รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนวิจัย มก.ปีงบประมาณ 2552

รหัสโครงการวิจัย ก-ษ(ด)25.52
การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อใช้ในการป้องกันมาลาเรีย
Screening of extracts from marine organisms for preventing malaria

หัวหน้าโครงการ ผศ.พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์
หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง บางเขน
หน่วยงานหลัก ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง บางเขน

แหล่งทุน : ทุนอุดหนุนวิจัย มก.
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ระยะเวลาวิจัย 1 ปี (ปีงบประมาณ 2552)

แบบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย (Project)

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการวิจัย

1.1 รหัส ก-ษ(ด)25.52 ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อใช้ในการป้องกันมาลาเรีย

1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ ผศ.พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์

1.4 หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง บางเขน

หน่วยงานหลัก ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง บางเขน

1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ปีงบประมาณ 2552

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล

- ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 250,000.00 บาท ประกอบด้วย

ปีงบประมาณ 2552 ได้รับ 250,000.00 บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. พัฒนานวัตกรรมการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล
2. คัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ที่มีคุณสมบัติต้านมาลาเรีย เพื่อใช้เป็นแหล่งในการพัฒนายาต้านมาลาเรีย
3. ศึกษาหมู่ทางเคมีของสารที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี TLC

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีงบประมาณ	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
2552	1-6	ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ซึ่งยุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย ดังนั้นถ้าสามารถป้องกันไม่ให้มียุงก้นปล่อง ก็จะเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันมาลาเรีย โดยนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สกัดด้วยเอทธานอลและน้ำ 84 สาร โดยสิ่งมีชีวิตที่นำมาสกัดแบ่งเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีการใช้ในชุมชนพื้นบ้าน เพื่อเป็นยารักษาโรค ได้แก่ ไม้ป่าชายเลน กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานความเป็นพิษ เช่น ฟองน้ำ ปะการังอ่อน ทากทะเล และกลุ่มสิ่ง

มีชีวิตที่พบเห็นได้ทั่วไปในบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง เช่น สาหร่ายทะเล หญ้าทะเล ปลิงดำ เป็นต้น นำสารสกัดที่เตรียมได้มาทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ซึ่งคาดว่าน่าจะคัดเลือกสิ่งมีชีวิตได้อย่างน้อย 20% จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีศักยภาพในการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นในช่วงที่ทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตาย 0-100 % เพื่อหาค่า LC50 และทดสอบเปรียบเทียบส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตที่แสดงความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง นอกจากนั้นยังมีการทดสอบความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ในชุมชน โดยการนำสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ไปใส่อ่างและวางทดสอบตามที่อยู่อาศัยบริเวณที่มักพบมีลูกน้ำยุงเมื่อมีน้ำขัง เพื่อศึกษาว่าในสภาวะที่เป็นจริง สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่คัดเลือกได้จากการศึกษานี้ มีความเป็นไปได้ในการป้องกันยุงได้หรือไม่ เพื่อการประยุกต์ไปใช้ในชุมชนท้องถิ่นได้อย่างแท้จริง

7-12 ศึกษาวิธีการป้องกันมาลาเรียอีกวิธีหนึ่ง คือ การพัฒนายาต้านมาลาเรีย ซึ่งในการศึกษานี้จะทำการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถต้านมาลาเรีย โดยการใช้วิธีการทางเคมี ซึ่งมาจากการศึกษากลไกในการทำให้เกิดมาลาเรียของเชื้อโปรโตซัว ซึ่งเมื่อเข้าไปกินเม็ดเลือดแดงในมนุษย์แล้ว จะสร้างรงควัตถุตัวหนึ่งเพื่อไม่ให้เป็นพิษต่อตัวเองชื่อว่า Hemozoin ดังนั้นสารที่ยับยั้งการสร้าง Hemozoin ได้ก็จะทำให้โปรโตซัวตาย ในการศึกษานี้ใช้วิธีการศึกษาการยับยั้งสารที่ชื่อว่า ?-hematin ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์เลียนแบบ Hemozoin ดังนั้นสารที่ยับยั้ง ?-hematin ก็จะทำให้โปรโตซัวตาย ซึ่งกลไกนี้ก็ได้มีรายงานพบในยารักษามาลาเรียที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้ด้วย โดยจะเตรียมสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลในกลุ่มที่มีรายงานว่ามีการสร้างสารต้านมาลาเรีย เช่น ฟองน้ำ กัลปังหา รวมทั้งสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ อย่างน้อย 50 ชนิด โดยเตรียมในรูปของสารสกัดด้วยเมทธานอล และนำไปทดสอบด้วยวิธีการทางเคมี ซึ่งสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป คาดว่าน่าจะมีสารที่สามารถยับยั้ง ?-hematin ได้อย่างน้อย 20% นอกจากนั้นยังทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสารที่คัดเลือกได้จากการศึกษานี้ต่อไป

1.11 สรุปผลการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

- วัตถุประสงค์ (ตามแผน)

1.ธ.ค. 51 : เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการทดสอบการกำจัดลูกน้ำยุง 20 ชนิด
ม.ค.–ก.พ.52 : เตรียมสารสกัดสำหรับใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง
มี.ค.-พ.ค.52 : นำสารสกัดจำนวน 40 สารมาทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง
พ.ค. 52 : รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1
มิ.ย. 52 : เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลเพิ่มเติมให้ได้ 40 ชนิด
มิ.ย – ก.ค 52 :เตรียมสารสกัด 80 สาร และทดสอบการยับยั้งมาลาเรีย
ต.ค.52: ศึกษากลุ่มของสารที่คาดว่าออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย TLC
พ.ย.52 : วิเคราะห์ผล สรุป และส่งรายงานและเตรียมการเสนอผลงานวิจัย

- เป้าหมาย/ผลที่คาด (ตามแผน)

1.1. สามารถคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยกำหนดให้กลุ่มเป้าหมายมีค่า LC50 < 100 mg/L

2. สามารถคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถยับยั้งมาลาเรีย คาดว่าประมาณ 30 %

- ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)

1.1.เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลมาทำการทดสอบได้ 42 ชนิด
2.สามารถเตรียมสารสกัดเป็น 2 กลุ่มตามเป้าหมายได้สารสกัดทั้งหมด 84 สาร
3.สามารถคัดเลือกสารสกัดเบื้องต้นที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ความเข้มข้นสูงคือ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 25 สารคิดเป็น 29.76 %
4.นำสารสกัดที่คัดเลือกได้ในการทดสอบเบื้องต้น 25 สาร มาดำเนินการทดสอบที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องที่มีค่า LC50 ต่ำกว่า 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร 6 สาร โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดมาจากผลเถาถอบแถบ มีค่า LC50 เท่ากับ 405.69 มิลลิกรัม ต่อลิตร
5. ส่วนต่างๆของเถาถอบแถบและการใช้สารสกัดที่แตกต่างกันมีผลทำให้ความเป็นพิษแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเถาถอบแถบเป็นพันธ์ไม้ในป่าชายเลน หาได้ง่ายในชุมชนท้องถิ่น และมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงสูงสุด เมื่อทดสอบในบ้านบริเวณชุมชนที่เก็บตัวอย่าง พบว่ามีความเป็นไปได้เบื้องต้นในการใช้สารสกัดจากเถาถอบแถบกำจัดลูกน้ำยุงในชุมชนท้องถิ่น เนื่องจากไม่พบลูกน้ำยุงในชุดทดสอบ
6.เตรียมสารสกัดจากสิ่งมีชีวิต ในทะเลได้185 สาร และนำมาเตรียมต่อให้ได้ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป
7.สามารถคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ยับยั้ง ?-hematin ได้ 42 สาร คิดเป็น ร้อยละ 22.70
8. พบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ?-hematin สูงสุดมี 6 สาร จากสาหร่าย 1 สาร หญ้าทะเล 1 สาร ไม้ป่าชายเลน 2 สาร และฟองน้ำ 2 สาร

9.สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ?-hematin มีหมู่ของสารที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพ ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟีนอล แอนทราควิโนน คูมาริน เทอร์พีน

1.12 ผลการดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนหรือไม่ อย่างไร

- เป็นไปตามแผน

1.13 ปัญหา อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

มีปัญหาและอุปสรรคด้านวิชาการ

- เอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องกับการนำสิ่งมีชีวิตในทะเลมาใช้ในการศึกษาการกำจัดลูกน้ำยุงในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูล ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยการนำพืชสมุนไพรมาทำการทดสอบ จึงต้องมีการทดลองหาค่าระดับความเข้มข้นต่างๆ ทั้งหมด จึงต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษาค่อนข้างมาก ในส่วนของการศึกษาการยับยั้ง ?-hematin ต้องใช้เวลาในการเตรียมสารค่อนข้างนาน เนื่องจากความจำกัดในจำนวนเครื่องมือคือ Rotary evaporator และการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง well plate reader spectrophotometer ซึ่งต้องขอความอนุเคราะห์จากหน่วยงานอื่น ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการจองใช้เครื่อง

