การประเมิน cell morphology

ตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope, Axiovert 200, Zeiss, Germany) โดยใช้เทคนิค Phase Contrast

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT reduction assay

ตรวจวัด MTT reduction ซึ่งบ่งบอกความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (1983)⁽³³⁾ ดังนี้ เติมสารละลาย MTT 10 ไมโครลิตร (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS) ลงในเซลล์ของแต่ละหลุม (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติม DMSO 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ดูดสารละลายของแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย

Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 570/620 นาโนเมตร ค่า MTT reduction แสดงในรูปของร้อยละเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ (untreated control) ซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสารหรือสมุนไพร $\times 100$) / ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

การตรวจวัดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธี LDH release assay

ตรวจวัดปริมาณ LDH ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (LDH release) เป็นการประเมินการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งบ่งบอกการตายของเซลล์ (cell death) ด้วยวิธี colorimetric โดยใช้ *In vitro* Toxicology Assay Kit Lactate dehydrogenase based (Sigma, USA) เป็นการวัดปริมาณเอนไซม์ LDH ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ดังนี้ ดูด medium 100 ไมโครลิตร จากแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate เพื่อวัดปริมาณ LDH ภายนอกเซลล์ และดูด medium ที่เหลือทิ้ง แล้วเติม Triton X-100 (0.5%) 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นดูด aliquots 100 ไมโครลิตร จากแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate เพื่อวัดปริมาณ LDH ภายในเซลล์ ปฏิบัติการเริ่มโดยการเติม assay mixture (ประกอบด้วยสารตั้งต้น สารทำให้เกิดสีและเอนไซม์) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วหุ้ม plate ด้วย aluminium foil และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม HCl (0.5N) 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 490/690 นาโนเมตร ค่า LDH release ของแต่ละหลุมแสดงในรูปของร้อยละซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของ LDH ภายนอกเซลล์ $\times 100$) / (ค่าการดูดกลืนแสงของ LDH ภายนอกเซลล์ + ค่าการดูดกลืนแสงของ LDH ภายในเซลล์) และนำค่า LDH release ในรูปของร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (untreated control) ซึ่งคำนวณจาก LDH release ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร $\times 100$ / LDH release ของกลุ่มควบคุม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of the mean, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 3 การทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (N = 3) การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ unpair t-test ค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

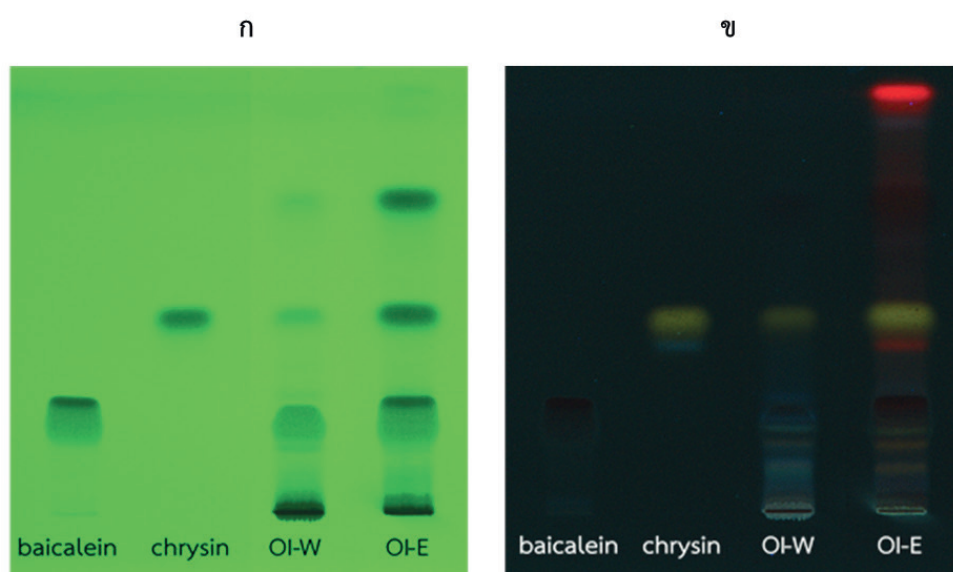
การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลในแต่ละวิธีของการทดสอบมาจาก 6 การทดลอง (n = 6) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ โดยแต่ละการทดลองทำภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน แล้วนำผลที่ได้จากการทดลองในแต่ละวันมารวมกัน จนครบ 6 การทดลอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้ในแต่ละวันที่ทำการทดสอบไม่มีความแตกต่างกัน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้ Analysis of variance (ANOVA) และการเปรียบเทียบข้อมูลที่แตกต่างกัน กรณีความแปรปรวนของทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันใช้ Scheffe multiple comparisons และกรณีความแปรปรวนของทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันใช้ Tamhane's T2 multiple comparisons ค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

การควบคุมคุณภาพสารสกัด

ผลการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยวิธี TLC พบแถบสีดำของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ตรงกับแถบของสารละลายมาตรฐาน baicalein และพบแถบสีเหลืองของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ตรงกับแถบของสารละลายมาตรฐาน chrysin ซึ่งจาก chromatogram พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) มีความเข้มของแถบมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกามีปริมาณสาร baicalein และ chrysin มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา



ภาพที่ 2 ที่แอลซีโครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน baicalein และ chrysin

ก. ตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ข. พ่นด้วยสารละลาย NP-PEG และตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-E มีฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลตามความเข้มข้น (concentration dependent manner) ที่ใช้ทดสอบ โดยสารสกัด OI-W มีค่า IC_{50} เท่ากับ 121.17 ± 5.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัด OI-E มีค่า IC_{50} เท่ากับ 61.72 ± 4.44 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารมาตรฐาน trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 136.99 ± 5.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากกว่าสารสกัด OI-W และสารสกัดทั้งสองชนิดต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่า trolox โดยสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลมีความแรงในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (TEAC) เป็น 1.13 และ 2.23 เท่า เมื่อเทียบกับ trolox หรืออนุพันธ์วิตามินอีต่อกรัมของตัวอย่างสารสกัด

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์พบว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-E มีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แบบ concentration dependent manner โดยสารสกัด OI-W มีค่า IC_{50} เท่ากับ 85.62 ± 3.30

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัด OI-E มีค่า IC_{50} เท่ากับ 86.78 ± 9.45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารมาตรฐาน gallic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.14 ± 0.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-E สามารถต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ต้านได้ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ gallic acid

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ของ hydroxyl radical scavenging activity ของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

สารสกัด/สารมาตรฐาน	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	TEAC/Trolox equivalence
สารสกัดด้วยน้ำ (OI-W)	121.17 ± 5.07	1.13
สารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E)	61.72 ± 4.44	2.23
Trolox	136.99 ± 5.25	

IC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจากการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ($n = 3$) และแต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ

TEAC = ค่าบอกความแรงของสารสกัดสมุนไพรในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นจำนวนเท่า เมื่อเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี (Trolox/ α -tocopherol equivalent antioxidant capacity) ต่อกรัมของตัวอย่างสารสกัด

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของ superoxide radical scavenging activity ของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

สารสกัด/สารมาตรฐาน	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัดด้วยน้ำ (OI-W)	85.62 ± 3.30
สารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E)	86.78 ± 9.45
Gallic acid	16.14 ± 0.79

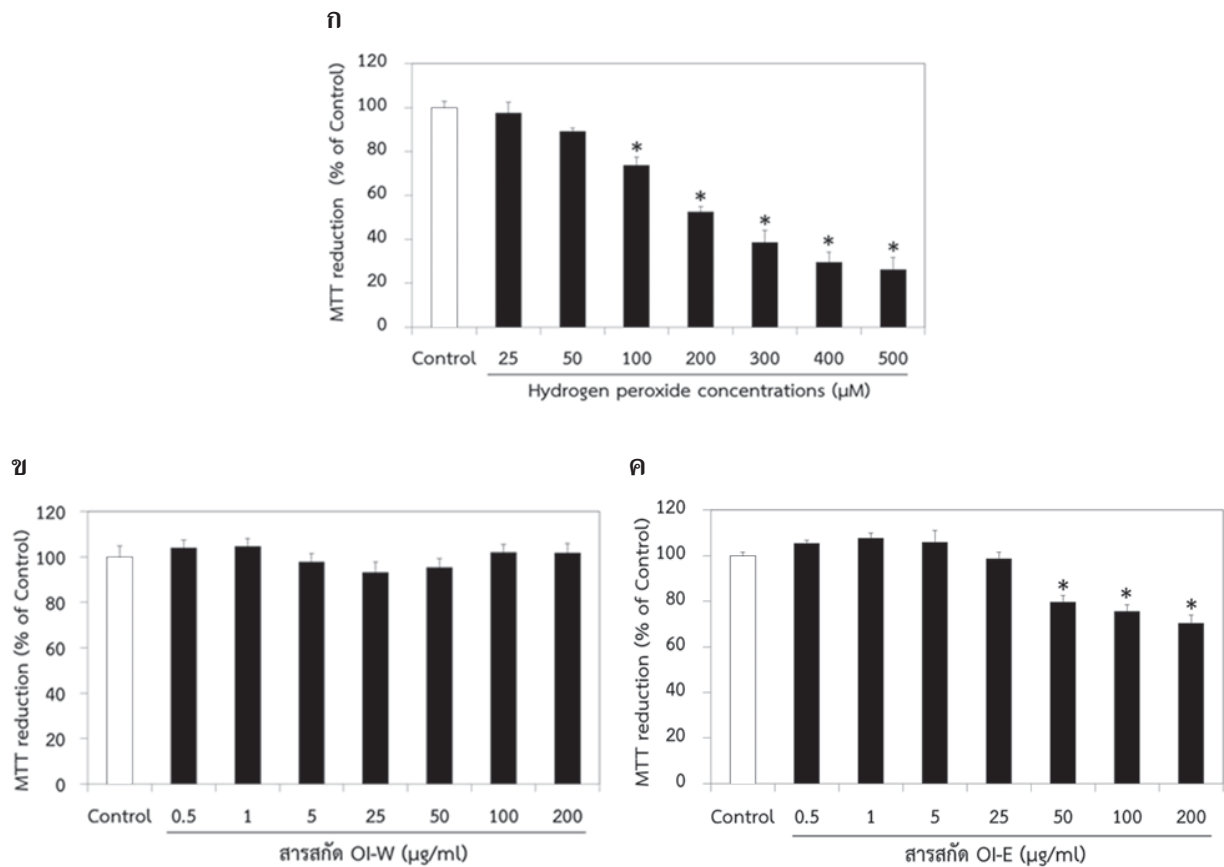
IC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจากการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ($n = 3$) และแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาท N1E-115 พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ concentration dependent manner โดย cell viability ของกลุ่มที่สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นในช่วง 100–500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 3 ก) และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ โดยมีลักษณะบวม/หดตัว/ฝ่อเป็นซากเซลล์ที่ตายแล้วอยู่ปะปนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และ

neurites มีความยาวสั้นลงและไม่มีความต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4) ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นพร้อมกันกับการลดลงของ cell viability เนื่องจากเซลล์ประสาทสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทในการทดลองต่อไป



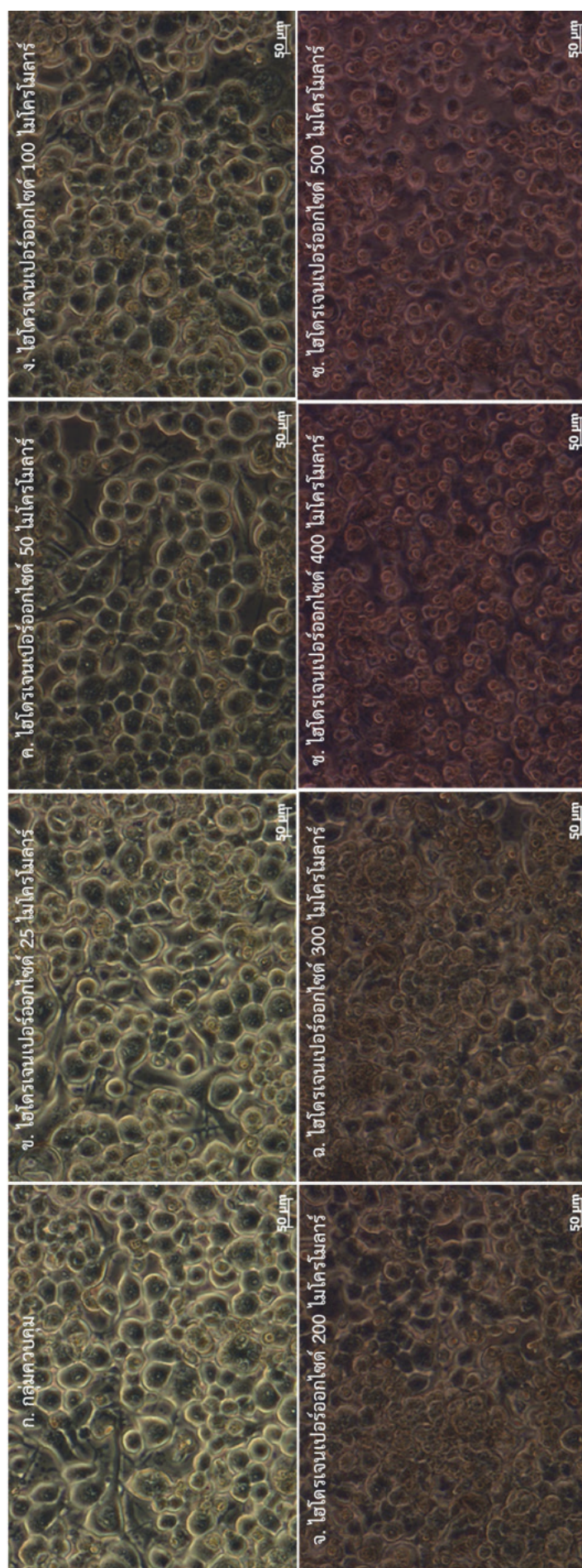
ภาพที่ 3 ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115

(ก) ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ข) ผลของสารสกัด OI-W ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ค) ผลของสารสกัด OI-E ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง ($n = 6$) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4 ความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับโดยใช้เทคนิค Phase Contrast (ก) กลุ่มควบคุม (ข) - (ช) กลุ่มสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25-500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

เมื่อเซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทเป็นร้อยละ 103.93, 104.53, 97.78, 93.19, 95.35, 102.21 และ 101.66 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) (ภาพที่ 3 ข) เมื่อเซลล์ประสาทสัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทเป็นร้อยละ 105.40, 107.74, 105.93, 98.76, 79.72, 75.60 และ 70.39 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) (ภาพที่ 3 ค) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W (0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ในขณะที่สารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลลด cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 20.28, 24.40 และ 29.61 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 3 ข และภาพที่ 3 ค)

การทดสอบสารสกัด OI-W ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นร้อยละ 46.40 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.38, 25.20 30.27 และ 33.51 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 5 ก)

จากการประเมินการตายของเซลล์ พบว่า LDH release ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 184.89 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลด LDH release อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 95.51, 120.60, 144.42 และ 154.31 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 5 ข) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 25-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถป้องกันการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่ม cell viability และลด plasma membrane damage ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามเมื่อให้เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียวก่อนที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-W ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (ภาพที่ 5 ค)

ขณะที่เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด OI-E พบว่า MTT reduction ของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นร้อยละ 47.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.41 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 6 ก)

จากการประเมินการตายของเซลล์ พบว่า LDH release ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นหลังการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 196.44% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลด LDH release อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 124.49 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ภาพที่ 6 ข) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-E จากเปลือก

ต้นเพกา ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถป้องกันการบาดเจ็บหรือตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยเพิ่ม cell viability และลด plasma membrane damage ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามเมื่อให้เซลล์ประสาท N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการให้สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียวก่อนที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด OI-E ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (ภาพที่ 6 ค)

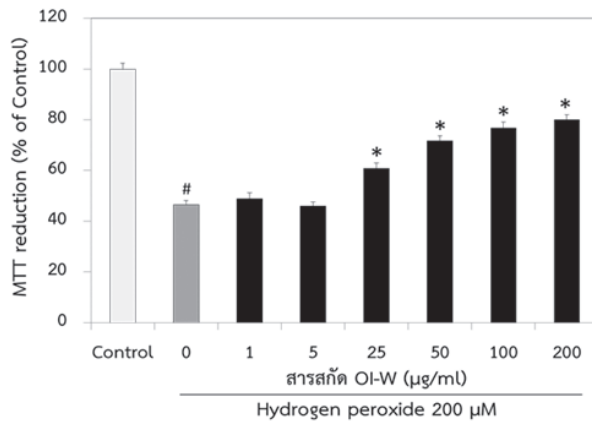
การทดสอบผลของสารสกัด OI-W และ OI-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมต

จากการทดสอบความเป็นพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาท N1E-115 ที่ทำให้เปลี่ยนสภาพแล้วด้วย DMSO (differentiated N1E-115) พบว่ากลูตาเมตเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ concentration dependent manner โดย cell viability ของกลุ่มที่สัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้นในช่วง 25-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 7 ก) และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ประสาทลดลง เซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ และ neurites มีความยาวสั้นลงและไม่มี ความต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 8) ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นพร้อมกันกับการลดลงของ cell viability เนื่องจากเซลล์ประสาทสัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในการทดลองต่อไป

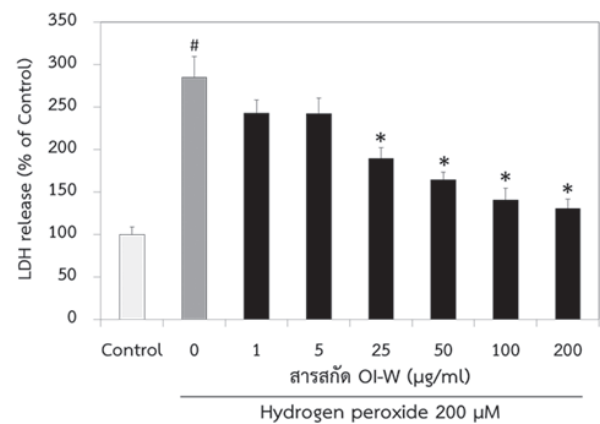
เมื่อให้เซลล์ประสาท differentiated N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาท ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W และ OI-E ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 7 ข และภาพที่ 7 ค)

เมื่อทำให้เซลล์ประสาท differentiated N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 9 ก และภาพที่ 9 ข) หรือสัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือ OI-E ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการให้กลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วประเมิน cell viability ด้วยการวัด MTT reduction พบผลเช่นเดียวกัน คือ ทั้งสารสกัด OI-W และ OI-E ไม่มีผลต่อ MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 9 ค และภาพที่ 9 ง) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัด OI-W และ OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมตได้

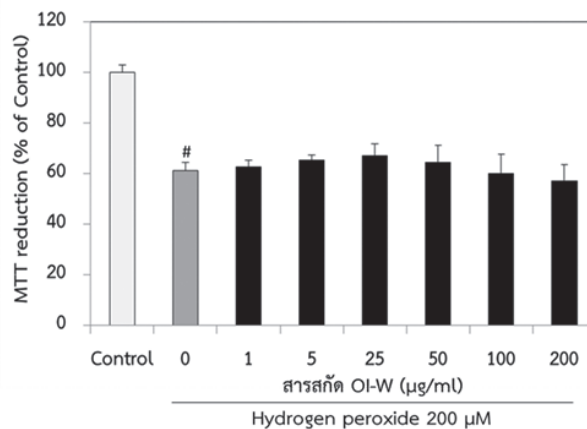
ก



ข



ค



ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115 ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

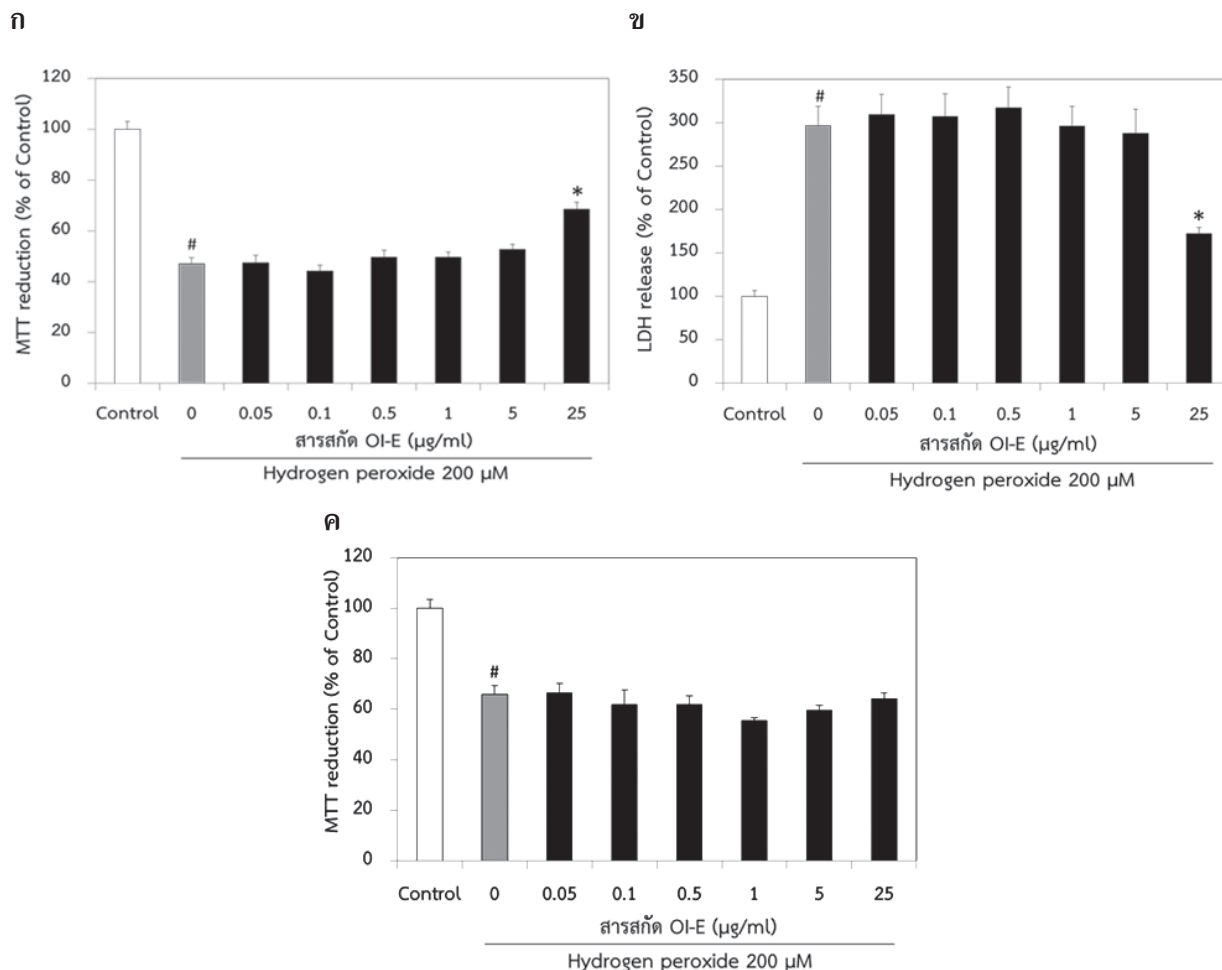
(ก) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-W พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และ (ข) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-W พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell death ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay และ cell death ด้วยวิธี LDH release assay

(ค) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-W ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก่อนสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง ($n = 6$) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



ภาพที่ 6 ผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115 ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

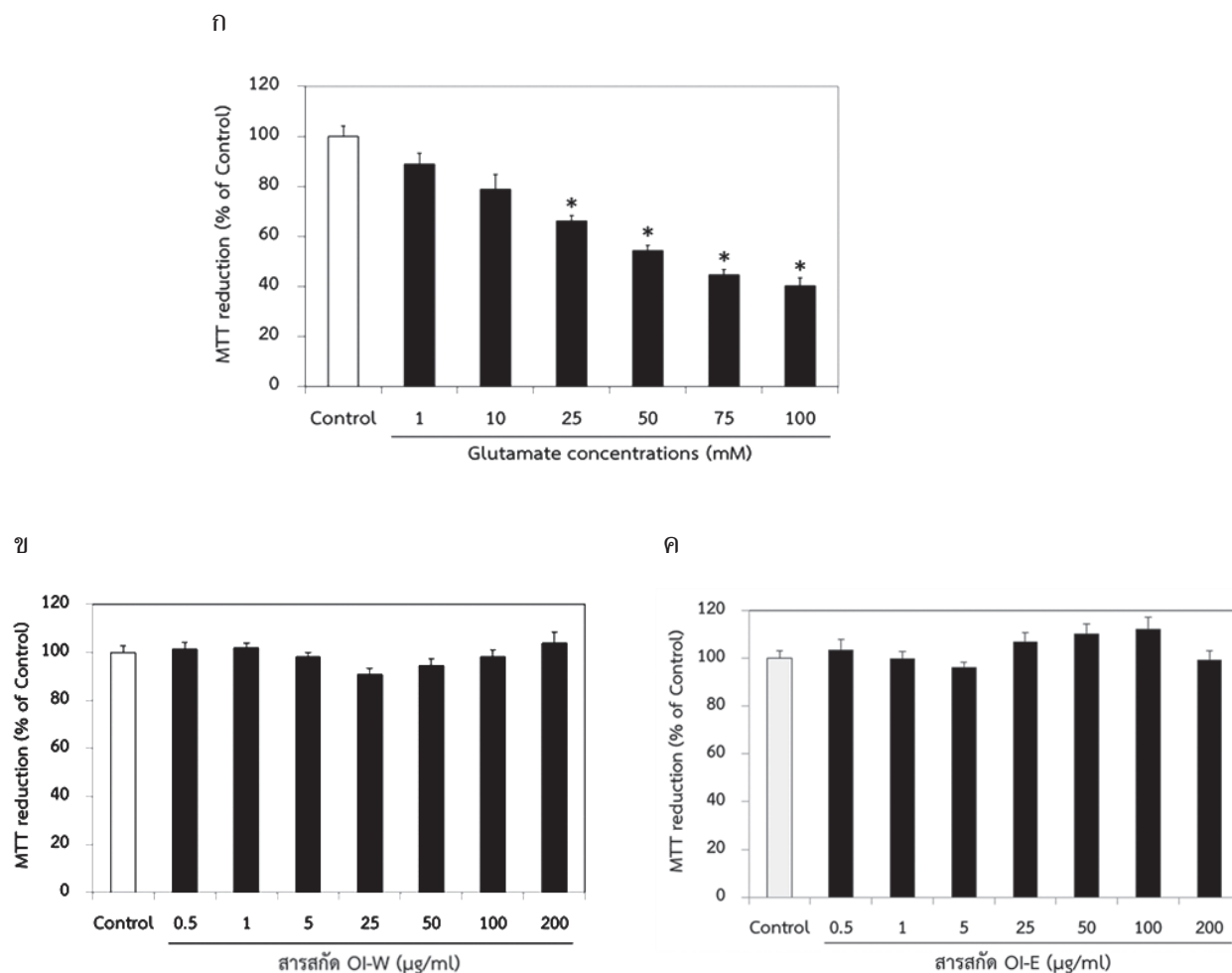
(ก) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-E พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และ (ข) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-E พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell death ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay และ cell death ด้วยวิธี LDH release assay

(ค) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-E ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ N1E-115 อายุ 48 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก่อนสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง ($n = 6$) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

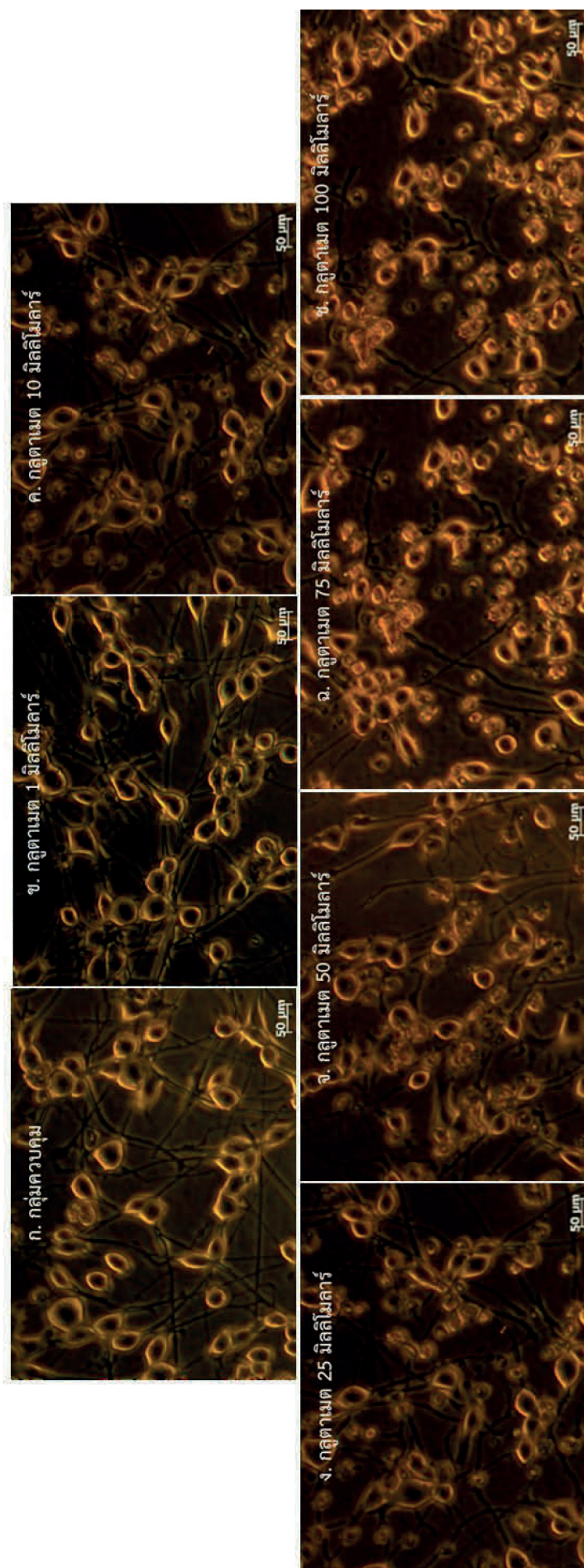


ภาพที่ 7 ผลของกลูตาเมต สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา (OI-E) ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115

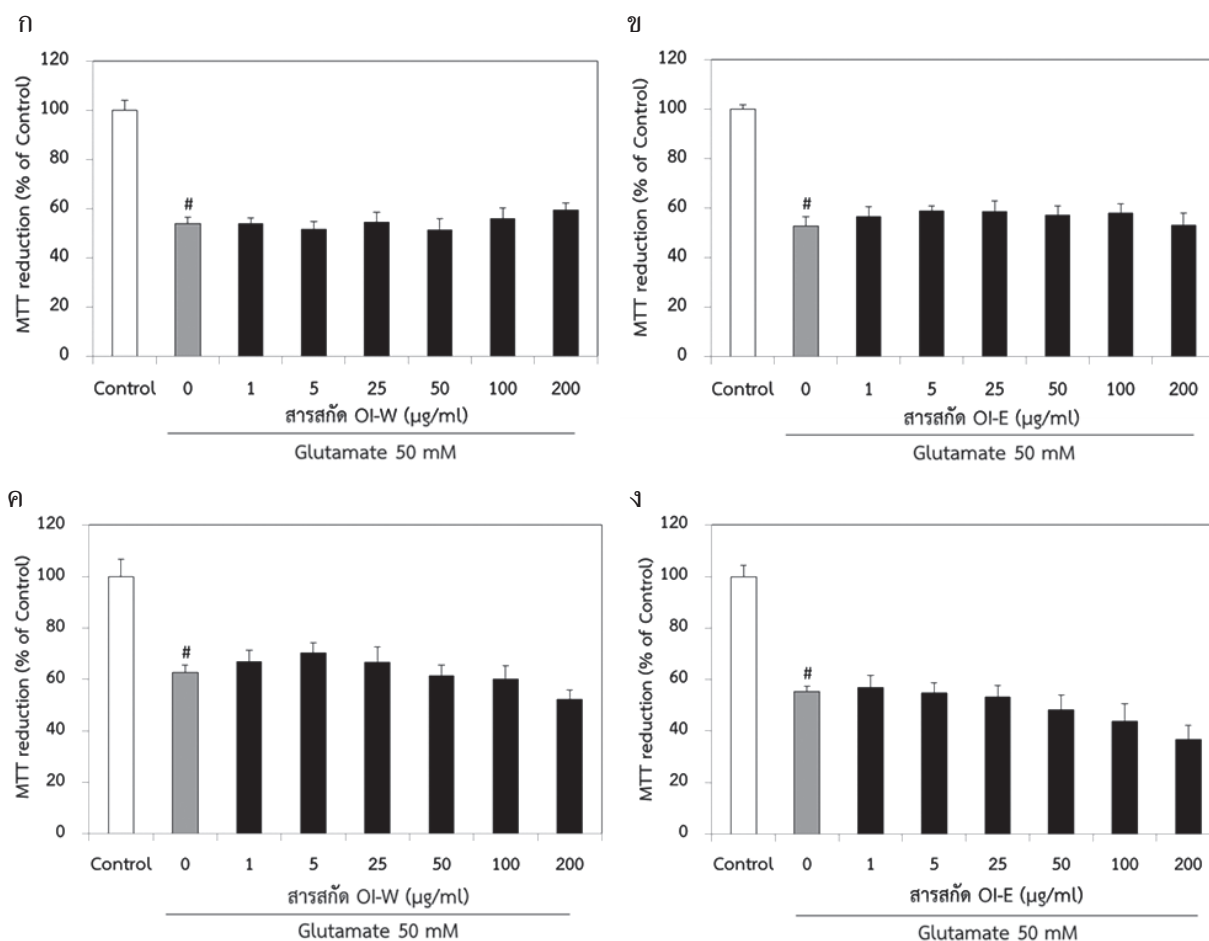
- (ก) ผลของกลูตาเมตต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- (ข) ผลของสารสกัด OI-W ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- (ค) ผลของสารสกัด OI-E ต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 0.5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง ($n = 6$) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 8 ความเป็นพิษของกลูตาเมตต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับโดยใช้เทคนิค Phase Contrast (ก) กลุ่มควบคุม (ข) - (ช) กลุ่มสัมผัสกับกลูตาเมต 1-100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



ภาพที่ 9 ผลของสารสกัดด้วยน้ำ (OI-W) และสารสกัดด้วยเอทานอล (OI-E) จากเปลือกต้นเพกาต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115 ที่เกิดจากกลูตาเมต

- (ก) ผลการสัมผัสร่วมของสารสกัด OI-W พร้อมกับกลูตาเมต (ข) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-E พร้อมกับกลูตาเมตต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- (ค) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-W ก่อนกับกลูตาเมต (ง) ผลการสัมผัสสารสกัด OI-E ก่อนกับกลูตาเมตต่อ cell viability ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เซลล์ differentiated N1E-115 อายุ 96 ชั่วโมง สัมผัสกับสารสกัด OI-W หรือสารสกัด OI-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมิน cell viability ด้วยวิธี MTT reduction assay

ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 การทดลอง ($n = 6$) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิจารณ์

อนุมูลอิสระมีบทบาทในการทำลายเนื้อเยื่อและมีผลต่อความเสื่อมของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด neurodegenerative diseases และทั้งไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยใช้แบบจำลองที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ trolox และ gallic acid

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาสามารถต้านอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ได้โดยสารสกัด OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้แรงกว่าสารสกัด OI-W และสารสกัด OI-W และ OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่า trolox ในขณะที่สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ gallic acid การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา สอดคล้องกับรายงานที่มีผู้วิจัยมาแล้ว^(26,28) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีอื่นที่ต่างกัน จากรายงานของ Singh และ Kakkar⁽²⁶⁾ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกามีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่แรงในหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin โดยศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate (ABTS) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay และ Saha และคณะ⁽²⁸⁾ รายงานว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกเพกา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, FRAP assay, hydrogen peroxide scavenging activity และ thiobarbituric acid assay

ข้อมูลเบื้องต้นจากการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (TLC) และใช้ baicalein และ chrysin เป็นสารเปรียบเทียบ (reference substances) นั้น พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีสาร baicalein, chrysin ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นที่พบองค์ประกอบทางเคมีในเปลือกต้นเพกาเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น oroxylin A, baicalein, chrysin, scutellarein^(9,10) ดังนั้นการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา นี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดดังกล่าว และสารสกัด OI-E ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้แรงกว่าสารสกัด OI-W สอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาโดยวิธี TLC ที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกา มีปริมาณสาร baicalein และ chrysin มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกต้นเพกา (ภาพที่ 2) หรืออาจมีสารอื่นในกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือสารกลุ่มโพลีฟีนอลตัวอื่นเป็นส่วนประกอบด้วยจึงเสริมฤทธิ์กัน ทำให้สารสกัดด้วยเอทานอลแสดงต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า และมีหลักฐานสนับสนุนว่าสาร antioxidants อาจจะช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทอันเป็นผลมาจากภาวะ oxidative stress ได้⁽⁴⁾ ดังนั้นการที่สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้น กลไกการออกฤทธิ์อย่างน้อยส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในเปลือกต้นเพกาทำให้สามารถลดการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท ทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาทได้ หากมีการหาปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือโพลีฟีนอลในสารสกัดเพการ่วมด้วยจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความแรงในการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดสมุนไพร

จากการสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาพร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นผลให้เกิดการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงที่เกิดจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเพิ่ม cell viability และลด LDH release ในขณะที่การสัมผัสกับสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่มีผลต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงที่เกิดจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์

ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเกิดจากการออกฤทธิ์โดยตรงในการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อให้พร้อมกัน ทำให้ลดการตายของเซลล์ประสาท เป็นการแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทด้วยการไปยับยั้ง/ลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ประสาทในแง่ของการป้องกันการเกิดพิษเมื่อให้สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเข้าสู่เซลล์ก่อนแล้วจึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลัง ดังแสดงในภาพที่ 5 ค และภาพที่ 6 ค

การสัมผัสของเซลล์ประสาท differentiated N1E-115 กับสารสกัด OI-W หรือสารสกัด OI-E พร้อมกับการก่อนการสัมผัสกับกลูตาเมต ไม่มีผลต่อการบาดเจ็บหรือการตายที่เกิดจากพิษของกลูตาเมต แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาไม่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ที่เป็นผลมาจากพิษของกลูตาเมต แม้จะเป็นที่ทราบว่าการกลูตาเมตทำให้เซลล์ตายโดยเกี่ยวข้องกับ oxidative stress ในทำนองเดียวกับที่เกิดในสภาวะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็ตาม แต่กลไกการเกิดพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทมีความแตกต่างจากการเกิดพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยพิษของกลูตาเมตเกิดจากการกระตุ้นตัวรับกลูตาเมตมากเกินไปโดยเฉพาะ N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทจากการกระตุ้น glutamate (glutamate excitotoxicity) ทั้งในแบบ *in vitro* และ *in vivo*⁽³⁴⁾ เป็นผลให้แคลเซียมไหลเข้าเซลล์จำนวนมาก (calcium overload) เกิดการเสียสมดุลของแคลเซียม มีการสร้างและสะสมสารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกาย (ROS) ในปริมาณมากนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย เกิด mitochondrial dysfunction และ mitochondrial damage ตามมา ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทและกระตุ้นวิธีการตายของเซลล์⁽³⁵⁾ การที่สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาไม่สามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตได้เนื่องจากกลูตาเมตทำให้เซลล์ตายโดยมีกลไกอื่นนอกเหนือจากการชักนำให้เกิด oxidative stress ร่วมอยู่ด้วย ทำให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดเพกาไม่เพียงพอที่จะลดการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตได้อย่างไรก็ตามข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสมุนไพรเพกาในรูปของสารสกัดหยาบเท่านั้น หากมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเตรียมสารสกัดเพกาให้บริสุทธิ์ขึ้นเป็นสารสกัดเพกาแยกส่วน (subfraction extract) และศึกษาผลสารสกัดเพกาแยกส่วนต่อ markers ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ เช่น การวัดปริมาณ glutathione, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, lipid peroxidation, ROS เป็นต้น จะทำให้ทราบถึงสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดเพกาที่ชัดเจนขึ้น

จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นรายงานครั้งแรกของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อให้พร้อมกัน โดยกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา ซึ่งการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลเป็นแนวทางหนึ่งที่ป้องกันไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย และสารสกัดนี้อาจมีศักยภาพในการปกป้องเซลล์ประสาทจากโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ อย่างไรก็ตามควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาเพิ่มเติมในเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงต่อพยาธิสภาพหรือทดสอบในสัตว์ทดลองก่อนนำไปพัฒนาเป็นยาสมุนไพรต่อไป

สรุป

สารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกต้นเพกาสามารถดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ได้ โดยต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่าอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ การสัมผัสร่วมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำหรือสารสกัดด้วยเอทานอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา มีฤทธิ์ปกป้องการตายของเซลล์ประสาท N1E-115 สารสกัดจากเปลือกต้นเพกาจึงอาจมีศักยภาพในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทหรือบรรเทาการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ ผลการศึกษานี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับยับยั้งหรือบรรเทาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเภสัชเวท สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ภาพสมุนไพรเพกา

เอกสารอ้างอิง

1. Mao X, Gu C, Chen D, Yu B, He J. Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget* 2017; 8(46): 81649-61.
2. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp Neurobiol* 2015; 24(4): 325-40.
3. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2016; 53(6): 4094-125.
4. Chang KH, Cheng ML, Chiang MC, Chen CM. Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases. *Clin Chim Acta* 2018; 485: 79-87.
5. Gardner S, Sidisunthorn P, Chayamarit K. Forest trees of Southern Thailand volume 1: acanthaceae to escalloniaceae. Bangkok, Thailand: Kobfai Publishing Project; 2015. p. 242-247.
6. Santisuk T. Bignoniaceae. In: Smitinand T, Larsen K, editors. Flora of Thailand volume 5, part 1. Bangkok, Thailand: Forest Herbarium, Department of National Parks; 1987. p. 32-37.
7. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เพกา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 19 พ.ย. 2562]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก URL: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=94>.
8. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2562. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 95 ง (วันที่ 17 เมษายน 2562). หน้า 8.
9. Sankara S, Nair AGR. Flavonoids of the stem bark of *Oroxylum indicum*. *Curr Sci* 1972; 41: 62-3.
10. Majumdar S, Mohanta BC, Chowdhury DR, Banik R, Dinda B, Basak A. Proprotein convertase inhibitory activities of flavonoids isolated from *Oroxylum indicum*. *Curr Med Chem* 2010; 17(19): 2049-58.
11. Lalrinzuali K, Vabeiryureilai M, Jagetia GC. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of stem bark of Sonapatha *Oroxylum indicum* in vivo. *Int J Inflamm* 2016; 2016: 8247014. (8 pages).
12. Siritwatanametanon N, Fiebich BL, Efferth T, Prieto JM, Heinrich M. Traditional used Thai medicinal plants: in vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(2): 196-207.
13. Ali RM, Houghton PJ, Raman A, Hoult JRS. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of extracts and constituents of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. *Phytomedicine* 1998; 5(5): 375-81.

14. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JRS, Itharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J Ethnopharmacol* 2003; 85(2-3): 207-15.
15. Asaduzzaman M, Nasrin N, Muhit A, Raihan SZ, Apu AS, Akbar A. Antidiarrheal, analgesic and cytotoxic activities of crude extract of *Oroxylum indicum* (L.) stem bark. *J Pharm Res* 2011; 4(11): 4296-8.
16. Tripathy BN, Panda SK, Sahoo S, Mishra SK, Nayak L. Phytochemical analysis and hepatoprotective effect of stem bark of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *Int J Pharm Biol Arch* 2011; 2(6): 1714-7.
17. Bharali MK, Konya H, Chetry LB. Protective effect of *Oroxylum indicum* on acetaminophen induced liver injury in rat. *Int Curr Pharm J* 2014; 3(2): 223-7.
18. Radhika LG, Meena CV, Peter S, Rajesh KS, Rosamma MP. Phytochemical and antimicrobial study of *Oroxylum indicum*. *Anc Sci Life* 2011; 30(4): 114-20.
19. Das S, Choudhury MD. Antimicrobial activity of stem bark extracts from the plant *Oroxylum indicum* Vent. *Assam Univ J Sci Technol* 2010; 5(1): 95-9.
20. Chusri S, Sinvaraphan N, Chaipak P, Luxsananuwig A, Voravuthikunchai SP. Evaluation of antibacterial activity, phytochemical constituents and cytotoxicity effects of Thai household ancient remedies. *J Altern Complement Med* 2014; 20(12): 909-18.
21. Sireeratawong S, Khonsung P, Nanna U, Vannasiri S, Lertprasertsuke N, Singhalak T, et al. Anti-diarrheal activity and toxicity of Learng Pid Samud recipe. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2012; 9(4): 519-29.
22. Chetry LB, Bharali MK. Antiproliferative effect of aqueous bark extract of *Oroxylum indicum* (L.) on *Vignaradiata* L (Green gram) seedlings. *J Phytopharmacol* 2018; 7(2): 175-9.
23. Kumar DRN, George VC, Suresh PK, Kumar RA. Cytotoxicity, apoptosis induction and anti-metastatic potential of *Oroxylum indicum* in human breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(6): 2729-34.
24. Shetgiri PP, Dargi KK, D'Mello PM. Evaluation of antioxidant and antihyperlipidemic activity of extracts rich in polyphenols. *Int J Phytomed* 2010; 2(3): 267-76.
25. Mangal P, Khare P, Jagtap S, Bishnoi M, Kondepudi KK, Bhutani KK. Screening of six Ayurvedic medicinal plants for anti-obesity potential: an investigation on bioactive constituents from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz bark. *J Ethnopharmacol* 2017; 197: 138-46.
26. Singh J, Kakkar P. Modulation of liver function, antioxidant responses, insulin resistance and glucose transport by *Oroxylum indicum* stem bark in STZ induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 62: 722-31.
27. Lalrinzuali K, Vabeiryureilai M, Jagetia GC. Topical application of stem bark ethanol extract of Sonapatha, *Oroxylum indicum* (L.) Kurz accelerates healing of deep dermal excision wound in Swiss albino mice. *J Ethnopharmacol* 2018; 227: 290-9.

28. Saha P, Choudhury PR, Das S, Talukdar AD, Choudhury MD. *In vitro* antioxidant activity of bark extracts of *Oroxylum indicum* (L.) vent. Asian J Pharm Clin Res 2017; 10(8): 263-6.
29. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal Biochem 1987; 165(1): 215-9.
30. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun 1972; 46(2): 849-54.
31. Amano T, Richelson E, Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. Proc Nat Acad Sci USA 1972; 69(1): 258-63.
32. Kimhi Y, Palfrey C, Spector I, Barak Y, Littauer UZ. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. Proc Nat Acad Sci USA 1976; 73(2): 462-6.
33. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
34. Lewerenz J, Maher P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases--what is the evidence? Front Neurosci 2015; 9: 469. (20 pages).
35. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. Oxid Med Cell Longev 2015; 964518. (7 pages).

Antioxidative and Neuroprotective Activities of *Oroxylum indicum* Stem Bark Extracts in Mouse Neuroblastoma Cells

Sadudee Rattanajarasroj Warunee Jirawattanapong Nattaporn Polsan

Nithida Phonkot Yuwadee Mettametha Sakwichai Ontong and Pratom Tongsrirak

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Oxidative stress is a major risk factor for neurodegenerative diseases. It has been reported that antioxidants could relieve symptoms of neurodegenerative diseases. Pa-ka (*Oroxylum indicum* (L.) Kurz) stem bark contains polyphenols with antioxidant activities and may be use to alleviate oxidative stress-induced neurodegenerative process. This study aimed to investigate the antioxidative and neuroprotective activities of water extract (OI-W) and ethanol extract (OI-E) from Pa-ka stem bark on hydrogen peroxide and glutamate-induced neurotoxicity in N1E-115 cell cultures. For free radical scavenging capacity using hydroxyl and superoxide scavenging assay, OI-W and OI-E exhibited antioxidant activity. It was found that co-exposure of cultured neurons to hydrogen peroxide with OI-W or OI-E extract for 24 hours could protect against cell injury or cell death from hydrogen peroxide in N1E-115 cultures, while both extracts did not prevent glutamate-induced neurotoxicity. These findings indicated that *O. indicum* stem bark showed the neuroprotective effect on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity, at least, its mechanism might partly involve the antioxidant activity. Further studies in *in vitro* models with specific pathology as well as in animals are required to clarify its activity and underlying mechanisms prior to develop as herbal medicine for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: *Oroxylum indicum*, antioxidative activity, neuroprotective activity

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง สูตรอัดเม็ดและประสิทธิภาพการใช้เพื่อควบคุม ยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคอเฟาสซิเอตัส สายพันธุ์ธรรมชาติพื้นที่ชายแดนไทย

อุรุษากร จันทรแสง นิตยา เมธาวณิชพงศ์ จิตติ จันทรแสง นันทพร ผลสุวรรณ พรธิดา เพชรสุวรรณ
พรชัย วิริยะศรานนท์ ดนาพร สารพฤษ และบัลลังก์ อุปพงษ์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

บทคัดย่อ แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงถูกนำมาใช้ควบคุมโรคที่นำโดยพาหะจากปัญหาการติดต่อสารเคมี แบคทีเรียบาซิลลัส ทุริงเยนซิส อิสราเอลเลนซิส (บีทีไอ) และบาซิลลัส สเฟียร์ดิส (บีเอส) มีราคาแพงและบางผลิตภัณฑ์ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ การศึกษาครั้งนี้ได้นำแบคทีเรียบีทีไอผงแห้งที่ผลิตขึ้น มีการทดสอบประสิทธิภาพและรายงานผลไปแล้ว มาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สูตรอัดเม็ด มาทดสอบประสิทธิภาพและความคงทนกับลูกน้ำยุงลายบ้าน จากนั้นนำไปทดสอบด้านความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคอเฟาสซิเอตัส สายพันธุ์พื้นที่ชายแดนไทยด้านประเทศเมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา ผลการศึกษาได้ผลิตภัณฑ์บีทีไอสูตรอัดเม็ดค่าความแรง 2,150 ITU/mg มีความคงทนควบคุมลูกน้ำยุงลายได้ร้อยละ 100 เป็นเวลา 28 วัน การทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญพื้นที่ไทย เมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา มีความต้านทานอยู่ในช่วง 0.36-1.21, 0.72-1.20 และ 0.92-1.39 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงรำคาญมาตรฐาน และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วน ได้ทดสอบความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญต่อแบคทีเรียบีเอสแบบผงแห้งที่ผลิตขึ้นและเทมโฟสควบคู่กัน พบว่าลูกน้ำยุงรำคาญพื้นที่ชายแดนไทยทั้ง 3 ด้านมีค่าความต้านทานต่อแบคทีเรียบีเอสอยู่ในช่วง 0.87-2.66, 1.99-3.17 และ 3.50-7.03 ต่อเทมโฟส 0.47-3.01, 1.04-1.86 และ 1.07-2.45 เท่า ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลเป็นแผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์

คำสำคัญ: บาซิลลัส ทุริงเยนซิส อิสราเอลเลนซิส (บีทีไอ), บาซิลลัส สเฟียร์ดิส (บีเอส), เทมโฟส, ยุงรำคาญ, แผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์

Corresponding author E-mail: uruyakorn.c@dmisc.mail.go.th

Received: 4 October 2019

Revised: 5 November 2020

Accepted: 16 November 2020

บทนำ

การควบคุมยุงเป็นมาตรการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อตัดวงจรการระบาดของโรคที่มียุงเป็นพาหะ การควบคุมยุงทำได้หลายวิธี ประกอบด้วยการใช้สารเคมี การควบคุมทางกายภาพ การจัดการแหล่งเพาะพันธุ์ การให้ความรู้กับประชาชน รวมทั้งการควบคุมทางชีววิธีซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับและถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเนื่องด้วยปัญหาความเป็นพิษของสารเคมี รวมทั้งปัญหาด้านความต้านทานของยุงพาหะเนื่องจากมีการใช้สารเคมีเป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่องจนทำให้ไม่สามารถควบคุมยุงได้อย่างมีประสิทธิภาพ การควบคุมทางชีววิธี หมายถึงการนำสิ่งมีชีวิตมาใช้ควบคุมสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งโดยปกติจะเป็นศัตรูทางธรรมชาติที่มีความจำเพาะต่อกัน โดยเป็นได้ทั้งในลักษณะของการเป็นตัวห้ำ ตัวเบียน และเชื้อโรคทั้งแบคทีเรีย ไวรัสและเชื้อรา ซึ่งพบว่ามีความปลอดภัยเนื่องจากมีความจำเพาะกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการควบคุม⁽¹⁾ การใช้แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง ทั้งชนิดบาซิลลัส ทุริงเยนซิส สายพันธุ์อิสราเอลเลนซิส; บีทีไอ (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; Bti) และบาซิลลัส สเฟียริกัส; บีเอส (*Bacillus sphaericus*; Bsph) เป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งการกำจัดลูกน้ำยุงลายในภาชนะขังน้ำในบ้านเรือน และกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญโดยนำไปใส่ในแหล่งเพาะพันธุ์ตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงที่มีจำหน่ายมีราคาแพง โดยเฉพาะเมื่อต้องใช้ในปริมาณมากเมื่อมีการระบาดของโรคที่นำโดยยุงพาหะเกิดขึ้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีการกิจหนึ่งในด้านการวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านสาธารณสุข จึงควรมีการพัฒนาการผลิตแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงเพื่อให้มีผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาใช้ช่วยในการควบคุมโรคที่เกิดจากยุง ประกอบกับในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยและประเทศในอาเซียนอีก 9 ประเทศได้มีการรวมตัวเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน และตามแผนแม่บทด้วยความเชื่อมโยงระหว่างกันอาเซียน ได้ให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางการคมนาคมของภูมิภาค ซึ่งทำให้มีการเคลื่อนย้ายของประชากรเข้าออกผ่านชายแดนมากขึ้น และส่งผลให้คนไทยมีความเสี่ยงในการเกิดโรคติดต่อข้ามพรมแดนมากขึ้นด้วย โดยมีทั้งโรคติดต่อจากคนสู่คนโดยตรงและโรคติดต่อนำโดยแมลง ได้แก่ โรคเท้าช้าง และมาลาเรีย เป็นต้น รวมทั้งได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อโรคพยาธิเท้าช้างในแรงงานต่างประเทศเป็นจำนวนมาก โดยในปี พ.ศ. 2557, 2558 และ 2559 มีการตรวจพบผู้มีเชื้อโรคพยาธิเท้าช้างในแรงงานชาวเมียนมาร์ร้อยละ 58.82, 33.30 และ 75.0 จากจำนวนผู้ป่วยที่พบทั้งหมดในประเทศไทยตามลำดับ^(2,3,4) ซึ่งโรคนี้ในประเทศไทยมียุงลายป่าและยุงเสือเป็นพาหะ ขณะที่ในประเทศเมียนมาร์ จีน และอินเดีย มียุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส (*Culex quinquefasciatus*) เป็นพาหะ ซึ่งยุงรำคาญชนิดนี้ในประเทศไทยเป็นยุงที่มีความชุกชุมสูงและพบได้ทั่วไปโดยมีแหล่งเพาะพันธุ์อยู่ตามแหล่งน้ำที่มีอินทรีย์วัตถุสูง เช่น แหล่งน้ำขัง ท่อระบายน้ำ เป็นต้น หากยุงรำคาญชนิดนี้ได้รับเชื้อโรคพยาธิเท้าช้างจากประชากรที่มีการเคลื่อนย้ายเข้าออกผ่านชายแดน จะทำให้มีโอกาสเป็นยุงพาหะนำโรคดังกล่าวมาสู่ประชาชนคนไทยได้⁽⁵⁾ ดังนั้นเพื่อให้กระทรวงสาธารณสุขมีความพร้อมในการควบคุมยุงรำคาญชนิดนี้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง บีทีไอแบบผงแห้งที่คณะผู้วิจัยได้ผลิตขึ้นและมีการทดสอบประสิทธิภาพรวมทั้งรายงานผลไปเรียบร้อยแล้ว⁽⁶⁾ มาต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสตรักเจอร์ดัดแปลงเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งาน จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นกับยุงลายบ้านสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยแสดงผลเป็นค่าความแรง (potency)⁽⁷⁾ และค่าความคงทน (residual effect) ในการควบคุมยุงแบบจำลองธรรมชาติ ซึ่งได้ดำเนินการตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ที่ห้องปฏิบัติการได้รับการรับรอง (เลขที่การรับรอง 4016/49) รวมทั้งได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพด้านความต้านทาน (resistance) กับลูกน้ำยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส ซึ่งเป็นยุงที่ต้องเฝ้าระวังในพื้นที่ชายแดนไทยจากปัญหาดังกล่าว โดยนำตัวอย่างลูกน้ำยุงรำคาญจากแหล่งเพาะพันธุ์ธรรมชาติของทุกจังหวัดในชายแดนประเทศไทยที่ติดกับประเทศเมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา รวม 27 จังหวัด มาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ และนำลูกน้ำยุงมาทดสอบหาอัตราส่วนความต้านทาน (Resistant Ratio; RR) ต่อผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสตรักเจอร์ดัดแปลงโดยเปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นอกจากนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนในด้านการใช้งานของสารควบคุมลูกน้ำยุงที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งได้แก่แบคทีเรียกำจัด

ลูกน้ำยุงชนิดบีเอสและสารเคมีเทมโฟส จึงได้ดำเนินการทดสอบความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญกับแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงบีเอสแบบผงแห้งที่คณะผู้วิจัยได้ผลิตขึ้นเช่นกัน และกับผลิตภัณฑ์เทมโฟสขององค์การเภสัชกรรม (ทรายจีพีโอ-1) โดยบีเอสแบบผงแห้งนี้เป็นการผลิตเบื้องต้นที่จะมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป และเนื่องจากปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีข้อมูลดาวเทียมและระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์มาใช้ประโยชน์กับงานทางด้านสาธารณสุข⁽⁸⁾ จึงได้นำผลจากการศึกษามานำมาบูรณาการร่วมกับการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศภูมิศาสตร์แสดงผลการศึกษาในลักษณะของแผนที่แสดงพื้นที่และระดับความต้านทานยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส ต่อผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด แบคทีเรียบีเอสแบบผงแห้ง และสารเคมีเทมโฟส รวม 3 แผนที่ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้นอกจากได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบแบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดที่ได้ทดสอบและพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงทางสาธารณสุขแล้วยังได้ฐานข้อมูลการใช้สารกำจัดลูกน้ำยุงสำหรับควบคุมยุงในพื้นที่บริเวณชายแดนประเทศไทยและมีแนวทางในการบริหารจัดการยุงที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดลูกน้ำยุงได้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง

แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงทั้งชนิดบีทีไอและบีเอส เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงมีขั้นตอน ประกอบด้วย

การเตรียมหัวเชื้อ ด้วยการใช้อธิษฐานของแบคทีเรียบีทีไอและบีเอสที่คณะผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงและเก็บรักษาไว้อยู่ในอาหาร Nutrient agar นำมาเชยเชื้อใส่ในอาหารเหลวสำเร็จรูป Nutrient broth (ไมโครไบโอโลยี® เมอร์ค) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 23-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (20 Genesys, Spectronic Unicam) โดยวัดจากความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งจะได้แบคทีเรียอยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด รวมทั้งมีความแข็งแรง เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่มีสารอาหารเหมาะสมกับแบคทีเรียบีทีไอและบีเอสในการสร้างสปอร์และฟล็อกโปรตีนที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงได้ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ด้วยการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ทำให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ดี⁽⁹⁾ โดยแบคทีเรียบีทีไอใช้อาหารสูตร Peptone Glucose Salt Medium และบีเอสใช้อาหารสูตร Nutrient broth supplemented with salt and yeast extract อย่างละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยง นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง โดยใช้น้ำเกลือครั้งละ 150 มิลลิลิตร นำตะกอนเชื้อที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส (FreeZone®, Labconco) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดให้เป็นผงละเอียดในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow clean bench) บรรจุในขวดและปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบแบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด

นำแบคทีเรียบีทีไอแบบผงแห้งที่เพาะเลี้ยงได้มาทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยดูจากโคโลนีที่มีลักษณะจำเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar) คือเป็นโคโลนีเดี่ยว มีสีขาวขุ่น ขนาด 5 ถึง 10 มิลลิเมตร ขอบและผิวหน้าไม่เรียบ และผิวหน้ามีลักษณะด้าน⁽¹⁰⁾ จากนั้นนำแบคทีเรียบีทีไอผงแห้งมาผสมกับวัตถุดิบที่ใช้ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์อัดเม็ด ในอัตราส่วนที่ผ่านการคำนวณจากสูตรการตอกเม็ดยาที่คิดค้นขึ้น (ทั้งนี้สูตรส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีการผลิตอยู่ระหว่างการยื่นขอจดอนุสิทธิบัตร) นำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (เครื่องผสมแบบลูกเต๋า

ขนาดความจุ 10 กิโลกรัม) จากนั้นนำมาขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์สูตรอัดเม็ดโดยใช้เครื่องตอกเม็ดยาชนิดหัวตอกเดี่ยว เพื่อให้ได้เม็ดที่มีน้ำหนักประมาณ 1 กรัม/เม็ด มีอัตราการใช้ 1 เม็ดต่อน้ำ 200 ลิตร โดยกระบวนการผลิตมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการผลิต โดยนำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดทุกรุ่นการผลิตมาวิเคราะห์ความคงที่ของค่าความแรง (potency)

การวิเคราะห์ค่าความแรง (potency) ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด

เป็นการหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง มีหน่วยเป็น International Toxic Unit (ITU) ต่อ 1 มิลลิกรัมของผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย โดยเทียบกับแบคทีเรียบีทีไอมาตรฐานแบบผงแห้ง (เชื้อแบคทีเรียบีทีไอมาตรฐาน รหัสรุ่น บีทีไอ 2-12) ซึ่งมีค่าความแรงของเชื้อบริสุทธิ์อยู่ที่ 24,214 ITU ต่อ 1 มิลลิกรัม ดำเนินการโดยซึ่งผลิตภัณฑ์บีทีไอสูตรอัดเม็ด 5 กรัม ผสมกับน้ำกรองปราศจากเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 50,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้เป็นสารละลายตั้งต้น จากนั้นนำสารละลายตั้งต้นมาทดสอบกับลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ด้วยวิธีทางชีววิเคราะห์ (bioassay) ซึ่งเบื้องต้นเป็นการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 0 ถึง 100 โดยนำสารละลายตั้งต้นมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 5 ระดับ แต่ละระดับให้มีความเข้มข้นต่างกัน 10 เท่า เตรียมความเข้มข้นละ 2 ขั้ว และชุดเปรียบเทียบที่ใช้ น้ำกรองอีก 2 ขั้ว ใส่ลูกน้ำยุงลายวัย 4 ตอนต้น จำนวน 10 ตัวลงในถ้วยที่บรรจุสารละลายปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อถ้วย บันทึกจำนวนลูกน้ำที่ตายหลังครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดสอบแบบละเอียด โดยนำช่วงความเข้มข้นเบื้องต้นมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 5 ระดับ แต่ละระดับให้มีความเข้มข้นต่างกัน 2 เท่า เตรียมความเข้มข้นละ 4 ขั้ว และชุดเปรียบเทียบที่ใช้ น้ำกรองอีก 4 ขั้ว นำผลทดสอบมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์โพรบิต (probit) และดำเนินการทดสอบโดยวิธีเดียวกันกับแบคทีเรียบีทีไอมาตรฐานแบบผงแห้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์โดยใช้สูตร

$$\text{ค่าความแรง} = \frac{\text{ค่าความแรงของบีทีไอมาตรฐาน} \times \text{ความเข้มข้นของบีทีไอมาตรฐานที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายร้อยละ 50}}{\text{ค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายร้อยละ 50}}$$

การทดสอบความคงทน (residual) ของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด

ทดสอบความคงทนของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดกับลูกน้ำยุงลายบ้านสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ด้วยวิธีแบบจำลองธรรมชาติ โดยนำถังพลาสติกใส่น้ำปริมาณ 50 ลิตร ใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดปริมาณ 0.25 กรัม ซึ่งเทียบเท่ากับอัตราการใช้ของสูตรผลิตภัณฑ์ที่ได้พัฒนาขึ้นคือ 1 เม็ดต่อน้ำ 200 ลิตร จากนั้นใส่ลูกน้ำยุงลายวัย 4 ตอนต้น จำนวน 25 ตัวต่อถัง บันทึกจำนวนลูกน้ำยุงที่ตายหลังครบ 24 ชั่วโมง นำลูกน้ำยุงทั้งที่ตายและรอดชีวิตออกจากถัง ใส่ลูกน้ำใหม่ จำนวน 25 ตัวต่อถังทุกวัน เพื่อติดตามประสิทธิภาพความคงทนของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด รวมทั้งมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 25 ของปริมาณน้ำเริ่มต้นทุกวันเช่นกัน เพื่อเป็นการจำลองการใช้น้ำ รายงานผลค่าความคงทนเป็นจำนวนวันที่ลูกน้ำยุงยังคงมีการตายร้อยละ 100 โดยการทดสอบกำหนดให้มีภาชนะทดสอบจำนวน 4 ขั้ว และภาชนะเปรียบเทียบที่ไม่มีการใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดอีก 4 ขั้ว

การดำเนินการในภาคสนาม

คัดเลือกพื้นที่จังหวัดชายแดนไทย เมียนมาร์ 10 จังหวัด (แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ตาก กาญจนบุรี เพชรบุรี ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และระนอง) จังหวัดที่ติดกับประเทศลาว 11 จังหวัด (นครพนม พิชญ์โลก

อำนาจเจริญ มุกดาหาร เลย อุตรดิตถ์ หนองคาย พะเยา อุบลราชธานี บึงกาฬ และน่าน) และจังหวัดที่ติดกับประเทศกัมพูชา 6 จังหวัด (สุรินทร์ จันทบุรี ศรีสะเกษ ตราด สระแก้ว และบุรีรัมย์) โดยแต่ละจังหวัดคัดเลือกอำเภอที่ติดชายแดนจังหวัดละ 2 อำเภอ และใน 1 อำเภอ คัดเลือก 2 ตำบล เพื่อให้ครอบคลุมและเป็นตัวแทนของจังหวัดชายแดน ขณะเดียวกันวัดพิกัดพื้นที่โดยใช้อุปกรณ์ที่มีระบบการหาตำแหน่งทั่วโลก (GPS) เก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงรำคาญวัย 1 ถึงวัยที่ 2 จากแหล่งเพาะพันธุ์ธรรมชาติ นำใส่ภาชนะขวดพลาสติก ติดฉลากแสดงรายละเอียดได้แก่ วันที่และสถานที่เก็บตัวอย่างลูกน้ำยุง รวมทั้งชนิดของแหล่งเพาะพันธุ์ จากนั้นนำลูกน้ำยุงกลับมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบค่าความต้านทาน (resistance) ของลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์พื้นที่ชายแดน ต่อผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด แบคทีเรียบีเอสแบบผง และสารเคมีเทมโฟส

ตัวอย่างลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส จากแต่ละพื้นที่ในจังหวัดเดียวกันนำมาเพาะเลี้ยงรวมกันจนถึงระยะตัวเต็มวัยเพื่อเป็นตัวแทนของยุงในจังหวัดนั้น ตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยบางส่วนจะนำมาจำแนกชนิดโดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องตา เพื่อตรวจยืนยันว่าเป็นยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อเนื่องจนถึงรุ่นที่ 2 และ 3 เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงที่เพียงพอและมีขนาดลำตัวใกล้เคียงกันสำหรับการทดสอบ นำลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์ชายแดนวัย 4 ตอนต้น ดำเนินการทดสอบหาความต้านทานต่อผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด แบคทีเรียบีเอสแบบผง และสารเคมีเทมโฟส โดยหาความเข้มข้นของสารกำจัดลูกน้ำทั้ง 3 ชนิดที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายร้อยละ 50 ด้วยการทดสอบแบบเบื้องต้นและการทดสอบแบบละเอียดโดยวิธีทางชีววิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดสอบหาความแรงของผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดตั้งที่กล่าวมาแล้ว บันทึกจำนวนลูกน้ำยุงรำคาญที่ตายหลังครบ 48 ชั่วโมง⁽¹¹⁾ คำนวณหาความเข้มข้นของสารกำจัดลูกน้ำยุงทั้ง 3 ชนิดที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์ชายแดนตายร้อยละ 50 โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์แบบโปรบิต และดำเนินการทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กับผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด แบคทีเรียบีเอสแบบผง และสารเคมีเทมโฟส ด้วยวิธีเดียวกันควบคู่ไปด้วย นำค่าความเข้มข้นของสารกำจัดลูกน้ำยุงทั้ง 3 ชนิดที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายร้อยละ 50 มาคำนวณหาความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์ชายแดนเปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้สูตร

$$\text{ค่าความต้านทาน} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นของสารกำจัดลูกน้ำยุงที่ทำให้ลูกน้ำยุงสายพันธุ์ชายแดนตายร้อยละ 50}}{\text{ค่าความเข้มข้นของสารกำจัดลูกน้ำยุงที่ทำให้ลูกน้ำยุงสายพันธุ์มาตรฐานตายร้อยละ 50}}$$

ทั้งนี้ การทดสอบค่าความแรงและความต้านทานมีการควบคุมคุณภาพโดยกำหนดให้อุณหภูมิห้องทดสอบอยู่ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส น้ำที่ใช้ทดสอบมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 6.8 ถึง 7.2

การจัดทำแผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์แสดงพื้นที่และระดับความต้านทานของยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์ชายแดน

นำค่าพิกัดพื้นที่ที่ได้มีการเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงรำคาญมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลค่าความต้านทานของลูกน้ำยุงต่อแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิด และสารเคมีเทมโฟส ทำแผนที่ด้วยระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์และแสดงผลข้อมูลชั้นสูง (Arc GIS, ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) เพื่อดูสภาพแวดล้อมและนำมาซ้อนทับกับแผนที่จากกรมแผนที่ทหาร (ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

ผล

การวิเคราะห์ค่าความแรงและความคงทนของผลิตภัณฑ์แบบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด

จากการวิเคราะห์ค่าความแรงและการทดสอบความคงทนของผลิตภัณฑ์แบบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดกับลูกน้ำยุงลายบ้านสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าผลิตภัณฑ์แบบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ดที่ได้มีการพัฒนาขึ้นครั้งนี้มีค่าความแรง 2,150 ITU ต่อ 1 มิลลิกรัมของผลิตภัณฑ์ และมีความคงทนควบคุมลูกน้ำยุงลายให้มีการตายได้ร้อยละ 100 เป็นเวลา 28 วัน เมื่อจำลองการใช้น้ำโดยมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 25 ทุกวันตลอดการศึกษา

การดำเนินการเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส ในภาคสนาม

สามารถสำรวจและเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงรำคาญจากแหล่งเพาะพันธุ์ธรรมชาติได้ครบทุกจังหวัดของพื้นที่ชายแดนประเทศไทยทั้ง 3 ด้าน รวมทั้งได้พิกัดพื้นที่ที่มีการเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงรวมทั้งสิ้นจำนวน 108 พื้นที่และจุดพิกัด และตัวอย่างลูกน้ำยุงเมื่อนำกลับมาเพาะเลี้ยง พบว่าเป็นยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส ทั้งหมด

การทดสอบค่าความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์ชายแดน

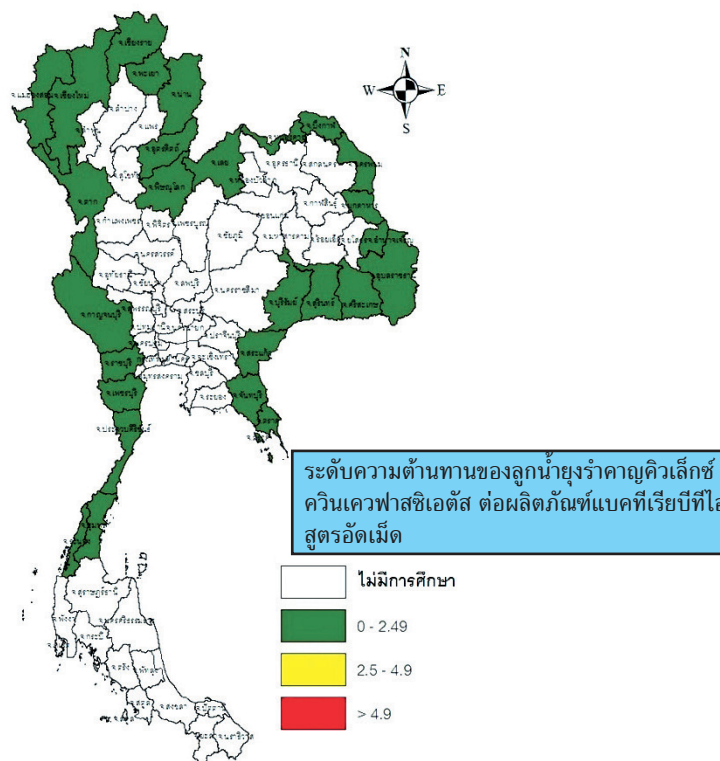
ผลการศึกษา ได้ค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์แบบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงบีทีไอสูตรอัดเม็ด แบบคทีเรียบีเอสแบบผงแห้ง และสารเคมีเทมโฟส ที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์ชายแดน ในแต่ละการทดสอบตายร้อยละ 50 และเมื่อนำค่าความเข้มข้นมาคำนวณหาระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญในแต่ละจังหวัด โดยเปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าลูกน้ำยุงรำคาญในพื้นที่ชายแดนทั้ง 3 ด้านติดกับประเทศเมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา มีระดับความต้านทานต่อผลิตภัณฑ์แบบคทีเรียกำจัดลูกน้ำบีทีไอสูตรอัดเม็ดอยู่ในช่วง 0.36–1.21, 0.72–1.20 และ 0.92–1.39 เท่า ในขณะที่ความต้านทานต่อแบบคทีเรียบีเอสแบบผงแห้งอยู่ในช่วง 0.87–2.66, 1.99–3.17 และ 3.50–7.03 เท่า ส่วนความต้านทานต่อสารเคมีเทมโฟส พบว่ามีความใกล้เคียงกับความต้านทานต่อผลิตภัณฑ์แบบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงบีทีไอสูตรอัดเม็ด คือมีความต้านทานอยู่ในช่วง 0.47–2.65, 1.04–1.86 และ 1.07–2.45 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การจัดทำแผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์แสดงพื้นที่และระดับความต้านทานของยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์พื้นที่ชายแดน

