

Thesis Title Mosquito Repellency of Volatile Oils Derived
from Plants

Author Mr. Kittichai Kamsuk

Degree Master of Science (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Chairperson
Assoc. Prof. Wej Choochote	Member
Assist. Prof. Eumpom Rattanachanpichai	Member
Assoc. Prof. Dr. Atchariya Jitpakdi	Member
Assist. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Member

ABSTRACT

Ten plant species, *Amomum xanthioides* (cardamom), *Anethum graveolens* (dill fruits), *Apium graveolens* (celery), *Carum carvi* (caraway), *Curcuma zedoaria* (zedoary), *Foeniculum vulgare* (florence fennel), *Kaempferia galanga* (lesser galangal), *Piper longum* (long pepper), *Zanthoxylum limonella* (sichuan pepper), and *Z. piperitum* (Chinese sichuan pepper) were screened for repellency against laboratory-reared *Aedes aegypti* mosquito. Extraction by steam distillation revealed that percentage yield ranged from 0.54 to 5.72% of volatile oils. The highest yield of volatile oil was obtained from *Z. limonella*, whereas that of *Cu. zedoaria* was the lowest. In the repellent test of individual oils, only three pure oils including *An. graveolens*, *K. galanga*, and *Z. piperitum* exerted potential protection against *Ae. aegypti*, with median complete-protection times of 0.5, 0.25, and 0.5 hours, respectively. The other seven oils were ineffective as a mosquito repellent. However, the protection time of some plant oils including *Cu. zedoaria*, *K. galanga*, *Z. limonella*, and *Z. piperitum* were increased significantly by incorporating 10% vanillin ($P < 0.05$). The highest potential was established from *Z. piperitum* oil + 10% vanillin (2.5 hours, range = 2-2.5 hours). Mixtures of pairs of the 3 most effective oils (*An. graveolens*, *K. galanga*, and *Z. piperitum*), which were established

from individual oil testing, possessed slight repellency that ranged from 0-0.5 hours. None of the oil combinations repelled *Ae. aegypti* for longer than their constituent oil alone, except for 75% *K. galanga* + 25% *Z. piperitum*. With vanillin added, however, each oil mixture provided improved protection, which was approximately equal to oil on its own. *Z. piperitum* fruit oil, which is considered the most effective repellent, was then selected for the analysis of chemical composition and biological stability. The chemical identification achieved by GC/MS analysis revealed that the main component of *Z. piperitum* fruit oil was limonene (37.99%), with minor amounts of sabinene (13.30%) and β -myrcene (7.17%), constituting almost 59% of all the volatile constituents. Testing *Ae. aegypti* against fresh and stored samples of *Z. piperitum* fruit oil, with and without 10% vanillin, demonstrated that repellent activity of *Z. piperitum* oil kept at -20°C or 4°C was present for a period of at least 3 months. During this time the median complete-protection times were 1-2.5 hours, which were similar to those of fresh pure oil. Nevertheless, the biting protection times of pure *Z. piperitum* oil kept at ambient temperature ($24-37^{\circ}\text{C}$) for various durations were different from those of the fresh sample. While the biting protection time of *Z. piperitum* fruit oil was decreased to 0.5 hour after storing at ambient temperature for 1 month, that stored for 2 and 3 months was slightly increased to 0.75 and 1 hour, respectively. The protection time of the oil samples was also increased significantly by the addition of 10% vanillin in all cases of fresh and store samples ($P < 0.05$). In addition to a hot sensation, no adverse effects such as dermal skin irritation, rash, dermatitis or other allergic responses were observed on the skin of volunteers who applied *Z. piperitum* fruit oil, either during 6 months of application or in the following 3 months of follow-up. Therefore, the essential oil of *Z. piperitum* fruit could be an interesting alternative in the development of mosquito repellents when applying as an effective personal protection measure against mosquito bites.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ไลยุงของน้ำมันหอมระเหยจากพืช	
ผู้เขียน	นายกิตติชัย คำสุข	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ประสิดวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. อุดม ชัยทอง	ประธานกรรมการ
	รศ. เวช ชูโชติ	กรรมการ
	ผศ. เอี่ยมพร รัตนชาญพิชัย	กรรมการ
	รศ. ดร. อัจฉริยา จิตต์ภักดี	กรรมการ
	ผศ. ผ่องศรี ทิพวง โกศล	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ไลยุงของน้ำมันหอมระเหยจากพืชกับยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ ได้ทำการคัดเลือกพืชสมุนไพรจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ เร่ว (*Amomum xanthioides*), เทียนตาตักแตน (*Anethum graveolens*), ขึ้นฉ่าย (*Apium graveolens*), ยี่ห่วย (*Carum carvi*), ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*), เทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum vulgare*), เปราะหอม (*Kaempferia galanga*), คีปลี่ (*Piper longum*), มะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) และพริกหอม (*Zanthoxylum piperitum*) มาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) พบว่าพืชทั้งหมดจะให้ผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยประมาณ 0.54-5.72% โดยพืชที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือมะแขว่น ส่วนขมิ้นอ้อยจะให้ผลผลิตต่ำสุด เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยทั้งสิบชนิดมาทดสอบฤทธิ์ไลยุงในห้องปฏิบัติการพบว่า มีน้ำมันหอมระเหยเพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ไลยุง คือ น้ำมันหอมระเหยจากเทียนตาตักแตน, เปราะหอมและพริกหอม โดยสามารถป้องกันยุงกัดได้นาน 0.5, 0.25 และ 0.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยอีก 7 ชนิดที่เหลือไม่มีฤทธิ์ป้องกันยุงกัด อย่างไรก็ตามในการทดสอบฤทธิ์ไลยุงของน้ำมันหอมระเหยที่ผสมด้วย 10% vanillin พบว่ามีสูตรน้ำมันหอมระเหยบางชนิด ได้แก่ สูตรน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นอ้อย, เปราะหอม, มะแขว่นและพริกหอม มีฤทธิ์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสูตรที่ผสมระหว่างน้ำมันหอมระเหยพริกหอมกับ 10% vanillin มีฤทธิ์สูงสุด คือสามารถป้องกันยุงกัดได้นาน 2.5 ชั่วโมง (2-2.5 ชั่วโมง) การทดสอบฤทธิ์ไลยุงของสูตรน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการนำน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ไลยุงสูงสุด 3 ชนิดคือ น้ำมันหอม