มีปัญหาและอุปสรรคด้านอื่นๆ

- ผลการดำเนินการวิจัยส่วนใหญ่เป็นไปตามแผนหลักที่ระบุไว้ และยังสามารถคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่นำมาเตรียมสารสกัดจำนวนมากกว่าที่ระบุไว้ในแผน ซึ่งจะทำให้โอกาสที่จะพบสารสกัดที่ออกฤทธิ์ป้องกันมาลาเรียทั้งในลักษณะการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง และสารที่มีคุณสมบัติต้านการสร้างรงควัตถุของโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียมีมากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญของการทดสอบในครั้งนี้ คือ ลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ใช้ในการทดสอบ เป็นลูกน้ำยุงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ซึ่งค่อนข้างใช้ระยะเวลาในการรอซื้อตัวอย่างลูกน้ำแต่ละครั้งนาน เนื่องจากสถาบันมีภารกิจในการผลิตลูกน้ำยุง เพื่อใช้ในงานวิจัยของสถาบันเองด้วย และลูกน้ำยุงก้นปล่องค่อนข้างเลี้ยงได้ยาก และคณะผู้วิจัยก็ไม่มีห้องปฏิบัติการและความเชี่ยวชาญในการผลิตลูกน้ำยุงก้นปล่องได้เอง ทำให้การทดสอบแต่ละครั้งไม่ต่อเนื่อง การทดสอบต้องใช้ระยะเวลาในการรอลูกน้ำยุงก้นปล่องนาน 1-2 เดือน และได้จำนวนลูกน้ำยุงก้นปล่องไม่มากเท่าที่ต้องการ การทดสอบซ้ำได้จำนวนซ้ำไม่มากเท่าที่ควร แต่ก็เพียงพอต่อการคำนวณค่าทางสถิติ ในการทดสอบภาคสนาม ทำการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการเปียกและบริเวณรอบๆ อาคารภาควิชา ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากไม่มีลูกน้ำยุงในชุดทดสอบใดๆ เลย ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณยุงมีไม่มากและพื้นที่ทดสอบกว้างมีคนเข้าออกตลอดเวลา แต่การทดสอบที่บ้านเรือนในชุมชนป่าชายเลน ได้ผลในระดับหนึ่งที่มองเห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ แต่ยังทำการทดสอบไม่ได้มาก เนื่องจากระยะเวลาในการศึกษาจำกัด

แนวทางการแก้ไข

- ขอความร่วมมือจากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในการใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านค่าจาก well plate ได้

1.14 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ

1.15 ผลผลิต/สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs)

- อื่นๆ (ระบุ)

สนับสนุนการเรียนการสอนวิชาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (255521) วิชานิเวศวิทยาเคมีทางทะเล (255448) และวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (255421) และการทำปัญหาพิเศษและวิทยานิพนธ์ของนิสิตภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง

1.16 จุดเด่นของผลงานวิจัย / ผลผลิต / สิ่งที่ได้จากการวิจัย (outputs)

- สร้างองค์ความรู้ใหม่/นวัตกรรมที่ทันสมัย

องค์ความรู้ใหม่ในเรื่องสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

- พัฒนาภูมิปัญญาท้องถิ่น

การใช้สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลในการกำจัดยุงในชุมชนท้องถิ่นบริเวณที่เก็บตัวอย่าง

1.17 การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

1. การนำผลการวิจัยไปเผยแพร่/ถ่ายทอด

1.1 วารสารวิชาการระดับชาติ/วารสารวิชาการระดับนานาชาติ

-

1.2 นำเสนอในการประชุม/สัมมนาระดับชาติและนานาชาติ 2 เรื่อง

นำเสนอในการประชุม/สัมมนาระดับชาติ

- ลักษณะเอกสาร/รูปแบบการนำเสนอ : บทความเต็มรูปแบบ/ภาคโปสเตอร์

- ชื่อผู้เสนอผลงาน : พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์ วีระพงษ์ ศรีโฉมงาม เยาวนารถ พลายมาต และ สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ

- ชื่อเรื่อง : การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อควบคุมลูกน้ำยุงที่เป็นพาหะนำโรค

- ชื่อการประชุมสัมมนา : การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- วัน/เดือน/ปี : จาก 3 ก.ค. 2553 ถึง 5 ก.ค. 2553

- สถานที่/เมือง/ประเทศ : กรุงเทพ

- หน้า : 345 ถึง 353

นำเสนอในการประชุม/สัมมนาระดับชาติ

- ลักษณะเอกสาร/รูปแบบการนำเสนอ : บทความเต็มรูปแบบ/ภาคโปสเตอร์

- ชื่อผู้เสนอผลงาน : พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์, วีระพงศ์ ศรีโฉมงาม, เยาวนารถ พลายมาต และ สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ.

- ชื่อเรื่อง : การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง –haemtin เพื่อใช้เป็นสารต้านมาลาเรีย

- ชื่อการประชุมสัมมนา : การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- วัน/เดือน/ปี : จาก 4 ก.พ. 2554 ถึง 5 ก.พ. 2554

- สถานที่/เมือง/ประเทศ : กรุงเทพ

- หน้า : 391 ถึง 399

1.3 เผยแพร่ผลงานในรูปแบบการจัดนิทรรศการ

-

1.4 บทความ

-

1.5 จัดอบรมถ่ายทอด

-

1.6 นำเสนอทางสื่อผสม

-

1.7 ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย

-

1.9 อื่นๆ

-

2. เป้าหมายการนำผลลัพธ์ / ผลสำเร็จที่ได้ / หรือคาดว่าจะได้จากการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1 . ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน

- วิชาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (255521) วิชานิเวศวิทยาเคมีทางทะเล (255448) และวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (255421) และการทำปัญหาพิเศษและวิทยานิพนธ์ของนิสิตภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง

2 . ด้านอุตสาหกรรม

- เป็นการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพ ไปพัฒนาเป็นสารกำจัดลูกน้ำยุงและพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรีย

3 . ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม

- เป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในทะเลให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด และพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้แก่สารกำจัดลูกน้ำยุงจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

4 . ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย

- คัดเลือกสารกำจัดลูกน้ำยุงที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสารกำจัดลูกน้ำยุงไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม และคัดเลือกแหล่งของสารต้านมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพในการรักษามาลาเรียและไม่มีผลข้างเคียงต่อร่างกาย

5 . นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป

- นำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงและฤทธิ์ต้านมาลาเรียอย่างเด่นชัด ไปทำการวิจัยขั้นต่อไป โดยการแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างทางเคมี เพื่อให้สามารถสังเคราะห์ใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม

1.18 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ด้านใด

- ยุทศาสตร์การบริหารราชการแผ่นดิน (พ.ศ.2548 - 2551)

1 . ยุทธศาสตร์การพัฒนาคุณภาพคนและสังคมไทยสู่สังคมแห่งภูมิปัญญาและการเรียนรู้

เป้าประสงค์ การเสริมสร้างสุขภาวะคนไทยให้มีสุขภาพแข็งแรงทั้งกายและใจ มีความสัมพันธ์ทางสังคม และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่น่าอยู่

2 . ยุทธศาสตร์การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม

เป้าประสงค์ การพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ และภูมิปัญญาท้องถิ่น

- นโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ(พ.ศ.2551 - 2553)

ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 4 การเสริมสร้างและพัฒนาทุนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การบริหารจัดการและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน

1.19 การรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา

-

1.20 การได้รับรางวัล

- ได้รับรางวัล รางวัลที่ 2 ผลงานภาคโปสเตอร์การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รับรางวัลเมื่อ 2 ก.พ. 2553

1.21 งานที่จะทำต่อไป

- การศึกษาเพิ่มเติมในการนำไปใช้ประโยชน์ในชุมชนท้องถิ่น โดยเพิ่มชุดทดสอบตามบ้านเรือนให้มากขึ้น และนำสารที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงที่ได้จากสัตว์ทะเล ซึ่งมีข้อจำกัดในปริมาณวัตถุดิบ รวมทั้งสารที่มีคุณสมบัติยับยั้ง ?-hematin ไปศึกษาพัฒนาในขั้นตอนต่อไป คือการแยกและทำให้สารบริสุทธิ์ และการตรวจหาโครงสร้างของสาร ซึ่งจะได้ขอความร่วมมือจากหน่วยงานที่มีความเชี่ยวชาญทางเคมี และมีเครื่อง HPLC เพื่อร่วมมือในการพัฒนาองค์ความรู้พื้นฐานที่ได้จากการศึกษานี้ ให้สามารถพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันมาลาเรียต่อไป

1.22 คำชี้แจงเพิ่มเติม

-

1.23 ได้แนบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project) ตามหัวข้อในส่วนที่ 2 มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(ผศ.พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์)

27 ก.ค. 2555

ส่วนที่ 2 **รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์**

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยรหัส ก-ย(ด)25.52

การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อใช้ในการป้องกันมาลาเรีย

Screening of extracts from marine organisms for preventing malaria

(1)พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์, (2)สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ, (3)นางเยาวนารถ พลายมาต

(1)Puntip Wisespongpand, (2)Suriyan Tunkijjanukij, (3)