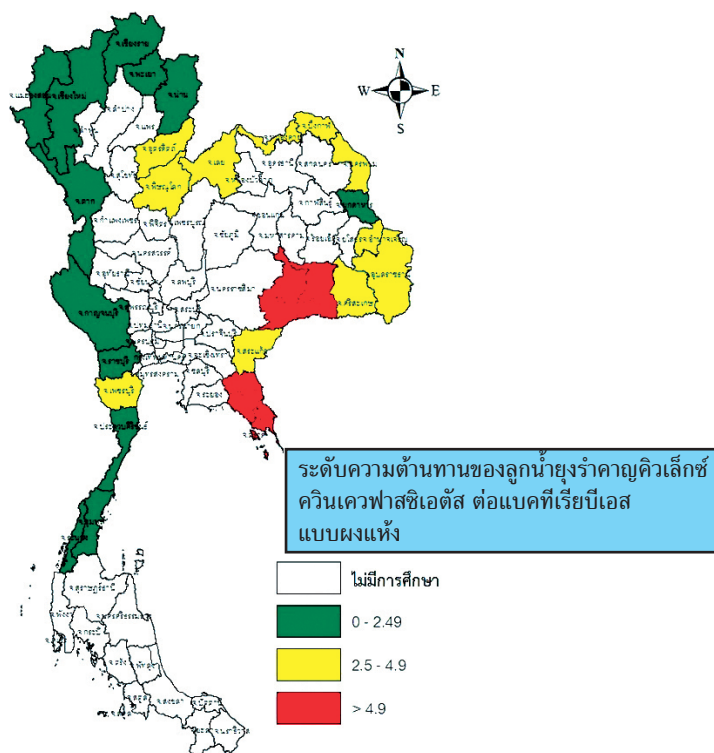
ดำเนินการถ่ายโอนข้อมูลพิกัดพื้นที่ศึกษาจำนวน 108 จุด ของ 27 จังหวัด ลงในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ได้เตรียมไว้ จากนั้นได้นำมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลความต้านทานของลูกน้ำยุง จัดทำเป็นแผนที่ด้วยระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ โดยใช้โปรแกรม Arc GIS ที่ซ้อนทับกับแผนที่จากกรมแผนที่ทหาร จะได้เป็นสถานการณ์ความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์พื้นที่ชายแดนไทยต่อผลิตภัณฑ์แบบคทีเรียกำจัดลูกน้ำบีทีไอสูตรอัดเม็ด บีเอสแบบผงแห้ง และสารเคมีเทมโฟส (ภาพที่ 1–ภาพที่ 3) โดยการจัดทำแผนที่ดังกล่าวใช้เกณฑ์พิจารณาขององค์การอนามัยโลก⁽¹²⁾ หากค่าความต้านทานของแมลงต่อสารเคมีกำจัดแมลงสูงกว่า 10 เท่า แสดงว่าแมลงสร้างความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงชนิดนั้นสูงมาก จึงได้จัดลำดับค่าความต้านทานเป็น 3 ระดับ โดยใช้สีในการแสดงค่าเป็นระดับต่ำ ปานกลาง และสูง ตามมาตรฐานสากลที่ใช้ คือ สีเขียว (0.0–2.49 เท่า : ระดับต่ำ), สีเหลือง (2.50–4.99 เท่า : ระดับปานกลาง) และสีแดง (ความต้านทาน > 4.99 เท่า : ระดับสูง) โดยผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบระดับที่สูงมาก (10 เท่า)

ตารางที่ 1 ระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินควาฟาสซิเอตัส สายพันธุ์ชายแดนไทย ด้านประเทศเมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา เปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ต่อผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอสูตรอัดเม็ด แบคทีเรียบีเอสแบบผงแห้ง และสารเคมีเทม็ฟอส

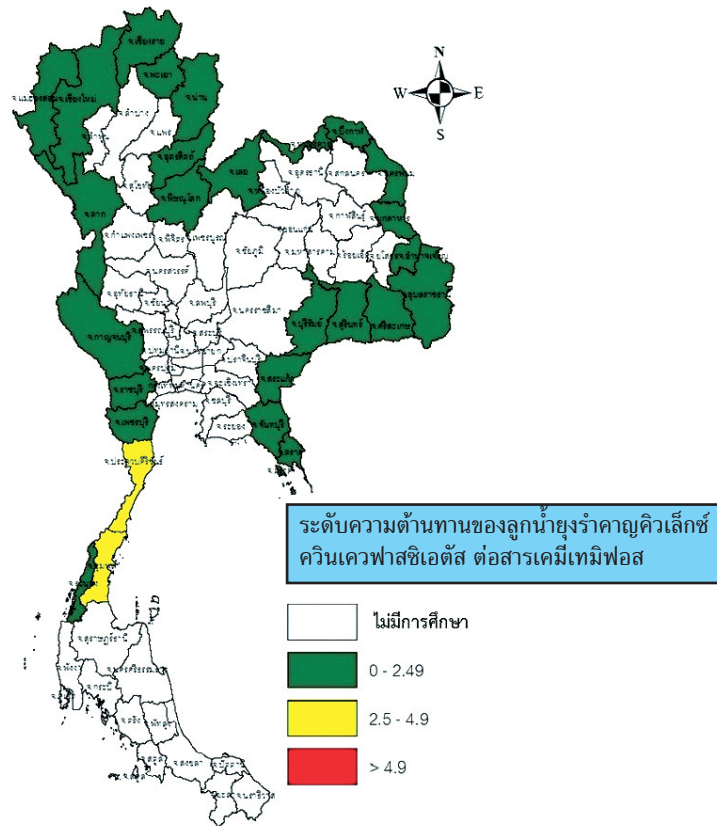
จังหวัดชายแดน ที่ติดต่อกับประเทศ		ความต้านทาน ต่อบีทีไอ สูตรอัดเม็ด	จังหวัด	ความต้านทาน ต่อบีเอส แบบผง	จังหวัด	ความต้านทาน ต่อสารเคมี เทม็ฟอส
เมียนมาร์	ประจวบฯ	0.360	เชียงใหม่	0.872	เชียงราย	0.467
	เพชรบุรี	0.407	กาญจนบุรี	0.912	ตาก	1.225
	ชุมพร	0.452	แม่ฮ่องสอน	1.007	เพชรบุรี	1.475
	ระนอง	0.575	ชุมพร	1.042	เชียงใหม่	1.480
	แม่ฮ่องสอน	0.637	ระนอง	1.047	กาญจนบุรี	1.712
	ราชบุรี	0.800	ราชบุรี	1.380	แม่ฮ่องสอน	1.937
	ตาก	0.897	ตาก	1.652	ราชบุรี	2.065
	เชียงใหม่	0.937	ประจวบฯ	1.567	ระนอง	2.455
	เชียงราย	1.077	เชียงราย	1.765	ประจวบฯ	2.645
	กาญจนบุรี	1.207	เพชรบุรี	2.657	ชุมพร	3.005
ลาว	นครพนม	0.72	น่าน	1.99	หนองคาย	1.04
	พิษณุโลก	0.76	พะเยา	2.09	พะเยา	1.26
	อำนาจเจริญ	0.83	มุกดาหาร	2.40	น่าน	1.26
	มุกดาหาร	0.85	อุบลราชธานี	2.54	เลย	1.31
	เลย	0.89	หนองคาย	2.55	มุกดาหาร	1.35
	อุดรดิตถ์	0.92	อุดรดิตถ์	2.57	อุบลราชธานี	1.48
	หนองคาย	0.95	บึงกาฬ	2.58	อุดรดิตถ์	1.50
	พะเยา	1.01	อำนาจเจริญ	2.71	บึงกาฬ	1.55
	อุบลราชธานี	1.05	เลย	2.87	พิษณุโลก	1.64
	บึงกาฬ	1.12	นครพนม	3.01	อำนาจเจริญ	1.77
	น่าน	1.20	พิษณุโลก	3.17	นครพนม	1.86
กัมพูชา	สุรินทร์	0.92	สระแก้ว	3.50	บุรีรัมย์	1.07
	จันทบุรี	1.05	ศรีสะเกษ	3.67	ตราด	1.18
	ศรีสะเกษ	1.21	ตราด	5.37	สุรินทร์	1.60
	ตราด	1.30	จันทบุรี	5.74	ศรีสะเกษ	2.10
	สระแก้ว	1.31	สุรินทร์	7.03	จันทบุรี	2.38
	บุรีรัมย์	1.39	บุรีรัมย์	8.47	สระแก้ว	2.45



ภาพที่ 1 แผนทีภูมิศาสตร์สารสนเทศแสดงพื้นที่และระดับความต้านทานของลูงน้ำยุงรำคาญคิเล็กซ์ คิวนเควฟาสซิเอตัส ทีเก็บจากพื้นที่ 27 จังหวัดช่ายแดนไทย เมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา ต่อบัณฑิตภัณฑ์แบบคทีเรียกำจัตุลูงน้ำยุงบีไอสู่อัตเมิต



ภาพที่ 2 แผนทีภูมิศาสตร์สารสนเทศแสดงพื้นที่และระดับความต้านทานของลูงน้ำยุงรำคาญคิเล็กซ์ คิวนเควฟาสซิเอตัส ทีเก็บจากพื้นที่ 27 จังหวัดช่ายแดนไทย เมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา ต่อบัณฑิตภัณฑ์แบบคทีเรียกำจัตุลูงน้ำยุงบีไอแบบผงแห้ง



ภาพที่ 3 แผนที่ภูมิศาสตร์สารสนเทศแสดงพื้นที่และระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินควาฟาสซิเอตัส ที่เก็บจากพื้นที่ 27 จังหวัดชายแดนไทย เมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา ต่อสารเคมีกำจัดลูกน้ำยุงเทมเพออส

วิจารณ์

แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงบีทีไอได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงเมื่อนำมาใช้ใส่ในภาชนะเก็บกักน้ำในบ้านเรือนเพื่อกำจัดลูกน้ำยุง⁽¹⁾ โดยยุงส่วนใหญ่ที่มักกัดคนเลือดจะเป็นยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินควาฟาสซิเอตัส ซึ่งออกหากินในเวลากลางคืน มีแหล่งเพาะพันธุ์อยู่ตามแหล่งน้ำที่มีอินทรีย์วัตถุสูง เช่น แหล่งที่มีน้ำขังเป็นเวลานาน ท่อระบายน้ำ เป็นต้น และยุงลายบ้านที่กัดคนเลือดในเวลากลางวัน ซึ่งมีแหล่งเพาะพันธุ์เป็นน้ำสะอาดตามภาชนะเก็บกักน้ำในบ้านเรือน เมื่อสารเคมีกำจัดแมลงถูกนำมาใช้เป็นเวลานาน มีผลทำให้แมลงรวมทั้งยุงสร้างความต้านทาน การนำเชื้อโรคมานำมาใช้เพื่อควบคุมยุงตามวิธีการทางชีววิธีมีทั้งการใช้แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา โดยพบว่าการใช้แบคทีเรียมีข้อดีกว่าการใช้ไวรัสหรือเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิดบาซิลลัส ทุริงเยนซิส สายพันธุ์ฮิสตราเอลเลนซิส (บีทีไอ) เนื่องจากสามารถสร้างเอนโดทอกซินที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงและมีความจำเพาะในการฆ่าลูกน้ำยุง แบคทีเรียบีทีไอจึงได้ถูกพัฒนาให้อยู่ในสูตรและรูปแบบต่าง ๆ ทั้งแบบผง แบบอัดเม็ด และแบบของเหลว ตามวัตถุประสงค์ของการใช้ เช่น แอฟริกาซึ่งเป็นภูมิภาคที่มีปัญหาโรคมalara ระบาดโดยยุงกัดปล่อย ได้ใช้แบคทีเรียแบบผงแห้งทั้งชนิดบีทีไอและบีเอสนำมาผสมกันแล้วใส่ในแหล่งเพาะพันธุ์ ซึ่งพบว่าสามารถลดจำนวนยุงได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹³⁾ ส่วนในมลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการใช้บีทีไอควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญชนิดเดียวกับที่มีการศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้สูตรแบบฉีดพ่น ซึ่งพบว่ายุงมีอัตราการตายแต่จะลดลงเป็นสัดส่วนกับระยะทางของการฉีดพ่น⁽¹⁴⁾ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียบีทีไอที่ผลิตขึ้นในครั้งนี้เป็นสูตรแบบอัดเม็ดที่ทำให้สะดวกต่อการใช้งานทั้งในแหล่ง

เพาะพันธุ์ยุงลายที่เป็นพาหะเก็บกักน้ำในบ้านเรือนและแหล่งเพาะพันธุ์ยุงรำคาญ โดยเม็ดบีทีไอจะมีน้ำหนักมากกว่าแบบคิรีสูตรแบบผงจึงสูญเสียได้ช้ากว่า โดยทั้งนี้ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพกับยุงลายสายพันธุ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในด้านค่าความแรงและความคงทน รวมทั้งได้ทดสอบด้านความต้านทานกับยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์พื้นที่ชายแดน ที่มีโอกาสเป็นยุงพาหะนำโรคเท้าช้างจากประชากรที่มีการเคลื่อนย้ายเข้าออกผ่านชายแดนซึ่งอาจนำโรคดังกล่าวมาสู่ประชาชนคนไทยได้⁽¹⁵⁾ โดยปกติการดูประสิทธิภาพของบีทีไอในการฆ่าลูกน้ำยุงจะวัดเป็นค่าความแรง ซึ่งมีรายงานการใช้แบบคิรีบีทีไอแบบเม็ดละเอียดละลายน้ำมีค่าความแรง 4,000 ITU ต่อ 1 มิลลิกรัมของผลิตภัณฑ์ มีอัตราการใช้ 0.27-0.53 ปอนด์ต่อเอเคอร์ เพื่อควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส แล้วพบว่าสามารถควบคุมลูกน้ำยุงได้ 7-12 วัน⁽¹⁶⁾ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ต้นแบบแบบคิรีบีทีไอสูตรแบบอัดเม็ดที่ผลิตได้ในครั้งนี้มีค่าความแรง 2,150 ITU ต่อ มิลลิกรัมของผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพเพียงพอและมีความคงทนควบคุมลูกน้ำยุงลายให้มีการตายได้ร้อยละ 100 เป็นเวลา 28 วัน ในสภาวะจำลองธรรมชาติที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 25 ของน้ำเดิมทุกวันตลอดการทดสอบ และสามารถนำไปใช้ควบคุมยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส สายพันธุ์พื้นที่ชายแดนไทยได้ เนื่องจากลูกน้ำยุงมีความต้านทานไม่เกิน 1.39 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับต่ำตามเกณฑ์การพิจารณาขององค์การอนามัยโลก⁽¹²⁾ และเนื่องจากแบบคิรีกำจัดลูกน้ำยุงบีเอสและสารเคมีเทมโฟสเป็นสารกำจัดลูกน้ำที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้จึงได้ผลิตแบบคิรีบีเอสแบบผงแห้งเป็นเบื้องต้นด้วย เพื่อที่จะพัฒนาให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ต่อไป รวมทั้งนำสารเคมีเทมโฟส (ทรายจีพีไอ-1) ผลิตภัณฑ์ขององค์การเภสัชกรรม มาทดสอบประสิทธิภาพกับลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส ควบคู่กันเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนสำหรับใช้ควบคุมลูกน้ำยุงทางสาธารณสุข ซึ่งพบว่าลูกน้ำยุงรำคาญมีความต้านทานต่อแบบคิรีบีเอสสูงกว่าแบบคิรีบีทีไอ (8.47 เท่า) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญชนิดนี้ต่อแบบคิรีบีเอส ทั้งลูกน้ำยุงสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการซึ่งได้มีการเพาะเลี้ยงไว้และสายพันธุ์ภาคสนามที่เก็บจากประชากรยุงในสภาพธรรมชาติ⁽¹⁷⁾ ส่วนเทมโฟส ลูกน้ำยุงเริ่มมีความต้านทาน (3.0 เท่า) ในบางพื้นที่ เช่นเดียวกับการศึกษาในประเทศอินเดียที่ยุงรำคาญชนิดนี้มีความชุกชุมสูง โดยพบว่าลูกน้ำยุงมีความต้านทานต่อเทมโฟสอยู่ในช่วง 1.34 ถึง 114 เท่า⁽¹⁸⁾ และโดยที่การนำเทคโนโลยีสารสนเทศภูมิศาสตร์มาใช้งานหลาย ๆ ด้านรวมทั้งทางด้านสาธารณสุข เช่น การเตือนภัยไข้เลือดออกในประเทศไทย⁽¹⁹⁾ และการหาพื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดมาลาเรียในพื้นที่ไทย-ลาว และไทย-กัมพูชา⁽²⁰⁾ ซึ่งเช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ที่แสดงผลความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัส ที่เก็บจากพื้นที่ชายแดนไทย 27 จังหวัดต่อสารกำจัดลูกน้ำยุง 3 ชนิด ในลักษณะของแผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์

สรุป

การศึกษานี้ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบแบบคิรีกำจัดลูกน้ำยุงชนิดบีทีไอสูตรอัดเม็ดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ มีประสิทธิภาพและความคงทนในการควบคุมยุงลายบ้านเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ช่วยสนับสนุนการควบคุมไข้เลือดออก (จากเดิมมีผลิตภัณฑ์ลักษณะเช่นนี้ แต่ได้มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีไปแล้ว โดยผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ผลิตขึ้นมาใหม่มีการเปลี่ยนแปลงสูตรส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์) และได้มีการผลิตแบบคิรีกำจัดลูกน้ำยุงบีเอสแบบผงแห้งเบื้องต้นซึ่งจะพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป รวมทั้งได้ข้อมูลการนำแบบคิรีบีทีไอสูตรอัดเม็ดไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญในพื้นที่ชายแดนไทยได้อย่างเหมาะสม ซึ่งแสดงผลเป็นแผนที่ภูมิศาสตร์สารสนเทศ คือสามารถใช้แบบคิรีบีทีไอในจังหวัดชายแดนไทยกับประเทศเมียนมาร์ ลาว และกัมพูชา (มีค่าความต้านทานของลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์ชายแดนต่ำ คือ อยู่ในช่วง 0.36-1.21, 0.72-1.20 และ 0.92-1.39 เท่า) ส่วนแบบคิรีบีเอสไม่ควรนำมาใช้ควบคุมยุงรำคาญในพื้นที่ชายแดนด้านกัมพูชา เนื่องจากยุงในบางพื้นที่มี

ความต้านทานสูงขึ้น 8.47 เท่า ส่วนพื้นที่ชายแดนไทยลาว มี 3 จาก 11 จังหวัด คือ พะเยา น่าน และมุกดาหาร ที่ยังสามารถใช้แบคทีเรียบีเอสควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ ส่วนจังหวัดที่เหลือถึงแม้ค่าความต้านทานอยู่ในระดับปานกลาง ถ้าจะนำแบคทีเรียบีเอสมาใช้ต้องใช้ในปริมาณที่มากขึ้นและต้องใช้ควบคู่กับวิธีควบคุมอื่นๆ หรือหมุนเวียนไปใช้วิธีควบคุมอื่นแทนเพื่อป้องกันยุงเกิดความต้านทานที่สูงขึ้นไปอีก ในขณะที่สารเคมีที่มีฟอสสามารถนำไปใช้ได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียบีทีไอ อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลของชายแดนภาคใต้ที่ยังไม่สามารถดำเนินการศึกษาได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติและกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย ขอขอบคุณนางเลาณา เขาวนาดิศัย อดีตผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชีววิทยา) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เป็นต้นแบบในผลิตแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายศึกษาควบคุมแมลงทางชีววิธี กลุ่มกฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่มีส่วนช่วยการศึกษาวิจัยครั้งนี้ให้มีความสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in drinking-water, background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization; 2009.
2. สำนักระบาดวิทยา. โรคเท้าช้าง. ใน: สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2557. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2558. หน้า 41-42.
3. สำนักระบาดวิทยา. โรคเท้าช้าง. ใน: สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2558. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2559. หน้า 45-46.
4. สำนักระบาดวิทยา. โรคเท้าช้าง. ใน: สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2559. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2560. หน้า 45-46.
5. Tritteraprapab S, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y, Scott AL. Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex quinquefasciatus*: establishing the potential for urban filariasis in Thailand. *Epidemiol Infect* 2000; 125(1): 207-12.
6. Chansang U, Methawanitpong N, Saraprug D, Phetsuwan P, Ponsuwan N, Wiriyasarnont P. Development of larvicidal *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by the Thai NIH and its comparison to *Bacillus sphaericus* and temephos in a selection experiment with the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res* 2020; 8(5): 58-65.
7. Dulmage HT, Correa JA, Gallegos-Morales G. Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development. In: de Barjac H, Sutherland DJ, editors. *Bacterial control of mosquitoes and black flies*. London: Rutgers University Press, 1990. p. 110-133.
8. Racloz V, Ramsey R, Tong S, Hu W. Surveillance of dengue fever virus: a review of epidemiological models and early warning systems. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(5): e1648. 9 pages.

9. Chowanadisai L, Methawanitphong N, U-mai N. Effectiveness of bacterial larvicide products from Thai strain *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In: Ngo DB, Akhuest RJ, Dean DH, editors. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. Hanoi: Science and Technic Publishing House 2005. p. 365–382.
10. Buchanan RE, Gibbons NE, editors. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1974.
11. WHO. Bioassay method for the titration of *Bacillus sphaericus* preparations with RB 80 standard. In: *Informal consultations on the development of Bacillus sphaericus as a microbial larvicide*. Geneva: World Health Organization; 1985. p. 20–21.
12. WHO. Instruction for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: World Health Organization; 1981.
13. Kahindi SC, Muriu S, Derua YA, Wang X, Zhou G, Lee MC, et al. Efficacy and persistence of long-lasting microbial larvicides against malaria vectors in western Kenya highlands. *Parasit Vectors* [serial online] 2018. Jul [cited 2020 Jun 22]; 11(1): [10 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6069807>.
14. Dunford JC, Stoops CA, Estep AS, Britch SC, Richardson AG, Walker TW, et al. SR450 and Superhawk XP applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* against *Culex quinquefasciatus*. *J Am Mosq Control Assoc* 2014; 30(3): 191–8.
15. Triterapapab S, Nuchprayoon I, Porksakorn C, Poovorawan Y, Scott AL. High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95(5): 535–8.
16. Su T, Mulla MS. Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* mosquitoes in microcosms. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; 15(3): 356–65.
17. Zahiri NS, Su T, Mulla MS. Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *J Med Entomol* 2002; 39(3): 513–20.
18. Tabbabi A, Daaboub J, Laamari A, Cheikh RB, Feriani M, Boubaker C, et al. Evaluation of resistance to temephos insecticide in *Culex pipiens pipiens* larvae collected from three districts of Tunisia. *Afr Health Sci* 2019; 19(1): 1361–7.
19. Xu Z, Bambrick H, Yakob L, Devine G, Lu J, Frentiu FD, et al. Spatiotemporal patterns and climatic drivers of severe dengue in Thailand. *Sci Total Environ* 2019; 656: 889–901.
20. วัชรพงษ์ แสงนิล, จารุวรรณ วังบุตดี. การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์เพื่อจำแนกพื้นที่เสี่ยงต่ออุบัติการณ์โรคมาลาเรียในเขตพื้นที่ชายแดนไทย-ลาว-กัมพูชา จังหวัดศรีสะเกษ และจังหวัดอุบลราชธานี. *วารสารสาธารณสุขศาสตร์* 2557; 44(3): 260–72.

Development of the Tablet Bacterial Larvicide Formulation and the Effectiveness against Thai-border Population Strains of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*

Uruiyakorn Chansang Nittaya Methawanitpong Chitti Chansang Nuntaporn Phonsuwan
Porntida Petsuwan Pornchai Wiriyasaranont Danaporn Saraprug
and Ballang Uppapong

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Bacterial larvicides have been used for vector control according to the problems of insecticide resistance and environmental residual effect. Available larvicides *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) and *Bacillus sphaericus* (Bsph) are expensive and some of them are not effective enough to control mosquito larvae. This study was carried out to produce tablet Bti which was extended from the previous study on the production of powder Bti. The preliminary trials for effectiveness of the tablet Bti were performed for the potency and simulated field residual effect against standard strain *Aedes aegypti* larvae. Then the tablet Bti was evaluated for the resistance of *Culex quinquefasciatus* larvae which was collected from 27 provinces located at 3 Thai borders along Myanmar, Laos and Cambodia. The results showed that the tablet Bti has potency 2,150 ITU/mg product and covered 28-day residual in simulated field conditions. The resistance of mosquitoes from the 3 areas to tablet Bti were 0.36–1.21, 0.72–1.20 and 0.92–1.39 fold, respectively when compared to standard strain of mosquito. In order to obtain the adequate data on larvicide using for public health mosquito control program, the tests were run in parallel to the field strain of *Culex* mosquito to the initial powder Bsph produced in the same laboratory and commercial temephos. It was found that the mosquitoes from the 3 borders showed the RR to Bsph at 0.87–2.66, 1.99–3.17 and 3.50–7.03, and to temephos at 0.47–3.01, 1.04–1.86 and 1.07–2.45 fold, respectively. These initiated data were presented as the GIS map construction.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), *Bacillus sphaericus* (Bsph), Temephos, *Cx. quinquefasciatus*, GIS map

ประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดยุงลายบ้าน โดยการพ่นฝอยละเอียดแบบกึ่งภาคสนาม

จิราภรณ์ เสวะนา บุษราคัม สีนาคม และบุญเสริม อ่วมอ่อง

กองโรคติดต่อทางแมลง กรมควบคุมโรค ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดยุงลายบ้านโดยการพ่นฝอยละเอียดแบบกึ่งภาคสนาม ทดสอบโดยวิธี Cage Bio-assay test ใช้ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (LS) และ 3 สายพันธุ์พื้นถิ่นจากจังหวัดเชียงใหม่ (CMS) ตาก (TKS) และระยอง (RYS) โดยใช้ยุงเลี้ยงในห้องปฏิบัติการรุ่นที่ 3 ทดสอบกับสารเคมี 4 สูตร ได้แก่ สูตรผสม-1 [(deltamethrin, s-bioallethrin, piperonyl butoxide (PBO)], สูตรผสม-2 (lambda-cyhalothrin, tetramethrin, PBO), สูตรผสม-3 (zeta cypermethrin, tetramethrin, PBO) และสูตรเดี่ยว (cyfluthrin) พบว่าเมื่อใช้อัตราการผสมที่ระบุไว้ที่ฉลากและอัตราการผสมสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก (WHO) สูตรผสม-3 มีประสิทธิภาพดีที่สุดสามารถฆ่ายุงลายได้มากกว่าร้อยละ 90 ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในขณะที่สูตรผสม-1 และสูตรผสม-2 เมื่อใช้อัตราการผสมที่ระบุไว้ที่ฉลากมีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้มากกว่าร้อยละ 90 ได้ 3 สายพันธุ์ (LS, CMS, TKS) ส่วนสารเคมีสูตรเดี่ยว (cyfluthrin) เมื่อใช้อัตราการผสมสูงสุดตามคำแนะนำของ WHO มีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้มากกว่าร้อยละ 90 ได้ 3 สายพันธุ์ (LS, CMS, TKS) แต่เมื่อใช้อัตราการผสมที่ระบุไว้ที่ฉลากสามารถฆ่ายุงลายเฉพาะสายพันธุ์ LS ได้มากกว่าร้อยละ 90 แต่มีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายสายพันธุ์ในพื้นที่ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้น้อยกว่าร้อยละ 90 ดังนั้นควรใช้สารเคมีสูตรผสมซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่ายุงลายได้ดีกว่าสารเคมีสูตรเดี่ยว

คำสำคัญ : สารเคมีกำจัดแมลง, สารไพรีทรอยด์สังเคราะห์, การพ่นฝอยละเอียด, ยุงลายบ้าน

Corresponding author E-mail: jira.ento@gmail.com

Received: 14 October 2020

Revised 3 November 2020

Accepted 27 November 2020

บทนำ

ปัจจุบันมีการพ่นเคมีควบคุมยุงพาหะนำโรคเพื่อยุติการแพร่เชื้อเป็นจำนวนมาก และสารเคมีควบคุมยุงพาหะนำโรคถูกจัดให้เป็น “วัตถุมีพิษ” ตามพระราชบัญญัติวัตถุมีพิษ พ.ศ. 2510 ซึ่งสารเคมีกำจัดแมลงที่แพร่หลายและใช้กันมากในปัจจุบันแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้างและปฏิกิริยาเคมี ได้แก่ 1) กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 2) กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 3) กลุ่มคาร์บาเมต 4) กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ โดยหลักการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีกำจัดแมลง ควรเลือกสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงสูง มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ ผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมต่ำคือ ต้องสลายตัวเร็ว สะสมในดินและน้ำน้อย ผลกระทบต่ำต่อแมลงที่มีประโยชน์ เช่น ผึ้ง และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น นก กุ้ง และปลา สารเคมีราคาไม่แพงและหาซื้อได้สะดวก ไม่ทำให้เกิดรอยเปื้อนหรือคราบสกปรกกับผาผนังและเครื่องเรือน สามารถใช้ได้กับเครื่องพ่นที่มีอยู่และไม่ทำให้เครื่องพ่นสกปรกหรือรื้อง่าย ซึ่งการควบคุมโรคทางสาธารณสุขแนะนำให้ใช้สารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ โครงสร้างของ pyrethrin ซึ่งสกัดได้จากดอกเบญจมาศ มีความเป็นพิษต่อแมลงสูง แต่มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ สารเคมีในกลุ่มนี้ที่ใช้พ่นควบคุมยุงพาหะนำโรค เช่น deltamethrin, permethrin, resmethrin และ bioresmethrin เป็นต้น⁽¹⁾ การใช้สารเคมีควบคุมยุงพาหะนำโรคใช้เล็ดออกใช้หลักการพ่นแบบฟุ้งกระจาย แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การพ่นหมอกควัน และการพ่นฝอยละเอียด ซึ่งการพ่นหมอกควัน เป็นเครื่องพ่นที่ใช้ความร้อนช่วยในการแตกตัวของน้ำยาออกเป็นละอองเม็ดเล็ก ๆ ใช้น้ำมันดีเซลเป็นตัวทำละลาย จุดเดือดน้ำมันดีเซลอยู่ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 150–360 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้จะมีผลในการทำลายคุณภาพสารเคมี ส่วนการพ่นฝอยละเอียด เป็นเครื่องพ่นที่ใช้พลังงานลมหรือแรงเหวี่ยงสลัดน้ำยาให้แตกตัวออกเป็นเม็ดเล็ก ๆ ขนาดเม็ดละอองน้ำยาเล็กกว่า 50 ไมครอน สารเคมีที่ใช้พ่นเป็นแบบความเข้มข้นสูงเพราะตัวทำละลายน้อย ใช้พ่นปริมาณน้อย แต่สามารถพ่นคลุมพื้นที่ได้มากกว่าการพ่นหมอกควัน⁽²⁾ ซึ่งองค์การอนามัยโลกมีคำแนะนำการใช้สารเคมีและอัตราการผสมสารเคมีสำหรับเครื่องพ่นแบบฝอยละเอียดดังนี้ สารเคมี deltamethrin อัตราการใช้สารออกฤทธิ์ 0.5–1.0 กรัม/เฮกตาร์ สารเคมี zeta-cypermethrin อัตราการใช้สารออกฤทธิ์ 1–3 กรัม/เฮกตาร์ สารเคมี cyfluthrin อัตราการใช้สารออกฤทธิ์ 1–2 กรัม/เฮกตาร์ และสารเคมี lambda-cyhalothrin cyfluthrin อัตราการใช้สารออกฤทธิ์ 1.0 กรัม/เฮกตาร์⁽³⁾

ประเทศไทยมีการใช้สารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์พ่นควบคุมยุงลายกระจายทั่วทุกพื้นที่ในประเทศ บางพื้นที่มีการใช้สารเคมีชนิดเดิมเป็นระยะเวลานานหลายปีติดต่อกันส่งผลให้ยุงลายเกิดการปรับตัว สร้างความต้านทานต่อสารเคมีขึ้น ยุงสามารถเพิ่มประชากรได้มากยิ่งขึ้น และจากการศึกษาสถานะความไวต่อสารกำจัดแมลงของยุงลายจากภาคสนามที่เก็บในปี 2559 ช่วงฤดูหนาวและฤดูร้อน พบว่ายุงลายจากพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดระนอง และจังหวัดระยอง ตีต่อสารกลุ่มไพรีทรอยด์ (deltamethrin, lambda cyhalothrin, cyfluthrin) และ propoxur มีเพียงยุงลายจากจังหวัดนครสวรรค์ที่ตีต่อยา malathion⁽⁴⁾ และมีรายงานว่ายุงลายมีการพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ควบคุมยุง เช่น deltamethrin, permethrin และ alphacypermethrin ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย^(5,6) สอดคล้องกับรายงานการตี้อย่างของยุงลาย *Ae. aegypti* ต่อบริการกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์หลายระดับ ตั้งแต่ระดับต่ำจนถึงระดับสูงในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากการใช้สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์อย่างกว้างขวาง⁽⁷⁾ จากข้อมูลที่ผ่านมาการศึกษาวิจัยและข้อมูลการพ่นเคมีควบคุมยุงลายยังมีไม่เพียงพอในการนำข้อมูลมาพิจารณาเลือกใช้สารเคมีกำจัดยุงลายภายในประเทศไทยเพื่อที่จะหยุดยั้งการแพร่เชื้อและการใช้สารเคมีควบคุมยุงลายให้ได้ประสิทธิผล ดังนั้นกองโรคติดต่อภายในโดยแมลง กรมควบคุมโรค จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพและอัตราการใช้ที่เหมาะสมของสารเคมีกำจัดแมลง 4 ชนิดที่ใช้ฉีดพ่นควบคุมยุงลายในประเทศไทยด้วยวิธีพ่นฝอยละเอียด กับยุงลาย 4 สายพันธุ์ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงลายต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. สายพันธุ์ยุงลายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) ยุงลายสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (LS) 2) ยุงลายสายพันธุ์พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ (CMS) 3) ยุงลายสายพันธุ์พื้นที่จังหวัดตาก (TKS) 4) ยุงลายสายพันธุ์พื้นที่จังหวัดระยอง (RYS) ซึ่งยุงลายสายพันธุ์พื้นที่คัดเลือกมาจากพื้นที่มีการระบาดของโรคไข้เลือดออกสูงและมีประวัติการใช้สารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์เป็นระยะเวลานาน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี ชนิดของสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบมี 2 แบบ ได้แก่ สารเคมีสูตรผสม สารเสริมฤทธิ์ (3 สูตร) และสารเคมีสูตรเดี่ยว (1 สูตร) โดยใช้อัตราการผสมสารเคมีสำหรับการพ่นฝอยละเอียด 2 แบบ คือ การผสมสารเคมีตามฉลากสารเคมี และการผสมสารเคมีตามค่าสูงสุดที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ รายละเอียดของสารเคมีดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราการทดสอบประสิทธิภาพสารเคมี 4 สูตร

สูตรของสารเคมี (ชื่อการค้า)	องค์ประกอบสารเคมี	อัตราผสมน้ำมัน ดีเซล	อัตราการใช้สารออกฤทธิ์ กรัม/เฮกตาร์ (g/ha)	
			ตามฉลาก สารเคมี	ตามค่าสูงสุดที่องค์การ อนามัยโลกแนะนำ ⁽²⁾
สูตรผสม-1 (Mix-1) [Deltacide]	Deltamethrin 0.50% w/v S-bioallethrin 0.75% w/v Piperonyl butoxide 10% w/v	1 ต่อ 9	0.75	1.0
สูตรผสม-2 (Mix-2) [Tornado-Forte EC]	Lambda-cyhalothrin 1.0% w/v Tetramethrin 4.0% w/v Piperonyl Butoxide 5.0% w/v	1 ต่อ 19	0.5	1.0
สูตรผสม-3 (Mix-3) [Cynoff-ZD Super]	Zeta-cypermethrin 2.25% w/v Tetramethrin 2.25 % w/v Piperonyl butoxide 9.0% w/v	1 ต่อ 11	0.3	3.0
สูตรเดี่ยว (Cyfluthrin) [คลีค 15]	Cyfluthrin 1.5% w/v	1 ต่อ 17	1.25	2.0

3. ทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีโดยวิธี Cage Bio-assay test ใช้ยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการและสายพันธุ์พื้นที่ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดตาก และจังหวัดระยอง เลี้ยงในห้องปฏิบัติการรุ่นที่ 3 เพศเมียอายุ 3-5 วัน นำไปใส่กรงโครงสแตนเลส บุด้วยผ้ามุ้งขนาด 10 × 10 × 20 เซนติเมตร กรงละ 25 ตัว นำไปไว้ในห้องขนาด 20 ตารางเมตร ความสูงเฉลี่ย 4 เมตร วางที่ระดับพื้น และแขวนระดับความสูง 150 และ 250 เซนติเมตรจากพื้น ระดับความสูงละ 7 กรง พ่นสารเคมีด้วยเครื่องพ่นฝอยละเอียด โดยใช้สารเคมีและอัตราการใช้ส่วนผสมตามที่กำหนดไว้ ปิดอบห้องทดสอบเมื่อพ่นสารเคมีเสร็จ เพื่อให้ยุงสัมผัสกับสารเคมีเป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาที่ยุงสัมผัสกับสารเคมีเป็นเวลา 60 นาที บันทึกจำนวนยุงสลบที่เวลา 60 นาที และบันทึกจำนวนยุงที่ตายและรอดชีวิตที่เวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบ ถ้าชุดเปรียบเทียบมีอัตราการตายต่ำกว่า 5% ให้ใช้ค่าอัตราการตายจริง หากอัตราตายอยู่ระหว่าง 5-10% ให้ปรับค่าอัตราการตาย โดยใช้ Abbott's formula และถ้าอัตราการตายมากกว่า 20% ถือว่าผลการทดสอบผิดพลาด ต้องทำการทดสอบใหม่

$$\text{Abbott's formula} = \frac{\% \text{ ตายของยุงที่ทดสอบ} - \% \text{ ตายของยุงเปรียบเทียบ}}{100 - \% \text{ ตายของยุงเปรียบเทียบ}} \times 100$$