ระเหยจากเทียนคาต้กแตน, เปราะหอมและพริกหอมมาผสมกันเป็นคู่ ๆ ในสัดส่วนต่าง ๆ พบว่าสูตรน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมได้ทั้งหมดมีฤทธิ์เพียงเล็กน้อย โดยมีฤทธิ์ป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วงแคบๆ คือ 0-0.5 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ไล่ยุงระหว่างสูตรน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวกับน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว ๆ แต่ละชนิด พบว่าสูตรน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่ที่เตรียมได้จากการผสมน้ำมันหอมระเหยแต่ละคู่กลับมีฤทธิ์ป้องกันยุงที่ต่ำกว่า ยกเว้นสูตรน้ำมันหอมระเหยที่ผสมระหว่างเปราะหอม (75%) กับพริกหอม (25%) จะมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว ๆ อย่างไรก็ตามพบว่าสูตรน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวนี้จะมีฤทธิ์ไล่ยุงสูงขึ้นใกล้เคียงกับฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว ๆ ได้เมื่อนำมาผสมด้วย 10% vanillin ในการศึกษาและวิเคราะห์ทางองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC/MS และทดสอบหาความคงตัวของชีวภาพ (Biological stability) ของน้ำมันหอมระเหยพริกหอมซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ไล่ยุงสูงสุด พบว่า องค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพริกหอม คือ limonene (37.99%) ส่วนองค์ประกอบรองลงมาคือ sabinene (13.30%) และ β -myrcene (7.17%) รวมคิดเป็น 59% ขององค์ประกอบทั้งหมด ในการทดสอบความคงตัวของชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยพริกหอม ซึ่งได้ทำการศึกษาดังฤทธิ์ไล่ยุงลาย *Ae. aegypti* ของน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมได้ใหม่ ๆ เปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่เก็บไว้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าน้ำมันหอมระเหยพริกหอมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และ 4°C มีฤทธิ์คงเดิมอย่างน้อย 3 เดือน คือมีฤทธิ์ไล่ยุงที่เทียบเคียงกันกับน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมใหม่ ๆ โดยสามารถป้องกันยุงกัดได้นาน 1-2.5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำมันหอมระเหยพริกหอมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิปกติของสภาวะแวดล้อม (Ambient temperature: $24-37^{\circ}\text{C}$) ณ เวลาต่าง ๆ มีฤทธิ์ป้องกันยุงที่แตกต่างกัน คือ เมื่อเก็บไว้นาน 1 เดือนจะมีฤทธิ์ป้องกันยุงลดลงเป็น 0.5 ชั่วโมง แต่เมื่อเก็บไว้นานขึ้นเป็นเวลา 2 และ 3 เดือน กลับสามารถป้องกันยุงได้นานมากขึ้นเป็น 0.75 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่เก็บไว้เหล่านี้มาผสมกับ 10% vanillin พบว่ามีฤทธิ์ป้องกันยุงได้นานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในการศึกษาฤทธิ์ไล่ยุงของน้ำมันหอมระเหยตลอดระยะเวลา 6 เดือนที่ทำการศึกษาดังกล่าวและอีก 3 เดือนของการติดตามผลพบว่า น้ำมันหอมระเหยพริกหอมไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคือง, ผื่นแดง, อักเสบ หรือผลเสียใด ๆ ต่อผิวหนังของอาสาสมัครเลย ยกเว้นในอาสาสมัครบางรายจะรู้สึกร้อนเล็กน้อยบริเวณที่ทาสาร ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยพริกหอมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นสารไล่ยุง (Repellents) ที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ป้องกันยุงกัดได้ต่อไป