บทคัดย่อ

ศึกษาการนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมาใช้ในการป้องกันมาลาเรียเป็น 2 หัวข้อหลัก คือ การควบคุมปริมาณยุงโดยการใช้สารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมากำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง และการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีคุณสมบัติต้านมาลาเรีย โดยศึกษาจากกลไกการยับยั้งสาร ?-hematin ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง 25 สาร คิดเป็นร้อยละ 29.76 ของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ โดยทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตายอย่างน้อย 50% ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารสกัดที่มาจากกลุ่มฟองน้ำและปะการังอ่อนมากที่สุดคือ กลุ่มละ 8 สาร โดยสารสกัดจากผลเถาถอบแถบด้วยเอทธานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยมีค่า LC50 ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 405.69 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสารสกัดจากผลเถาถอบแถบด้วยเอทธานอลมีความเป็นพิษสูงสุด แตกต่างจากสารสกัดจากใบและกิ่งก้านอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการทดสอบเบื้องต้นในภาคสนาม พบว่าสารสกัดจากผลเถาถอบแถบด้วยเอทธานอลมีความเป็นไปได้มากที่สุดในการนำไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงในชุมชนท้องถิ่น เนื่องจากสามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้รวมทั้งมีปริมาณมากและสามารถเก็บตัวอย่างได้ง่าย ส่วนสารสกัดจากกลุ่มสัตว์ทะเลที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง คือ สารสกัดด้วยเอทธานอลจากกัลปังหา unidentified sea fan 01 ปะการังอ่อน Cladiella sp. และฟองน้ำ Acanthella sp. โดยมีค่า LC50 ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 638.62, 736.53 และ 874.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารสกัดจากน้ำที่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด คือ สารสกัดจากกัลปังหา unidentified sea fan 02 ปะการังอ่อน Alcyonium sp. และ Sinularia sp. โดยมีค่า LC50 ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1,030.78, 1,051.60 และ 1,162.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องส่วนใหญ่จะเป็นสารสกัดด้วยเอทธานอล ในการศึกษานี้ยังสามารถคัดเลือกสิ่งมีชีวิตในทะเลมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารที่จะพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียด้วยกลไกการยับยั้ง ?-hematin จำนวน 42 สาร คิดเป็นร้อยละ 22.70 โดยสารสกัดที่มีศักยภาพในการจะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียได้ดี โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่โดดเด่น คือ สารสกัดจากต้นฝาดขาว (Lumnitzera racemosa) ฟองน้ำสีม่วง (Neopetrosia sp.) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Brachytrichia quoyi) หญ้าทะเล (Cymodocea rotundata) ผลของเถาถอบแถบ (Derris

trifoliata) และฟองน้ำ (Pseudoceratina purpurea) ตามลำดับ ซึ่งจากการตรวจสอบหมู่ทางเคมีที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง ?-hematin ด้วย TLC คาดว่าจะเป็นหมู่อัลคาลอยด์ ฟีนอล แอนทราควิโนน แอนโทรน และคูมาริน การศึกษานี้เป็นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ในการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล เพื่อพัฒนาเป็นสารกำจัดลูกน้ำยุง ทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และพัฒนาเป็นสารต้านมาลาเรียใช้ในการป้องกันมาลาเรียต่อไป

คำสำคัญ : มาลาเรีย ยุงก้นปล่อง สารสกัดจากสิ่งมีชีว

ABSTRACT

The screening of marine extracts for malaria control in this study were performed in 2 objectives, for control the mosquito vector (Anopheles dirus) and screening for antimalarial substances with possessed ?-hematin inhibition activity. The results showed that totally 25 extracts (29.76%) were showed larvicidal activities against A. dirus with the mortalities above 50% at concentration of 5,000 mg/L. These toxic extracts were almost from sponge and soft coral with 8 extracts for each group. The ethanol extract from Derris trifoliata's seed showed the most potent larvicidal activity with LC50 values at 24 hrs. of 405.69 mg/L. The extracts from the seed of this plant also showed significantly different larvicidal activity from its blades and stems. ($P<0.05$). The larvicidal assay performed in the field experiments also support the usage of ethanol extracts of D. trifoliata's seed in local area from theirs potent toxicities including the sufficient amount and the accessibility of sample collection. The extracts from marine animals which showed promising larvicidal activities against A. dirus were ethanol extracts of unidentified sea fan 01, soft coral (Cladiella sp.) and sponge (Acanthella sp.) with LC50 values at 24 hrs. of 638.62, 736.53 and 874.16 mg/L, respectively. The aqueous extracts with high toxicities were from unidentified sea fan 02, soft coral (Alcyonium sp.) and soft coral (Sinularia sp.) with LC50 values at 24 hrs. of 1,030.78, 1,051.60 และ 1,162.50 mg/L, respectively. This also indicted that the ethanol extracts had potent toxicity than aqueous extracts.

For antimalarial substances, the marine extracts were screened by ?-hematin inhibition assay. Totally 42 extracts (22.70%) showed ?-hematin inhibition activities. The most potent activity with the highest absorbance values were belonged to the extracts of mangrove tree (Lumnitzera racemosa), blue sponge (Neopetrosia sp.), blue green algae (Brachytrichia quoyi) seagrass (Cymodocea rotundata), mangrove's seed (Derris trifoliata) and sponge (Pseudoceratina purpurea) The chemical investigation by TLC supposed the moiety with showed ?-hematin inhibition activity should be alkaloid, phenol, anthraquinone, anthrone, and coumarin. This study used the biotechnology with friendly to environment for screening marine extracts to control the mosquito vectors as an alternative from the toxic chemicals to the environment and antimalarial substances will be further develop for malaria control.

Key words : Malaria, mosquito larvae, marine extract

---

(1)ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง บางเขน

(1)Faculty of Fisheries

(2)คณะประมง บางเขน

(2)Faculty of Fisheries

(3)สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 8 จ.ราชบุรี สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาต

(3)

ส่วนที่ 2 **รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์**
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552
โครงการวิจัยรหัส ก-ษ(ด) 25.52

การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อใช้ในการป้องกันมาลาเรีย

(Screening of marine extracts for malaria control)

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์[1] เยาวนารถ พลายมาต[2] และ สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ[1]
Puntip Wisespongpand[1] Yaowanart Plaimart[2] and Suriyan Tunkijjanukij[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมาใช้ในการป้องกันมาลาเรียเป็น 2 หัวข้อหลัก คือ การควบคุมปริมาณยุงโดยการใช้สารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมากำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง และการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีคุณสมบัติต้านมาลาเรีย โดยศึกษาจากกลไกการยับยั้งสาร β-hematin ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง 25 สาร คิดเป็นร้อยละ 29.76 ของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ โดยทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตายอย่างน้อย 50% ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารสกัดที่มาจากกลุ่มฟองน้ำและปะการังอ่อนมากที่สุด คือ กลุ่มละ 8 สาร โดยสารสกัดจากผลเถาถอบแถบด้วยเอทธานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 405.69 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสารสกัดจากผลเถาถอบแถบด้วยเอทธานอลมีความเป็นพิษสูงสุด แตกต่างจากสารสกัดจากใบและกิ่งก้านอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการทดสอบเบื้องต้นในภาคสนาม พบว่าสารสกัดจากผลเถาถอบแถบด้วยเอทธานอลมีความเป็นไปได้มากที่สุดในการนำไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงในชุมชนท้องถิ่น เนื่องจากสามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้รวมทั้งมีปริมาณมากและสามารถเก็บตัวอย่างได้ง่าย ส่วนสารสกัดจากกลุ่มสัตว์ทะเลที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง คือ สารสกัดด้วยเอทธานอลจากกัลปังหา unidentified sea fan 01 ปะการังอ่อน *Cladiella* sp. และฟองน้ำ *Acanthella* sp. โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 638.62, 736.53 และ 874.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารสกัดจากน้ำที่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด คือ สารสกัดจากกัลปังหา unidentified sea fan 02 ปะการังอ่อน *Alcyonium* sp. และ *Sinularia* sp. โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1,030.78, 1,051.60 และ 1,162.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องส่วนใหญ่จะเป็นสารสกัดด้วยเอทธานอล

[1] *ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University
[2] *สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 8 จ.ราชบุรี*
Regional Environmental Office 8, Rachaburi province

ในการศึกษานี้ยังสามารถคัดเลือกสิ่งมีชีวิตในทะเลมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารที่จะพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียด้วยกลไกการยับยั้ง β-hematin จำนวน 42 สาร คิดเป็นร้อยละ 22.70 โดยสารสกัดที่มีศักยภาพในการจะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียได้ดี โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่โดดเด่น คือ สารสกัดจากต้นฝาดขาว (*Lumnitzera racemosa*) ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Brachytrichia quoyi*) หญ้าทะเล (*Cymodocea rotundata*) ผลของเถาถอบแถบ (*Derris trifoliata*) และฟองน้ำ (*Pseudoceratina purpurea*) ตามลำดับ ซึ่งจากการตรวจสอบหมู่ทางเคมีที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง β-hematin ด้วย TLC คาดว่าจะเป็นหมู่อัลคาลอยด์ ฟีนอล แอนทราควิโนน แอนโทรน และคูมาริน

การศึกษานี้เป็นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ในการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล เพื่อพัฒนาเป็นสารกำจัดลูกน้ำยุง ทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และพัฒนาเป็นสารต้านมาลาเรียใช้ในการป้องกันมาลาเรียต่อไป

ABSTRACT

The screening of marine extracts for malaria control in this study were performed in 2 objectives, for control the mosquito vector (*Anopheles dirus*) and screening for antimalarial substances with possessed β-hematin inhibition activity. The results showed that totally 25 extracts (29.76%) were showed larvicidal activities against *A. dirus* with the mortalities above 50% at concentration of 5,000 mg/L. These toxic extracts were almost from sponge and soft coral with 8 extracts for each group. The ethanol extract from *Derris trifoliata*'s seed showed the most potent larvicidal activity with LC_{50} values at 24 hrs. of 405.69 mg/L. The extracts from the seed of this plant also showed significantly different larvicidal activity from its blades and stems. ($P<0.05$). The larvicidal assay performed in the field experiments also support the usage of ethanol extracts of *D. trifoliata*'s seed in local area from theirs potent toxicities including the sufficient amount and the accessibility of sample collection. The extracts from marine animals which showed promising larvicidal activities against *A. dirus* were ethanol extracts of unidentified sea fan 01, soft coral (*Cladiella* sp.) and sponge (*Acanthella* sp.) with LC_{50} values at 24 hrs. of 638.62, 736.53 and 874.16 mg/L, respectively. The aqueous extracts with high toxicities were from unidentified sea fan 02, soft coral (*Alcyonium* sp.) and soft coral (*Sinularia* sp.) with LC_{50} values at 24 hrs. of 1,030.78, 1,051.60 และ 1,162.50 mg/L, respectively. This also indicted that the ethanol extracts had potent toxicity than aqueous extracts.