เกณฑ์การตัดสินประสิทธิภาพสารเคมี

เกณฑ์การวิเคราะห์ข้อมูลยุงลายจะใช้เกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) คือ อัตราการตายเฉลี่ยของยุงที่ทดสอบทั้งหมดไม่น้อยกว่า 90% จึงถือว่าการพ่นที่ความเข้มข้นตามกำหนดมีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงลายพันธุ์นั้นได้^(8,9)

ผล

ประสิทธิภาพของสารเคมี สูตรผสม-1 (Mix-1) เมื่อทดสอบตามอัตราการใช้บนฉลากและอัตราสูงสุดที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ พบว่ามีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (LS), จังหวัดเชียงใหม่ (CMS) และจังหวัดตาก (TKS) ส่วนยุงลายสายพันธุ์จังหวัดระยอง (RYS) อัตราการผสมสารเคมีที่แนะนำไว้ที่ฉลากและอัตราสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก ฆ่ายุงลายได้เพียง 60% และ 77.33% ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การตัดสินประสิทธิภาพสารเคมีขององค์การอนามัยโลก แต่มีฤทธิ์ทำให้ยุงลายสลบ (knockdown) ทั้ง 4 สายพันธุ์ ตามอัตราการใช้ที่แนะนำไว้ที่ฉลากและอัตราผสมสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกอยู่ที่ 62.48-97.90% และ 80.19-98.10% ตามลำดับ รายละเอียดตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การตอบสนองของยุงลาย *Ae. aegypti* ต่อสารเคมี สูตรผสม-1 (Mix-1)

สายพันธุ์ยุงลายบ้าน <i>Ae. aegypti</i>	อัตราการใช้ 0.75 g/ha		อัตราการใช้ 1.0 g/ha	
	อัตราการสลบ ที่ 60 นาที	อัตราการตาย ที่ 24 ชม.	อัตราการสลบ ที่ 60 นาที	อัตราการตาย ที่ 24 ชม.
ห้องปฏิบัติการ (LS)	87.62	90.00	95.81	96.00
เชียงใหม่ (CMS)	97.90	98.48	98.10	99.00
ตาก (TKS)	94.29	92.38	90.67	91.86
ระยอง (RYS)	62.48	60.00	80.19	77.33

สารเคมี สูตรผสม-2 (Mix-2) เมื่อทดสอบตามอัตราการใช้บนฉลากและอัตราสูงสุดที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ พบว่ามีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (LS), จังหวัดเชียงใหม่ (CMS) และจังหวัดตาก (TKS) ส่วนยุงลายสายพันธุ์จังหวัดระยอง (RYS) อัตราการผสมสารเคมีที่แนะนำไว้ที่ฉลากและอัตราสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก ฆ่ายุงลายได้เพียง 83.62% และ 68.79% ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การตัดสินประสิทธิภาพสารเคมีขององค์การอนามัยโลก แต่มีฤทธิ์ทำให้ยุงลายสลบทั้ง 4 สายพันธุ์ ตามอัตราการใช้ที่แนะนำไว้ที่ฉลากและอัตราผสมสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกอยู่ที่ 84.38-98.67% และ 74.48-99.43% ตามลำดับ รายละเอียดตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การตอบสนองของยุงลาย *Ae. aegypti* ต่อสารเคมี สูตรผสม-2 (Mix-2)

สายพันธุ์ยุงลายบ้าน <i>Ae. aegypti</i>	อัตราการใช้ 1.25 g/ha		อัตราการใช้ 2.0 g/ha	
	อัตราการสลบ ที่ 60 นาที	อัตราการตาย ที่ 24 ชม.	อัตราการสลบ ที่ 60 นาที	อัตราการตาย ที่ 24 ชม.
ห้องปฏิบัติการ (LS)	98.67	98.86	99.43	98.00
เชียงใหม่ (CMS)	95.62	96.11	98.48	99.40
ตาก (TKS)	92.38	92.19	94.67	90.00
ระยอง (RYS)	84.38	83.62	74.48	68.79

สารเคมี สูตรผสม-3 (Mix-3) เมื่อผสมตามอัตราการใช้ที่แนะนำบนฉลากเป็นอัตราสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก พบว่ามีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (LS), จังหวัดเชียงใหม่ (CMS), จังหวัดตาก (TKS) และจังหวัดระยอง (RYS) และมีฤทธิ์ทำให้ยุงลายสลบทั้ง 4 สายพันธุ์อยู่ที่ 99.43-100% รายละเอียดตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การตอบสนองของยุงลาย *Ae. aegypti* ต่อสารเคมีสูตรผสม-3 (Mix-3)

สายพันธุ์ยุงลายบ้าน <i>Ae. aegypti</i>	อัตราการใช้ 3.0 g/ha	
	อัตราการสลบที่ 60 นาที	อัตราการตายที่ 24 ชม.
ห้องปฏิบัติการ (LS)	100	100
เชียงใหม่ (CMS)	100	100
ตาก (TKS)	99.43	99.62
ระยอง (RYS)	99.81	99.62

สารเคมี สูตรเดี่ยว (cyfluthrin) เมื่อทดสอบตามอัตราการใช้บนฉลาก พบว่ามีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% เพียงสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการเท่านั้น แต่เมื่อใช้อัตราสูงสุดที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ พบว่ามีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% เพิ่มขึ้น 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (LS), จังหวัดเชียงใหม่ (CMS) และจังหวัดตาก (TKS) ส่วนยุงลายสายพันธุ์จังหวัดระยอง อัตราการใช้บนฉลากและอัตราสูงสุดที่องค์การอนามัยโลกแนะนำฆ่ายุงลายได้เพียง 68.38% และ 64.95% ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การตัดสินประสิทธิภาพสารเคมีขององค์การอนามัยโลก แต่มีฤทธิ์ทำให้ยุงลายสลบทั้ง 4 สายพันธุ์ ตามอัตราการใช้ที่แนะนำไว้ที่ฉลากและอัตราผสมสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกอยู่ที่ 76.38-99.43% และ 71.05-93.71% ตามลำดับ รายละเอียดตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การตอบสนองของยุงลาย *Ae. aegypti* ต่อสารเคมี สูตเรเดีย (cyfluthrin)

สายพันธุ์ยุงลายบ้าน <i>Ae. aegypti</i>	อัตราการใช้ 1.25 g/ha		อัตราการใช้ 2.0 g/ha	
	อัตราการสลบ ที่ 60 นาที	อัตราการตาย ที่ 24 ชม.	อัตราการสลบ ที่ 60 นาที	อัตราการตาย ที่ 24 ชม.
ห้องปฏิบัติการ (LS)	99.43	98.91	79.43	92.00
เชียงใหม่ (CMS)	86.29	82.38	93.71	98.34
ตาก (TKS)	91.05	82.36	88.19	92.19
ระยอง (RYS)	76.38	68.38	71.05	64.95

วิจารณ์

การตอบสนองของยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ 4 ชนิด ด้วยวิธีการพ่นแบบพ่นฝอยละเอียด พบว่าสารเคมีสูตรผสม-3 มีประสิทธิภาพในการฆ่ายุงลายดีที่สุด สามารถฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% ทั้ง 4 สายพันธุ์ เนื่องจากอัตราการผสมสารเคมีที่แนะนำไว้ที่ฉลากเป็นอัตราการผสมสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกอยู่แล้ว แต่เพื่อชะลอการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีของยุงลายและเพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาอัตราการผสมสารเคมีที่มีความเข้มข้นต่ำลงแต่ยังคงมีประสิทธิภาพฆ่ายุงลายได้ดี เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมยุงลายต่อไป

สารเคมีสูตรผสม-1 และสารเคมีสูตรผสม-2 เมื่อใช้อัตราการผสมสารเคมีที่แนะนำไว้ที่ฉลากมีประสิทธิภาพดี สามารถฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% จำนวน 3 สายพันธุ์ (LS, CMS, TKS) ซึ่งปริมาณของสารเคมีตามอัตราการผสมที่แนะนำไว้ที่ฉลากสามารถฆ่ายุงลายได้ดีและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการพ่นเคมีควบคุมยุงลายในพื้นที่ศึกษา เพราะเมื่อใช้ปริมาณสารเคมีเพิ่มขึ้นก็ยังคงฆ่ายุงลายได้มากกว่า 90% จำนวน 3 สายพันธุ์เท่าเดิม (LS, CMS, TKS) ดังนั้นเพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย และชะลอการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีของยุงลายจึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีแต่อย่างใด

ส่วนสารเคมี cyfluthrin สูตรเดี่ยว เมื่อใช้อัตราการผสมสารเคมีที่แนะนำไว้ที่ฉลากสามารถฆ่ายุงลายบ้านได้มากกว่า 90% เพียงสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (LS) เท่านั้น แต่เมื่อใช้อัตราสูงสุดตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก มีประสิทธิภาพดี สามารถฆ่ายุงลายบ้านได้มากกว่า 90% ได้ 3 สายพันธุ์ (LS, CMS, TKS) ซึ่งสารเคมี cyfluthrin สูตรเดี่ยวอาจมีข้อจำกัดในการใช้ เนื่องจากไม่มีสาร piperonyl butoxide (PBO) ช่วยเสริมฤทธิ์ โดยการเติมสาร piperonyl butoxide (PBO) ที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenases⁽¹⁰⁾ กลไกการย่อยสลายสารฆ่าแมลงกลุ่มเอนไซม์ทำลายพิษ (detoxification) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารฆ่าแมลงแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของแมลง ซึ่งในยุงพบว่าเอนไซม์กลูตาไทโอน เอสทรานสเฟอเรส มีหน้าที่หลักในการทำลายสารพิษจากสารเคมีหรือสารฆ่าแมลง จึงทำให้แมลงรอดตายและกลายเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานสารเคมี⁽¹¹⁾ ซึ่งสารเคมีสูตรผสม-1 เป็นสารเคมีหลักที่มีการแนะนำให้ใช้พ่นควบคุมยุงลายบ้าน แต่เมื่อมีการนำไปใช้หลายพื้นที่ของประเทศไทย ยุงลายบ้านอาจเกิดการปรับตัวและพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารเคมีทำให้ต่อสู้ต่อสารเคมีได้ สอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการพ่นหมอกควัน พ่นฝอยละออง และพ่นฝอยละอองดีตรอยนต์ ในการควบคุมยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ในเขตเทศบาลนครสงขลา โดยการใช้สารเคมี deltamethrin 0.5% w/v พบว่าการพ่นสารเคมีแบบหมอกควันและแบบฝอยละอองสามารถควบคุมความหนาแน่นของยุงลายบ้านได้ดีในชุมชนแออัด หลังจากพ่นแล้วสามารถลดความหนาแน่นของยุงลายบ้านได้ในช่วงเวลา 1-2 สัปดาห์ เท่านั้น การพ่นสารเคมีจึงเหมาะสำหรับการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออก การควบคุมแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายบ้านจึงเป็นมาตรการที่สำคัญ

ที่จะช่วยลดความหนาแน่นของยุงลายได้⁽¹²⁾ และจากการทดสอบ Susceptibility test ยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลง กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ 3 ชนิด คือ permethrin 0.75%, deltamethrin 0.05% และ lambda-cyhalothrin 0.05% จำนวน 29 จังหวัดของประเทศไทย พบว่าสารเคมี deltamethrin มีฤทธิ์ต่อสารเคมี 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครสวรรค์, จังหวัดชุมพร, จังหวัดสงขลา และจังหวัดสุราษฎร์ธานี ส่วนสารเคมี lambda-cyhalothrin ยุงลายบ้านยังตอบสนองดีต่อสารเคมีทั้ง 29 จังหวัด⁽¹³⁾ และจากการศึกษาการใช้สารเสริมฤทธิ์ piperonyl butoxide (PBO) เพื่อเพิ่มอัตราการตายของยุงลายบ้านที่สร้างความต้านทานต่อสารเคมี deltamethrin ในประเทศไทย ด้วยวิธี Bioassays ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก โดยให้ยุงลายบ้านสัมผัสกับ PBO 4% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยสัมผัสสารเคมี deltamethrin 0.05% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ายุงลายบ้านมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (64.8-98.1%) และมีอัตราการสลบ knockdown time (KDT) ช่วงการสลบ KDT50 อยู่ที่ 1.7 ถึง 2.8 และ KDT95 อยู่ที่ 1.9 ถึง 4.0 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี deltamethrin เพียงอย่างเดียวกับสาร PBO ผสม deltamethrin⁽¹⁴⁾ สอดคล้องกับการทดสอบสารเคมีทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ deltamethrin, zeta cypermethrin, cyfluthrin และ lambda cyhalothrin ที่มีฤทธิ์ knockdown ยุงลายบ้านทั้ง 4 สายพันธุ์ เนื่องจากสารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์มีคุณสมบัติในการทำให้ยุงเกิดอาการ knockdown โดยรบกวนการทำงานของระบบประสาท ทำให้แมลงบินเป็นอัมพาตอย่างรวดเร็ว⁽¹⁵⁾ ดังนั้นควรแนะนำให้ประชาชนเก็บกวาดซากยุงที่สลบมาทำลายทันทีหลังจากฉีดพ่นสารเคมีและปิดอบให้ยุงสัมผัสกับสารเคมีภายในบ้านเป็นเวลา 30-60 นาที จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีทั้ง 4 ชนิด แนะนำให้ใช้สารเคมีสูตรผสมที่มีสาร piperonyl butoxide (PBO) เป็นสารเสริมฤทธิ์ เพื่อช่วยให้สารเคมีมีประสิทธิภาพในการฆ่ายุงลายดียิ่งขึ้นสำหรับพื้นที่ 3 จังหวัดที่ทำการศึกษาร่วมทั้งสามารถนำข้อมูลไปประกอบการพิจารณาเพื่อตัดสินใจในการเลือกใช้สารเคมีและอัตราการผสมที่เหมาะสมกับบริบทของแต่ละพื้นที่ได้ร่วมกับประวัติการใช้สารเคมีของพื้นที่เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการพ่นเคมีควบคุมยุงลายในพื้นที่ที่ทำการศึกษต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางหรือวิธีมาตรฐานสำหรับใช้ศึกษากับตัวอย่างยุงลายจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยได้

สรุป

การใช้สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ 4 สูตร ได้แก่ สูตรผสม-1, สูตรผสม-2, สูตรผสม-3 และสูตรเดี่ยว (cyfluthrin) ด้วยวิธีการพ่นแบบฝอยละเอียดในการควบคุมยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* พบว่าสารเคมีสูตรผสม-3 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการฆ่ายุงลายในพื้นที่ที่ทำการศึกษา และพบว่าเมื่อเติม piperonyl butoxide (PBO) ลงในสูตรเพื่อเป็นสารเสริมฤทธิ์ประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงจะดียิ่งขึ้น ดังนั้นควรใช้สารเคมีสูตรผสมซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่ายุงลายบ้านได้ดีกว่าสารเคมีสูตรเดี่ยว ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงเทคนิคการพ่นสารเคมี และอัตราการผสมสารเคมีจะต้องปฏิบัติอย่างถูกต้องจึงจะสามารถควบคุมยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือวิชาการโรคติดต่อเฉียบพลันและโรคไข้เลือดออกเฉียบพลันด้านการแพทย์และสาธารณสุข. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2559.
2. สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการใช้เครื่องพ่นสำหรับปฏิบัติการเพื่อป้องกันและควบคุมโรคไข้เลือดออก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2558.

3. WHO. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization; 1997.
4. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ. ความสัมพันธ์ของสภาพภูมิอากาศที่ส่งผลต่อยุงลายพาหะของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย. นครปฐม: สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล. 2559.
5. Thanispong K, Sathantriphop S, Chareonviriyaphap T. Insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Thailand. J Pestic Sci 2008; 33(4): 351-6.
6. Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-Klan R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. Parasit Vectors 2013; 6: 280. (28 pages).
7. Amelia-Yap ZH, Chen CD, Sofian-Azirun M, Low VL. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. Parasit Vectors 2018; 11: 322. (17 pages).
8. WHO. Space spray application of insecticides for vector and public health pest control: a practitioner's guide. Geneva: World Health Organization; 2003.
9. WHO. Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications. Geneva: World Health Organization; 2009.
10. จินตนา ยาโนละ. กลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงใน *Culex quinquefasciatus* ยุงรำคาญพาหะนำโรคพยาธิฟิลาเรีย. เชียงใหม่: ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2559.
11. สิริภค สุระพร. กลไกที่แมลงต้านทานต่อสารฆ่าแมลง. วารสารเกษตรพระวรุณ 2562; 16(1): 34-48.
12. วิรัช วงศ์หิรัญรัตน์, ชุติศักดิ์ โมลิโต, โสภาวดี มูลเมฆ. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการพ่นหมอกควันพ่นฝอยละออง และพ่นฝอยละอองติดยนต์ ในการควบคุมยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) ในเขตเทศบาลนครสงขลา. สงขลา: สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา; 2552.
13. Chuaycharoensuk T, Juntarajumnong W, Boonyuan W, Bangs MJ, Akkratanakul P, Thammaphalo S, et al. Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. J Vector Ecol 2011; 36(1): 204-12.
14. Kongmee M, Thanispong K, Sathantriphop S, Sukkanon C, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. Enhanced mortality in deltamethrin-resistant *Aedes Aegypti* in Thailand using a piperonyl butoxide synergist. Acta Trop 2019; 189: 76-83.
15. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ปลอดภัย ปลอดภัย ถ้าใช้ยาถูกต้องยุงถูกวิธี. [ออนไลน์]. 2552; [สืบค้น 20 พ.ย. 2563]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://oryor.com/อย/detail/media_printing/32.

Efficacy of Insecticides for *Aedes aegypti* Control by Ultra-Low-Volume Application in Semi-Field Condition

Jiraporn Sevana Bussarakum Sinakom and Boonserm Aumaung

Vector Borne Diseases Division, Department of Disease Control, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The efficacy of insecticides using ultra-low volume (ULV) spraying to control *Aedes aegypti* mosquito was evaluated by the cage-bioassay test method. Laboratory strain (LS) and 3 field strains of mosquitoes collected from Chiang Mai (CMS), Tak (TKS) and Rayong (RYS) provinces were used for this testing. Three mixed formulations: Mix-1 [deltamethrin, s-bioallethrin, piperonyl butoxide (PBO)], Mix-2 (lambda-cyhalothrin, tetramethrin, PBO), Mix-3 (zeta cypermethrin, tetramethrin, PBO) and one single formulation (containing cyfluthrin only) were tested in parallel on mixing ratios shown on the labels and the maximum ratio recommended by the guideline of World Health Organization (WHO). The efficacy of those formulations were evaluated for the percentage of mosquito knock down rate at 60 minutes and mortality rate at 24 hours. It was found that the Mix-3 formulation provided the highest efficacy to kill *Ae. aegypti* all strains. The Mix-1 and Mix-2 formulation using at ratios shown on the labels were effective to kill *Ae. aegypti* over 90% of the 3 strains (LS, CMS and TKS). While the single formulation of cyfluthrin, using at maximum ratio recommended by WHO, could kill 3 strains (LS, CMS and TKS) of *Ae. aegypti* over 90%. If it was applied as labelled, it could kill more than 90% of the LS strain only, while the efficacies against the 3 field strains were less than 90% mortality rate. Therefore, it was recommended to use the mixed formulations of insecticides to control *Ae. aegypti* mosquito, instead of the single formulation containing only one chemical active ingredient.

Keywords : Insecticides, Synthetic Pyrethroids, Ultra-Low-Volume (ULV), *Aedes aegypti*

การพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงจากน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

ภาณุกิจ กันหาจันทร์¹ ศรีสุตา สมัยใหม่² จักรวาล ชมภูศรี¹ สรียา เรืองพัฒน์พงศ์³ พายุ ภัคตินวน¹ ษญาดา ขำสวัสดิ์¹ นาวี ศรีวรมย์¹ และเกรียงศักดิ์ ฤชุศาสตร์¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300

³สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คลองหลวง ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงปริมาณมากเพื่อควบคุมยุงพาหะโรคไข้เลือดออก ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและยุงต้านทานต่อสารเคมี จึงควรมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อลดผลกระทบดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด (โหระพา กานพลู ยูคาลิปตัส อบเชยจีน ตะไคร้บ้าน ตะไคร้หอม มะกรูด ส้ม ส้มเขียวหวาน กระชาย) ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านสายพันธุ์จากห้องปฏิบัติการ (Lab strain) และสายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมี (Resistant strain) ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain มีค่า LC_{50} เท่ากับ 62.8, 66.0 และ 77.4 ppm ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain มีค่า LC_{50} เท่ากับ 72.3, 83.1 และ 109.6 ppm ตามลำดับ จึงนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และศึกษาประสิทธิภาพต่อลูกน้ำยุงลายบ้านทั้ง Lab strain และ Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนามนาน 5 สัปดาห์ สำหรับลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain พบว่า มีอัตราการตายร้อยละ 100, 66.7, 57.7, 36.7 และ 0 ตามลำดับ ส่วนผลต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain พบว่า มีอัตราการตายร้อยละ 100, 61.7, 46.7, 33.3 และ 0 ตามลำดับ สรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงในรูปแบบไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายได้ดี สามารถนำไปใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุง, ไมโครอิมัลชัน, น้ำมันหอมระเหย, ลูกน้ำยุงต้านทานสารเคมี

Corresponding author E-mail: phanukit.k@dmsc.mail.go.th

Received: 15 October 2020

Revised: 30 November 2020

Accepted: 8 December 2020

บทนำ

ในประเทศไทยมีโรคติดต่อที่นำโดยแมลงอยู่หลายโรคด้วยกัน ยุงลายบ้านเป็นแมลงชนิดหนึ่งที่เป็นพาหะหลักนำโรคติดต่อที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศ ได้แก่ โรคไข้เลือดออก โรคชุกุนยาและโรคติดเชื้อไวรัสชิคา ปัจจุบันมาตรการหลักในการป้องกันโรยังคงให้ความสำคัญกับการกำจัดหรือการควบคุมยุงพาหะนำโรค ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกที่ชื่อเต็งวาเซียร์แล้ว แต่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้เพียงร้อยละ 65.6⁽¹⁾ ที่ผ่านมามีการนำสารเคมีกำจัดแมลงมาใช้ในการควบคุมยุงพาหะหลายชนิดในกลุ่ม Organophosphate เช่น มาลาไรออน (malathion) และเฟนิโตรไธออน (fenitrothion) กลุ่ม Carbamate เช่น โพรพ็อกเซอร์ (propoxur), เบนไดโอคาร์บ (bendiocarb) กลุ่ม Synthetic pyrethroids เช่น เดลตาเมธริน (deltamethrin), เพอร์เมธริน (permethrin) เป็นต้น แต่การใช้สารเคมีกำจัดแมลงนั้นทำให้เกิดสารตกค้างเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ นอกจากนี้ยังทำให้ยุงเกิดการต้านทานต่อสารเคมี ดังนั้นเพื่อเป็นการลดผลกระทบที่เกิดขึ้นดังกล่าว น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาทดแทนการใช้สารเคมี เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรมีพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงต่ำ และมีรายงานว่า องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด เช่น geraniol, methyl chavicol, eucalyptol, limonene, linalool, citronellal และ eugenol มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงและไล่ยุงได้⁽²⁾

Azhari, H.N. และคณะ ปี 2012 รายงานว่า จากการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ระยะที่ 3 ของน้ำมันหอมระเหยโหระพา (*Ocimum bacillicum*) โดย methyl chavicol (MCV) accession ให้ค่า LC_{50} และ LC_{90} เท่ากับ 160 และ 262 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สำหรับ geraniol-geraniol (GGV) accession ให้ค่า LC_{50} และ LC_{90} เท่ากับ 174 และ 356 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แสดงว่า MCV accession มีประสิทธิภาพดีกว่า GGV accession และเมื่อวิเคราะห์ methyl chavicol accession ด้วย GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบดังนี้ คือ methyl chavicol (43%), linalool (17.55%), geraniol (13.73%), eucalyptol (5.00%), methyl cinnamate (5.00%), α -bergamotene (3.22%) และ eugenol (2.79%) รวมทั้ง β -pinene, β -myrcene, caryophyllene, germacrene และ β -ocimene (1.00-1.89%) สำหรับวิเคราะห์ GGV accession ด้วย GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบ ดังนี้ geraniol (68.42%), geraniol (9.61%), linalool (8.12%) รวมทั้ง β -ocimene และ caryophyllene (1.05-2.90%)⁽²⁾

Dalia, I.H. และคณะ ปี 2013 รายงานว่า จากการศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม (*Citrus sinensis*) ทั้งเปลือกส้มดิบและเปลือกส้มสุก พบว่ามีสารลิโมนีน (limonene) ร้อยละ 80.14 และร้อยละ 80.93 ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากใบส้ม พบว่ามี terpinen-4-ol ร้อยละ 14.1 เป็นองค์ประกอบหลักสำหรับน้ำมันหอมระเหยจากดอกส้ม พบว่ามีสาร sabinene เป็นองค์ประกอบหลักและพบสารลิโมนีนเป็นองค์ประกอบรอง และจากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากส้มในการกำจัดลูกน้ำยุง ระยะที่ 4 ของยุงรำคาญ *Culex pipiens* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากใบส้ม และจากดอกส้มด้วย LC_{50} อยู่ในช่วง (20-160 ppm)⁽³⁾

ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่มีองค์ประกอบทางเคมีของสารเหล่านี้ เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน ทั้งลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการและลูกน้ำยุงลายบ้านจากแม่งยุงที่มีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษา (จังหวัดจันทบุรี) โดยน้ำมันหอมระเหย

ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจะถูกนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงเพื่อตัดวงจรการเกิดโรคไข้เลือดออก โรคชคุณกุนยา และโรคติดเชื้อไวรัสซิกา นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้สมุนไพรในท้องถิ่นที่มีอยู่จำนวนมากให้เกิดประโยชน์สูงสุดและยังสามารถช่วยลดต้นทุนการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์ที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของประชาชนและสิ่งแวดล้อม วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการและกึ่งภาคสนาม และศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายตัว และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของไมโครอิมัลชัน ที่พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด (โหระพา กานพลู ยูคาลิปตัส อบเชยจีน ตะไคร้บ้าน ตะไคร้หอม มะกรูด ส้ม ส้มเขียวหวาน และกระชาย) ซื้อมาจากบริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทยจีน จำกัด เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเจือจางด้วย 1% Tween 20 โดยใช้ 1% Tween 20 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control)

สารสังเคราะห์ลิโมนีนของ Sigma Aldrich, USA เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ในการทดสอบกึ่งภาคสนาม

ชนิดของลูกน้ำยุงที่ใช้ในการวิจัย

ลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ระยะ 3-4 จากห้องปฏิบัติการ เป็น Lab strain

ลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ระยะ 3-4 จากแม่ยุงที่มีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง ที่เก็บมาจาก (จังหวัดจันทบุรี) เป็น Resistant strain

การเตรียมลูกน้ำยุงลายบ้านสำหรับการทดสอบ

สัตว์ที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ไข่ยุง ที่นำมาเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง ได้รับการสนับสนุนจากฝ่ายพิพิธภัณฑ์แมลงและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ได้จากการนำไข่ยุงที่ติดบนกระดาษกรองลงฟักในถาดพลาสติก ใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นไข่จะเริ่มฟักเป็นลูกน้ำยุงระยะที่ 1 เริ่มให้อาหารหนูบดละเอียด และเลี้ยงลูกน้ำยุงลายระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน จะได้ลูกน้ำยุงระยะที่ 3 ถึงระยะที่ 4 ที่อุณหภูมิ 28-30 °C สามารถนำไปใช้ทดลองได้ โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างละ 20 ตัว ในแต่ละระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Larvicidal activity)

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง ดัดแปลงมาจากวิธีของ Pedro M. Gutierrez, Jr. และคณะ (2014)⁽⁴⁾

1. เตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละระดับความเข้มข้นจาก 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,000 ppm ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร (5 ซ้ำ)
2. ควบคุมสภาวะแวดล้อมของการทดลองที่อุณหภูมิ 27 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75-85% RH
3. เติมลูกน้ำยุงระยะ 3 ตอนปลาย หรือ 4 ตอนต้น จำนวน 20 ตัว ใส่ลงในสารละลายของน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
4. ใช้ 1% Tween 20 ซึ่งเป็นตัวทำลายเป็นกลุ่มควบคุม

5. บันทึกผลจำนวนการตายของลูกน้ำหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมง ของการทดสอบ และประเมินผลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำโดยใช้ Abbott's formula และคำนวณหาค่าอัตราการตายของลูกน้ำ (LC_{50}) โดยใช้ Probit analysis

สำหรับลูกน้ำยุงลายบ้านที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษาที่มีรายงานยุงลายต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง deltamethrin และ cypermethrin จะนำมาทดสอบยืนยันความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง deltamethrin และ cypermethrin ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี WHO standard susceptibility test ถ้าพบว่ายุงลายบ้านจากจังหวัดจันทบุรีมีอัตราการตายน้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ายุงลายบ้านมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่ทดสอบตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงเช่นเดียวกันกับทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการและลูกน้ำยุงลายบ้านจากแม่งที่มีมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษา (น้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส) เพื่อหาเอกลักษณ์และปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS โดยส่งตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

การพัฒนาตำรับและรูปแบบของสูตรผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุง และทดสอบประสิทธิภาพ

พัฒนาตำรับและรูปแบบของสูตรผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุง ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยวในรูปแบบไมโครอิมัลชัน การเตรียมไมโครอิมัลชันโดยวิธี low energy method⁽⁵⁾ ใช้ polysorbate 20 3.5 มิลลิลิตร กวนผสมกับ propylene glycol 3.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม essential oil ของน้ำมันโหระพา 2 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมให้เข้ากันบน magnetic stirrer ด้วยความเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที กวนส่วนผสมทั้งหมดด้วยอัตราเร็วเดิม เป็นเวลา 60 นาที แล้วส่งทำการวัดขนาดอนุภาค (Droplet size และ polydispersity ด้วย Photon correlation spectroscopy (Zetasizer ZS, Malvern, UK)) และศึกษาความคงตัวของตำรับอิมัลชันโหระพา ทำการทดสอบภายใต้ 40°C, 75% RH ณ เวลา 1, 7, 21, 30 และ 60 วัน หลังการเตรียม (ภาพที่ 1)

พัฒนาตำรับและรูปแบบของผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวมในรูปแบบไมโครอิมัลชัน การเตรียมไมโครอิมัลชันโดยวิธี low energy method ใช้ polysorbate 20 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ผสมกับ propylene glycol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม Cremophor RH 40 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม plantacare 1200 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม essential oil ของน้ำมันโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส ปริมาตร 5, 4, 4 มิลลิลิตร ตามลำดับ กวนส่วนผสมให้เข้ากันบน magnetic stirrer ด้วยความเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที กวนส่วนผสมทั้งหมดด้วยอัตราเร็วเดิม เป็นเวลา 60 นาที แล้วส่งทำการวัดขนาดอนุภาค (Droplet size และ polydispersity ด้วย Photon correlation spectroscopy (Zetasizer ZS, Malvern, UK)) และศึกษาความคงตัวของตำรับอิมัลชันสมุนไพรรวม ทำการทดสอบภายใต้ 40°C, 75% RH ณ เวลา 1, 7, 21, 30 และ 60 วัน (ภาพที่ 2)

หลังการเตรียมแล้ว ทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้น ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการและลูกน้ำยุงลายบ้านจากแม่งที่มีมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษา โดยทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เดี่ยวของน้ำมันหอมระเหยโหระพา และสูตรผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวม ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านทั้งสอง strain ทั้งในห้องปฏิบัติการและในกึ่งภาคสนาม



ภาพที่ 1 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรเดี่ยวโหระพา



ภาพที่ 2 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม

การศึกษาขนาด การกระจายตัวของอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของอิมัลชันโหระพา และอิมัลชันสมุนไพรรวม

ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค (size and polydispersity index; PDI): วัดด้วยเครื่อง Zeta Sizer (NanoZS, Mavernt, UK) ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้เทคนิค Photon correlation spectroscopy (PCS) วัดซ้ำ 3 ครั้ง ($n=3$) โดยวิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีของ Soradech และคณะ (2018)⁽⁶⁾

การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคก่อนและหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในช่วงเวลาต่าง ๆ

ใช้สถิติ one way ANOVA

การศึกษาความคงตัวของเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันน้ำมันหอมระเหย

การศึกษาความคงตัวของตำรับอิมัลชันโหระพา และอิมัลชันสมุนไพรรวม ทำการทดสอบภายใต้ 40°C, 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน ซึ่งวิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีของ Soradech และคณะ (2018)⁽⁶⁾ โดยคุณลักษณะทางเคมีกายภาพที่ทำการทดสอบ ได้แก่ ขนาด การกระจายอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว โดยใช้เครื่อง Zeta sizer NanoZS (Mavernt, ประเทศอังกฤษ) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 เครื่องวัดขนาดการกระจายอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว Zeta sizer Nano ZS (Mavernt, ประเทศอังกฤษ)

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เดี่ยวของน้ำมันหอมระเหยโหระพา และสูตรผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวม ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน **Lab strain** ในระดับห้องปฏิบัติการ⁽⁴⁾

1. เตรียมสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา (โหระพา + น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (2:1:3.5:3.5) และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1) ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร (5 ขั้ว)
2. ควบคุมสภาวะแวดล้อมของการทดลองที่อุณหภูมิ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 75–85 %RH
3. เติมลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการระยะ 3 หรือ 4 จำนวน 20 ตัว ใส่ลงในสารละลายของน้ำมันหอมระเหย ที่แต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 200 มิลลิลิตร
4. ใช้ (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5) ซึ่งเป็นตัวทำละลาย และน้ำประปาเป็นกลุ่มควบคุม
5. บันทึกผลจำนวนการตายของลูกน้ำหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมงของการทดสอบ และประเมินผลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำโดยใช้ Abbott's formula และคำนวณหาค่าอัตราการตายของลูกน้ำยุง (LC_{50}) โดยใช้ Probit analysis

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เดี่ยวของน้ำมันหอมระเหยโหระพา และสูตรผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวม ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain** ในระดับห้องปฏิบัติการ⁽⁴⁾

ดำเนินการแบบเดียวกันกับ Lab strain ยกเว้นข้อ 3 ใช้ลูกน้ำยุง Resistant strain

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน **Lab strain** ในระดับกึ่งภาคสนาม (โอ่งมังกร ขนาด 180 ลิตร, $n=3$) วิธีการทดสอบดัดแปลงตามวิธีของ Thanyalak และคณะ (2006)⁽⁷⁾ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ในระดับกึ่งภาคสนาม (โอ่งมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

1. เตรียมสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1) และสูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1) ใส่ลงในโถงมุ้งที่มีน้ำประปาปริมาณ 180 ลิตร (3 ชั่วโมง)
2. คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เป็นเวลา 30 นาที
3. เติมลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการระยะ 3 หรือ 4 จำนวน 20 ตัว ใส่ลงในสารละลายของสูตรน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละสูตรปริมาณ 180 ลิตร
4. ใช้ (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1) ซึ่งเป็นตัวทำละลาย และน้ำประปาเป็นกลุ่มควบคุม
5. บันทึกผลจำนวนการตายของลูกน้ำหลังจากวันแรก สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 5 ของการทดสอบ
6. บันทึกอุณหภูมิตลอดการทดลอง และวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความขุ่นของน้ำก่อนและหลังการทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน (Resistant strain) ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมุ้ง ขนาด 180 ลิตร, $n=3$) ดำเนินการแบบเดียวกับ Lab strain กึ่งภาคสนาม ยกเว้นข้อ 3 ใช้ลูกน้ำยุง Resistant strain

การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิ, pH และค่าความขุ่นของน้ำ (O.D.) ก่อนและหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในทางสถิติ ในการวิเคราะห์ข้อมูลสภาพน้ำในโถงก่อนและหลังการทดลองใช้สถิติ t-test

ผล

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Larvicidal activity) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Pedro M.Gutierrez, Jr. และคณะ (2014) พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน (Lab strain) รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยกานพลูและน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 62.8, 66.0 และ 77.4 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain

สารทดสอบ	ความเข้มข้นในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain LC_{50} (ppm)
น้ำมันหอมระเหยโหระพา	62.8
น้ำมันหอมระเหยกานพลู	66.0
น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส	77.4
น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน	78.2
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน	125.5
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม	188.2
น้ำมันหอมระเหยมะกรูด	255.7
น้ำมันหอมระเหยส้ม	290.6
น้ำมันหอมระเหยส้มเขียวหวาน	312.5
น้ำมันหอมระเหยกระชาย	321.2

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain**

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Larvicidal activity) ตัดแปลงมาจากวิธีของ Pedro M. Gutierrez, Jr. และคณะ (2014) พบว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain** รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยกานพลูและน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 72.3, 83.1 และ 109.6 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain**

สารทดสอบ	ความเข้มข้นในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain LC_{50} (ppm)
น้ำมันหอมระเหยโหระพา	72.3
น้ำมันหอมระเหยกานพลู	83.1
น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส	109.6
น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน	122.6
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน	184.3
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม	289.6
น้ำมันหอมระเหยมะกรูด	344.3
น้ำมันหอมระเหยส้ม	397.5
น้ำมันหอมระเหยส้มเขียวหวาน	429.7
น้ำมันหอมระเหยกระชาย	512.0

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโหระพา น้ำมันหอมระเหยกานพลู และน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน **Lab strain** และ **Resistant strain** (น้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส) เพื่อหาสารเอกลักษณ์และปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS โดยส่งตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพา ส่วนใหญ่มีสาร methyl chavicol เป็นองค์ประกอบทางเคมีร้อยละ 84.45 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสาร δ -3-carene, α -bergamotene และ 1,8-cineole ร้อยละ 6.62, 1.40 และ 0.69 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) น้ำมันหอมระเหยกานพลู ส่วนใหญ่มีสาร eugenol เป็นองค์ประกอบทางเคมีร้อยละ 91.61 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสาร trans-caryophyllene และ α -humulene ร้อยละ 6.56 และ 1.83 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสส่วนใหญ่มีสาร eucalyptol เป็นองค์ประกอบทางเคมีร้อยละ 82.15 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสาร limonene, β -myrcene, α -pinene และ α -terpinene ร้อยละ 7.18, 4.43, 2.31 และ 2.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโหระพา

Retention time	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
6.70	1,8-cineole	0.69
16.32	δ -3-carene	6.62
17.22	α -bergamotene	1.40
19.82	Methyl chavicol	84.45

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลู

Retention time	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
20.42	eugenol	91.61
22.07	Trans-caryophyllene	6.56
23.12	α -humulene	1.83

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส

Retention time	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
6.33	α -pinene	2.31
9.00	β -myrecene	4.43
9.12	Limonene	7.18
9.50	Eucalyptol	82.15
10.07	α -terpinene	2.23

ผลการศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค (PDI) และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของไมโครอิมัลชันโหระพา และไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม

จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไมโครอิมัลชันโหระพา และไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) เพื่อวัดขนาดและการกระจายอนุภาค (size and polydispersity index; PDI): ซึ่งทำการวัดด้วยเครื่อง Zeta Sizer (NanoZS, Mavert, UK) ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้เทคนิค photon correlation spectroscopy (PCS) ณ เวลา 1, 7, 21, 30 และ 60 วัน หลังการเตรียม วัดซ้ำ 3 ครั้ง ($n=3$) ดังภาพที่ 1 โดยวิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีของ Soradech และคณะ (2018) พบว่าไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้นมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 106.13 ± 1.26 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.29 ± 0.00 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -17.73 ± 2.10 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 1 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 97.73 ± 1.20 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.47 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -17.57 ± 1.22 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 7 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 95.19 ± 0.67 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.43 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -27.53 ± 1.19 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 21 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 86.17 ± 0.41 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.51 ± 0.00 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -19.47 ± 1.72 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 30 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 100.21 ± 1.90 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.42 ± 0.02 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -17.97 ± 1.22 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 60 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 63.32 ± 0.50 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.53 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -55.47 ± 4.78 (ตารางที่ 6)

ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 82.59 ± 0.66 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.47 ± 0.00 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -27.23 ± 0.81 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 1 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 95.44 ± 6.95 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.60 ± 0.04 มีค่าศักย์ไฟฟ้า

ที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -15.30 ± 1.57 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 7 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 227.63 ± 45.87 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.33 ± 0.05 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -27.50 ± 0.36 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 21 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 388.40 ± 3.77 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.51 ± 0.10 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -40.93 ± 4.40 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 30 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 163.93 ± 46.19 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.31 ± 0.04 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -24.50 ± 2.43 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม วันที่ 60 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 323.32 ± 0.50 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.53 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -55.47 ± 4.78 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ขนาดอนุภาค การกระจายตัว (PDI) และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของไมโครอิมัลชันโหระพา และไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)	การกระจายตัวของอนุภาค (PDI)	ศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV)
1. ไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้น	106.13 ± 1.26	0.29 ± 0.00	-17.73 ± 2.10
2. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 1	97.73 ± 1.20	0.47 ± 0.01	-17.57 ± 1.22
3. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 7	95.19 ± 0.67	0.43 ± 0.01	-27.53 ± 1.19
4. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 21	86.17 ± 0.41	0.51 ± 0.00	-19.47 ± 1.72
5. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 30	100.21 ± 1.90	0.42 ± 0.02	-17.97 ± 1.22
6. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 60	63.32 ± 0.50	0.52 ± 0.01	-19.13 ± 0.81
7. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น	82.59 ± 0.66	0.47 ± 0.00	-27.23 ± 0.81
8. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 1	95.44 ± 6.95	0.60 ± 0.04	-15.30 ± 1.57
9. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 7	227.63 ± 45.87	0.33 ± 0.05	-27.50 ± 0.36
10. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 21	388.40 ± 3.77	0.51 ± 0.10	-40.93 ± 4.40
11. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 30	163.93 ± 46.19	0.31 ± 0.04	-24.50 ± 2.43
12. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 60	323.32 ± 0.50	0.53 ± 0.01	-55.47 ± 4.78

- จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้น เท่ากับ 106.13 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ขนาดอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 106.13 nm เป็น 63.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยลดลงจาก -17.73 mV เป็น -19.13 mV

- จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น เท่ากับ 82.59 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 82.59 nm เป็น 323.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงจาก -27.23 mV เป็น -55.47 mV

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน จากห้องปฏิบัติการ ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ร้อยละ 80.0±3.5 และ 84.0±4.2 ตามลำดับที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20+propylene glycol) (1:3.5:3.5) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (% Mortality)	
	24 hrs.	48 hrs.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5)	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันโหระพา (โหระพา + น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (2:1:3.5:3.5)	80.0±3.5	100.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	84.0±4.2	100.0±0.0

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 75.0±3.5 และ 81.0±2.2 ตามลำดับที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ร้อยละ 91.0±4.2 และ 92.0±2.7 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุง (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพาและสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (%Mortality)	
	24 hrs.	48 hrs.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5)	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันโหระพา (โหระพา + น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (2:1:3.5:3.5)	75.0±3.5	91.0±4.2
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	81.0±2.2	92.0±2.7

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกร ขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่า มีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 ร้อยละ 66.7±2.9, 57.7±2.9, 36.7±2.9 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่า มีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 ร้อยละ 70.0±5.0, 66.7±2.9, 50.0±0.0 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงตลอดระยะเวลาการทดสอบ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีนต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (%Mortality)					
	Day 0	1 st week	2 nd weeks	3 rd weeks	4 th weeks	5 th weeks
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	66.7±2.9	57.7±2.9	36.7±2.9	0.0±0.0
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	70.0±5.0	66.7±2.9	50.0±0.0	0.0±0.0

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีนต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่ามีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 61.7±2.9, 46.7±2.9, 33.3±2.9 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่ามีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 65.0±0.0, 60.0±0.0, 41.7±2.9 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงตลอดระยะเวลาการทดสอบ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกิ่งภาคสนาม (โถงมุ้งขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (%Mortality)					
	Day 0	1 st week	2 nd weeks	3 rd weeks	4 th weeks	5 th weeks
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	61.7±2.9	46.7±2.9	33.3±2.9	0.0±0.0
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	65.0±0.0	60.0±0.0	41.7±2.9	0.0±0.0

ผลการศึกษาค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกิ่งภาคสนาม (โถงมุ้งขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ (Temp., pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกิ่งภาคสนาม (โถงมุ้งขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่าอุณหภูมิของน้ำก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง กลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมและกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ค่า pH ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนค่าความขุ่นของน้ำ พบว่ากลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมและกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ค่า O.D. ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ก่อนทดสอบ			หลังทดสอบ		
	Temp.	pH	O.D.	Temp.	pH	O.D.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	31.7±0.6	7.83±0.01	0.0446±0.0035	31.0±0.6	7.81±0.02	0.0504±0.0014
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	33.0±0.0	7.81±0.02	0.0459±0.0020	32.0±0.0	7.52±0.01	0.0557±0.0028
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	32.0±0.0	7.80±0.02	0.0457±0.0016	31.7±0.6	7.26±0.02	0.1152±0.0127
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	31.0±0.6	7.83±0.01	0.0465±0.0011	33.0±0.0	7.34±0.03	0.0757±0.0041

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่า อุณหภูมิของน้ำก่อนหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.5$) ในทุกกลุ่มทดสอบ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง กลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมและกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ค่า pH ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.5$) ส่วนค่าความขุ่นของน้ำ พบว่ากลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม และกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ค่า O.D. ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.5$) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ก่อนทดสอบ			หลังทดสอบ		
	Temp.	pH	O.D.	Temp.	pH	O.D.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	32.5±0.5	7.81±0.01	0.0443±0.0035	32.0±0.9	7.80±0.02	0.0469±0.0042
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	32.3±0.3	7.83±0.01	0.0452±0.0032	32.0±0.0	7.60±0.02	0.0548±0.0032
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	32.0±0.9	7.81±0.02	0.0462±0.0039	33.0±0.0	7.24±0.03	0.1146±0.0124
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	31.7±0.8	7.80±0.02	0.0457±0.0034	31.0±0.6	7.32±0.03	0.0756±0.0031

วิจารณ์

น้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain และลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain คือ น้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส

จากการศึกษาฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ สมเกียรติ บุญญะบัญชา ที่ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดต่อยุงลาย ได้แก่ กะเพราขาว กะเพราแดง กะเพราผี แมงลัก โหระพา และตะไคร้หอม โดยทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 และ 4 พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุดเช่นเดียวกัน⁽⁸⁾ นอกจากนี้ค่า LC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อลูกน้ำยุงลาย ($LC_{50} = 62.8$ ppm) พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ⁽⁹⁾ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ได้นำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงมาพัฒนาต่อยอดจากงานวิจัยของ สมเกียรติ บุญญะบัญชา และงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ ปี 2012 ให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงมากยิ่งขึ้น โดยใช้ความเข้มข้นที่ 250 ppm ในรูปแบบของไมโครอิมัลชันสมุนไพรเดี่ยวและสมุนไพรรวม พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง อัตราการตายของลูกน้ำยุงเท่ากับร้อยละ 80 และ 84 ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการตายของลูกน้ำยุงเท่ากับร้อยละ 100 และ 100 ตามลำดับ

นอกจากนี้งานวิจัยของ สมเกียรติ บุญอยู่บัญชา และงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ ทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรในรูปแบบของสารสกัดเท่านั้น ไม่ได้ทำเป็นรูปแบบไมโครอิมัลชันในการทดสอบฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุง และระยะเวลาในการทดสอบ Larvicidal activity ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่านั้น แต่จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษา longevity ของไมโครอิมัลชันที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 5 ทำให้ไมโครอิมัลชันเป็นรูปแบบที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดลูกน้ำยุงได้จริง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาน้ำมันหอมระเหยให้อยู่ในรูปแบบของไมโครอิมัลชัน โดยใช้ความเข้มข้น 250 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นของงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ ที่ใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1,000 ppm ดังนั้นแสดงว่าการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของไมโครอิมัลชันจะช่วยให้ประหยัดปริมาณการใช้ น้ำมันหอมระเหยลง และช่วยให้ประหยัดต้นทุนในการผลิตได้

นอกจากนั้น ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูและยูคาลิปตัสมีประสิทธิผลรองลงมาจากน้ำมันหอมระเหยโหระพาในการกำจัดลูกน้ำ Lab strain และลูกน้ำยุงที่ต้านทานต่อสารเคมี Resistant strain

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโหระพา พบ methyl chavicol เป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 84.45 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลู พบ eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 91.61 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส พบ eucalyptol เป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 82.15

จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้น เท่ากับ 106.13 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าขนาดอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 106.13 nm เป็น 63.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยลดลงจาก -17.73 mV เป็น -19.13 mV

จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น เท่ากับ 82.59 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 82.59 nm เป็น 323.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงจาก -27.23 mV เป็น -55.47 mV

การเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน เพราะอัตราการตายของลูกน้ำยุงขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่ออกฤทธิ์เสริมฤทธิ์กัน ดังนั้นควรพัฒนาสมุนไพรรวมในรูปแบบไมโครอิมัลชันมากกว่าสมุนไพรเดี่ยว เนื่องจากไมโครอิมัลชันในรูปแบบของสมุนไพรรวมมีสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดลูกน้ำยุงที่เสริมฤทธิ์กัน เช่น methyl chavicol, eugenol และ eucalyptol เป็นต้น ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมกับสูตรลิโมนีนสังเคราะห์ พบว่าสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain และ Resistant strain ในระดับกึ่งกลางภาคสนามได้ใกล้เคียงกับสูตรลิโมนีนสังเคราะห์

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิผลของไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมในการกำจัดลูกน้ำยุงลดลงทุกสัปดาห์ อาจจะเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมีการระเหยไป เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมแบบกึ่งภาคสนาม อย่างไรก็ตามไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรเหมาะสมกับการนำไปใช้ในแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีพืชน้ำ เช่น อ่างบัว บ่อเลี้ยงปลาкарพ์ รวมทั้งภาชนะที่ใช้ใส่น้ำให้สัตว์เลี้ยงดื่ม เพราะน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรมีความปลอดภัยสูงและมีความเป็นพิษต่อพืชและสัตว์ต่ำ

ข้อเสนอแนะ ควรมีการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิผลต่อการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านเพิ่มเติม และควรหาวิธีเพิ่มประสิทธิผลให้สามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้ร้อยละ 100 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการสังเคราะห์สารสำคัญ (active component) ที่ออกฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงเลียนแบบสารธรรมชาติ ดังนั้น

จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปในการพัฒนาวิธีการและรูปแบบในการใช้ประโยชน์ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เพื่อทดแทนและลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย เช่น อาจจะพัฒนาในรูปแบบ MMF (Monomolecular Film) เป็นแผ่นฟิล์มโมเลกุลเดี่ยว ออกฤทธิ์ทางกายภาพ ทำให้เกิดฟิล์มบางๆ ขึ้นมาระหว่างผิวน้ำกับอากาศ ทำให้ลูกน้ำตัวมือง ยุง ไม่สามารถใช้ออกซิเจนได้ ทำให้ตายลง⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ควรทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากในหนูขาว และการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุง เพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุป

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า อัตราตายอยู่ในช่วงร้อยละ 80-100

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าอัตราตายอยู่ในช่วงร้อยละ 75-92

ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมมีประสิทธิภาพดีกว่าไมโครอิมัลชันสมุนไพรเดี่ยว เนื่องจากไมโครอิมัลชันในรูปแบบของสมุนไพรรวมมีสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดลูกน้ำยุงที่เสริมฤทธิ์กันมากกว่าไมโครอิมัลชันในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยว

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม พบว่า ประสิทธิภาพลดลงทุกสัปดาห์ ภายในระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 5 สัปดาห์ อัตราตายร้อยละ 100, 66.7, 57.7, 36.7 และ 0 ตามลำดับ

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม พบว่าประสิทธิภาพลดลงทุกสัปดาห์ ภายในระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 5 สัปดาห์ อัตราตายร้อยละ 100, 61.7, 46.7, 33.3 และ 0 ตามลำดับ

การวัดค่าความเป็นกรดต่างและค่าความขุ่นของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมในน้ำที่ใช้ในการทดสอบ พบว่าค่า pH ลดลงหลังการทดสอบ แต่ค่ายังอยู่ในช่วงสภาวะความเป็นกลาง ส่วนค่าความขุ่น พบว่า O.D. มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการทดสอบ แต่น้ำที่มองเห็นยังคงใสเป็นปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพดี สามารถนำไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติได้โดยไม่ทำให้สภาพน้ำเปลี่ยนไป

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร. จิตติ จันทรแสง หัวหน้าฝ่ายพิพิธภัณฑสถานและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยา นางสาวเบญญาภา รูปพุดชา และนายภูติษ พันไทย เจ้าหน้าที่ฝ่ายฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณ นางสาวประภาณีษ วันโสภา พนักงานห้องปฏิบัติการ ฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ลูกน้ำยุงลายที่ดักจุ่มต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บจากพื้นที่ศึกษา (จังหวัดจันทบุรี)

เอกสารอ้างอิง

1. Hadinegoro SR, Arredondo-Garcia JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med* 2015; 373(13): 1195-206.
2. Nour AH, Nour A, Yusoff M, Sandanasamy J. Bioactive compounds from Basil (*Ocimum basilicum*) essential oils with larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. 3rd International Conference on Biology, Environment and Chemistry (IPCBEE) 2012; 46: 21-4.
3. Hamdan DI, Mohamed ME, Abdulla RH, Mohamed SM, El-Shazly AM. Anti-inflammatory, insecticidal and antimicrobial activities and chemical composition of the essential oils of different plant organs from navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Malesy) grown in Egypt. *J Med Plants Res* 2013; 7(18): 1204-15.
4. Gutierrez PM, Antepuesto AN, Eugenio BAL, Santos MFL. Larvicidal activity of selected plant extracts against the dengue vector *Aedes aegypti* mosquito. *Int Res J Biological Sci* 2014; 3(4): 23-32.
5. Duarte JL, Amado JRR, Oliveira AEMFM, Cruz RAS, Ferreira AM, Souto RNP, et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Rev Bras Farmacogn* 2015; 25: 189-92.
6. Soradech S, Kusolkumbot P, Thubthimthed S. Development and characterization of microemulsions containing *Tiliacora triandra* Diels as an active ingredient for antioxidant and melanogenesis stimulating activities. *J App Pharm Sci* 2018; 8(3): 46-54.
7. Fansiri T, Thavara U, Tawatsin A, Krasaesub S, Sithiprasasna R. Laboratory and semi-field evaluation of Mosquito Dunks[®] against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37(1): 62-6.
8. สมเกียรติ บุญญะบัญชา. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดต่อยุงลาย (*Aedes aegypti* L.). [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร, คณะเกษตรศาสตร์. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2536.
9. Manimaran A, Cruz MMJJ, Muthu C, Vincent S, Ignacimuthu S. Larvicidal and knockdown effects of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles stephensi* (Liston). *Adv Biosci Biotechnol* 2012; 3: 855-62.
10. Sukkanon C, Yaicharoen R, Ngrenngarmert W. Comparative effectiveness of monomolecular surface film on *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles minimus* (Theobald) (Diptera: Culicidae). *Agric Nat Resour* 2016; 50: 465-9.

Development of Essential Oils-based Microemulsion Larvicide Product for Control of Insecticide-resistant Strain of *Aedes aegypti* Mosquito Larvae

Phanukit Kunhachan¹ Srisuda Samaimai² Jakkrawarn Chompoonsri¹

Sareeya Reungpatthanaphong³ Payu Bhakdeenuan¹ Chayada Khumsawad¹

Navy Srivarom¹ and Kriangsak Ruchusatsawat

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Suan Dusit University, Dusit, Bangkok, 10300

³Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

ABSTRACT Chemical insecticides have been used on a large scale to control vectors of dengue fever until now, resulting in chemical toxic to environment and causing chemical resistance in mosquitoes. Natural product should be developed as alternative larvicides to reduce the adverse effects of chemical use. The aim of this study is to determine the larvicidal efficacy of 10 herbal essential oils (Sweet basil, Clove, Eucalyptus, Chinese cassia, Lemon grass, Citronella, Kiffir lime, Orange, Tangerine and Lesser galangal) against laboratory strain (LS) and chemical resistant strain (RS) of *Aedes aegypti* larvae. The results showed that Sweet basil, Clove and Eucalyptus were the most effective herbal essential oils against the LS larvae with the LC_{50} of 62.8, 66.0 and 77.4 ppm, respectively. While, these three essential oils showed efficacy against the RS larvae with the LC_{50} of 72.3, 83.1 and 109.6 ppm, respectively. The microemulsion formulation of the mixture of three oils (Sweet basil, Clove and Eucalyptus) was formulated as a product and tested against LS and RS larvae under semi-field conditions for 5 weeks. During the test period against LS larvae, the product provided mortality rate of 100, 66.7, 57.7, 36.7 and 0.0 percent, respectively. In the same period, it showed mortality rate against RS larvae of 100, 61.7, 46.1, 33.3 and 0.0 percent, respectively. In conclusion, the herbal microemulsion product derived from mixture of the three essential oils demonstrated good efficacy against *Ae. aegypti* larvae and it could be used to control the mosquito larvae in natural breeding sites.

Keywords: Larvicidal activity, microemulsion, essential oils, insecticide-resistant mosquito larvae

สำรวจการปนเปื้อนพยาธิในผักสดและผลไม้สด จากตลาดสด 5 ภูมิภาคของประเทศไทย

ขันทอง เพ็ชรนอก และกนกวรรณ ตุ่นสกุล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้สำรวจการปนเปื้อนพยาธิในผักสดและผลไม้สดจำนวน 224 ตัวอย่าง จากตลาดสดรวม 10 แห่ง ใน 5 ภูมิภาค ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนพฤษภาคม 2561 โดยวิธีตกตะกอนด้วยสารละลายไลโปนเอฟความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ พบปนเปื้อนไข่พยาธิไส้เดือน ไข่พยาธิตัวกลม ตัวอ่อนพยาธิตัวกลม และตัวแก่พยาธิตัวกลม ในผักสดกินใบ 11 ชนิด จำนวน 97 ตัวอย่าง จาก 110 ตัวอย่าง (ร้อยละ 88.18) พบ *Capillaria* spp. egg เฉพาะในผักชีฝรั่ง ที่เก็บจากตลาดภาคเหนือ ขณะที่ผักสดกินผล 29 ตัวอย่าง พบไข่พยาธิไส้เดือนและตัวอ่อนพยาธิตัวกลมร้อยละ 58.00 จากการตรวจทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ส่วนผลไม้สด 22 จาก 64 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34.38) พบเฉพาะตัวอ่อนพยาธิตัวกลม การสำรวจนี้ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบจากตลาดสด 5 ภูมิภาค (p -value = 0.69) ขณะที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบ ผักสดกินผล และผลไม้สด (p -value = <0.00001) การสำรวจครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผักสดส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนไข่พยาธิไส้เดือน ไข่พยาธิตัวกลม และตัวอ่อนพยาธิตัวกลม การล้างผักและผลไม้ให้สะอาดก่อนรับประทานจึงจำเป็นอย่างยิ่งต่อสุขภาวะที่ดีของผู้บริโภค

คำสำคัญ: พยาธิ, ผักสด, ผลไม้สด

Corresponding author E-mail: kuntong.p@dmsc.mail.go.th

Received: 4 October 2019

Revised: 29 May 2020

Accepted: 31 July 2020

บทนำ

ผักสดและผลไม้สด เป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เป็นแหล่งวิตามินและแร่ธาตุที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และมีคุณสมบัติของการเป็นแหล่งใยอาหาร ซึ่งเป็นสารที่ช่วยลดการดูดซึมของคอเลสเตอรอลและไขมัน และยังช่วยทำให้ระบบการย่อย ระบบการขับถ่ายทำงานได้อย่างปกติ นอกจากนี้ผักและผลไม้บางชนิดยังมีสารพิเศษที่ช่วยทำหน้าที่คล้ายยาป้องกันและรักษาโรคบางชนิด เช่น มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง เป็นต้น⁽¹⁾ อย่างไรก็ตามการรับประทานผักสดและผลไม้สดอาจก่อให้เกิดโทษจากพยาธิที่ปนเปื้อนได้^(2,3) โดยผักสดอาจมีการปนเปื้อนพยาธิระยะติดต่อที่มีอยู่ในดิน⁽⁴⁾ หรือจากน้ำรดผักที่มาจากแหล่งน้ำซึ่งปนเปื้อนพยาธิ ปุ๋ยที่มาจากอุจจาระของคนหรือมูลสัตว์ รวมถึงปนเปื้อนระหว่างขั้นตอนเก็บเกี่ยว ขนส่งหรือวางจำหน่าย ซึ่งประเทศไทยมีภูมิอากาศร้อนชื้น จึงมีสภาพแวดล้อมที่อำนวยต่อการเจริญของพยาธิที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศ ซึ่งอาจพบมากหรือน้อยแตกต่างกันตามภูมิภาค เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือพบพยาธิใบไม้ตับเป็นส่วนใหญ่ ภาคใต้พบพยาธิปากขอ (hookworm) พยาธิแส้ม้า (*Trichuris trichiura*) และพยาธิไส้เดือน (*Ascaris lumbricoides*)⁽⁵⁾ เมื่อรับประทานผักสดหรือผลไม้สดที่ปนเปื้อนพยาธิอาจทำให้เกิดการเจ็บป่วยจากการที่พยาธิเข้าไปเจริญในร่างกาย โดยเฉพาะในลำไส้ เกิดอาการท้องผูก หรือท้องเสีย เกิดการสะสมของพิษในร่างกาย เกิดอาการโรคโลหิตจาง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและข้อ รวมทั้งมีโอกาสที่ทำให้พยาธิแพร่กระจายไปในวงกว้างได้ ดังนั้นจึงทำการสำรวจการปนเปื้อนของพยาธิในผักสดและผลไม้สดที่จำหน่ายจากตลาดสด 5 ภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อนำไปเป็นแนวทางการควบคุม หรือป้องกันโรคพยาธิที่อาจปนเปื้อนจากผักสดและผลไม้สดสู่คนได้

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 7 แห่ง ได้แก่ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง เก็บตัวอย่างผักสดและผลไม้สดจำนวน 24 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผักสดกินใบ 11 ชนิด ได้แก่ กะเพรา ใบแมงลัก ผักชี ผักชีฝรั่ง สะระแหน่ ใบบัวบก โหระพา คื่นช่าย ผักแพรว ผักปลัง และตะไคร้ ผักสดกินผล 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วฝักยาว มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มะเขือยาว และพริกชี้ฟ้า ผลไม้สด 8 ชนิด ได้แก่ ส้ม มะม่วง ฝรั่ง เงาะ ลำไย แอปเปิ้ล แก้วมังกร และชมพู จากตลาดสด 5 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนพฤษภาคม 2561 ภาคละ 2 จังหวัด คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดนครราชสีมา ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดเชียงใหม่ ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดชลบุรีและจังหวัดระยอง ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสงขลาและจังหวัดตรัง และภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี และกรุงเทพมหานคร

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณพยาธิ

ตรวจพยาธิโดยใช้วิธีตกตะกอน (sedimentation technique) ตามวิธีของ ภารดี และคณะ⁽⁶⁾ โดยสุ่มตัวอย่างผัก 200 กรัม ไม่ล้างน้ำ ตัดรากทิ้ง แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ใส่ลงใน beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายไลโปนเอฟ (บริษัท ไลอ้อน (ประเทศไทย) จำกัด, ประเทศไทย) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (บริษัท เทอร์โม ฟิชเชอร์ ไซแอนทิฟิค (ประเทศไทย) จำกัด, ประเทศไทย) ให้ท่วมผัก สำหรับผลไม้สด

นำตัวอย่างผลไม้ใส่ลงในถุงพลาสติก เติมน้ำละลายไลโปนเอฟความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไปแช่ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 240 ครั้งต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปกรอง โดยใช้ sedimentation cylinder นำน้ำส่วนที่ผ่านการกรองแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทน้ำเหนือตะกอนทิ้งให้เหลือประมาณ 5 – 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วถ่ายของเหลวลงหลอดสำหรับปั่น และนำไปปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ให้น้ำในหลอดมีปริมาตรเหลือ 1.0 มิลลิลิตร เขย่าตะกอนให้เข้ากัน ตรวจหาชนิดของพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x และ 40x โดยตรวจประมาณ 3-4 สไลด์ต่อชนิดตัวอย่าง พร้อมนับจำนวนพยาธิ

การทดสอบทางสถิติ

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติของการปนเปื้อนพยาธิในผักสดจากตลาดสด 5 ภูมิภาค และหาความสัมพันธ์การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบ ผักสดกินผล และผลไม้สด โดยคำนวณค่าไคสแควร์ (Chi-square test) สำหรับข้อมูลตารางขนาด 2×2 โดยมีระดับนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p\text{-value} \leq 0.05$

ผล

ผักสดกินใบ

จากการตรวจผักสดกินใบ 11 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 110 ตัวอย่าง พบปนเปื้อนพยาธิจำนวน 97 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 88.18 ของผักสดกินใบทั้งหมด ซึ่งใน 1 ตัวอย่างพบพยาธิมากกว่าหนึ่งชนิด พยาธิที่ตรวจพบได้แก่ ไช้พยาธิไส้เดือน (*Ascaris* spp. egg) 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.82, ตัวอ่อนพยาธิตัวกลม (nematode larva) 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.73, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 43 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 39.09, *Ascaris* spp. egg, ไช้พยาธิตัวกลม (nematode egg) และ nematode larva 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.18, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และตัวแก่พยาธิตัวกลม (nematode adult) 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.36 (ตารางที่ 1) ซึ่งผักแต่ละชนิดพบมีปนเปื้อนของพยาธิ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ดังนี้

กะเพรา: พบพยาธิปนเปื้อนในทุกตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 7 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 2 ตัวอย่าง

ใบแมงลัก: พบพยาธิปนเปื้อนในทุกตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 2 ตัวอย่าง, nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 6 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 1 ตัวอย่าง

ผักชี: พบพยาธิปนเปื้อนในทุกตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 3 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 5 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 1 ตัวอย่าง

ผักชีฝรั่ง: พบพยาธิปนเปื้อนในทุกตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 5 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 2 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva, nematode adult และ *Capillaria* spp. egg 1 ตัวอย่าง

สระแหน่: พบพยาธิปนเปื้อนในทุกตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 3 ตัวอย่าง, nematode egg และ nematode larva 3 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 2 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 2 ตัวอย่าง

ใบบัวบก: พบพยาธิปนเปื้อนในทุกตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg, nematode larva 4 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 5 ตัวอย่าง

โหระพา: พบพยาธิปนเปื้อน 9 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 3 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 6 ตัวอย่าง

คะน้า: พบพยาธิปนเปื้อน 8 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 2 ตัวอย่าง, nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 4 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 1 ตัวอย่าง

ผักแพรว: พบพยาธิปนเปื้อน 8 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 5 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 2 ตัวอย่าง

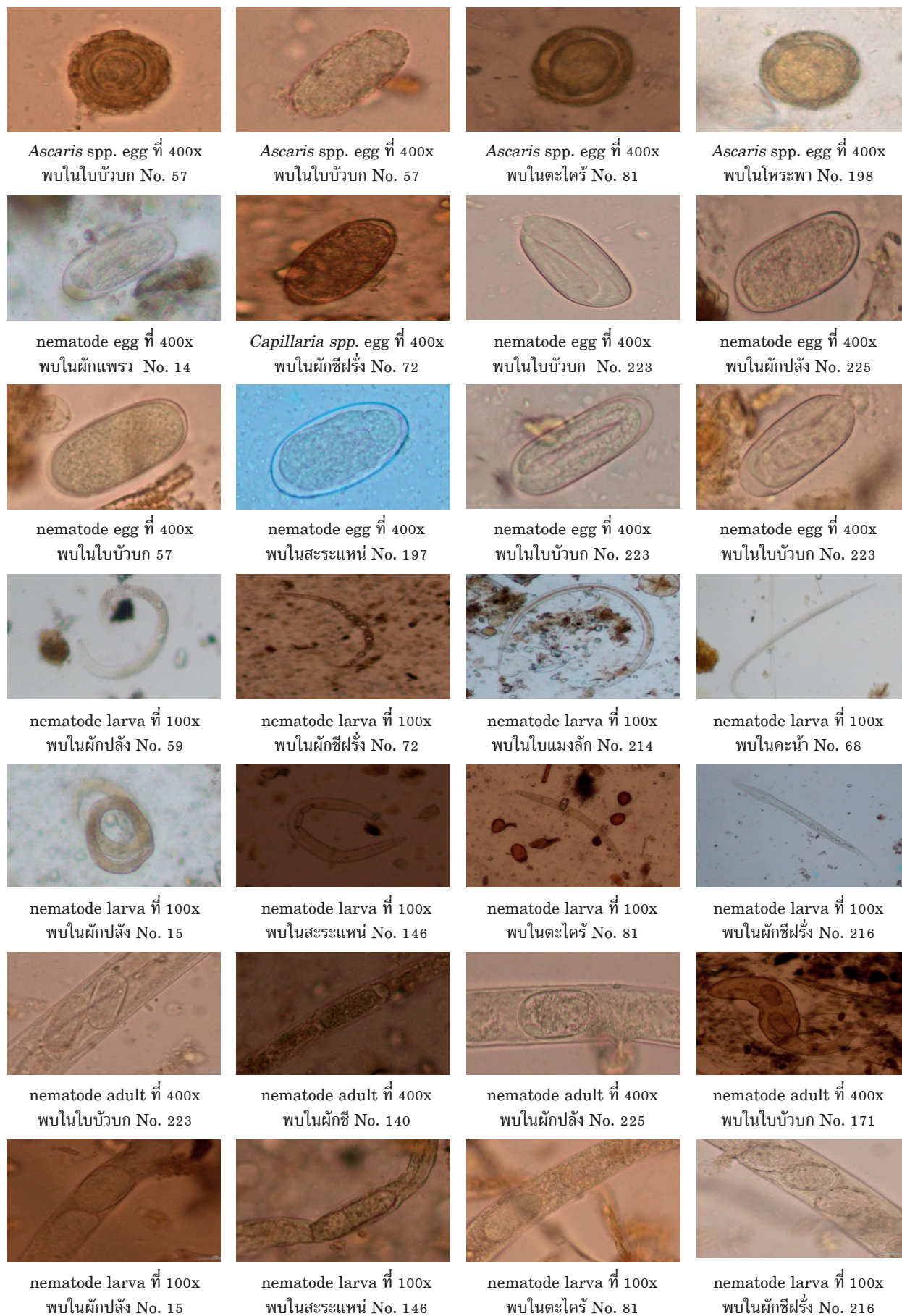
ผักปลัง: พบพยาธิปนเปื้อน 6 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 2 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 2 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 1 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva และ nematode adult 1 ตัวอย่าง

ตะไคร้: พบพยาธิปนเปื้อน 6 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 2 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg และ nematode larva 3 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode egg และ nematode larva 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบ 11 ชนิด

ผักสด กินใบ	พบพยาธิ (%)	<i>Ascaris</i> spp. egg (%)	nematode larva (%)	<i>Ascaris</i> spp. egg & nematode larva (%)	<i>Ascaris</i> spp. egg & nematode egg & nematode larva (%)	<i>Ascaris</i> spp. egg & nematode egg & nematode larva & nematode adult (%)
1. กะเพรา	10 (100.00)	7 (70.00)	-	-	1 (10.00)	2 (20.00)
2. ใบแมงลัก	10 (100.00)	2 (20.00)	1 (10.00)	6 (60.00)	-	1 (10.00)
3. ผักชี	10 (100.00)	-	3 (30.00)	5 (50.00)	1 (10.00)	1 (10.00)
4. ผักชีฝรั่ง	10 (100.00)	-	1 (10.00)	5 (50.00)	1 (10.00)	3 (30.00)*
5. สระแหน่	10 (100.00)	-	3 (30.00)	3 (30.00)	2 (20.00)	2 (20.00)
6. ใบบัวบก	10 (100.00)	-	-	4 (40.00)	1 (10.00)	5 (50.00)
7. โหระพา	9 (90.00)	-	3 (33.33)	6 (66.67)	-	-
8. คะน้า	8 (80.00)	2 (25.00)	1 (12.50)	4 (50.00)	-	1 (12.50)
9. ผักแพรว	8 (80.00)	-	5 (62.50)	-	1 (12.50)	2 (25.00)
10. ผักปลัง	6 (60.00)	2 (33.33)	-	2 (33.33)	1 (16.67)	1 (16.67)
11. ตะไคร้	6 (60.00)	-	2 (33.33)	3 (50.00)	1 (16.67)	-
รวม	97 (88.18)	13 (11.82)	14 (12.73)	43 (39.09)	9 (8.18)	18 (16.36)

*ตรวจพบ *Capillaria* spp. egg ใน 1 ตัวอย่าง



ภาพที่ 1 ตัวอย่างชนิดของพยาธิที่ตรวจพบในผักสดกินใบ

เมื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบจากตลาดสด 5 ภูมิภาค ภาคละ 22 ตัวอย่าง พบปนเปื้อน *Ascaris* spp. egg, nematode egg, *Capillaria* spp. egg, nematode larva และ nematode adult เมื่อเปรียบเทียบการปนเปื้อนของแต่ละภูมิภาคด้วยวิธีไคสแควร์ (Chi-square test) ไม่พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.69) ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลการตรวจพยาธิมีรายละเอียด ดังนี้

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่นและนครราชสีมา): พบพยาธิปนเปื้อน 21 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 19 ตัวอย่าง, nematode egg 7 ตัวอย่าง, nematode larva 17 ตัวอย่าง, nematode adult 3 ตัวอย่าง

ภาคเหนือ (พิษณุโลกและเชียงใหม่): พบพยาธิปนเปื้อน 19 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 15 ตัวอย่าง, nematode egg 3 ตัวอย่าง, *Capillaria* spp. egg 1 ตัวอย่าง, nematode larva 16 ตัวอย่าง, nematode adult 2 ตัวอย่าง

ภาคตะวันออก (ชลบุรีและระยอง): พบพยาธิปนเปื้อน 20 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 17 ตัวอย่าง, nematode egg 2 ตัวอย่าง, nematode larva 17 ตัวอย่าง, nematode adult 1 ตัวอย่าง

ภาคใต้ (สงขลาและตรัง): พบพยาธิปนเปื้อน 18 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 16 ตัวอย่าง, nematode egg 5 ตัวอย่าง, nematode larva 16 ตัวอย่าง, nematode adult 6 ตัวอย่าง

ภาคกลาง (ปทุมธานีและกรุงเทพมหานคร): พบพยาธิปนเปื้อน 19 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 16 ตัวอย่าง, nematode egg 7 ตัวอย่าง, nematode larva 18 ตัวอย่าง, nematode adult 6 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบจากตลาด 5 ภูมิภาค

แหล่งซื้อตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)		χ^2
	พบ	ไม่พบ	
1. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	21 (95.45)	1 (4.55)	2.27 (p -value = 0.69)
2. ภาคเหนือ	19 (86.36)	3 (13.64)	
3. ภาคตะวันออก	20 (90.91)	2 (9.09)	
4. ภาคใต้	18 (81.82)	4 (18.18)	
5. ภาคกลาง	19 (86.36)	3 (13.64)	
รวม	97 (88.18)	13 (11.82)	