For antimalarial substances, the marine extracts were screened by β-hematin inhibition assay. Totally 42 extracts (22.70%) showed β-hematin inhibition activities. The most potent activity with the highest absorbance values were belonged to the extracts of mangrove tree (*Lumnitzera*

racemosa), blue sponge (*Neopetrosia* sp.), blue green algae (*Brachytrichia quoyi*) seagrass (*Cymodocea rotundata*), mangrove's seed (*Derris trifoliata*) and sponge (*Pseudoceratina purpurea*) The chemical investigation by TLC supposed the moiety with showed β-hematin inhibition activity should be alkaloid, phenol, anthraquinone, anthrone, and coumarin.

This study used the biotechnology with friendly to environment for screening marine extracts to control the mosquito vectors as an alternative from the toxic chemicals to the environment and antimalarial substances will be further develop for malaria control.

Key Words : สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ยุงพาหะ สารกำจัดลูกน้ำยุง สารต้านมาลาเรีย เถาถอบแถบ, ฝาดขาว marine extracts, mosquito vectors, larvicidal, antimalarial substances, *Derris trifoliate, Lumnitzera racemosa*

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่คนไทยรู้จักกันมาเป็นเวลานานแล้ว พบในคนทุกเพศทุกวัยโดยเฉพาะเด็กและสตรีมีครรภ์ มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* โดยมียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค ผู้ที่ได้รับเชื้อมาลาเรียที่ไม่ได้รับการรักษาที่ถูกวิธีมักจะเสียชีวิต ทั้งนี้องค์การอนามัยโลกได้รายงานว่าทั่วโลกมีผู้ที่ป่วยเป็นมาลาเรียปีละไม่ต่ำกว่า 500 ล้านคน และมีผู้ที่เสียชีวิตปีละไม่ต่ำกว่า 1 ล้านคน (WHO, 2007; 2010) สำหรับประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยเป็นมาลาเรียในปี 2549-2552 คือ 16,764 21,509, 26,064 และ 22,843 คน ตามลำดับ โดยพบผู้ป่วยเป็นจำนวนมากตามจังหวัดที่อยู่ในเขตชายแดนและมีป่าทึบ ทั้งนี้มีรายงานผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากมาลาเรียในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาประมาณ 200-600 คน (เครือข่ายข้อมูลข่าวสารโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2552) ทำให้มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย

มาลาเรียเป็นโรคที่มียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เป็นมาลาเรียเบื้องต้นคือการป้องกันไม่ให้ถูกยุงก้นปล่องกัดโดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้มุ้งหรือตาข่ายป้องกัน การใช้ยาฉีดยุง การใช้ยากันยุง และการทาสารป้องกันยุง เป็นต้น รวมทั้งจะต้องมีมาตรการควบคุมปริมาณยุงที่เป็นพาหะด้วย ซึ่งวิธีการควบคุมปริมาณยุงที่ดีที่สุดคือการทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ซึ่งในวงจรชีวิตของยุงมันจะวางไข่ในน้ำและมีพัฒนาการเป็นตัวอ่อนที่เป็นรู้จักกันดีคือลูกน้ำ ซึ่งการตัดวงจรชีวิตโดยการกำจัดลูกน้ำยุงเป็นวิธีการควบคุมปริมาณยุงที่นิยมกระทำกันทั่วไป โดยวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือการพ่นสารเคมีที่ทำให้ลูกน้ำยุงตาย การใช้ทรายอะเบทในแหล่งน้ำขัง การใช้สารซีโอไลท์ เป็นต้น (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2550) แต่อย่างไรก็ตามสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงและพ่นฆ่ายุง มักมีความเป็นพิษต่อมนุษย์และเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (พาลาภ, 2537; Key and Scott, 1992) และยุงก็มีการสร้างความต้านทานต่อสารเคมี (โสมฤทัย และ คณะ, 2550) ทำให้การใช้สารเคมีในการกำจัดยุงมีข้อจำกัด จึงได้มีความพยายามที่จะหาวิธีการกำจัดยุงด้วยวิธีการอื่น เช่น วิธีการทางกายภาพโดยใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นสารลดแรงตึงผิว (Tawatsin, *et al*., 2006) และวิธีการที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในขณะนี้ คือ การใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่นำสิ่งมีชีวิตหรือสารจากสิ่งมีชีวิตมาใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง เช่น การใช้จุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำ ซึ่งมีข้อจำกัดที่สำคัญคือขั้นตอนการศึกษาที่สลับซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายสูง (ประคอง, 2550) และการศึกษาการพัฒนานำสารจากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะสมุนไพรมาใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Tongtokit, 2004) เช่น สนสองใบ (ทรงพล, 2542) กูดเกี๊ยะ (สัมภาษณ์, 2544) รากหางไหลแห้ง (สมบูรณ์ และ คณะ, 2547) เมล็ดน้อยหน่า (เพ็ญนภา และ คณะ, 2549) ขมิ้นชัน (อภิวัฏ และ คณะ, 2550) และมะกรูด (ชารุณี, 2550) เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยเพื่อพัฒนาสารจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติมาเพื่อใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงยังคงมีการศึกษาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องมาจากความต้องการเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

การควบคุมยุงที่เป็นพาหะนำเชื้อโรคมาลาเรียโดยการกำจัดลูกน้ำยุงมีข้อจำกัดที่จะกระทำได้เฉพาะบริเวณ และการป้องกันไม่ให้ถูกยุงกัดก็ไม่ได้เป็นสิ่งที่กระทำได้ง่าย ดังนั้นถ้าไม่สามารถหลีกเลี่ยงในการถูกยุงกัดได้ การป้องกันมาลาเรียจึงจำเป็นต้องใช้ยาต้านมาลาเรีย เช่น กลุ่มยา ACTs (Artemisinin-based combination) ซึ่งเป็นการใช้ยาร่วมกันระหว่าง artemether และ lumefantrine, artesunate และ amodiaquine, artesunate และ mefloquine และยาอื่นๆ ที่มักใช้ร่วมกันเช่น Chloroquine, Mefloquine, Quinine และ Sulfadoxine-pyrimethamine เป็นต้น (WHO, 2010) ซึ่งต่อมามีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่พบว่าเชื้อมาลาเรียมีการพัฒนาสายพันธ์และทำให้เกิดการดื้อยาต้านมาลาเรียที่มีใช้กันทุกวันนี้ โดยจะพบว่าการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในแต่ละสถานที่มีความผันแปรแตกต่างกันไป รวมทั้งการดื้อยาของเชื้อโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียในแต่ละจังหวัดของประเทศไทยก็มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน (ศูนย์ข้อมูลเชื้อดื้อยา, 2550) ดังนั้นตราบใดที่การดื้อยาของเชื้อโปรโตซัวที่ทำให้เกิดมาลาเรียยังมีการพัฒนาสายพันธุ์อยู่ตลอดเวลา ความต้องการยารักษามาลาเรียโดยเฉพาะตัวยาที่มีโครงสร้างใหม่ ๆ ก็ยังคงต้องทำการพัฒนาค้นคว้าอย่างไม่มีที่สิ้นสุด

สิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นแหล่งที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีการพัฒนามาใช้ประโยชน์ทางยาในด้านต่าง ๆ ด้วยความแตกต่างของสภาพแวดล้อมระหว่างบนบกและในทะเล ทำให้สิ่งมีชีวิตในทะเลมีการสร้างสารที่เป็นเอกลักษณ์และมีโครงสร้างใหม่ๆ (Faulkner, 2000) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตในทะเลจึงมีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งที่จะค้นพบสารใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติทางยารวมทั้งสารต้านมาลาเรีย (Mayer *et al*., 2007; Fattorusso and Taglialatela-Scafati, 2009) และด้วยความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในทะเลไทยจึงเป็นที่น่าเชื่อว่าจะสามารถค้นพบสารต้านมาลาเรียจากสิ่งมีชีวิตในทะเลไทย