ผักสดกินผล

จากการตรวจผักสดกินผล 5 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ที่เก็บจากตลาดสดแต่ละภูมิภาค พบปนเปื้อนพยาธิ 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 58.00 ได้แก่ ถั่วฝักยาว มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มะเขือยาว และพริกชี้ฟ้า จำนวน 5, 7, 5, 3 และ 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50, 70, 50, 30 และ 90 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ถั่วฝักยาว: พบพยาธิปนเปื้อน 5 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 4 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode larva 1 ตัวอย่าง

มะเขือเทศ: พบพยาธิปนเปื้อน 7 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 6 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode larva 1 ตัวอย่าง

มะเขือเปราะ: พบพยาธิปนเปื้อน 5 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 1 ตัวอย่าง, nematode larva 3 ตัวอย่าง, *Ascaris* spp. egg, nematode larva 1 ตัวอย่าง

มะเขือยาว: พบพยาธิปนเปื้อน 3 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 3 ตัวอย่าง

พริกชี้หนู: พบพยาธิปนเปื้อน 9 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 1 ตัวอย่าง, nematode larva 8 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3 การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินผล 5 ชนิด จากตลาดสด 5 ภูมิภาค

ผักสด กินผล	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจพบพยาธิ (%)	<i>Ascaris</i> spp. egg	nematode larva	<i>Ascaris</i> spp. egg & nematode larva
1. ถั่วฝักยาว (10)	5 (50.00)	-	4 (80.00)	1 (20.00)
2. มะเขือเทศ (10)	7 (70.00)	-	6 (85.71)	1 (14.29)
3. มะเขือเปราะ (10)	5 (50.00)	1 (20.00)	3 (60.00)	1 (20.00)
4. มะเขือยาว (10)	3 (30.00)	-	3 (100.00)	-
5. พริกชี้หนู (10)	9 (90.00)	1 (11.11)	8 (88.89)	-

การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินผลจากตลาดสดแต่ละภูมิภาค พบปนเปื้อน *Ascaris* spp. egg, nematode larva ซึ่งมีรายละเอียดตามภูมิภาค ดังนี้

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่นและนครราชสีมา): พบพยาธิปนเปื้อน 5 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 และ nematode larva 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 80

ภาคเหนือ (พิษณุโลกและเชียงใหม่): พบพยาธิปนเปื้อน 6 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100

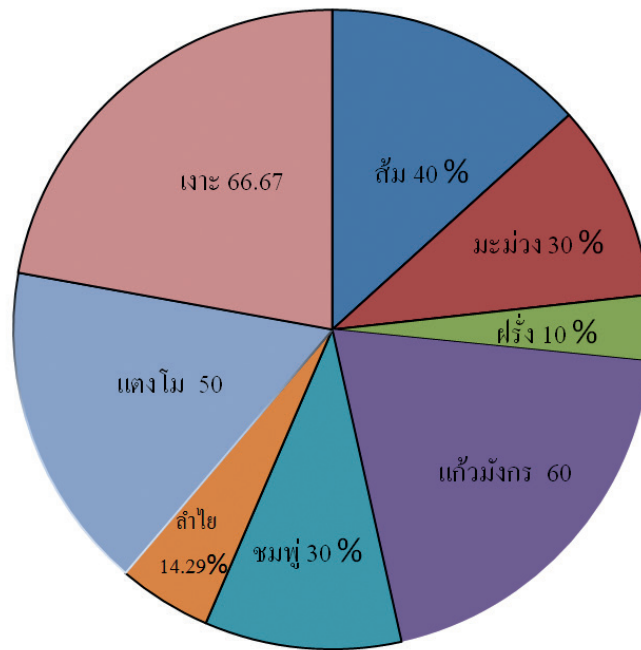
ภาคตะวันออก (ชลบุรีและระยอง): พบพยาธิปนเปื้อน 8 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.5 และ nematode larva 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 87.5

ภาคใต้ (สงขลาและตรัง): พบพยาธิปนเปื้อน 5 ตัวอย่าง โดยพบ nematode larva 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100

ภาคกลาง (ปทุมธานีและกรุงเทพมหานคร): พบพยาธิปนเปื้อน 5 ตัวอย่าง โดยพบ *Ascaris* spp. egg 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 และ nematode larva 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100

ผลไม้สด

จากการตรวจผลไม้สดจำนวน 8 ชนิด 64 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน nematode larva 22 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 34.38 ได้แก่ ส้ม มะม่วง ฝรั่ง แก้วมังกร ชมพู่ ลำไย แดงโม และเงาะ จำนวน 10, 10, 10, 10, 10, 7, 4 และ 3 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนพยาธิจำนวน 4, 3, 1, 6, 3, 1, 2 และ 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.00, 30.00, 10.00, 60.00, 30.00, 14.29, 50.00 และ 66.67 ตามลำดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การปนเปื้อน nematode larva ในผลไม้สด 8 ชนิด

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติของการปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบ ผักสดกินผล และผลไม้สด โดยคำนวณค่าไคสแควร์ (Chi-square test) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.00001$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบ ผักสดกินผล และผลไม้สด

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)		χ^2
	พบ	ไม่พบ	
1. ผักสดกินใบ	97 (88.18)	13 (11.82)	54.12
2. ผักสดกินผล	29 (58.00)	21 (42.00)	
3. ผลไม้สด	22 (34.38)	42 (65.62)	
รวม	148 (66.07)	76 (33.93)	($p\text{-value} < 0.00001$)

วิจารณ์

การสำรวจผักสดกินใบ 11 ชนิด ทั้ง 5 ภูมิภาคของการศึกษานี้ พบ *Ascaris* spp. egg. ซึ่งไข่พยาธิชนิดนี้พบได้มากในดินทั้งในประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่น มักปนเปื้อนมากับอาหาร ทำให้เกิดโรคในคน เมื่อคนกลืนไข่พยาธิลงไปในระบบทางเดินอาหาร น้ำย่อยจากกระเพาะอาหารจะย่อยเปลือกไข่ ทำให้ตัวอ่อนฟักออกจากไข่บริเวณลำไส้เล็กตอนต้น พยาธิจะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด เดินทางเข้าสู่ตับเพื่อไปยังหัวใจซีกขวาและปอดในที่สุด^(7, 8) นอกจากนี้ผักทุกชนิด ยกเว้นโหระพา พบ nematode egg โดยพบว่าตัวอย่างใบบัวบกตรวจพบ nematode egg ทั้ง 5 ภูมิภาค ซึ่งอาจเกิดจากใบบัวบกมีลำต้น ก้านและใบอยู่ติดดิน ทำให้เมื่อใส่ปุ๋ยหรือรดน้ำที่มีการปนเปื้อนพยาธิ

อาจตกค้างบนใบได้มากกว่าผักชนิดอื่น ส่วนผักชีฝรั่งตรวจพบ *Capillaria* spp. egg ซึ่งเป็นไข่พยาธิที่ไม่ก่อโรคโดยตรง แต่อาจขับถ่ายไข่และตัวอ่อนซึ่งจะทำให้พยาธิเหล่านี้ไปแพร่กระจายที่อื่นต่อไป⁽⁶⁾ มีรายงานว่าไข่ของพยาธิตัวแก่ที่อาศัยในลำไส้เล็กจะออกมาพร้อมกับอุจจาระ หากลงสู่พื้นจะเจริญเป็นตัวอ่อนอยู่ภายในเปลือกไข่ เมื่อปลาน้ำจืดกินเข้าไปก็ฟักออกเป็นตัวอ่อนอยู่ในลำไส้ปลา ประมาณ 10 - 20 วัน ตัวอ่อนก็จะเจริญเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อ เมื่อคนกินปลาน้ำจืดสุกๆ ดิบๆ เช่น ก้อยปลา พยาธิก็จะเจริญเป็นตัวแก่อยู่ในลำไส้เล็กต่อไป^(9,10) การก่อโรคอาจเกิดจากกินปลาดิบที่มีตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อเข้าไป แล้วฟักตัว ทำให้เกิดท้องร่วงรุนแรงและเรื้อรัง น้ำหนักตัวลดลง อ่อนเพลีย ในที่สุดผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้^(11,12) การตรวจพบไข่พยาธิในผักอาจเกิดจากใช้น้ำที่มีการปนเปื้อนจากอุจจาระของมนุษย์รดผัก

ผักสดกินใบทุกชนิดพบ nematode larva เนื่องจากผักที่ตรวจมีส่วนที่บริเวณที่อยู่ติดดิน การปนเปื้อนพยาธิจึงเป็นสิ่งที่ติดมากับดินที่ใช้ปลูกผัก ซึ่งทางปฏิบัติจากสวนผักเมื่อเก็บและตัดแต่งเพื่อส่งขายจนถึงมือผู้บริโภคจะไม่มีการล้างผักก่อน จึงทำให้ตรวจพบ nematode larva ซึ่งไม่ทำให้เกิดโรคในคน ไม่มีความสำคัญทางการแพทย์⁽⁶⁾ แต่มีรายงานว่าในลำไส้ของพยาธิดังกล่าวอาจมีแบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรคเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์⁽¹³⁾ ผักสดกินใบเกือบทุกชนิด ยกเว้นโหระพาและตะไคร้ ตรวจพบ nematode adult ทั้ง 5 ภูมิภาค ซึ่งในตัวอย่างที่พบ nematode adult พบการปนเปื้อนของพยาธิชนิดอื่นๆ ด้วย เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าการปนเปื้อนพยาธิในผักสดมีความชุกในฤดูร้อน (กลางเดือนกุมภาพันธ์-กลางพฤษภาคม) ซึ่งมีภูมิอากาศร้อนชื้น และมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญและพัฒนาของไข่พยาธิ⁽¹⁴⁾ และบ่งชี้ว่าการปนเปื้อนพยาธิในผักสดที่จำหน่ายอาจมาจากดินที่ทำการเพาะปลูกหรือขั้นตอนการเพาะปลูกที่เกษตรกรอาจนำอุจจาระคนหรืออุจจาระของสัตว์ และใช้น้ำสกปรกที่ปนเปื้อนพยาธิมารดผัก^(6,15,16) เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิต ทำให้พยาธิปนเปื้อนมากับผักสดที่ส่งออกขายตามท้องตลาดได้ ดังนั้นก่อนนำผักสดมารับประทานควรล้างผักให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างผัก และล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง

ส่วนการปนเปื้อนพยาธิของผักสดกินผล อาจมาจากขั้นตอนการใส่ปุ๋ยหรือรดน้ำที่มีการปนเปื้อนพยาธิ รวมทั้งการเก็บเกี่ยว การขนส่ง และการวางจำหน่ายในตลาดสดที่เป็นตลาดเปิด ขณะที่การปนเปื้อนที่พบ nematode larva ในผลไม้สดทุกชนิด โดยเฉพาะพบมากในเงาะร้อยละ 66.67 และแก้วมังกรร้อยละ 60 ผลไม้ทั้งสองชนิดมีเปลือกที่หุ้มด้วยขนและใบ หากน้ำที่ใช้รดสกรปรกก็อาจปนเปื้อนพยาธิได้ หรืออาจปนเปื้อนในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวที่ผลไม้หล่นลงพื้นดิน หรือปนเปื้อนระหว่างการขนส่งจากแหล่งผลิตที่บรรจุรวมกับผักสดชนิดต่างๆ รวมทั้งในระหว่างการจำหน่ายที่ไม่มีการแยกสัดส่วนการวางจำหน่ายที่จำเพาะ

ผลการหาความสัมพันธ์ทางสถิติของการปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบจากตลาด 5 ภูมิภาค พบมีการปนเปื้อนพยาธิไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อาจเพราะผักทุกชนิดปลูกในดินที่นิยมยกทรงกว้างและลึกแบบที่เรียกว่าร่องจีน ซึ่งสะดวกในการให้น้ำโดยให้น้ำจากท้องร่องขึ้นมารดบนสันแปลงผัก และการเก็บเกี่ยวผักใบจะดูจากอายุนับตั้งแต่ปลูก ส่วนผักกินผลนั้นขึ้นอยู่กับชนิด เช่น พริกและมะเขือเทศ สามารถดูได้จากสีของผลหรือดูการเปลี่ยนแปลงของสี ซึ่งจะบอกถึงการสุกแก่ของผัก⁽¹⁷⁾ ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน จึงพบการปนเปื้อนพยาธิไม่แตกต่างกัน ส่วนผักสดกินผลและผลไม้สด มีลักษณะการปลูก การใส่ปุ๋ย การรดน้ำ และโครงสร้างของลำต้นที่จะปนเปื้อนพยาธิได้ต่างกัน จึงไม่มีความสัมพันธ์กันในการตรวจพบพยาธิ ส่วนการหาความสัมพันธ์การปนเปื้อนพยาธิในผักสดกินใบ ผักสดกินผล และผลไม้สด พบมีการปนเปื้อนพยาธิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากผักสดกินใบ มีส่วนของกิ่ง ก้าน ใบอยู่ติดหรือใกล้พื้นดิน ใบผักมีรอยหยัก และจำนวนใบที่ปกคลุมมากกว่า เมื่อใส่ปุ๋ยและรดน้ำที่ปนเปื้อนพยาธิจะตกค้างบนใบได้มากกว่า แต่ผักสดกินผล ส่วนของต้นจะอยู่สูงจากพื้นดิน เมื่อใส่ปุ๋ยหรือรดน้ำที่ปนเปื้อนพยาธิจะตกค้างบนผักกินผลน้อยกว่าผักสดกินใบ ส่วนผลไม้สด พบ nematode larva อาจปนเปื้อนจากการเก็บเกี่ยวที่ผลไม้หล่นลงสู่พื้นดิน ปนเปื้อนจากการขนส่ง หรือการวางจำหน่ายที่ไม่แยกเป็นสัดส่วน เนื่องจากตลาดสดส่วนใหญ่เป็นแบบตลาดเปิด และไม่มีการควบคุมด้านสุขลักษณะที่ดี จึงอาจเกิดการปนเปื้อนพยาธิได้

ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นจากการตรวจโดยใช้วิธีตกตะกอน (sedimentation technique) และใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจแยกชนิดจากการสังเกตรูปร่างลักษณะของพยาธิ ทำให้ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็น nematode larva ชนิดใด ต้องวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น การเพาะเชื้อ การย้อมสี รวมทั้งการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาหรือชีวโมเลกุล เป็นต้น หากสามารถเก็บตัวอย่าง nematode larva ในดินจากพื้นที่เพาะปลูก มาศึกษาเปรียบเทียบกับ nematode larva ที่พบปนเปื้อนในตัวอย่างผักสดได้ ก็อาจช่วยอธิบายสาเหตุการปนเปื้อน ตลอดจนอาจหาวิธีควบคุมและป้องกันได้

สรุป

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผักสดและผลไม้สดจากตลาดสด 5 ภูมิภาคของประเทศไทย มีการปนเปื้อนไข่พยาธิที่ก่อโรคในคน และมีการปนเปื้อนของดินสิ่งสกปรกและมูลสัตว์ ดังนั้นก่อนนำผักสดและผลไม้สดมารับประทาน ควรล้างให้สะอาดโดยแช่น้ำยาล้างผักระยะหนึ่งก่อน แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์การแพทย์และเจ้าหน้าที่ฝ่ายสารกักจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ดักค้ำทุกท่าน ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่มีส่วนในการแบ่งและจัดส่งตัวอย่างให้ตรวจวิเคราะห์ ทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ผักผลไม้ : ประโยชน์ของผักและผลไม้ 14 ข้อ ! – Medthai. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 11 ก.ย. 2562]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://medthai.com/ผักผลไม้/>.
2. Uttah EC, Akwari A, Ukpong GI, Ogban E, Iboh C. Fruits and vegetable consumption attitudes: the major risk factor in hookworm epidemiology in a tourist destination in Nigeria. Trans J Sci Technol 2013; 3: 39-49.
3. Bekele F, Tefera T, Biresaw G, Yohannes T. Parasitic contamination of raw vegetables and fruits collected from selected local markets in Arba Minch town, Southern Ethiopia. Infect Dis Poverty 2017; 6: 19. (7 pages).
4. Ulukanligil M, Seyrek A, Aslan G, Ozbilge H, Atay S. Environmental pollution with soil-transmitted helminthes in Sanliurfa, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(7): 903-9.
5. Muennoo C, Maipanich W, Sanguankiat S, Anantaphruti MT, Soil-transmitted helminthiasis among fishermen, farmers, gardeners and townspeople in southern Thailand. J Trop Med Parasitol 2000; 23: 7-11.
6. ภารดี มามีชัย, ดำรงค์ เชี่ยวศิลป์. การสำรวจหนอนพยาธิติดต่อผ่านดินในผักสดในตลาดเขตเทศบาลเมือง จังหวัดนนทบุรี. สารเทคนิคการแพทย์จุฬา 2534; 5(16): 859-67.

7. ประยงค์ ระดมยศ และคณะ. ปรสิตและหนอนพยาธิทางการแพทย์ ทฤษฎีและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: กองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข; 2537.
8. เอกสารการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของเชื้อปรสิตหนอนพยาธิจากสิ่งส่งตรวจ. วันที่ 13-15 สิงหาคม 2557. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล; 2557.
9. ทศนีย์ สุโกศล. ปรสิตก่อโรค. นครราชสีมา: สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี; 2545.
10. โรคพยาธิลำไส้แคปิลลาเรีย-MutualSelfcare.Org. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 2 มิ.ย. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://mutualselfcare.org/medicine/infectious/capillariasis.aspx>.
11. โพชนงค์ ห่องบุตรศรี. ปรสิตวิทยาทางการแพทย์: โปรโตซัวและพยาธิตัวกลม. ปทุมธานี: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2543.
12. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. โรคพยาธิลำไส้แคปิลลาเรีย. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 11 ก.ย. 2562]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://parasitology.md.chula.ac.th/th/index.php/92-2013-04-05-03-08-43>.
13. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. [online]. 2011; [cited 2015 Jun 4]; [564 screens]. Available from: URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf.
14. นันทพร จงกลณี, ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์. การตรวจหาการปนเปื้อนของปรสิตในผักสดจากอำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2558; 43(1): 5141-50.
15. Uga S, Hoa NT, Noda S, Moji K, Cong L, Aoki Y, et al. Parasite egg contamination of vegetables from a suburban market in Hanoi, Vietnam. Nepal Med Coll J 2009; 11(2): 75-8.
16. Decoded Science. Parasitic protozoa on fruits and vegetables. [online]. 2019; [cited 2014 Jul 7]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.decodedscience.org/parasitic-protozoa-on-fruits-and-vegetables/>.
17. ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ. หลักการปลูกพืชผัก. [ออนไลน์]. 2544; [สืบค้น 2 มิ.ย. 2563]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.ku.ac.th/e-magazine/january44/agri/plant/>.

A Survey on Parasitic Contamination in Fresh Vegetables and Fresh Fruits from 5 Regional Markets of Thailand

Kuntong Pednog and Kanogwan Toonsakool

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Contamination of parasites in fresh vegetables and fresh fruits from 10 markets located in 5 regions of Thailand was examined by sedimentation technique using a mixture of 1% Lipon-F detergent and 0.85% of normal saline solution. A total of 224 samples were collected during February–May 2018. Our survey demonstrated that *Ascaris* spp. egg, nematode egg, nematode larva, nematode adults were found in 97 of 110 samples of leaf vegetables (88.18%). *Capillaria* spp. Egg was found only in parsley. In addition, *Ascaris* spp. egg and nematode larva were contaminated in 29 of 50 fruit vegetables (58.00%). Furthermore, 22 of 64 fresh fruits (34.38%) were only contaminated with nematode larva. There was no significant difference on parasitic contamination in leaf vegetables from 5 regional markets (p -value = 0.69), whereas contamination was significantly different among leaf vegetables, fruit vegetables and fresh fruits (p -value < 0.00001). Our results revealed that the majority of parasites found in fresh vegetables were *Ascaris* spp. egg, nematode egg and nematode larva. Therefore, for a good health, fresh vegetables and fresh fruits should be thoroughly rinsed before consuming.

Keywords: parasite, fresh vegetables, fresh fruits

การปลอมปนสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและ ยาสมุนไพรในจังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ระหว่าง พ.ศ. 2559-2562

สมฤดี บุญมี และพิมลดา ไชยรัตน์

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอดอนสัก ภูเก็ต 83110

บทคัดย่อ สารสเตียรอยด์เป็นยาควบคุมพิเศษตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 การนำสารสเตียรอยด์ไปใช้ในทางที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดผลข้างเคียงร้ายแรง เดกซาเมทาโซน และเพรดนิโซโลนเป็นสเตียรอยด์ปลอมปนที่พบบ่อยในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรในช่วงปี พ.ศ. 2559-2562 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต ได้วิเคราะห์การปลอมปนสารสเตียรอยด์ในตัวอย่างยาแผนโบราณและยาสมุนไพรจำนวน 48 ตัวอย่าง ที่เก็บในเขตพื้นที่จังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.8 โดยพบการปลอมปนเป็นเดกซาเมทาโซน 7 ตัวอย่าง เพรดนิโซโลน 1 ตัวอย่าง ปลอมปนทั้งเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน 2 ตัวอย่าง ข้อมูลที่ได้นำไปแจ้งเตือนภัยในระบบแจ้งเตือนภัย “กรรมวิทย์ with you” ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้ผู้บริโภคตระหนักถึงอันตรายที่อาจได้รับจากการใช้ยาแผนโบราณและยาสมุนไพร

คำสำคัญ: สเตียรอยด์, ปลอมปน, ยาสมุนไพร, ยาแผนโบราณ

Corresponding author E-mail: somruedee.b@dmasc.mail.go.th

Received: 4 October 2019

Revised: 24 August 2020

Accepted: 25 September 2020

บทนำ

ยาแผนโบราณและยาสมุนไพรได้รับความนิยมมาอย่างยาวนานและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในอนาคตจากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลกต่อปริมาณความนิยมสมุนไพรในตลาดโลกที่มีมูลค่าถึง 3,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในปี 2549 จะเพิ่มขึ้นเป็น 5,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในปี 2593⁽¹⁾ การรักษาโรคด้วยยาแผนโบราณนี้ในบางกรณีอาจให้ผลการรักษาที่ค่อนข้างช้า และพบว่าผู้ผลิตบางรายมีการลักลอบผสมยาแผนปัจจุบันลงไปในผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกิดผลการรักษาที่รวดเร็วและเป็นการดึงดูดผู้บริโภค ซึ่งยาดังกล่าวที่มักปลอมปนลงไปคือ สารสเตียรอยด์

สารสเตียรอยด์เป็นกลุ่มฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายให้เป็นปกติอยู่เสมอ เช่น ด้านการอักเสบ ลดอาการปวดต่าง ๆ หรือปรับความเครียด ปรับความอ่อนเพลียไม่มีแรงให้เป็นปกติได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังทำให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานเป็นปกติและอื่น ๆ อีกมากมาย⁽²⁾ โดยสารสเตียรอยด์ที่นิยมลักลอบปลอมปนบ่อยที่สุดคือ เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone) และเพรดนิโซโลน (Prednisolone)⁽³⁾ ซึ่งสารทั้ง 2 ตัวนี้เป็นยาควบคุมพิเศษในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ต้องสั่งจ่ายโดยแพทย์และมีเภสัชกรเป็นผู้จ่ายและให้คำแนะนำในการใช้ยาเท่านั้น⁽⁴⁾ ในทางการแพทย์สารสเตียรอยด์ใช้เป็นยาด้านอักเสบและแก้แพ้ ใช้รักษาอาการแพ้ชนิดรุนแรงหรือเรื้อรัง เช่น หอบหืด และโรคภูมิแพ้ทางผิวหนัง หรือกลุ่มโรคออโตอิมมูน เช่น โรคไตรั่ว (nephrotic) และเอสแอลอี (Systemic Lupus Erythematosus) เป็นต้น⁽⁵⁾ ระยะแรกที่ได้รับสารสเตียรอยด์ผู้ป่วยรู้สึกว่าการดีขึ้นจึงหลงเชื่อและรับประทานต่อเนื่อง แต่ผลของการใช้ยาดังกล่าวมีอันตรายหรือผลข้างเคียงสูง เพราะยามีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ติดเชื้อได้ง่าย เป็นเหตุให้เกิดโรคแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ยายังกดการทำงานของต่อมหมวกไต มีผลต่อฮอร์โมน ทำให้เกิด Cushing's syndrome เกิดภาวะความดันโลหิตสูง กล้ามเนื้ออ่อนแรง กระเพาะอาหารทะลุ และกระดูกพรุน เป็นต้น⁽²⁾

มีรายงานในหลายประเทศพบปัญหาเช่นเดียวกัน เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบผลิตภัณฑ์อาหารเสริมอ้างว่าสามารถรักษาข้ออักเสบ ปวดกล้ามเนื้อ กระดูกพรุน มะเร็ง และอื่น ๆ แต่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบสารสเตียรอยด์ปลอมปนในรูปแบบของเดกซาเมทาโซน ในสารธรรมชาติสังเคราะห์พบการปลอมปนยากกลุ่มคอติโคสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณหรือผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรง บางผลิตภัณฑ์ทำให้ผู้บริโภคเสียชีวิต ด้วยยาที่พบบ่อยคือ เดกซาเมทาโซน และจากฐานข้อมูลผลิตภัณฑ์ปลอมปนสเตียรอยด์ของสหพันธรัฐมาเลเซียพบผลิตภัณฑ์ยาจีนทั้งที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาและที่ไม่ได้ขึ้นทะเบียนมีการปลอมปนสารสเตียรอยด์รวม 12 รายการ พบผลิตภัณฑ์อาหารมีการปลอมปนสารสเตียรอยด์ 1 รายการ ซึ่งเป็นการปลอมปนเดกซาเมทาโซนเช่นกัน⁽⁶⁾

สำหรับประเทศไทยมีการสำรวจสารสเตียรอยด์ปลอมปนในยาชุดและยาสมุนไพรหลายแห่ง เช่น ในปี 2558 ที่ตำบลบ้านโสก อำเภอลำลูกเกด จังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่ามีสารสเตียรอยด์ปลอมปนร้อยละ 12.20 ของตัวอย่างยาชุดและยาจากสมุนไพรทั้งหมด 41 ตัวอย่าง ยาชุดที่พบสารสเตียรอยด์มีสรรพคุณเป็นยาแก้ปวดเมื่อยทุกตัวอย่าง⁽⁷⁾ จากรายงานข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ยาแผนโบราณ ในเขตพื้นที่สาธารณสุขที่ 4 และ 5 ระหว่างปี พ.ศ. 2548-2552 จำนวน 626 ตัวอย่าง พบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์สูงถึงร้อยละ 25.08 บางตัวอย่างมีปริมาณสเตียรอยด์ที่ใช้ปลอมปนเทียบเท่ากับการได้รับยาสเตียรอยด์ 4-12 เม็ดต่อวัน⁽⁸⁾

จากการตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบการปลอมปนยาแผนปัจจุบันจำนวน 97 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 196 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสารสเตียรอยด์มากที่สุด⁽³⁾ และในเขตความรับผิดชอบของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี ใน 9 จังหวัด พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณที่ไม่มีเลขทะเบียนยาหรือไม่ทราบแหล่งผลิต ซึ่งเป็นเดกซาเมทาโซน 24 ตัวอย่าง และเพรดนิโซโลน 12 ตัวอย่าง ซึ่งปริมาณที่พบใกล้เคียงกับการบริโภคยาเม็ดเดกซาเมทาโซนมีอัตราส่วนหนึ่งส่วนสี่เม็ดถึง 3 เม็ด⁽⁹⁾ และจากข้อมูลของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ภาคใต้ (สุราษฎร์ธานี) พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์จำนวน 14 ตัวอย่าง จาก 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40)^(10,11) จากข้อมูลที่ได้กล่าวมานี้ทำให้ทราบว่าปัญหาการปลอมปนสารสเตียรอยด์ในยายังมีอยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ

สาเหตุหนึ่งคือ การขาดความรู้ของประชาชน จึงทำให้ประชาชนมีความเสี่ยงต่อการได้รับอันตรายจากสารสเตียรอยด์ โดยไม่ได้ตั้งใจ ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการตรวจวิเคราะห์หาสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรในพื้นที่รับผิดชอบของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต (ภูเก็ต พังงา และกระบี่) ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์การปลอมปนสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรในเขตพื้นที่จังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ระหว่างปี พ.ศ. 2559-2562 และเพื่อการสื่อสารสาธารณะให้ประชาชนตระหนักถึงอันตรายของสารสเตียรอยด์ และการปลอมปนในผลิตภัณฑ์เหล่านี้

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างทั้งหมด 48 ตัวอย่าง จำแนกเป็น 3 กลุ่มตามแหล่งที่มา คือ กลุ่มที่ 1 ยาแผนโบราณและยาสมุนไพรจากหน่วยงานสาธารณสุขเครือข่ายในเขตรับผิดชอบของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต (สำนักงานสาธารณสุขอำเภอท้ายเหมือง สถานีอนามัยเฉลิมพระเกียรติบางม่วง จังหวัดพังงา สถานีอนามัยเฉลิมพระเกียรติคลองพน จังหวัดกระบี่) รวม 14 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่ประชาชนผู้บริโภคนำมาขอส่งตรวจรวม 4 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากโครงการเฝ้าระวังผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ไม่ปลอดภัยในเขตพื้นที่จังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ปีงบประมาณ 2562 รวม 30 ตัวอย่าง ในรูปแบบยาลูกกลอน ยาผง ยาแคปซูล ยาเม็ด และยาน้ำ

สารเคมี

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ : คลอโรฟอร์ม (V.S.CHEM HOUSE. ประเทศไทย) อะซิโตน, ไดคลอโรมีเทน อีเธอร์ เอทานอล (Merck KGaA สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) เมทานอล เอทิลอะซิเตท (J.T.Baker) Tetrazolium blue (SIGMA-ALDRICH) โซเดียมไฮดรอกไซด์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือสำหรับวิธีรังสีเลเซอร์ (Thin layer chromatography, TLC) ประกอบด้วย ตู้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV cabinet) ยี่ห้อ Desaga รุ่น CabUVIS อุปกรณ์สำหรับวิธีรังสีเลเซอร์ ประกอบด้วย ถังสำหรับดำเนินการแยก (Developing Chamber Tank) กว้าง 6.2 เซนติเมตร × ยาว 17.5 เซนติเมตร × สูง 11.0 เซนติเมตร แผ่นกระจกขนาด 20 × 20 เซนติเมตร เคลือบ Silica Gel GF254 ความหนา 250 ไมครอน (Merck, Darmstadt, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) แผ่นช่วยการอิมมูโนขนาด 20 × 20 เซนติเมตร ชุดพ่นสารตรวจวัด (Reagent Sprayer) หลอดตวงเล็ก ขนาดบรรจุ 2 และ 5 ไมโครลิตร ยี่ห้อ BLAUBRAND® intraEND (Wertheim สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ตู้สเปรย์แผ่นที่แอลซี ยี่ห้อ CAMAG รุ่น Spray Cabinet II

สารเคมี

ระบบตัวทำละลาย TD = คลอโรฟอร์ม : อะซิโตน (80:20) ระบบตัวทำละลาย TF = เอทิลอะซิเตท ระบบตัวทำละลาย TP = ไดคลอโรมีเทน : อีเธอร์ : เมทานอล : น้ำ = (77: 15: 8: 1.2)

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานเกรดวิเคราะห์ : เดกซาเมทาโซน หมายเลขควบคุม WS D54-7/62 เพรดนิโซโลน หมายเลขควบคุม WS P48-6/61 ของสำนักงานและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การสกัดสารจากตัวอย่าง

ละลายตัวอย่างที่เป็นของแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร (อาจใช้การบดหรือความร้อนช่วยในการละลายตัวอย่าง) แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง ส่วนตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง กรองผ่านกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยคลอโรฟอร์ม เก็บสารในชั้นคลอโรฟอร์ม ระเหยให้แห้งและทิ้งไว้ให้เย็น เติมนีโทานอล 1-2 มิลลิลิตร ลงไป สำหรับเป็นสารละลายตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

แยกเตรียมสารละลายมาตรฐานของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในเอทานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การตรวจสอบสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

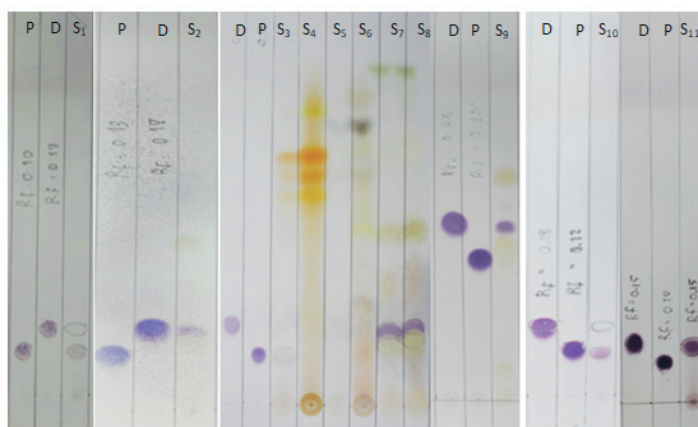
การตรวจสอบสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในตัวอย่างเป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยวิธี TLC โดยสารทั้งสองจะถูกแยกภายใต้สารดูดซับที่เป็นระบบคงที่ (stationary phase) และสารละลายผสมที่ใช้เป็นระบบเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารออกจากกัน โดยการแยกขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการละลายของสารในสารละลายผสมชนิดต่าง ๆ (developing solvent) และการดูดซับบนสารดูดซับ จากนั้นตรวจสอบตำแหน่งค่า Retardation factor (R_f : ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่สารละลายเคลื่อนที่) ของสารโดยดูสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีกับสารที่ใช้เป็นตัวสเปรย์ หรือส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร⁽¹²⁾ ซึ่งสารทั้งสองจะทึบแสงในตำแหน่งที่แตกต่างกัน และต้องได้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันของสารละลายอย่างน้อย 2 ระบบ กรณีที่ผลจาก 2 ระบบแรกไม่สอดคล้องกัน ต้องทำการทดสอบระบบที่ 3 จึงจะระบุได้ว่าการปลอมปนของสารสเตียรอยด์โดยระบบตัวทำละลาย (solvent system or mobile phase) ที่เหมาะสม คือ ค่า R_f มีค่าอยู่ระหว่าง 0.3-0.7 ซึ่งระบบตัวทำละลายในการวิเคราะห์ครั้งนี้มี 3 ระบบ⁽¹³⁾ คือ ระบบ TD ระบบ TF และระบบ TP

สำหรับการอ่านผลจะตรวจสอบด้วย 3 วิธีร่วมกัน คือ ดูการดูดกลืนแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เปรียบเทียบตำแหน่งของตัวอย่างกับสารมาตรฐานบนแผ่น TLC ใช้ดินสอทำเครื่องหมายวงกลมไว้ตรงตำแหน่งที่พบการเรืองแสง ซึ่งสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดจะทึบแสงในตำแหน่งที่แตกต่างกันบนแผ่น TLC ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร วิธีที่ 2 ตรวจสอบด้วยสารละลายที่ใช้ตรวจเฉพาะ (specific spraying reagent) สารละลายที่ใช้คือ 0.5% Tetrazolium blue ในเมทานอล พ่นลงไปบนแผ่น TLC ทิ้งไว้ให้แห้ง และพ่นทับด้วย 20% NaOH เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนจะเกิดสีม่วงกับน้ำยาสเปรย์ และวิธีที่ 3 อ่านผลจากการเปรียบเทียบผลของตัวอย่างกับสารมาตรฐานหรือสารอ้างอิง โดยสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบคือ สารอ้างอิงมาตรฐานเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน จากสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

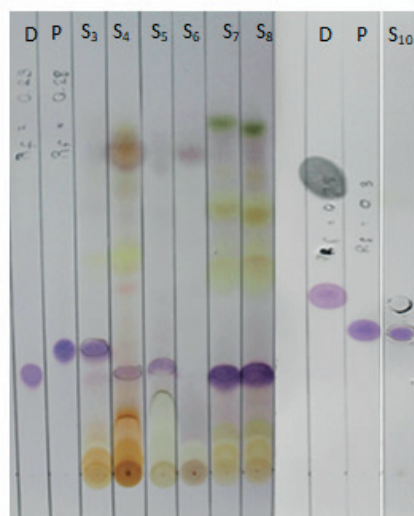
ผล

จากการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณและยาสมุนไพรจำนวน 48 ตัวอย่าง ตรวจพบการปลอมปนสารสเตียรอยด์จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.8 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยเทคนิค TLC ซึ่งตัวอย่างที่มีการปลอมปนสารสเตียรอยด์ จะเกิดเป็นแถบสีม่วงน้ำเงินกับน้ำยาพ่นในระยะเดียวกับสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ (ภาพที่ 1) โดยผลการทดสอบของตัวอย่าง หมายเลข S_1 , S_2 , S_7 , S_8 , S_9 และ S_{11} การวิเคราะห์ให้ผลที่สอดคล้องกันในตัวทำละลาย 2 ระบบแรก คือ ระบบสารละลาย TD และ TF จึงสามารถสรุปผลการตรวจพบเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนได้ แต่ตัวอย่างหมายเลข S_3 , S_4 , S_5 , S_6 และ S_{10} ผลการทดสอบในระบบทำละลายใน 2 ระบบแรกไม่สอดคล้องกัน จึงต้องทำการทดสอบระบบสารละลายที่ 3 คือระบบ

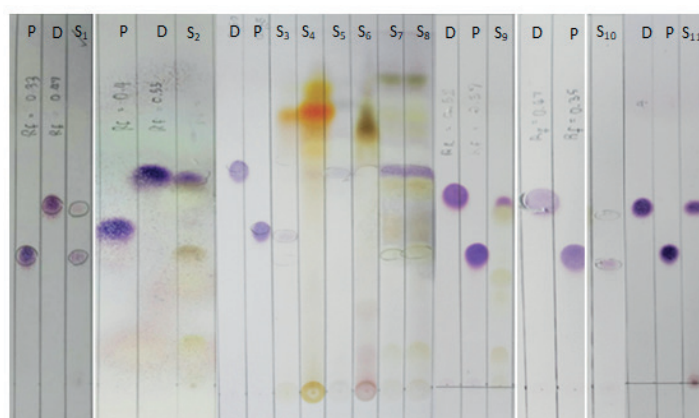
สารละลาย TP จึงสามารถสรุปได้ว่าพบการปลอมปนของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน และจากภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าโครมาโทแกรมที่แสดงจะปรากฏสีอื่นที่นอกเหนือจากสีม่วงของสารสเตียรอยด์ ซึ่งเกิดจากสีเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถกำจัดออกได้ด้วยน้ำยาสกัดตัวอย่าง



ระบบตัวทำละลาย TD = คลอโรฟอร์ม:อะซิโตน (80:20)



ระบบตัวทำละลาย TP ไดเอทิลเออร์มีเทน:อีเธอร์:เมทานอล:น้ำ (77:15:8:1.2)



ระบบตัวทำละลาย TF = เอทิลอะซิเตท

ภาพที่ 1 การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณด้วยวิธี TLC ในระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (P = Prednisolone; D = Dexamethasone; S = Sample)

เมื่อจำแนกตามอนุพันธ์ของสารสเตียรอยด์ที่ตรวจพบการปลอมปน พบว่าตัวอย่างปลอมปนเดกซาเมทาโซน เพรดนิโซโลนจำนวน 7 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 70.0% และ 10.0% ของจำนวนตัวอย่างที่พบการปลอมปนทั้งหมด และตรวจพบสารสเตียรอยด์ปลอมปนมากกว่า 1 ชนิด โดยพบการปลอมปนเดกซาเมทาโซน ร่วมกับเพรดนิโซโลนจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.0% ของจำนวนตัวอย่างที่พบการปลอมปนทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบการตรวจพบเดกซาเมทาโซน เพรดนิโซโลน และเดกซาเมทาโซนร่วมกับเพรดนิโซโลน คิดเป็นร้อยละ 14.6, 2.1 และ 4.2 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างที่ตรวจพบสารสเตียรอยด์โดยจำแนกตามอนุพันธ์

อนุพันธ์ของสารสเตียรอยด์	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ	ร้อยละ (จากตัวอย่างที่ตรวจพบ)	ร้อยละ (จากตัวอย่างทั้งหมด)
เดกซาเมทาโซน	7	70.0	14.6
เพรดนิโซโลน	1	10.0	2.1
เดกซาเมทาโซน และเพรดนิโซโลน	2	20.0	4.2
รวม	10		

เมื่อพิจารณาจากรูปแบบต่าง ๆ พบว่าในรูปแบบยาลูกกลอน ยาผง ยาแคปซูล และยาเม็ด รวม 9, 6, 14 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตรวจพบการปลอมปนสารสเตียรอยด์จำนวน 4, 3, 2 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 8.3, 6.3, 4.2 และ 2.1 ตามลำดับ ในส่วนของรูปแบบยาน้ำจำนวน 11 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ยาแผนโบราณและยาสมุนไพรที่ปลอมปนสารสเตียรอยด์จำแนกตามรูปแบบของยา

รูปแบบยา	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ สารสเตียรอยด์	ร้อยละ
ยาลูกกลอน	9	4	8.3
ยาผง	6	3	6.3
ยาแคปซูล	14	2	4.2
ยาเม็ด	8	1	2.1
ยาน้ำ	11	0	0.0
รวม	48	10	20.8

เมื่อจำแนกตัวอย่างตามประเภทของการขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณ พบว่าตัวอย่างที่มีทะเบียนตำรับยาจำนวน 23 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีทะเบียนตำรับยาจำนวน 25 ตัวอย่าง ตรวจพบการปลอมปนสารสเตียรอยด์จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.0 ของจำนวนตัวอย่างที่ไม่มีทะเบียนตำรับยา (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การตรวจสอบสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรจำแนกตามการขึ้นทะเบียนตำรับยา

การขึ้นทะเบียน	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ สารสเตียรอยด์	ร้อยละ
มีทะเบียนตำรับยา	23	0	0.0
ไม่มีทะเบียนตำรับยา	25	10	40.0
รวม	48	10	20.8

ทั้งนี้ตัวอย่างที่ได้รับจากเครือข่ายศูนย์แจ้งเตือนภัยฯ จำนวน 14 ตัวอย่าง พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 71.4 ของตัวอย่างจากศูนย์แจ้งเตือนภัยฯ และคิดเป็นร้อยละ 20.8 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด ส่วนตัวอย่างส่งตรวจจากประชาชนและตัวอย่างจากโครงการเฝ้าระวังฯ ตรวจไม่พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ยาแผนโบราณและยาสมุนไพรที่ตรวจพบสารสเตียรอยด์จำแนกตามแหล่งที่มาของตัวอย่าง

แหล่งที่มาของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ สารสเตียรอยด์	ร้อยละ (จากตัวอย่างที่ตรวจพบ)	ร้อยละ (จากตัวอย่างทั้งหมด)
เครือข่ายศูนย์แจ้งเตือนภัยฯ	14	10	71.4	20.8
ประชาชน	4	0	0.0	0.0
โครงการเฝ้าระวังฯ	30	0	0.0	0.0
รวม	48	10	71.4	20.8

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาจำแนกตามพื้นที่การเก็บตัวอย่างพบว่าตัวอย่างที่มาจากจังหวัดพังงาจำนวน 25 ตัวอย่าง พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.0 ของตัวอย่างจากจังหวัดพังงา และคิดเป็นร้อยละ 20.8 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด ส่วนตัวอย่างจากจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดกระบี่ตรวจไม่พบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 พื้นที่การเก็บตัวอย่างยาแผนโบราณและยาสมุนไพรและผลการตรวจสอบสารสเตียรอยด์

พื้นที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง ที่ตรวจพบ สารสเตียรอยด์	ร้อยละ (ตัวอย่างในจังหวัด)	ร้อยละ (ตัวอย่างทั้งหมด)
ภูเก็ต	9	0	0.0	0.0
กระบี่	14	0	0.0	0.0
พังงา	25	10	40.0	20.8
รวม	48	10	40.0	20.8

วิจารณ์

จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีการปลอมปนสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรในเขตพื้นที่จังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ในระหว่าง พ.ศ. 2559-2562 พบสารสเตียรอยด์ 2 ชนิดที่ปลอมปนอยู่ในตัวอย่างร้อยละ 20.8 ในยาที่ไม่มีทะเบียนยา

สารสเตียรอยด์ 2 ชนิดที่ปลอมปนอยู่ในตัวอย่างในเขตพื้นที่จังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต คือ เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่อยู่ในรูปสารเดี่ยวและสารผสมกัน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานผลการทดสอบของสำนักงานยาและวัตถุเสพติด ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ซึ่งตรวจวิเคราะห์การปลอมปนตัวยาเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณ ในตัวอย่างส่งตรวจจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาและตัวอย่างส่งตรวจจากประชาชน จำนวน 43 ตัวอย่าง ตรวจพบการปลอมปนเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในตัวยาดังกล่าว จำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด⁽³⁾ และจากการวิเคราะห์พบปริมาณเดกซาเมทาโซนที่สูงกว่าเพรดนิโซโลนถึง 7 เท่า เนื่องจากเดกซาเมทาโซนมีความแรงมากกว่าเพรดนิโซโลนถึง 6.7 เท่า และมีระยะเวลาการออกฤทธิ์ที่ยาวกว่า⁽¹⁴⁾ จึงทำให้ผู้ผลิตนิยมเติมเดกซาเมทาโซนลงในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรมากกว่าเพรดนิโซโลน ผลการศึกษายังพบว่ายาส่วนใหญ่ที่มีการปลอมปนอยู่ในรูปแบบของยาลูกกลอนและยาผงมากที่สุดเนื่องจากสามารถรับประทานได้ง่ายและเก็บรักษาได้นาน สอดคล้องกับการศึกษาของนันทนา กลิ่นสุนทร และคณะ⁽⁶⁾ ที่พบว่ายาสมุนไพรในรูปแบบยาผงและยาลูกกลอนมีปริมาณสเตียรอยด์ปลอมปนสูงที่สุด

การปลอมปนสารสเตียรอยด์ในตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ไม่มีเลขทะเบียนยาและไม่มีข้อมูลแหล่งผลิตและแหล่งซื้อขายจากจังหวัดพังงา สอดคล้องกับการศึกษาของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี⁽⁹⁾ และการศึกษาของ ธนพัฒน์ และคณะ⁽¹⁵⁾ ที่พบการปลอมปนสเตียรอยด์มากที่สุดในยาสมุนไพรที่ไม่ระบุถึงแหล่งผลิตหรือเลขทะเบียนแสดงถึงตัวอย่างที่มีทะเบียนตำรับยามีความปลอดภัยมากกว่าเนื่องจากมีการตรวจสอบและควบคุมจากภาครัฐในการขึ้นทะเบียน

วิธีการวิเคราะห์หาสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ปลอมปนในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งจากการสำรวจข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าวิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือ วิธี TLC และโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)⁽¹⁶⁾ ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หาสารสเตียรอยด์ โดยวิธี HPLC เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารสูง แต่ต้นทุนในการวิเคราะห์สูงกว่า TLC และผู้วิเคราะห์ควรมีประสบการณ์การใช้เครื่องมือ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้เลือกวิธี TLC ในการศึกษาเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว อุปกรณ์ไม่ซับซ้อน ต้นทุนการวิเคราะห์ต่ำ และสามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน⁽¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามวิธี TLC มีการใช้สารเคมี เช่น คลอโรฟอร์ม ใช้เป็นทั้งตัวทำละลายและสกัดสารจากตัวอย่างซึ่งมีความเป็นพิษสูงหากนักวิเคราะห์สัมผัสหรือสูดดมเป็นเวลานานอาจจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพในระยะยาวได้ ในอนาคตคณะผู้วิจัยจะพัฒนาวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยวิธี HPLC ซึ่งวิเคราะห์สารได้หลายชนิด ไม่มีข้อจำกัดด้านการระเหยของสาร ทำให้ปลอดภัยต่อนักวิเคราะห์ มีประสิทธิภาพ และความรวดเร็วและสามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารได้⁽¹⁸⁾

สาเหตุของการลักลอบการปลอมปนสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพร เนื่องจากผู้จำหน่ายหวังผลการรักษาที่ชัดเจนและรวดเร็วทำให้ประชาชนรู้สึกว่ายากดี ในช่วงแรกที่ได้รับประทานยาผู้ป่วยจะรู้สึกว่ามีอาการดีขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งในความจริงแล้วสารสเตียรอยด์มีฤทธิ์ต่อหลายระบบของร่างกาย แต่เมื่อรับประทานยาเป็นเวลานานจะเกิดผลข้างเคียงของสเตียรอยด์ได้ ข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้นำข้อมูลผลการวิเคราะห์ไปเผยแพร่ในระบบแจ้งเตือนภัย กรมวิทย์ with you ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์แล้ว⁽¹⁹⁾ และได้เผยแพร่ข้อมูลแก่ประชาชนในพื้นที่เขตรับผิดชอบผ่านอาสาสมัครสาธารณสุข (อสม.) วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน ภายใต้โครงการพัฒนาเครือข่ายวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนในพื้นที่จังหวัดภูเก็ต พังงา และกระบี่ ในวันที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2561

ณ อำเภอย้ายเหมือง จังหวัดพังงา ซึ่ง อสม. จะเป็นตัวแทนในการเผยแพร่ข้อมูลสู่ชุมชนในพื้นที่ต่าง ๆ ทำหน้าที่แจ้งเตือนภัยผลิตภัณฑ์ปลอมปนสารสเตียรอยด์ และเฝ้าระวังผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ไม่ให้เข้าถึงประชาชนในชุมชน

สรุป

ถึงแม้ว่ายาสเตียรอยด์จะจัดเป็นยาควบคุมพิเศษตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 อย่างไรก็ตามยังมีการลักลอบปลอมปนสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณและยาสมุนไพรในเขตพื้นที่จังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ในปี พ.ศ. 2559-2562 ผลการศึกษาได้เผยแพร่เป็นความรู้แก่ประชาชนในเว็บไซต์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องก็นำข้อมูลไปใช้ประกอบการแก้ไขปัญหาสุขภาพและแจ้งเตือนภัยแก่ประชาชนในพื้นที่ผ่าน อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน ทั้งนี้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเก็บตัวอย่างมากขึ้นและครอบคลุมในพื้นที่เขตรับผิดชอบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารมาตรฐาน หน่วยงานสาธารณสุขเครือข่ายในเขตรับผิดชอบของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต (สำนักงานสาธารณสุขอำเภอย้ายเหมือง สถานีอนามัยเฉลิมพระเกียรติบงม่วง จังหวัดพังงา สถานีอนามัยเฉลิมพระเกียรติคลองพน จังหวัดกระบี่) ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างยาแผนโบราณและยาสมุนไพรภายในพื้นที่รับผิดชอบ และขอขอบคุณนางสาวอรทัย สุพรรณ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต ที่ให้การสนับสนุนการเผยแพร่ผลงานให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. วราวุธ เสริมสินศิริ. เส้นทางพัฒนาสมุนไพรไทยสู่ความยั่งยืน. Med&Herb 2558; 2(5): 6-7.
2. แผนงานพัฒนาเภสัชภัณฑ์เฝ้าระวังและพัฒนาระบบยา (กพย.). สเตียรอยด์คืออะไร. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 7 มิ.ย. 2562]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://steroidsocial.org/steroid1.html>.
3. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ผลงานบริการด้านห้องปฏิบัติการ: ด้านยา ยาเสพติด และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท. ใน: รายงานประจำปี 2558. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2558. หน้า 168.
4. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 95 ตอนที่ 68 (วันที่ 4 กรกฎาคม 2521). หน้า 2072-2075.
5. American Pharmacists Association. Drug information handbook with international trade names index. 25th ed. Hudson, Ohio: Lexi-Comp; 2016.
6. ปรุฬห์ รุจนธำรงค์. เหมียวมองการจัดการปัญหาสเตียรอยด์ในต่างประเทศ. ยาวิพากษ์ 2555; 5(15): 7-10.
7. อรอนงค์ โสตา, มนตรา ศรีษะแย้ม, อรรถพล รอดแก้ว, จิตศิริณ ลายลักษณ์, ศศิภาวรรณ มาชนะ. การสำรวจสเตียรอยด์ในยาชุดและยาสมุนไพรในตำบลบ้านโสก อำเภอลำสัก จังหวัดเพชรบูรณ์. วารสารเภสัชกรรมไทย 2560; 9(1): 216-24.
8. นันทนา กลิ่นสุนทร, ดวงพร เข้มทอง, ชมพูนุท นุตสถาปนา. การศึกษาปริมาณสารสเตียรอยด์ที่ปลอมปนในยาจากสมุนไพรเขตพื้นที่สาธารณสุข 4, 5. วารสารอาหารและยา 2555; 19(2): 31-7.
9. จริยา อัครวรรธน ธรณียพร กิจไชยา. โครงการสำรวจการปนเปื้อนสารสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณใน 9 จังหวัด. วารสารอาหารและยา 2557; 21(3): 64-72.

10. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี. ผลการปฏิบัติงาน: กลุ่มงานยา. ใน: รายงานประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558. สุราษฎร์ธานี: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี; 2558. หน้า 67-69.
11. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง. งานบริการ: ห้องปฏิบัติการยาและวัตถุเสพติด. ใน: รายงานประจำปี 2558. ตรัง: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง; 2558. หน้า 35-37.
12. สำนักยาและวัตถุเสพติด. หลักการทางโครมาโทกราฟี: โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography; TLC). ใน: วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2558. หน้า 10-17.
13. ดวงทิพย์ อรรถธร, สรียา แซ่ลิ่ม, สิริทิพย์ วิชญวรนนท์, อภินัฐ คล้ายสัดิต, สุกัญญา เดชอดิษฐ์. การศึกษาการปนปลอมของสารสเตียรอยด์ เพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนในยาแผนโบราณในอำเภอกาญจนบุรี จังหวัดสงขลา. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 2553; 13(1): 20-30.
14. Zoorob RJ, Cender D. A different look at corticosteroids. Am Fam Physician 1998; 58(2): 443-50.
15. ธนพัฒน์ ชัยะโสทธิ, วรณคล เชื้อมงคล, อัษฎางค์ สำเร็จ, จันทร์พิมพ์ ตรูวิทยาคม. การทดสอบเบื้องต้นของการปลอมปนสเตียรอยด์ในยาผง ยาลูกกลอน ยาเม็ด ยาน้ำ และยาแคปซูล ในชุมชนกรุงเทพมหานคร. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2557; 9(4): 151-6.
16. มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์, โสมขจี หงส์ทอง, สุรัชณี เสวตศิลา. การให้บริการชุดทดสอบสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี โดยสำนักยาและวัตถุเสพติด. ว กรมวิทย์ พ 2555; 54(3-4): 174-86.
17. วีระวรรณ เรืองยุทธิกการณ. การตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยวิธีโครมาโทกราฟี. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2538; 28(2): 22-33.
18. จิราณัฐ แจ่มทวีกุล, สุเมธ เทียงธรรม, วลัยลักษณ์ เมธากัทร, จิตรา ชัยวัฒน์. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง. ว กรมวิทย์ พ 2558; 57(2): 157-73.
19. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรมวิทย์ With you. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 30 ก.ย. 2561]. [10 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://alert.dmhc.moph.go.th/>.

Adulteration of Traditional and Herbal Medicines with Steroids in Krabi, Phang-nga and Phuket During 2016–2019

Somruedee Boonmee and Pimollada Chairat

Regional Medical Science Center 11/1 Phuket, Department of Medical Sciences, Amphoe Thalang, Phuket 83110, Thailand

ABSTRACT Steroids are designated as special controlled drug according to Medicine Act B.E. 1967. Inappropriate use of steroids can cause harmful side effects. Dexamethasone and prednisolone are steroids usually found in traditional and herbal medicines. During October 2016 to September 2019, Regional Medical Science Center 11/1 Phuket analyzed a total of 48 traditional and herbal medicinal samples collected from Krabi, Phang-nga and Phuket using Thin Layer Chromatography (TLC) technique. The presence of steroids were foreseen that 10 products (20.8%) were adulterated with steroids. Dexamethasone was found in 7 products while prednisolone was detected in 1 product. Two products were adulterated with both steroids. The information obtained from this study was available in the website called “alert.dmsc.moph.go.th.” under supervision of the Department of Medical Sciences to inform consumers of health product safety.

Keywords: steroids, adulteration, herbal medicines, traditional medicines

เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพต่องานบริการ ห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข

วัลลภรัตน์ พบศิริ

ภาควิชาบริหารงานสาธารณสุข คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

การให้บริการทางห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุขที่มีคุณภาพแก่ผู้รับบริการหรือผู้ป่วยมีความสำคัญมากในปัจจุบัน เนื่องจากการแข่งขันทางการให้บริการสูงและผู้ป่วยต้องการการตรวจที่ถูกต้องในการประกอบการวินิจฉัยของแพทย์ การนำเทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพงานบริการของห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข จึงเป็นแนวทางใหม่อีกแนวทางหนึ่งที่นักเทคนิคการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือผู้สนใจอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่มีการบ่งชี้ถึงระดับความต้องการ หรือเพื่อเพิ่มความพึงพอใจให้กับผู้รับบริการที่บางครั้งอาจจะไม่ใช่ผู้ป่วยโดยตรง

เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพ

เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพ (Quality Function Deployment: QFD) หรือเรียกว่าเทคนิคการแปลงหน้าที่ทางคุณภาพ หรือการกระจายการทำงานเชิงคุณภาพ⁽¹⁾ หมายความว่า (1) ระบบการถ่ายทอดความต้องการของผู้รับบริการให้เป็นไปตามเป้าหมายที่เหมาะสมขององค์กรในทุกขั้นตอน ตั้งแต่การออกแบบบริการและการขายบริการหรือการให้บริการ (2) กระบวนการหรือกรรมวิธีที่มีขั้นตอนที่แน่นอนใช้ในการค้นหาความต้องการที่แท้จริงของผู้รับบริการด้านคุณภาพ และแปลความหมายความต้องการนั้นออกมาในเชิงเทคนิค สามารถวัดได้และนำไปปฏิบัติ รวมถึงการควบคุมติดตามและวัดผลกระบวนการให้บริการเพื่อให้ได้ผลตรงตามเป้าหมายที่กำหนด (3) วิธีที่แสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงและช่วยในการจัดลำดับความสำคัญของความต้องการของผู้รับบริการโดยแปลงให้เป็นกิจกรรมดำเนินงานในเชิงบริการ⁽²⁾ มีจุดประสงค์เพื่อปรับสมรรถนะการดำเนินงานของหน่วยงานหรือองค์กรให้มีประสิทธิภาพสูงสุด และตอบสนองต่อความคาดหวังของผู้รับบริการได้

Corresponding author E-mail: Vallerut.pob@mahidol.ac.th

Received: 21 December 2018

Revised: 7 February 2020

Accepted: 31 July 2020

เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพ (QFD) ถูกนำมาใช้ในงานคุณภาพในประเทศไทยมานานแล้ว ส่วนใหญ่ใช้ในงานอุตสาหกรรม งานธุรกิจ หรืองานเชิงวิศวกรรม เพื่อปรับปรุงคุณภาพสินค้าและบริการ ผู้ให้บริการจะได้รับความน่าเชื่อถือ และทำให้ผู้ใช้บริการกลับมาใช้บริการอีก ทั้งยังช่วยลดข้อร้องเรียนต่างๆ จากผู้ป่วยหรือผู้ใช้บริการได้ แต่ถ้าไม่สามารถสร้างความพึงพอใจให้กับผู้ใช้บริการก็จะเกิดผลในทิศทางตรงข้าม ส่งผลให้เกิดผลกระทบกับรายได้และต้นทุนของการดำเนินกิจการต่างๆ

การใช้เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพมีความเกี่ยวข้องกับโมเดลของคาโน⁽¹⁾ ซึ่งแบ่งความต้องการของสินค้าหรือบริการออกเป็น 3 ประเภท ซึ่งมีอิทธิพลต่อความพึงพอใจของผู้รับบริการในทางที่แตกต่างกัน คือ

1. ความต้องการคุณภาพขั้นพื้นฐาน (must be requirements or expected quality) เป็นความต้องการด้านคุณภาพขั้นพื้นฐานที่น้อยที่สุดของบริการที่ต้องมี หากคุณภาพของบริการนั้นไม่มีอยู่ ผู้รับบริการจะเกิดความไม่พึงพอใจอย่างมาก คุณลักษณะประเภทนี้ผู้รับบริการมักไม่ได้ให้ความสนใจแต่คาดหวังว่าควรจะมีในบริการนั้นๆ ดังนั้น การให้บริการมีสิ่งพื้นฐานที่ผู้รับบริการต้องการนั้นเป็นเพียงจุดเริ่มต้นเท่านั้น คุณภาพขั้นพื้นฐานถือเป็นตัวแปรในการแข่งขันซึ่งจำเป็นจะต้องมีอยู่ในการให้บริการ หากไม่มีแล้วผู้รับบริการจะไม่มีทางเกิดความพึงพอใจในการใช้บริการนั้นๆ

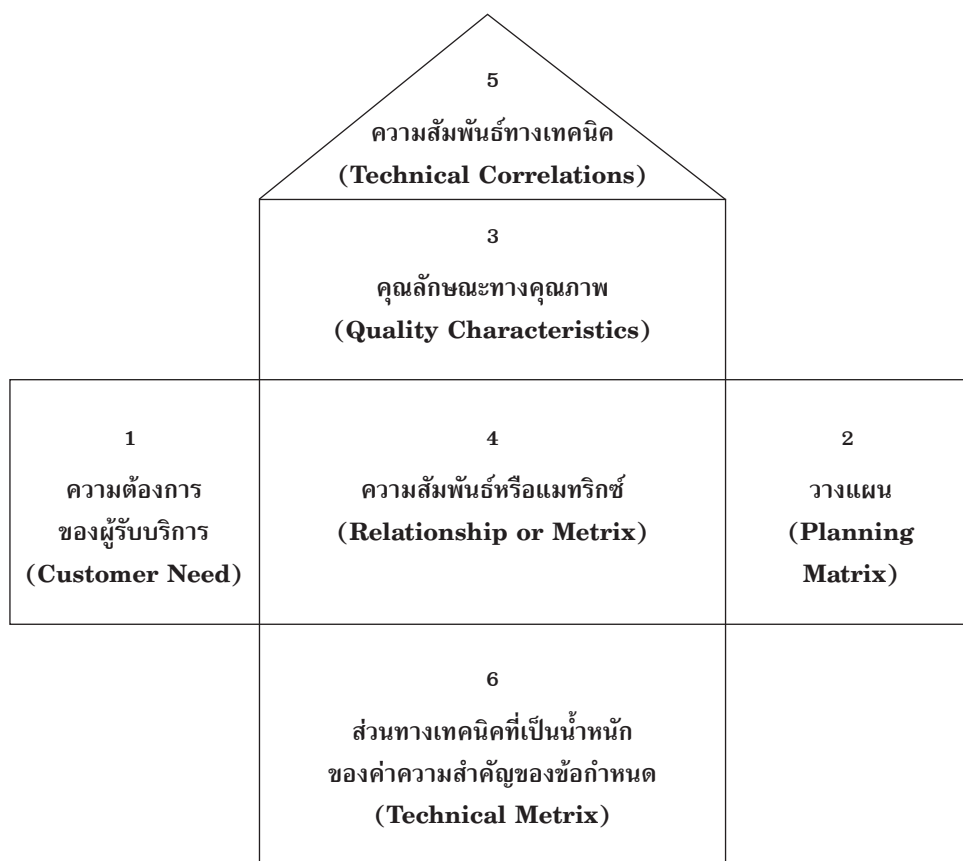
2. ความต้องการคุณภาพขั้นปกติ (one dimensional requirements or normal quality) ความต้องการคุณภาพขั้นปกติเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้รับบริการต้องการให้มีในบริการ ถ้ามีคุณลักษณะแบบนี้จะทำให้ผู้รับบริการมีความพึงพอใจมากขึ้น แต่ก่อนจะมีคุณลักษณะนี้ต้องเข้าใจในความสัมพันธ์ของความต้องการคุณภาพขั้นพื้นฐานก่อน ซึ่งสามารถเก็บข้อมูลได้จากการสัมภาษณ์ผู้รับบริการ ซึ่งถ้าสามารถทำในสิ่งที่ผู้รับบริการต้องการได้สำเร็จมากก็จะทำให้ผู้รับบริการเกิดความพึงพอใจมาก และในความต้องการระดับนี้เป็นสิ่งที่นิยมใช้ในการเปรียบเทียบกับคู่แข่งเนื่องจากเป็นคุณลักษณะที่วัดง่าย

3. ความต้องการคุณภาพที่ดึงดูด (attractive requirements or exciting quality) คุณภาพของการให้บริการเป็นสิ่งที่มียุทธพลเป็นอย่างมากในการจูงใจผู้รับบริการให้เกิดความพึงพอใจในการบริการ ซึ่งความต้องการที่ดึงดูดเป็นสิ่งที่ผู้รับบริการไม่ได้ทำการเปิดเผยหรือคาดหวังว่าจะได้รับเพราะเป็นสิ่งที่อยู่นอกความคาดหมาย แต่ถ้าการบริการนั้นๆ สามารถทำให้เกิดผลสำเร็จได้ก็จะเป็นผลดีต่อผู้รับบริการจะเกิดความพึงพอใจได้เป็นอย่างมาก ซึ่งจะเป็นการยกระดับคุณค่าของการบริการนั้นๆ ได้ด้วย แต่ถ้ากระทำไม่สำเร็จก็ไม่ทำให้เกิดความรู้สึกที่ไม่พึงพอใจแต่อย่างใด ความต้องการที่เกิดขึ้นในทั้งสามระดับนั้นจึงเหมาะแก่การนำไปใช้งานที่ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับบริการ เช่น ถ้าเป็นบริการใหม่ ผู้รับบริการยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก ความคาดหวังของผู้รับบริการก็จะอยู่ในระดับต่ำ เพราะแค่เพียงเห็นบริการใหม่ก็เกิดความประหลาดใจแล้ว แต่ถ้าเป็นบริการที่มีมานานแล้ว ความต้องการและความคาดหวังของผู้รับบริการก็จะอยู่ในระดับสูงตามไปด้วย ดังนั้นตัวขององค์กรเอง⁽³⁾ ต้องเร่งพัฒนาขีดความสามารถเพื่อเป็นยกระดับ และสร้างความแตกต่างเพื่อเพิ่มศักยภาพทางการแข่งขันการให้บริการต่อไป

จากแนวความคิดพื้นฐานของ QFD เริ่มจากการสำรวจความต้องการของผู้รับบริการ แล้วนำความต้องการที่ได้มาแปรให้เป็นข้อมูลทางเทคนิคที่ใช้ภายในองค์กร ซึ่งจะได้ค่าแทนลักษณะทางด้านเทคนิค (Technique Requirement) โดยทั่วไปแล้วค่าแทนลักษณะนี้จะแสดงผลเป็นตัวเลขบอกปริมาณที่สามารถวัดค่าได้ นำมาทำการจัดลำดับความสำคัญว่าควรทำการปรับปรุง/พัฒนา หรือออกแบบส่วนใดเป็นส่วนแรก^(4, 5)

การสร้างบ้านคุณภาพ (House of Quality)

การสร้างตารางหรือส่วนประกอบของบ้าน 6 ส่วน เป็นส่วนหนึ่งของเทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพ ประกอบด้วย (1) การศึกษาความต้องการของผู้รับบริการ (Customer Need) (2) ขั้นตอนการวางแผน (Planning Matrix) (3) คุณลักษณะทางคุณภาพ (Quality Characteristics) (4) ส่วนความสัมพันธ์หรือแมทริกซ์ (Relationship or Metrix) (5) ความสัมพันธ์ทางเทคนิค (Technical Correlations) (6) ส่วนประกอบทางเทคนิค (Technical Metrix) ผู้ที่ต้องการนำเทคนิคนี้มาใช้จึงควรศึกษาถึงความเป็นไปได้และความสามารถในการทำให้น่าสนใจและเกิดประโยชน์ต่องานการพัฒนาคุณภาพในห้องปฏิบัติการของตนได้



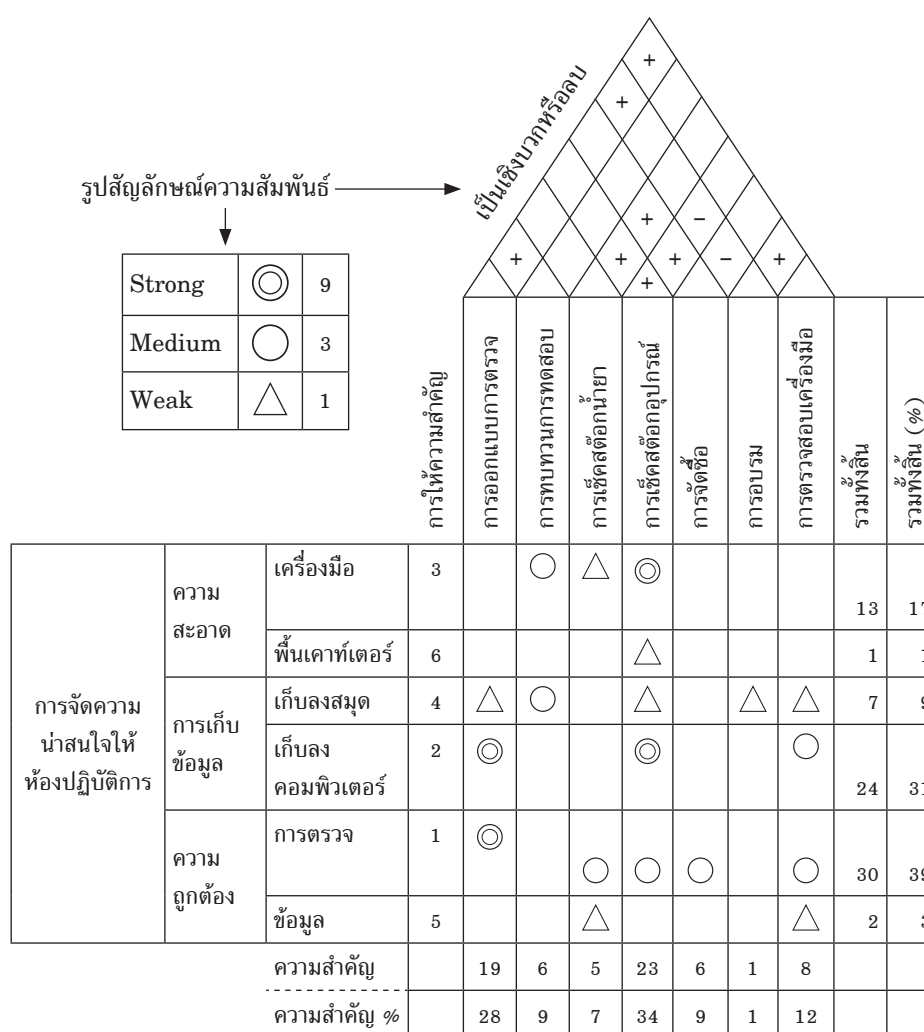
ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของบ้านคุณภาพ

ขั้นตอนในการสร้างบ้านคุณภาพ

1. **Customer Need** ในขั้นตอนนี้เริ่มจากการรวบรวมรายละเอียดความต้องการหลากหลายอย่างของผู้รับบริการ (ทั้งภายในและภายนอกองค์กร หรือห้องปฏิบัติการ) โดยรวมถึงความคาดหวังของผู้รับบริการที่มีความหมายกว้างและอาจมีข้อมูลอยู่มาก ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถใช้แผนภาพเชื่อมโยง⁽⁶⁾ เพื่อให้เกิดความง่ายในการจัดกลุ่มหรือจัดข้อมูลในการแยกความต้องการของผู้รับบริการให้มีความเหมาะสมและลดความสับสนในการแบ่งกลุ่มข้อมูลเมื่อความต้องการของผู้รับบริการมีในปริมาณมาก ข้อมูลดังกล่าวอาจมาจากการออกแบบสอบถามผู้รับบริการ

2. **Planning Matrix** ในส่วนนี้จะมีส่วนของข้อมูลที่เกี่ยวข้องคือ การจัดลำดับความสำคัญของผู้รับบริการ และเปรียบเทียบการสำรวจความคิดเห็นของผู้รับบริการเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงการให้บริการให้ดีขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2 สามารถจัดลำดับความสำคัญในการวางแผนจากเปอร์เซ็นต์ที่มากที่สุดไปหาที่น้อยที่สุดได้

6. **Technical Metrix** เป็นส่วนที่อยู่ใต้ถนน มีส่วนประกอบคล้ายคลึงกับการวางแผน



ภาพที่ 2 ตัวอย่างการใส่ข้อมูลของบ้านคุณภาพ

ประโยชน์ของเทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพ

1. ช่วยให้ผู้ใช้บริการเน้นความสำคัญของผู้รับบริการเป็นลำดับแรก เนื่องจากการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพได้ข้อมูลจากผู้รับบริการ ดังนั้นข้อมูลที่ได้อาจเป็นการสะท้อนถึงความต้องการที่แท้จริงของผู้รับบริการต่อผู้ใช้บริการ และผู้ใช้บริการจะสามารถค้นหาวิธีการที่จะทำให้บรรลุถึงความต้องการของผู้รับบริการได้อย่างเหมาะสม
2. ช่วยจัดโครงสร้างของข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่รัดกุม สามารถนำมาใช้ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงคณะทำงาน โครงสร้างของข้อมูลเหล่านี้ทำให้การทำงานเดิมดำเนินต่อไปได้โดยไม่หยุดชะงัก การกระจายหน้าที่ทางคุณภาพยังมีความยืดหยุ่นต่อการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากโครงสร้างทางแมทริกซ์เอื้ออำนวยต่อการเพิ่มหรือลดขนาดได้ตามข้อมูลที่ใส่เข้าไปในแมทริกซ์
3. ช่วยทำให้เกิดการทำงานเป็นทีม เนื่องจากการตัดสินใจขึ้นอยู่กับมติส่วนใหญ่ของทีม จึงทำให้เกิดเป้าหมายร่วมกัน สมาชิกในทีมมีส่วนร่วมในการออกความคิดเห็นเพื่อการพัฒนาการให้บริการ เป็นการประสานงานความร่วมมือ ทำให้เกิดความราบรื่นและความถูกต้องชัดเจนในการออกแบบบริการ⁽⁹⁾
4. ช่วยให้องค์กรจัดโครงสร้างเกี่ยวกับสารสนเทศที่เกี่ยวข้องได้โดยการเขียนข้อมูลจำนวนมากลงบนกระดาษแผ่นเดียวในการทำการวิเคราะห์ ทำให้ง่ายต่อการพัฒนา เนื่องจากสามารถมองเห็นภาพรวมของข้อมูลทุก ๆ ด้านได้ในเวลาอันรวดเร็ว และสามารถทบทวนซ้ำใหม่จนทำให้เกิดความคิดสร้างสรรค์ได้⁽¹⁰⁾
5. เพิ่มประสิทธิภาพในการจัดสรรทรัพยากรในหน่วยงานเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นได้ว่าทรัพยากรที่ใช้ไปสามารถเพิ่มความพึงพอใจของผู้รับบริการได้ ในการประยุกต์ใช้เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพจะช่วยปรับกรอบของงานออกแบบการให้บริการใช้เวลาสั้นลง ลดต้นทุนในการออกแบบการให้บริการ สามารถช่วยลดข้อขัดแย้งในการออกแบบการให้บริการและปัญหาต่าง ๆ ได้

ข้อควรระวังในการสร้างบ้านคุณภาพ พบว่าการสร้างต้องใช้ข้อมูลจากหลายด้านและจากหลากหลายฝ่าย จึงควรประกอบด้วยทีมงานที่ออกแบบมาจากหลายด้าน เพื่อให้มีข้อมูลเพียงพอในการนำมาใช้สร้างตาราง ในการปฏิบัติพบว่าในแต่ละทีมงานหรือในแต่ละกลุ่มจะมีปัญหาเมื่อเริ่มสร้าง จึงต้องทำความเข้าใจกับความต้องการของผู้รับบริการว่าผู้รับบริการต้องการสิ่งใด ซึ่งข้อมูลส่วนนี้ต้องอาศัยความรู้ด้านการตลาด ดังนั้นจึงควรมีบุคคลที่มีความรู้ด้านนี้ด้วยเข้ามาในการสร้างตาราง QFD ผู้ที่ต้องการนำเทคนิคนี้มาใช้ควรศึกษาถึงความเป็นไปได้และความสามารถในการทำให้น่าสนใจและเกิดประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพในห้องปฏิบัติการของตนได้ จากแนวความคิดพื้นฐานของ QFD ในการดำเนินงานคุณภาพโดยใช้เทคนิคนี้อาจก่อให้เกิดการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการขั้นสูงได้อย่างต่อเนื่อง (CQI) ควบคู่กันไปด้วย เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพและประสิทธิผลสูงสุด และเพื่อให้เกิดความสอดคล้องกับความต้องการของผู้ป่วยหรือผู้ใช้บริการอยู่เสมอ

สรุป

เทคนิคการแปลงหน้าที่เชิงคุณภาพ (Quality Function Deployment) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจัดโครงสร้างงานคุณภาพเพื่อจัดการออกแบบ วางแผนและพัฒนาการให้บริการ หรือพัฒนากระบวนการ ซึ่งเน้นที่การตอบสนองความต้องการของลูกค้า/ผู้รับบริการ/ผู้ใช้ เป็นหลักมากกว่าการพัฒนานวัตกรรมทางด้านเทคโนโลยี โดยเทคนิคนี้จะช่วยระบุความต้องการของลูกค้าหรือผู้ใช้บริการได้อย่างชัดเจน และประเมินคุณลักษณะของบริการว่าสามารถตอบสนองความพึงพอใจของลูกค้ามากน้อยเพียงใด

เอกสารอ้างอิง

1. ชาตรี หอมเขียว. การออกแบบและพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยใช้เทคนิคการแปลงหน้าที่ทางคุณภาพ: กรณีศึกษาโรงงานผลิตเฟอร์นิเจอร์ [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาการจัดการอุตสาหกรรม, คณะวิศวกรรมศาสตร์. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2552.
2. สิทธิชัย ยกถาวร. การออกแบบรูปแบบบริการสำหรับผู้ป่วยนอกของแผนกหูดอกมูกในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยใช้เทคนิคการแปลงหน้าที่ทางคุณภาพ [สารนิพนธ์]. ภาควิชาการจัดการอุตสาหกรรม, คณะวิศวกรรมศาสตร์. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2554.
3. Warwick Manufacturing Group. Quality function deployment. Coventry, UK: University of Warwick; 2007.
4. Buttigieg SC, Dey PK, Cassar MR. Combined quality function deployment and logical framework analysis to improve quality of emergency care in Malta. *Int J Health Care Qual Assur* 2016; 29(2): 123-40.
5. Hauser JR, Griffin A, Klein RL, Katz GM, Gaskin SP. Quality Function Deployment (QFD). In: *Wiley international encyclopedia of marketing* Vol. 5. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p.-213-218.
6. Baran Z, Yildiz MS. Quality function deployment and application on a fast food restaurant. *Int J Bus and Soc Sci* 2015; 6(9): 122-31.
7. Vinodh S, Kumar Chintha S. Application of fuzzy QFD for enabling leanness in a manufacturing organization. *Int J Prod Res* 2011; 49(6): 1627-44.
8. ลภภรณ์ เล็กล้วน. การสร้างเครื่องมือช่วยในการตัดสินใจพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยประยุกต์ใช้ตัวแบบของคานาโน [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2553.
9. สุรัตน์ ครอบพาณิชย์, อรรถกร เก่งพล. การปรับปรุงคุณภาพในการบริการของธุรกิจทางด้านการขนส่งโดยใช้เทคนิคการแปลงหน้าที่ทางคุณภาพและกระบวนการลำดับขั้นเชิงวิเคราะห์: กรณีศึกษาการขนส่งแบตเตอรี่. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ* 2550; 17(3): 47-56.
10. Barutcu S. mHealth apps design using quality function deployment. *Int J Health Care Qual Assur* 2019; 32(4): 698-708.