การศึกษานี้จะทำการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลของประเทศไทยที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และคัดเลือกสารต้านมาลาเรียจากสิ่งมีชีวิตในทะเล เพื่อที่จะค้นหาแหล่งของสารที่ใช้ในการป้องกันมาลาเรียแหล่งใหม่ๆ ที่มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ทดแทนสารเคมีกำจัดลูกน้ำยุงและทดแทนยาต้านมาลาเรียสายพันธ์ดื้อยา ซึ่งเชื่อว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลน่าจะมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของสารป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานในการพัฒนาสารกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องและยาต้านมาลาเรีย เพื่อเป็นการเสริมสร้างสุขภาวะของคนไทยให้มีสุขภาพแข็งแรง ปราศจากโรคมาลาเรียที่เป็นอันตรายถึงชีวิตต่อไป

ตรวจเอกสาร

โรคมาลาเรีย

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญของประชากรโลก เนื่องจากเป็นโรคที่ทำให้ถึงชีวิต มาลาเรียเกิดจากเชื้อโปรโตซัวสกุล *Plasmodium* ซึ่งมี 4 ชนิด และชนิดที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียในคนไทยมี 2 ชนิด คือ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* เมื่อยุงที่ติดเชื้อไปกัดคน มันจะใช้ปากที่เป็นท่อแหลมสำหรับดูดเลือดจากคนเพื่อเอาโปรตีนไปสร้างไข่ ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเป็นยุงตัวเมียและออกกัดคนช่วงเวลากลางคืน ขณะที่กัดยุงจะปล่อยน้ำลายออกมาซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนยาชา ทำให้คนถูกกัดไม่รู้สึกเจ็บ ซึ่งเชื้อโปรโตซัวจะอาศัยอยู่ในน้ำลายของยุงนั่นเอง ดังนั้นคนที่ถูกยุงกัดก็จะได้รับเชื้อโปรโตซัวในระยะ sporozoite จากนั้นจะมีพัฒนาการไปสู่ตับและเข้าสู่กระแสเลือดและไปทำลายเม็ดเลือดแดง ทำให้ผู้ป่วยมีอาการหนาวสั่น ไข้สูง ปวดศีรษะ ผิวหนังซีด อาเจียน เบื่ออาหาร บางรายปวดศีรษะมากอาจปวดลึกเข้าไปในกระบอกตา กระสับกระส่าย เพ้อ กระหายน้ำ ชีพจรเต้นเร็ว คลื่นไส้อาเจียน จะมีเหงื่อออกชุ่มตัว จะรู้สึกอ่อนเพลีย และผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกวิธีก็จะเสียชีวิต (เครือข่าวข้อมูลข่าวสาร โรคติดต่อนำโดยแมลง, 2552) องค์การอนามัยโลกรายงานว่า ทุกปีมีผู้ป่วยเป็นมาลาเรียมากกว่า 500 ล้านคน และเสียชีวิตด้วยโรคนี้ประมาณ 1 ล้านคน นั่นคือในทุกๆ 30 วินาที จะมีคนตายด้วยโรคมาลาเรีย 1 คน และผู้ที่เสียชีวิตมักเป็นเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี โดยเฉพาะเด็กที่อยู่ในครอบครัวที่ฐานะยากจน เด็กทารกที่ป่วยเป็นมาลาเรียหากไม่ตาย การพัฒนาการด้านสมองจะไม่สมบูรณ์ สำหรับสตรีมีครรภ์หากได้รับเชื้อมาลาเรีย ลูกที่คลอดจะมีน้ำหนักตัวน้อยกว่าปกติและอาจพิการด้วย (WHO, 2010) ดังนั้นมาลาเรียจึงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความสำคัญต่อความเป็นอยู่ของมนุษย์

ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรีย

ยุงก้นปล่องเป็นพาหะที่ทำให้มาลาเรียเป็นโรคติดต่อ ซึ่งยุงก้นปล่องชนิดที่เป็นพาหะหลัก (primary vectors) ทำให้เกิดมาลาเรียในประเทศไทยที่สำคัญ คือ *Anopheles dirus*, *Anopheles minimus* และ *Anopheles maculatus* ซึ่งยุงกลุ่มนี้มักแพร่เชื้อไข้มาลาเรียในบริเวณป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้ ส่วนอีกกลุ่มคือยุงพาหะรอง (secondary vectors) ประกอบด้วยยุงก้นปล่อง 3 ชนิดคือ *Anopheles sundaicus*, *Anopheles aconitus* และ *Anopheles pseudowillmori* (เครือข่าวข้อมูลข่าวสาร โรคติดต่อนำโดยแมลง, 2552) ยุงก้นปล่องชนิด *A. dirus* เป็นยุงพาหะที่มีประสิทธิภาพสูงในการแพร่เชื้อ มีขนาดใหญ่ชอบกัดกินเลือดคนและชอบเกาะพักนอกบ้าน มักวางไข่บริเวณแหล่งน้ำขังที่มีร่มเงาตามป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้ กลางวันเกาะพักตามพุ่มไม้และกลางคืนจะเข้ากัดคนในช่วงเวลา 22.00-23.00 น. ส่วนชนิด *A. minimus* มักวางไข่ตามลำธารหรือลำห้วยที่มีน้ำไหลช้าๆ เป็นยุงที่ชอบเกาะพักและกัดคนในบ้าน โดยมีช่วงเวลาที่กัดคนในแต่ละฤดูกาลแตกต่างกัน เช่น ฤดูหนาวเข้ากัดคนเวลา 18.00-19.00 น. แต่ฤดูฝนและฤดูร้อนชอบกัดเวลา 21.00-22.00 น. สามารถพบได้เกือบทุกจังหวัดที่มีการแพร่ของเชื้อมาลาเรีย เป็นยุงพาหะที่มีความสำคัญมากที่สุดในปัจจุบันนี้ (กลุ่มควบคุมโรคติดต่อแมลง สำนักงานควบคุมป้องกันโรคเขต 6, 2550)

ยุงก้นปล่องมีวงจรชีวิตเริ่มจากหลังกินเลือดแล้ว 4 วัน ตัวเมียจะวางไข่บนผิวน้ำ โดยลอยตัวบนผิวน้ำหรือปล่อยไข่ลงน้ำในขณะบินเรี่ยๆ ผิวน้ำ ไข่ออกใหม่จะมีสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีดำ โดยจะวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 150-200 ฟอง และวางไข่ได้อย่างน้อย 3 ครั้งตลอดชีวิต ไข่ยุงก้นปล่องฟักเป็นตัวภายใน 2 วัน จะพัฒนาเป็นตัวอ่อนที่เรียกว่า ลูกน้ำ (larvae) ซึ่งไม่มีท่อหายใจ แต่มีขนช่วยพยุงตัวขนานกับผิวน้ำ ในระยะลูกน้ำใช้เวลา 15-16 วัน ลูกน้ำจะพัฒนาเป็นตัวโม่ง (pupae) ซึ่งจะมีท่อหายใจกว้าง ไม่กินอาหาร และภายใน 2 วัน ตัวโม่งจะลอกคราบเป็นยุงตัวเต็มวัยต่อไป การที่ยุงชนิดใดๆ มีความสามารถในการนำหรือแพร่เชื้อได้หรือไม่นั้น ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความไวต่อเชื้อของยุงแต่ละชนิดที่ไม่เท่ากัน และแม้ยุงชนิดเดียวกัน ยังอาจมีสายพันธุ์ซึ่งไวต่อการติดเชื้อไม่เท่ากันด้วย อายุ อุปนิสัยในการดูดเลือดของยุง และความหนาแน่นของยุง เป็นต้น (เครือข่าวข้อมูลข่าวสาร โรคติดต่อนำโดยแมลง, 2552)

วิธีการกำจัดลูกน้ำยุงที่เป็นพาหะของโรค

วิธีป้องกันไม่ให้เป็นโรคมาลาเรียที่สำคัญที่สุด คือ ป้องกันตัวเองไม่ให้ถูกยุงกัด ซึ่งมีหลากหลายวิธี เช่น การฉีดยากันยุง การใช้ยากันยุง การใช้ตาข่ายกันยุง การทาสารกันยุง เป็นต้น และจะต้องมีการควบคุมปริมาณยุงซึ่งเป็นพาหะนำโรคด้วยการทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ทำลายแหล่งน้ำนิ่งไม่ให้ยุงก้นปล่องสามารถวางไข่ได้ ซึ่งมีตั้งแต่วิธีง่าย ๆ เช่น การแจกปลาหางนกยูงลายทำลายลูกน้ำยุง และวิธีการควบคุมยุงที่ส่วนใหญ่มักจะใช้คือการใช้สารเคมีในการกำจัดลูกน้ำยุง โดยที่รู้จักกันดีคือการพ่นหมอกควันและการใช้ทรายอะเบท ซึ่งสถานีอนามัยพันดอน จ.อุดรธานีพบว่าสามารถควบคุมลูกน้ำยุงลายได้ผลดีในระดับหนึ่ง แต่การพ่นหมอกควันมีต้นทุนในการดำเนินการค่อนข้างสูง ต้องจัดหาวัสดุอุปกรณ์ เช่น เครื่องพ่นหมอกควันและน้ำยา ส่วนการใส่ทรายอะเบทมีข้อจำกัดในการใช้ เพราะมีประชาชนบางกลุ่ม เช่น เด็กและผู้สูงอายุมีอาการเป็นผื่นเมื่อสัมผัสน้ำที่ใส่ทรายอะเบท (ชารุณี, 2550) ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีการควบคุมโดยสารเคมีมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในแหล่งน้ำ (Key and Scott, 1992) และยังทำให้เกิดการดื้อยาในแมลง จึงได้มีการศึกษาวิธีการกำจัดลูกน้ำด้วยวิธีทางกายภาพและชีวภาพ

วิธีการกำจัดลูกน้ำยุงโดยวิธีการทางกายภาพที่นิยมใช้คือการใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาศักยภาพของน้ำยาล้างจาน สบู่เหลว ผงซักฟอก แชมพูสระผม เพื่อใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงได้อย่างสะดวก ปลอดภัย และไม่มีพิษ โดยสารซักล้างเหล่านี้เมื่อสัมผัสตัวยุงหรือแมลง จะทำให้ระบบการหายใจผิดปกติและตายในที่สุด (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2550) นอกจากนั้นยังมีการศึกษานำน้ำมันที่สกัดมาจากพืชซึ่งมีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว (surfactant) มาใช้ในการกำจัดลูกน้ำและตัวโม่งของยุงพาหะ โดยพบว่าสามารถกำจัดตัวโม่งได้ดีกว่าลูกน้ำ และสามารถกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องได้ดีที่สุด ซึ่งการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำ oil surfactant มาใช้ในการควบคุมยุงพาหะแทนการใช้สารเคมี (Tawatsin *et al.*, 2006)

วิธีการกำจัดลูกน้ำยุงทางชีวภาพถือว่าเป็นวิธีที่มีความสำคัญเพราะว่าเป็นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพโดยการนำสิ่งมีชีวิตหรือสารจากสิ่งมีชีวิตมาใช้ ซึ่งทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น การใช้แบคทีเรียที่สร้างโปรตีนซึ่งอยู่ในรูปผลึกที่มีคุณสมบัติในการฆ่าลูกน้ำยุงอย่างจำเพาะจากแบคทีเรีย

Bacillus thuringiensis spp. *israelensis* และ *Bacillus sphaericus* ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขได้นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำยุงลายแบบเม็ด (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2550) อย่างไรก็ตามการพัฒนาจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการกำจัดลูกน้ำต้องใช้ขั้นตอนการศึกษาที่สลับซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายสูง (ประคอง, 2550) จึงได้มีการพัฒนาภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยการนำสมุนไพรซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดลูกน้ำยุง ซึ่งในขณะนี้มีรายงานจำนวนมากที่ใช้สมุนไพรในการกำจัดลูกน้ำยุงที่เป็นพาหะของโรค เช่น สถานีอนามัยพันดอน จังหวัดอุดรธานี ได้ทดลองนำมะกรูดคั้นน้ำไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงตามหมู่บ้านต่างๆ และพบว่าประชาชนร้อยละ 96.8 ใช้มะกรูดในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย ร้อยละ 100 ไม่พบอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้น้ำที่ใส่มะกรูด และร้อยละ 89.5 เชื่อว่ามะกรูดสามารถควบคุมลูกน้ำยุงลายได้ (ชารุณี, 2550) และมีการพัฒนาสารที่นำมาใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง โดยการใช้เทคโนโลยีในการสกัดให้อยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหย Tawatsin *et al*. (2006) ได้รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิดในประเทศไทยมีคุณสมบัติขับไล่ยุงไม่ให้วางไข่ในแหล่งน้ำ และชนิดที่ออกฤทธิ์แรงที่สุดในการขับไล่ยุงคือน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa*), หนุมานประสานกาย (*Schefflera leucantha*) และขิง (*Zingiber officinale*) ซึ่งต่อมา อภิวัฏ และ คณะ (2550) ได้ค้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้าของขมิ้นชันมีประสิทธิภาพดีที่สุดต่อการป้องกันการกัดของยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของมาลาเรีย สามารถป้องกันยุงกัดได้นาน 7-8 ชั่วโมงและมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุง โดยมีประสิทธิภาพต่อการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด (ค่า LC_{50} และ ค่า LC_{90} เท่ากับ 1.2 และ 5.9 ppm) การศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันนอกจากจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงไม่ให้มาวางไข่แล้ว ยังสามารถลดอัตราการฟักของไข่ยุงได้อีกทางหนึ่งด้วย

การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการกำจัดลูกน้ำยุงที่มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในประเทศไทย เช่น ทรงพล (2542) ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากสนสองใบในการควบคุมลูกน้ำยุงพาหะนำโรค โดยทำการสกัดจากส่วนของใบและก้านและใช้น้ำกลั่นและเอทธานอลเป็นตัวสกัด พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากก้านสนสองใบ สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลาย ยุงรำคาญ และยุงก้นปล่องได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 209.96, 274.21 และ 144.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำที่มีประสิทธิภาพมาจากส่วนของใบของสนสองใบ โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 5,067.56, 4,537.84 และ 582.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดจากก้านมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดจากใบ และสารสกัดด้วยเอทธานอลมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการศึกษาของเพ็ญนภา และ คณะ (2549) ที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากเมล็ดน้อยหน่ามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการฆ่าลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 34.56 และ 4.96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดน้อยหน่าสามารถกำจัดลูกน้ำยุงที่ความเข้มข้นสูงกว่าโดยมีค่า LC_{50} ต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญเท่ากับ 1,714.12 และ 1,031.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคณะผู้วิจัยมีแนวคิดว่าสามารถนำผลการทดลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อแหล่งชุมชน เนื่องจากวิธีการเตรียมสารสกัดไม่ยุ่งยาก และพืชสมุนไพรก็สามารถจัดหาได้ง่ายทุกภูมิภาคของประเทศไทย

สมบูรณ์ และ คณะ (2547) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากหางไหลแห้งพบว่ามีค่า LD_{50} ในเวลา 360 นาที เท่ากับ 5.6 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการศึกษาของสัมภาษณ์ (2544) พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากกูดเกี๊ยะมีประสิทธิภาพที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง ยุงลาย และยุงรำคาญที่ LC_{50} เท่ากับ 27.96, 67.90 และ 82.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และพบว่าสารสกัดจากกูดเกี๊ยะออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลง ซึ่งจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากูดเกี๊ยะมีสารเคมีหลายชนิดที่ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อคนและสัตว์ ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมวิธีการใช้ให้ถูกต้องโดยเน้นที่คุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลสามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้น้อยมากอย่างไรก็ตามการใช้วิธีการสกัดสารที่ถูกวิธีและให้ผลแน่นอนย่อมเป็นแนวทางหนึ่งที่จะได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพ และเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมแมลงพาหะนำโรคต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงที่เป็นพาหะของโรค

มีรายงานการศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลสามารถกำจัดลูกน้ำยุงไม่มากนัก โดยส่วนใหญ่จะแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำและทำให้ลูกน้ำตาย ซึ่งมีรายงานว่าฟองน้ำหลายชนิดที่สร้างสารกำจัดลูกน้ำยุงได้ เช่น การศึกษาของ Selvin and Lipton (2004) ที่พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำ *Dendrilla nigra, Axinella* และ *Clathria gorgonoides* สามารถทำให้ลูกน้ำยุงตาย 100% ที่ระดับความเข้มข้น 6-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาของ Rao *et al*. (2008) ก็พบว่าฟองน้ำหลายชนิด เช่น *Psammaplysilla purpurea* และ *Haliclona cribricutis* เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย แหล่งของสารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่รายงานว่าสามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้อีกกลุ่มหนึ่งคือสารสกัดจากพืชทะเล เช่น สาหร่ายทะเล หญ้าทะเล และต้นไม้ในป่าชายเลน ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากสาหร่าย *Caulerpa scalpelliformis, Dictyota dichotoma* (Thangam and Kathiresan, 1996) สาร clionasterol จากสาหร่ายใบมะกรูด (*Halimeda macroloba*) (Dzeha *et al*., 2004) สารสกัดจากสาหร่าย *Ulva fasciata* และ *Hypnea musciformis* (Selvin and Lipton, 2004b) สารสกัดจากสาหร่าย *Microdictyon pseudohapteron*, *Acanthophora muscoides* และหญ้าทะเล *Syringodium isoetifolium* (Devi *et al*., 1997) รวมทั้งสารสกัดจากรากของโกงกาง *Rhizophora apiculata* มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ดีที่สุดโดยมีค่า LC_{50} ต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารสกัดจากรากของโกงกาง *R. apiculata* สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลาย (*Ae. aegypti*) และลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 23 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Thangam and Kathiresan, 1996

นอกจากสารสกัดจากสาหร่ายขนาดใหญ่ ยังพบสารสกัดจากสาหร่ายเซลล์เดียวที่สร้างพิษเช่นไดโนแฟลกเจลเลต *Akashiwo sanguinea* ทำให้ลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ตาย ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis aeruginosa* สร้างสารพิษ microcystin ซึ่งทำให้ระยะเวลาในการพัฒนาการของลูกน้ำยุงลายใช้เวลานานกว่าปกติ (Rey *et al*., 2009) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Kiviranta *et al*. (2006)

ที่พบว่าสารสกัดจาก *M. aeruginosa* มีประสิทธิภาพในการทำให้ลูกน้ำยุงตาย ซึ่งน่าจะมาจากสารพิษกลุ่ม Hepatotoxin ที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสร้างขึ้นมา