ดัชนีชื่อผู้พิมพ์

ว กรมวิทย พ 62 (1-4) 2563

ก			
กษัตริย์ จงปิตุพัทธ์	62: 3: 155-166	จิรภา ศิลาเกษ	62: 3: 220-230
	62: 3: 167-178		62: 3: 231-242
กนกวรรณ ต้นสกุล	62: 4: 372-383	จิราภรณ์ เสวงนา	62: 4: 343-351
กฤษมน โสภณดิลก	62: 3: 167-178		
กฤษณ์ชัย จันทเพ็ชร	62: 3: 220-230		ช
	62: 3: 231-242	ชญาดา ขำสวัสดิ์	62: 4: 352-371
กวีวรรณ มงคลศิริ	62: 3: 167-178	ชญาดา ทองคำแสน	62: 3: 220-230
ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์	62: 2: 86-95		62: 3: 231-242
กิตติมา โสณะมิตร	62: 1: 26-35	ชูศักดิ์ โมลิโต	62: 1: 6-15
เกรียงศักดิ์ ฤชศาศวัต	62: 4: 352-371	ฐิติพร ทานตระกูล	62: 3: 205-219
ข			
ขันทอง เพ็ชรนอก	62: 2: 86-95	ณัฐกุล บุญเนื่อง	62: 3: 194-204
	62: 4: 372-383	ณัฐพร พลแสน	62: 4: 305-329
ขันธทิศา ชัยราช	62: 3: 205-219		
	62: 3: 243-251		ด
		ดนตรี ช่างสม	62: 3: 205-219
			62: 3: 243-251
ค			
คณิศร ลาภอดิศร	62: 3: 220-230	คณาพร สารพฤกษ์	62: 4: 330-342
	62: 3: 231-242	ดารินต์ณัญ บัวทอง	62: 2: 114-122
คำแพ้ว บัวใหญ่	62: 3: 243-251		
จ			
จักรวาล ชมภูศรี	62: 4: 352-371	ตรีทิพย์ รัตนวรชัย	62: 2: 123-132
จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย	62: 2: 59-75		ท
จิตติ จันทรแสง	62: 4: 330-342	ทองศักดิ์ ยี่ละ	62: 2: 114-122
จินดาวรรณ สิริทวินเนติ	62: 1: 16-24	ทรรศนัย มาศจำรัส	62: 3: 252-260
	62: 2: 50-58	ทัศนีย์ ไชยคำ	62: 3: 220-230
จินดาวรรณ สิริทวินเนติ	62: 4: 297-304		62: 3: 231-242
จิราภรณ์ บุญสูง	62: 2: 96-105	ไทเชะ มุขีโรตะ	62: 4: 284-296
จิราภรณ์ เพชรรักษ์	62: 3: 252-260		

ธ		ป	
ธันสกา ธนเดชากุล	62: 3: 133-142	ปนัดดา เทพอัศศร	62: 3: 155-166
	62: 3: 143-154		62: 3: 167-178
	62: 3: 205-219		62: 3: 179-193
ธรรมรัตน์ บุญสูง	62: 2: 96-105		62: 3: 220-230
ธาริยา เสาวรีย์	62: 1: 6-15		62: 3: 231-242
ธีรภมร เพ็งสกุล	62: 2: 114-122	ประถม ทองศรีรักษ์	62: 4: 305-329
		ปานทิพย์ ศิริโชติ	62: 3: 261-267
		เปรมจิต ทั้งตระกูล	62: 2: 114-122
น		พ	
นภวรรณ เชนใจ	62: 3: 205-219		
นฤมล เผื่อนกรบ	62: 2: 59-75		
นลินี แสงทอง	62: 3: 155-166	พรชัย วิริยะศรานนท์	62: 4: 330-342
	62: 3: 167-178	พรทิพย์ ไชยยะ	62: 3: 155-166
นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา	62: 3: 194-204		62: 3: 167-178
	62: 3: 261-267		62: 3: 179-193
	62: 4: 284-296	พริดา เพชรสุวรรณ	62: 4: 330-342
นวลฉวี เวชประสิทธิ์	62: 2: 59-75	พัทธนันท์ ธนพัตสิริกุล	62: 3: 252-260
นันทนัช สีสุวรรณ	62: 1: 36-49	พันธุ์ธิดา ตรียวง	62: 3: 155-166
นันทพร ผลสุวรรณ	62: 4: 330-342		62: 3: 167-178
นันทวรรณ เมฆา	62: 3: 205-219	พายุ ภักดีนวน	62: 4: 352-371
	62: 3: 243-251	พิมลดา ไชยรัตน์	62: 4: 384-394
นาวิ ศรีวรรณ	62: 4: 352-371	พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ	62: 3: 133-142
นิตยา เมธาวณิชพงศ์	62: 4: 330-342		62: 3: 143-154
นิตดา พลโคตร	62: 4: 305-329		62: 3: 205-219
นุสรา สัตย์เพริศพราย	62: 3: 261-267		62: 3: 243-251
บ		ภ	
บัลลังก์ อุปพงษ์	62: 1: 6-15	ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว	62: 1: 16-24
	62: 3: 133-142		62: 2: 50-58
	62: 3: 143-154		62: 4: 297-304
	62: 3: 205-219	ภากร ภิมมย์ทอง	62: 3: 133-142
	62: 3: 243-251	ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ	62: 3: 167-178
	62: 4: 330-342		62: 3: 179-193
บุษราคัม สีนาคม	62: 4: 343-351	ภานุกิจ กันหาจันทร์	62: 4: 352-371
บุญเสริม อ่วมอ่อง	62: 4: 343-351		
บุษราวรรณ ศรีวรรณะ	62: 2: 106-113		

	ม	วันดี มีฉลาด	62: 3: 133-142
มาลินี จิตตกานต์พิชัย	62: 1: 1-5		62: 3: 143-154
	62: 3: 133-142	วัลลภรัตน์ พบศิริ	62: 4: 395-400
	62: 3: 143-154	วารุณี จิรวัดนาพงศ์	62: 4: 305-329
	62: 3: 205-219	วิน เชยชมศรี	62: 1: 16-24
	62: 3: 243-251		62: 2: 50-58
เมทินี นิ่มน้อย	62: 1: 36-49		62: 4: 297-304
เมณะกา วิวน	62: 3: 268-280	วิภาดา ชวัญแก้ว	62: 3: 261-267
		วิมาลา อินอุ๋นโชติ	62: 3: 194-204
			62: 4: 234-296
ยุพเรศ เอื้อตรงจิตต์	62: 1: 26-35	วิโรจน์ พวงทับทิม	62: 3: 220-230
ยุวดี เมตตาเมธา	62: 4: 305-329		62: 3: 231-242
	บ	ศ	
บุษราคัม สีนาคม	62: 4: 345-351	ศศิตา อยู่สุข	62: 1: 36-49
บุญเสริม อ่วมอ่อง	62: 4: 345-351	ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง	62: 4: 305-329
		ศิริพร เหล่ามานะเจริญ	62: 1: 36-49
	ภ	ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์	62: 3: 261-267
ภาณุกิจ กันหาจันทร์	62: 4: 352-371	ศรีสุตา สมัยใหม่	62: 4: 352-371
		โคภิตา กาหลง	62: 3: 205-219
	ร		
รัตน์ระวี บุญเมือง	62: 3: 243-251		ส
รัตนา ตาเจริญเมือง	62: 3: 133-142	สกาลิน ไตรศิริวานิชย์	62: 2: 76-85
		สกุลรัตน์ สุนทรนัตราวัฒน์	62: 3: 167-178
	ล		62: 3: 179-193
ลักสรดา มุ่งมงคล	62: 3: 167-178		62: 3: 220-230
	62: 3: 179-193		62: 3: 231-242
		สดุติ รัตนจรัสโรจน์	62: 4: 305-329
	ว	สรียา เรืองพัฒน์พงศ์	62: 4: 352-371
วงเดือน นาคเนียม	62: 3: 268-280	สมฤดี บุญมี	62: 4: 384-394
วรางคณา อ่อนทรวง	62: 2: 106-113	สิทธิพร ปานเม่น	62: 3: 133-142
วรางลักษณ์ พิมพ์ภัย	62: 3: 220-230	สิทธิรักษ์ รอยตระกูล	62: 2: 59-75
	62: 3: 231-242	สิริชล กาละ	62: 3: 243-251
วราวรรณ วงษ์บุตร	62: 3: 133-142		62: 3: 133-142
	62: 3: 143-154		62: 3: 143-154
วริษฐา แสงดี	62: 3: 194-204	สิริพรรณ แสงอรุณ	62: 3: 205-219
			62: 3: 243-251

สิริภาภรณ์ ผุยกัน	62: 3: 133-142	สรียา เรืองพัฒน์พงศ์	62: 4: 352-371
	62: 3: 143-154	โสภาวดี มูลเมฆ	62: 1: 6-15
สิริลดา สุพรรณคง	62: 3: 261-267		
สุกัญญา วัฒนาโคคยกิจ	62: 4: 284-296	ท	
สุนันท์ทิพย์ ปุจฉาการ	62: 3: 261-267	หทัยกาญจน์ ทนไชย	62: 3: 133-142
สุดาวรรณ เขยชมศรี	62: 1: 16-24		
	62: 2: 50-58	อ	
สุทธิวัฒน์ ลำไย	62: 3: 281-283	อณิชา เลื่องชัยแขวง	62: 3: 167-178
	62: 2: 106-113	อภิชัย ประชาสุภาพ	62: 3: 155-166
สุนทรียา วิยเจริญ	62: 3: 133-142		62: 3: 167-178
	62: 3: 143-154	อมร ประดับทอง	62: 1: 16-24
	62: 3: 243-251		62: 2: 50-58
สุพรรณ ภัทรพรชัยวัฒน์	62: 4: 305-329		62: 4: 297-304
สุภาพร สุภารักษ์	62: 2: 106-113	อัมรา โยวัง	62: 2: 106-113
สุภาภรณ์ แซ่ตัน	62: 3: 252-260	อาชวินทร์ โรจน์วิวัฒน์	62: 3: 167-178
สุมาลี ชะนะมา	62: 3: 179-193		62: 3: 179-193
สุรัคเมธ มหาศิริมงคล	62: 3: 194-204		62: 3: 220-230
	62: 4: 284-296		62: 3: 231-242
สุนิดา เสนาวรานนท์	62: 3: 220-230	อุบลวรรณ ชัยอารยะเลิศ	62: 2: 76-85
	62: 3: 231-242	อุรุธากร จันทรแสง	62: 4: 330-342
สุวิธ ธรรมปาโล	62: 1: 6-15	โอภาส การย์กวินพงศ์	62: 3: 133-142

AUTHOR INDEX

Bull Dept Med Sci 62 (1-4), 2020

A		D	
Amara Yowang	62: 2: 106-113	Danaporn Saraprug	62: 4: 330-342
Amon Praduptong	62: 1: 16-25	Darinnat Buathong	62: 2: 114-122
	62: 2: 50-58	Don Changsom	62: 3: 205-219
	62: 4: 297-304		62: 3: 243-251
Anicha Luengchaichawang	62: 3: 167-178		
Apichai Prachasuphap	62: 3: 155-166	H	
Apichai Prachasuphap	62: 3: 167-178	Hathaikan Thanchai	62: 3: 133-142
Archawin Rojanawiwat	62: 3: 167-178		
	62: 3: 179-193	J	
	62: 3: 220-230	Jakkrawarn Chompoosri	62: 4: 352-371
	62: 3: 231-242	Janthima Jaresitthikunchai	62: 2: 59-75
		Jeerapa Srilaket	62: 3: 220-230
			62: 3: 231-242
B		Jindawan Siruntawineti	62: 1: 16-25
Ballang Uppapon	62: 1: 6-15		62: 2: 50-58
	62: 3: 133-142		62: 4: 297-304
	62: 3: 143-154	Jiraporn Sevana	62: 4: 343-351
	62: 3: 205-219	Jiraporn Phetrak	62: 3: 252-260
	62: 3: 243-251	Jirapun Bunsoong	62: 2: 96-105
	62: 4: 330-342		
Bussarakum Sinakom	62: 4: 343-351	K	
Busarawan Sriwanthana	62: 2: 106-113	Kampaew Buayai	62: 3: 243-251
Boonserm Aumaung	62: 4: 343-351	Kanisorn Larpardisorn	62: 3: 220-230
			62: 3: 231-242
C		Kanogwan Toonsakool	62: 4: 372-383
Chayada Khumsawad	62: 4: 352-371	Kaveewan Mongkolsiri	62: 3: 167-178
Chayada Tongkamsen	62: 3: 220-230	Khanthiwa Chairad	62: 3: 205-219
	62: 3: 231-242		62: 3: 243-251
Chitti Chansang	62: 4: 330-342	Kittima Sonamit	62: 1: 26-35
Chusak Molitto	62: 1: 6-15	Kodcharad Jongpitisub	62: 3: 155-166

Kodcharad Jongpitisub	62: 3: 167–178	Nuanjun Wichukchinda	62: 3: 194–204
Kokeiat Sarttarin	62: 2: 86–95		62: 3: 261–267
Kritchai Jeepod	62: 3: 231–242		62: 4: 284–296
Kritchai Juntaped	62: 3: 220–230	Nuntaporn Phonsuwan	62: 4: 330–342
Kritsamon Sophondilok	62: 3: 167–178	Nusara Satproedprai	62: 3: 261–267
Kuntong Pednog	62: 2: 86–95		
	62: 4: 372–383	O	
Kriangsak Ruchusatsawat	62: 4: 352–371	Opart Karnkawinpong	62: 3: 133–142
L		P	
Lapasrada Mungmongkol	62: 3: 167–178	Pakorn Piromtong	62: 3: 133–142
Lapasrada Mungmongkol	62: 3: 179–193	Panadda Dhepakson	62: 3: 155–166
			62: 3: 167–178
			62: 3: 179–193
M			
Malinee Chittaganphich	62: 1: 1: 5		62: 3: 220–230
Malinee Chittaganpitch	62: 3: 133–142		62: 3: 231–242
Malinee Chittaganpitch	62: 3: 143–154	Pantida Treeyoung	62: 3: 155–166
Malinee Chittaganpitch	62: 3: 205–219		62: 3: 167–178
Malinee Chittaganpitch	62: 3: 243–251	Pantip Sirichote	62: 3: 261–267
Menaka Vivon	62: 3: 268–280	Phanukit Kunhachan	62: 4: 352–371
Methinee Nimnoi	62: 1: 36–49	Parnuphan Panyajai	62: 3: 167–178
			62: 3: 179–193
N		Passaraporn Srimangkornkaew	62: 1: 16–25
Nalinee Saengtong	62: 3: 155–166		62: 2: 50–58
Nalinee Saengtong	62: 3: 167–178		62: 4: 297–304
Nanthanut Seesuwana,	62: 1: 36–49	Payu Bhakdeenuan	62: 4: 352–371
Nanthawan Mekha	62: 3: 205–219	Phatthanan Thanaphatsiriyakul	62: 3: 252–260
Nanthawan Mekha	62: 3: 243–251	Pilailuk Akkapaiboon Okada	62: 3: 205–219
Narumon Phaonakrop	62: 2: 59–75		62: 3: 133–142
Nattaporn Polsan	62: 4: 305–329		62: 3: 143–154
Natthakul Bunnueang	62: 3: 194–204		62: 3: 243–251
Navy Srivarom	62: 4: 352–371	Pornchai Wiriyasaranont	62: 4: 330–342
Nithida Phonkot	62: 4: 305–329	Porntida Petsuwan	62: 4: 330–342
Nittaya Methawanitpong	62: 4: 330–342	Porntip Chaiya	62: 3: 155–166
Noppavan Janejai	62: 3: 205–219		62: 3: 167–178
Nuanchawee Wetprasit	62: 2: 59–75		62: 3: 179–193

Pratom Tongsrirak	62: 4: 305-329	Sukanya Wattanapokayakit	62: 4: 284-296
Premchit Thangtrakul	62: 2: 114-122	Sukontip Putcharkarn	62: 3: 261-267
		Sakwichai Ontong	62: 4: 305-329
R		Sumalee Chanama	62: 3: 179-193
Ratana Tacharoenmuang	62: 3: 133-142	Sunthareeya Waicharoen	62: 3: 133-142
Ratravee Boonmuang	62: 3: 243-251		62: 3: 243-251
			62: 3: 143-154
S		Supaporn Seatan	62: 3: 252-260
Sadudee Rattanajarasroj	62: 4: 305-329	Supaporn Suparak	62: 2: 106-113
Sakalin Trisiriwanich	62: 2: 76-85	Suphan Phattarapornchaiwat	62: 4: 305-329
Sakulrat Soonthornchatrawat	62: 3: 167-178	Surakameth Maharisimongkol	62: 3: 194-204
	62: 3: 220-230		62: 4: 284-296
	62: 3: 231-242	Suttiwat lamyai	62: 3: 281-283
Sakwichai Ontong	62: 4: 305-329		62: 2: 106-113
Sareeya Reungpatthanaphong	62: 4: 352-371	Suwanida Senawaranon	62: 3: 220-230
Sasida Yoosuk	62: 1: 36-49		62: 3: 231-242
Sirichol Kala	62: 3: 243-251	Suwich Thammapalo	62: 1: 6-15
	62: 3: 133-142	Srisuda Samaimai	62: 4: 352-371
	62: 3: 143-154	Sareeya Reungpatthanaphong	62: 4: 352-371
Sirilada Suphankong	62: 3: 261-267		
Siripaporn Phuygun	62: 3: 133-142	T	
	62: 3: 143-154	Taisei Mushiroda	62: 4: 284-296
Siriphan Saeng-aroon	62: 3: 205-219	Tanongsak Yeela	62: 2: 114-122
	62: 3: 243-251	Tassanee Chaiyakum	62: 3: 220-230
Siriphorn Laomanacharoen	62: 1: 36-49		62: 3: 231-242
Srisuda Samaimai	62: 4: 352-371	Thamarat Bunsoong	62: 2: 96-105
Siriwan Chaisomboonpan	62: 3: 261-267	Thanutsapa Thanadachakul	62: 3: 133-142
Sitthiporn Parnmen	62: 3: 133-142		62: 3: 143-154
Sittiruk Roytrakul	62: 2: 59-75		62: 3: 205-219
Somruedee Boonmee	62: 4: 385-396	Thariya Saowarun	62: 1: 6-15
Sopavadee Moonmek	62: 1: 6-15	Thatsanee Masjamras	62: 3: 252-260
Sopita Kalong	62: 3: 205-219	Theerakamol Pengsak	62: 2: 114-122
Sudawan Chaeychomsri	62: 1: 16-25	Thitiphorn Hantragool	62: 3: 205-219
	62: 2: 50-58	Treetip Rattanavalachai	62: 2: 123-132
	62: 4: 297-304		

U		Waritta Sawaengdee	62: 3: 194-204
Ubonwan Chaarayalert	62: 2: 76-85	Warunee Jirawattanapong	62: 4: 305-329
Uruiyakorn Chansang	62: 4: 330-342	Wimala Inunchot	62: 3: 194-204
			62: 4: 284-296
V		Win Chaeychomsri	62: 1: 16-25
Vallerut Pobkeeree	62: 4: 396-401		62: 2: 50-58
			62: 4: 297-304
W		Wiphada Khwankaew	62: 3: 261-267
Walangluk Pimpapai	62: 3: 231-242	Wiroj Puangtabtim	62: 3: 220-230
Wandee Meechalard	62: 3: 133-142	62: 3: 231-242	
	62: 3: 143-154	62: 3: 231-242	
Warangkana Oncoung	62: 2: 106-113	Wongduan Nakniyom	62: 3: 268-280
Warangluk Pimpapai	62: 3: 220-230		
Warawan Wongboot	62: 3: 133-142		Y
Warawan Wongboot	62: 3: 143-154	Yuparaid Uetrongchi	62: 1: 26-35
		Yuwadee Mettametha	62: 4: 305-329

ดัชนีชื่อเรื่อง

ว กรมวิทย พ 62 (1-4), 2563

ก		
การโคลนและการแสดงออก	62: 3: 155-166	การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ น้ำตึจะเซ่ (Crocodylus siamensis) ในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley
โมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ ที่มีศักยภาพในการจับกับไวรัสโคโรนา สายพันธุ์ใหม่ 2019		การทวนสอบวิธีตรวจปริมาณแอนติเจน ของ Diphtheria ในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ
การตรวจ SARS-CoV-2 ในกลุ่ม แรงงานต่างด้าว จังหวัดสมุทรสาคร: ถอดบทเรียนการจัดการเก็บน้ำลาย	62: 3: 261-267	การประเมินการใช้งานตัวอย่างควบคุม คุณภาพชนิดแห้งสำหรับการตรวจวินิจฉัย การติดเชื้อเอชไอวี
การตรวจจโนทัยเปคตัวอย่างดีเอ็นเอ มนุษย์โดยวิธี real-time PCR ด้วยคูไพรเมอร์ <i>CDY-1</i>	62: 4: 284-296	การประเมินคุณภาพชุดทดสอบทาง นำเหลืองวิทยาสำหรับโรคโควิด-19 เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังเร่งด่วน
การเตรียมชุดตัวอย่างสำหรับ การประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคระบบ ทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง ของประเทศไทย	62: 3: 231-242	การประเมินคุณภาพชุดน้ำยาตรวจสอบ พันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR เพื่อขึ้นทะเบียน จำหน่ายในการเฝ้าระวังเร่งด่วน
การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล สำหรับสอบเทียบเครื่องวัดแอลกอฮอล์ จากลมหายใจ	62: 2: 96-105	การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบ ตรวจหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 ในประเทศไทย
การทดสอบความชำนาญของ ห้องปฏิบัติการด้านยา: การหาปริมาณ ด้วยสำคัญด้วยเทคนิคไฮเปอร์ ฟอร์แมนซัลลิดโครมาโทกราฟี	62: 1: 36-49	การประเมินผลเปปไทด์สังเคราะห์ต้าน จุลินทรีย์ต่อ Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus
การทดสอบความชำนาญเพื่อขึ้นทะเบียน ห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ตรวจวินิจฉัย SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time PCR	62: 3: 243-251	การประเมินศักยภาพห้องปฏิบัติการ ตรวจวิเคราะห์ไอโอดีนในเกลือเสริมไอโอดีน
การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ที่มี แอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ เพื่อ สุขอนามัยสำหรับมือด้วยวิธีแก๊ส โครมาโทกราฟี	62: 3: 268-280	การประยุกต์ใช้กับดักไข่ยุง “LeO-Trap” เพื่อลดความหนาแน่นของยุงลายในพื้นที่ ระบาดของโรคไข้เลือดออก จังหวัดสงขลา
		การปลอมปนสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณ และยาสมุนไพรในจังหวัดกระบี่ พังงา และภูเก็ต ระหว่าง พ.ศ. 2559-2562
		การพัฒนาชุดตรวจหลักการอิมมูโนออสโมกราฟี ตรวจทางห้องปฏิบัติการทางนำเหลืองวิทยา โรคโควิด-19

- การพัฒนาชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR 62: 3: 143-154
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงจากน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไมโครอิมัลชัน 62: 4: 352-371
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบแบบแคปซูลกำจัดลูกน้ำยุงสูตวัดเม็ดและประสิทธิภาพการใช้เพื่อควบคุมยุงรำคาญชนิดคิวเล็กซ์ ควินเคฟาสซิเอตัสสายพันธุ์ธรรมชาติ พื้นที่ชายแดนไทย 62: 4: 330-342
- การพัฒนาและประเมินคุณภาพชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดี IgM/IgG ต่อ SARS-CoV-2 ชนิดรวดเร็วโดยอิมมูโนโครมาโตกราฟี 62: 3: 167-178
- การพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี Reverse Transcription Droplet Digital PCR 62: 3: 194-204
- การพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการรองรับการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 62: 3: 252-260
- การศึกษาจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่พบ ณ สนามมวยและสถานบันเทิงในเขตกรุงเทพมหานครของประเทศไทย 62: 3: 133-142
- การสำรวจสิ่งแปลกปลอมในพริกแห้ง 62: 2: 86-95
- ค**
- ความชุกของแอนติบอดีที่พบไม่บ่อยในหญิงคลอดบุตรของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ 62: 2: 114-122
- ความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของน้ำมันจระเข้ (*Crocodylus siamensis*) ผสมกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker) ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar 62: 4: 297-304
- ท**
- เทคนิคการกระจายหน้าที่ทางคุณภาพต่องานบริการห้องปฏิบัติการชันสูตรสาครณสุข 62: 4: 396-401
- เทโลเมียร์/เทโล- เมอเรส เพื่อสุขภาพ 62: 2: 123-132
- ป**
- ประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดยุงลายบ้านโดยการพ่นฝอยละเอียดแบบกึ่งภาคสนาม 62: 4: 345-351
- พ**
- พิษกึ่งเรื้อรังของน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley 62: 2: 50-58
- ฤ**
- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง 62: 4: 305-329
- ส**
- สำรวจการปนเปื้อนพยาธิในผักสดและผลไม้สดจากตลาดสด 5 ภูมิภาคของประเทศไทย 62: 4: 373-384

TITLE INDEX

Bull Dept Med Sci 62 (1-4), 2020

A		D	
A Survey of Filth in Dried Chilies	62: 2: 86-95	Detection of SARS-CoV-2 in Foreign Workers at Samut Sakhon Province: Lessons Learned from Saliva Samples Collection	62: 3: 261-267
A Survey on Parasitic Contamination in Fresh Vegetables and Fresh Fruits from 5 Regional Markets of Thailand	62: 4: 373-384	Development and Evaluation of A Rapid Test for SARS-CoV-2 IgM/IgG Detection by Immunochromatography	62: 3: 167-178
Acute Oral Toxicity of <i>Crocodylus siamensis</i> Bile in Sprague Dawley Rats	62: 1: 16-25	Development of DMSc COVID-19 real-time RT PCR	62: 3: 143-154
Acute Oral Toxicity of Mixed <i>Crocodylus siamensis</i> Oil and <i>Kaempferia parviflora</i> Wall. Ex. Baker in Wistar Rats	62: 4: 297-304	Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of COVID-19	62: 3: 179-193
Adulteration of Traditional and Herbal Medicines with Steroids in Krabi, Phang-nga and Phuket During 2016 - 2019	62: 4: 385-395	Development of Essential Oils-based Microemulsion Larvicide Product for Control of Insecticide-resistant Strain of <i>Aedes aegypti</i> Mosquito Larvae	62: 4: 352-371
An Evaluation for Use of Dried Tube Specimens as Internal Quality Control Samples for HIV Diagnosis	62: 2: 106-113	Development of the Tablet Bacterial Larvicide Formulation and the Effectiveness against Thai-border Population Strains of the Mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	62: 4: 330-342
Antioxidative and Neuroprotective Activities of <i>Oroxylum Indicum</i> Stem Bark Extracts in Mouse Neuroblastoma Cells	62: 4: 305-329		
Application of LeO-Trap on Reduction of <i>Aedes</i> Mosquitoes in Dengue Endemic Areas, Songkhla Province	62: 1: 6-15		
C		E	
Cloning and Expression of Human Monoclonal Antibody with Potent Binding to 2019 Novel Coronavirus COVID-19	62: 3: 155-166 62: 1: 1-5	Efficacy of Insecticides for <i>Aedes aegypti</i> Control by Ultra-Low-Volume Application in semi-field Condition.	62: 4: 343-351
		Establishment of SARS-CoV-2 Quantification by Reverse Transcription Droplet Digital PCR	62: 3: 194-204

Evaluation of Covid-19 Serology Test Kits for Emergency Used Authorization	62: 3: 281-283	Pre-marketing Evaluation of real-time RT PCR Test Kits for SARS-CoV-2 Detection: Thailand Emergency Use Authorization	62: 3: 205-219
Evaluation of Laboratory Performance for Iodine Analysis in Iodized Salt	62: 1: 26-35	Preparation of Ethyl Alcohol Standard Solution for Breath Analyzer Calibration	62: 2: 96-105
Evaluation of Synthetic Antimicrobial Peptides against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus	62: 2: 59-75	Preparation of Panel Samples to Evaluate Antibody Test Kits for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2019 in Thailand	62: 3: 231-242
H			
Human Gender Genotyping Using real-time PCR with <i>CDY-1</i> primers	62: 4: 284-296	Prevalence of Unexpected Maternal Antibodies at Delivery in Songklanagarind Hospital	62: 2: 114-122
L			
Laboratory Capacity Building to Support the Pandemic of Coronavirus Disease 2019	62: 3: 252-260	Proficiency Testing for Pharmaceutical Testing Laboratories: Assay by High Performance Liquid Chromatography	62: 1: 36-49
Laboratory Performance on SARS-CoV-2 Detection by real-time PCR: A Prerequisite Evaluation for DMSc Laboratory Network	62: 3: 243-251	Q	
		Quality Function Deployment for Services in Public Health Laboratory	62: 4: 396-401
M			
Method Validation of Alcohol Contents in Alcohol-based Hand Sanitizer Products Using Gas-chromatography	62: 3: 268-280	SARS-CoV-2 : PUB and Boxing stadium in Bangkok, Thailand	62: 3: 133-142
Method Verification for Determination of Diphtheria Antigen in Diphtheria Vaccine	62: 2: 76-85	Sub-chronic Oral Toxicity of <i>Crocodylus siamensis</i> Bile in Sprague Dawley Rats	62: 2: 50-58
P			
Performance Evaluation of SARS-CoV-2 Antibody Test Kits in Thailand	62: 3: 220-230	T	
		Telomere/Telomerase for Health	62: 2: 123-132

คำขอบคุณ

คณะกรรมการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณท่านผู้เสียสละเวลาอันมีค่าที่ได้ตรวจแก้
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 62 ฉบับที่ 1-4 2563 ดังมีรายนามต่อไปนี้

นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท

นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์

นางวิษชุดา จริยะพันธุ์

นางสุวรรณา จารุสุข

นางสาวทิพวรรณ นิ่งน้อย

นายปรีชา จิงสมานกุล

นายสุธน วงษ์ชีรี

นางชมโฉล ไสินธุสาร

นางกนกพร อธิสุข

นางนพพร อนันต์สินกุล

นางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธ์

นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์

นางสาวจารุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล

ดร.สลักจิต ชุตินพงษ์เวท

นางวิษชุดา จริยะพันธุ์

ดร.เดือนถนนอม พรหมขัติแก้ว

ดร.วิมล เพชรกาญจนางค์

ดร.อุษาวดี ถาวระ

นางสาวมาลินี จิตต์กานต์พิชัย

ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร

รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์

รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทร์โกศล

รศ.ดร.สุวรรณา วรรณัน

รศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์

ผศ.ชญาณิศ ศรชัยธวัชวงศ์

ผศ.ดร.บรรจง เชื้อนแก้ว

ดร.วันดี ยินดียั่งยืน

ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล

ดร.วัลลัรัตน์ พบศิริ

ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย

ดร.วีรยา การพานิช

นางเย็นจิตร เตชะดำรงสิน

ดร.อารีรัตน์ สง่าแสง

ดร.สุมล ปวีตรานนท์

ดร.กัลยา อนุลักษณ์ปกรณ์

ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา



ใบสมัครเป็นสมาชิก วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

ต้องการรับ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เวลา 1 ปี (4 ฉบับ) เป็นเงิน 200.- บาท

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง

☐ ธนาณัติ

☐ ตัวแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

ส่งจ่าย

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบำราศนราดรุณ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

E-mail.....

ส่งจ่าย ปณณ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The Bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Supakit Sirilak Somlerk Jeungsamarn	Phichet Banyati
Technical Advisor	Pimjai Naigowit Panadda Silva Busarawan Sriwanthana	Sumol Pavitranon Duanthanorm Promkhatkaew
Editor	Apiwat Tawatsin	
Assistant Editor	Prapai Wongsinkongman Siripakorn Sangkitporn	Benjawan Phetsuksiri
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana Prasert Auewarakul Danai Tiwawech Suwanna Charunut Salakchit Chutipongvivate Padet Siriyasatien Pornpimol Kongtip Srisurang Tantimavanich Sunee Sirivichayakul Nuanchawee Wetprasit Chanitra Thuwajit Pintip Pongpech Usavadee Thavara Suthon Vongsheree Wichuda Jariyapan Supanee Duangteraprecha Piyada Wangroongsarb Wantana Paveenkittiporn	Siriraj Hospital, Mahidol University Siriraj Hospital, Mahidol University Naresuan University Huachiew Chalermprakiet University The Association of Medical Technologists of Thailand Chulalongkorn University Mahidol University Mahidol University Chulalongkorn University Ramkhamhaeng University Mahidol University Retired Government official Retired Government official Retired Government official Retired Government official Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Administration	Numfon Noiprasert Prasan Julwong Aphimon Jiraphongsathorn Navy Srivarom	Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Thanaaroonkarnpim Co., Ltd. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล



<https://bit.ly/BullDmsc>