นอกจากนั้นยังมีรายงานสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลอื่นๆ ที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง เช่น สารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์จากกุ้ง *Nematopalaemon tenuipes* สารสกัดเมทธานอลจากปลิงทะเล *Holothuria scabra* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex pipens fatigans*) (Thakur *et al.,* 2004) และสารสกัดจากเพรียงหัวหอม *Didemnem* sp. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการขับไล่ยุงก้นปล่อง (*An. maculatus*) (Hussein, *et al*., 2002)

การพัฒนาสารต้านมาลาเรีย

วิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันไม่ให้เป็นมาลาเรียคือการป้องกันไม่ให้ยุงก้นปล่องกัด โดยเฉพาะผู้ที่อาศัยในเขตป่าหรือนักท่องเที่ยวที่เดินทางเข้าไปในเขตป่า ซึ่งได้มีการพัฒนาสารขับไล่ยุงจากสารเคมี เช่น deet (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) (Thavara, *et al*., 2001) หรือจากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชที่พบในประเทศไทย (Tawatsin *et al*., 2001) และถ้าเกิดติดเชื้อมาลาเรียก็สามารถรับประทานยารักษาได้ ซึ่งมีความพยายามที่จะค้นหายารักษามาลาเรียมาตั้งแต่ปี 1944 ในชื่อยาที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ Quinine ซึ่งได้มาจากเปลือกต้น *Cinchona* spp. แต่ความสามารถในการพัฒนาสายพันธ์ของโปรโตซัว *Plasmodium* ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรค จึงทำให้เกิดการดื้อยาขึ้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาตัวยาใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง ซึ่งยาที่มีใช้ในปัจจุบัน เช่น Chloroquine, Doxycycline และ Mefloquine เป็นต้น ก็พบการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และการดื้อยาของเชื้อโปรโตซัวในแต่และภูมิภาคบนโลกและในภูมิภาคแตกต่างกันของแต่ละประเทศก็มีความแตกต่างและผันแปร เช่น ยา Mefloquine ที่ใช้ในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2536 ทุกจังหวัดไม่พบการเปลี่ยนแปลงการดื้อต่อยา ยกเว้นจังหวัดตากพบการดื้อต่อยาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องถึงปัจจุบัน เช่นเดียวกับ Chloroquine ที่พบการดื้อยาอย่างต่อเนื่องในจังหวัดตาก ในขณะที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน ระนอง และกาญจนบุรีเริ่มพบแนวโน้มการดื้อยาช่วงก่อนปี พ.ศ. 2542 ส่วนจังหวัดอื่นไม่พบการดื้อยา (ศูนย์ข้อมูลเชื้อดื้อยา สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2007) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องค้นหายาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย ซึ่งมีความต้องการที่ไม่มีที่สิ้นสุดตราบที่เชื้อสามารถเกิดการดื้อยาได้

มีรายงานการศึกษาว่าพืชและจุลชีพในไทยเป็นแหล่งที่สำคัญของสารต้านมาลาเรีย โดยเฉพาะกลุ่มสมุนไพร จากรายงานการศึกษาของกิตติศักดิ์ (2007) พบสารต้านมาลาเรียจากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 8 ชนิด พบว่าสารกลุ่ม aporphinoid alkaloids ซึ่งมีโครงสร้างเป็น 6a,7-dehydro มีฤทธิ์แรงที่สุด โดยมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ Chloroquine ส่วนสารกลุ่ม Xanthones นั้น แม้ว่าจะมีฤทธิ์ต้านมาลาเรียปานกลาง อาจจะนำมาพัฒนาใช้ร่วมกับยาต้านมาลาเรียชนิดอื่นได้ และยังพบสาร 7 – O-methyl garcinone E ซึ่งเป็นสารที่แยกจาก *Garcinia cowa* มีโครงสร้างใหม่ จึงน่าที่จะมีการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นสารต้านมาลาเรียต่อไป

กลไกในการพัฒนาสารต้านมาลาเรีย

การพัฒนาสารต้านมาลาเรียมักจะทำการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งโปรโตซัว *Plasmodium* ที่เป็นพาหะนำโรค หรือสารที่สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อโรค หรือสารที่ยับยั้งกระบวนการ heme detoxification ในโปรโตซัว ซึ่งกระบวนการนี้เริ่มจากเมื่อมนุษย์ถูกยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียกัด เชื้อโปรโตซัว *Plasmodium* ที่ทำให้เกิดมาลาเรียจะเข้าไปอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงและจะใช้ฮีโมโกลบิน (Haemoglobin) เป็นอาหาร โดยโปรโตซัวจะย่อยสลายส่วนที่เป็นโปรตีนของฮีโมโกลบินให้เป็นกรดอะมิโนแล้วปลดปล่อยส่วน Heme moiety ซึ่ง Heme เป็นสารที่เป็นตัวออกซิไดส์ที่ดีและทำให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ของเจ้าบ้านคือมนุษย์และเป็นพิษต่อโปรโตซัวเองด้วย และเนื่องจากโปรโตซัวไม่มีเอนไซม์ที่ชื่อว่า Heme oxygenase มันจึงไม่สามารถเปลี่ยน Heme ไปเป็น Tetrapyrrole ซึ่งเป็นของเสียที่จะถูกขับถ่ายออกจากเซลล์ ดังนั้นโปรโตซัวจึงมีกลไกในการลดความเป็นพิษของ Heme โดยการเปลี่ยนสารดังกล่าวให้เป็นรงควัตถุโดยกระบวนการตกผลึก (crystallization) ให้เป็นสารที่มีชื่อว่า Haemozoin อยู่ภายใน food vacuole ของโปรโตซัวเอง (Francis, *et al*., 1997; Egan, 1994; 2002) ดังนั้นสารที่มีกลไกในการยับยั้งการสร้าง Hemozoin ได้ ก็จะทำให้โปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียตาย จึงทำให้สามารถพัฒนายาต้านมาลาเรียผ่านทางกลไกนี้ ทั้งนี้มีการศึกษาพบว่ายา Chloroquine ที่นิยมใช้ในการรักษามาลาเรียในขณะนี้ มีกลไกในการรักษาโรคโดยไปยับยั้งการสร้างสารที่ชื่อว่า β-Haematin ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์มาจาก Heme ที่มีโครงสร้างเหมือน Haemozoin ดังนั้นการยับยั้ง β -Haematin จึงเป็นวิธีการศึกษาเพื่อคัดเลือกสารต้านมาลาเรียที่นิยมศึกษามากวิธีหนึ่งเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรีย (Chong, *et al*., 2003; Ncozaki and Egan, 2005; Trang *et al*., 2006; Hemplemann, 2007) จากการศึกษาของ Anthony *et al*. (2001) รายงานว่าสารกลุ่ม terpene isonitrile จากฟองน้ำ สามารถยับยั้งกระบวนการ heme detoxification ของโปรโตซัวได้

สารต้านมาลาเรียจากสิ่งมีชีวิตในทะเล

มีรายงานการศึกษาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องที่ชี้ให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นแหล่งที่สำคัญของสารที่มีคุณสมบัติต้านมาลาเรีย (Donia and Hamann, 2003; Mayer *et al*., 2007) โดยมีการศึกษาพบว่าฟองน้ำเป็นแหล่งสำคัญที่สุดที่พบสารยับยั้งมาลาเรียจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีการค้นพบสารกลุ่ม Cyclic peroxide จากฟองน้ำในสกุล *Mycale*, *Chondrilla*, *Sigmosceptrella*, *Plakortis*, *Plakiinastrlla*, *Latrunculia*, *Diacarnus* และ *Xestospongia* (Ravichandran *et al*., 2007) โดยสารที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งมาลาเรียที่มาจากสิ่งมีชีวิตในทะเลในขณะนี้ คือ Manzamine-A (Donia and Hamann, 2003) ซึ่งพบในฟองน้ำหลายชนิด (Sakai *et al.* 1986; Ang *et al*., 2000; Youssaf *et al*., 2002) โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เพียง 4.5 ng/ml และยับยั้ง *P. falciparum* ที่เป็นสายพันธุ์ดื้อยา Chloroquine ที่ IC_{50} 8.0 ng/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับยารักษามาลาเรียที่มีใช้กันอยู่ในขณะนี้ คือ Chloroquine ซึ่งมี MIC เท่ากับ 15.5 ng/ml และ Manzamine A ยังทำให้หนูทดลองมีอายุยืดยาวไปได้ถึง 10 วัน เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับ Manzamine A ซึ่งความสามารถของสารชนิดนี้ที่มีผลต่อการรักษาที่สำคัญคือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและไม่มีความเป็นพิษด้วย (Ang *et al*., 2000; Rao, *et al*.,

2003) ดังนั้นในอนาคตข้างหน้าความรู้ความเข้าใจในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ Manzamine A จะนำไปสู่ยาสังเคราะห์ที่สามารถรักษามาลาเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป สารจากฟองน้ำ *Halichondria* sp. ซึ่งสร้างสาร Halichondramide ก็เป็นสารอีกตัวหนึ่งที่มีศักยภาพในการเป็นยารักษามาลาเรีย โดยมี IC_{50} เท่ากับ 0.002 μg/ml มากกว่า Mefloquine ที่เป็นยารักษามาลาเรียที่ใช้กันอยู่ ซึ่งมีค่า IC_{50} เพียง 0.0003 μg/ml ในขณะที่สาร Kalihinol-A จากฟองน้ำ *Acanthella* sp. สามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียโดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ Mefloquine คือ EC_{50} เท่ากับ 0.0005 μg/ml (Miyaoka *et al*., 1998) นอกจากนั้นยังพบสารประกอบกลุ่ม Isocyanate, Isothiocyanates และ Isonitriles ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* ได้ดี (Konig *et al*., 1996) และสาร Plakortin และ Dihydroplakortin จากฟองน้ำ *Plakortis simplex* สามารถยับยั้ง *P. falciparum* ที่เป็นสายพันธ์ดื้อยาได้เป็นอย่างดี (Fattorusso *et al*., 2002)

กัลปังหาก็เป็นสิ่งมีชีวิตในทะเลอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษาพบสารยับยั้งมาลาเรีย เช่น แส้ทะเล *Eunicea* ซึ่งเป็นสัตว์ทะเลที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหลาย ๆ ด้าน รวมทั้งสารกลุ่ม Cembradiene diterpenoid ที่มีคุณสมบัติ antiplasmodial โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* W2 ซึ่งเป็นสายพันธ์ที่ดื้อยา Chloroquine ได้ดี (Wei *et al*., 2004) สาร Bielchowskysin จากกัลปังหา *Pseudopterogorgia kallos* ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* ที่ IC_{50} เท่ากับ 10 μg/ml และมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งได้เป็นอย่างดีด้วย (Marrero *et al*., 2004) ในขณะที่สาร Briarellins 6 ชนิด และ Polyanthellin A จากกัลปังหา *Briareum polyanthes* สามารถยับยั้งได้ดีกว่าโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8-9 μg/ml (Ospina *et al*., 2003) กลุ่มจุลินทรีย์ในทะเลซึ่งเป็นอีกแหล่งที่มีความสำคัญในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ก็พบว่าสร้างสารยับยั้งมาลาเรียด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร Trioxacarcins จาก *Streptomyces* sp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* สายพันธ์ K1 และ NF54 ได้อย่างโดดเด่น โดยมี IC_{50} ต่ำมาก คือ 1.5 และ 2.3 ng/ml

ในปี ค.ศ. 2009 Fattorusso and Taglialatela-Scafati ได้รวบรวมรายงานการศึกษาการพัฒนาสารต้านมาลาเรียจากสิ่งมีชีวิตในทะเล พบว่ามีรายงานการพบสารต้านมาลาเรียจนถึงขณะนี้ประมาณ 60 สาร โดยแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีเป็น 3 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่มีไอโซไนไตรล์ (Isonitrile) กลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloid) และกลุ่มเอนโดเปอร์ออกไซด์ (Endoperoxide) โดยสารกลุ่มไอโซไนไตรล์ที่มีศักยภาพในการต้านมาลาเรียได้ดี ได้แก่ สาร Axisonitrile-3 จากฟองน้ำ *Acanthella klethra* สามารถยับยั้งโปรโตซัวชนิดที่ดื้อยา Chloroquine ที่ระดับความเข้มข้นต่ำคือ 14 ng/mL สาร Amphilactene, Isothioamphilactane และ Neoamphilactane จากฟองน้ำ *Cymbastela hooperi* สาร Kalihinol จากฟองน้ำ *Acanthella* sp. ยับยั้งโปรโตซัวโดยมีค่า IC_{50} เพียง 0.4 ng/mL ซึ่งสารในกลุ่มไอโซไนไตรล์นี้ก็พบว่ามีกลไกในการต้านการเกิดมาลาเรียโดยยับยั้งการสร้างสาร β-hematin ของโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดง ซึ่งทำให้เป็นพิษต่อตัวโปรโตซัว ในกลุ่มอัลคาลอยด์สารที่มีศักยภาพสูงสุดคือสารในกลุ่ม Manzamines โดยมีการค้นพบครั้งแรกจากฟองน้ำ *Haliclona* sp. ในปี ค.ศ. 1986 และจากนั้นมาก็พบสารในกลุ่ม Manzamines อีกมากกว่า 60 สารจากฟองน้ำอีกหลายสกุล เช่น *Xestospongia, Ircinia* และ *Amphimedon* สาร Homofascaplysin A จากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* สามารถยับยั้งโปรโตซัว *Plasmodium falciparum* สายพันธ์ดื้อยาโดยมีค่า IC_{50} ที่ 20 ng/mL สารกลุ่ม

Phloeodictynes จากฟองน้ำในสกุล *Oceanapia* นอกจากฟองน้ำแล้วยังพบสารอัลคาลอยด์ที่ยับยั้งมาลาเรียได้ดีในกลุ่มเพรียงหัวหอม เช่น สารกลุ่ม Lepadins จากเพรียงหัวหอม *Clavelina lapadiformis* และ *Didemnum* sp. สาร Salinosporamide A จากแบคทีเรียทะเลสกุล *Salinispora* ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ในโปรโตซัว สำหรับสารกลุ่มเอนโดเปอร์ออกไซด์ที่มีศักยภาพในการต้านมาลาเรีย ได้แก่ สารกลุ่ม Plakortin จากฟองน้ำ *Plakortis simplex* สาร Methyl-3-epinuapapuanoate จากฟองน้ำ *Diacarnus levii* นอกจากสาร 3 กลุ่มหลักแล้วยังพบสารในกลุ่มเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการต้านมาลาเรีย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่มาจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น สาร Venturamides จาก *Oscillatoria* สาร Dragomabin จาก *Lyngbya majuscule* และสาร Gallinamide A จาก *Schizothrix*

วิธีวิจัย

ศึกษาการนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมาใช้ในการควบคุมมาลาเรียเป็น 2 หัวข้อหลัก คือ การควบคุมปริมาณยุงโดยการใช้สารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมากำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง และการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีคุณสมบัติต้านมาลาเรียเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามาลาเรีย ในส่วนของการศึกษาสารกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง จะให้ความสำคัญกับการสร้างเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่สามารถถ่ายทอดให้กับชุมชนท้องถิ่นได้ ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่เลือกใช้ในการศึกษาจึงเลือกสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในชุมชนของคนที่อาศัยอยู่ชายฝั่งทะเล และเป็นสิ่งมีชีวิตที่หาได้ง่ายและมีปริมาณมาก ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการเข้าถึงแหล่งวัตถุดิบกลุ่มที่สำคัญที่จะเลือกศึกษาคือพันธุ์ไม้ในป่าชายเลน นอกจากนั้นจะเลือกสิ่งมีชีวิตที่พบอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลง ที่สามารถเก็บตัวอย่างได้ง่าย และสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานความเป็นพิษอื่นๆ ด้วย สำหรับการคัดเลือกสารต้านมาลาเรีย ได้เลือกวิธีทดสอบทางเคมี โดยศึกษาจากกลไกการยับยั้งสารที่ชื่อว่า β-Hematin ซึ่งเป็นรงควัตถุสังเคราะห์จากสารต้นแบบคือ Hemozoin ซึ่งเป็นสารที่โปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียสร้างขึ้นมา เพื่อปกป้องตัวเองไม่ให้ได้รับพิษในขณะที่กินเลือดมนุษย์ ดังนั้นสารต้านมาลาเรียที่ยับยั้งการสร้าง β-Hematin ได้ ก็จะทำให้โปรโตซัวที่ทำให้เกิดมาลาเรียตายได้ โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

I. การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง

การศึกษาสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง จะใช้วิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่ทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องตาย โดยทำการทดสอบเบื้องต้น (preliminary test) เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพในการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่คัดเลือกไว้ มาศึกษาประสิทธิภาพความเป็นพิษขั้นละเอียด (full scale test) และทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตที่แสดงความเป็นพิษในระดับสูง และมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ โดยจะเน้นที่สิ่งมีชีวิตที่สามารถหาได้ง่ายในชุมชนท้องถิ่น โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. <u>การเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง</u>

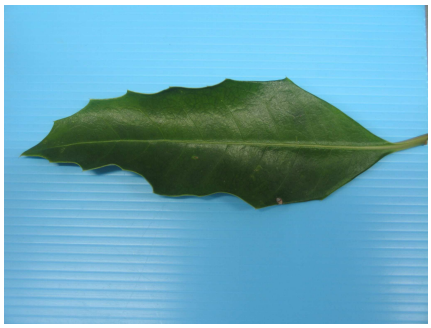
ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลจากบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลงด้วยวิธีเดินเก็บตามชายหาด และดำน้ำด้วยวิธี snorkel และ SCUBA ได้ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงทั้งสิ้น 42 ชนิด (ตารางที่ 1) ประกอบด้วยกลุ่มพืชทะเล 16 ชนิด คือ พันธุ์ไม้ป่าชายเลน 8 ชนิด (ภาพที่ 1) สาหร่ายทะเล 4 ชนิด และหญ้าทะเล 4 ชนิด (ภาพที่ 2) กลุ่มสัตว์ทะเล 26 ชนิด คือ ฟองน้ำ 7 ชนิด (ภาพที่ 3) ปะการังอ่อนและกัลปังหา 8 ชนิด (ภาพที่ 4) ปลิงทะเล 7 ชนิด (ภาพที่ 5) พรมทะเล 1 ชนิด ทากเปลือย 1 ชนิด กระต่ายทะเล 1 ชนิด และเห็ดทะเล 1 ชนิด (ภาพที่ 6) ทั้งนี้กลุ่มพืชทะเลจะเลือกชนิดที่สามารถพบได้ทั่วไป และชนิดที่มีรายงานว่ามีการสร้างสารกลุ่มแทนนินและสารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ เป็นพิษต่อปลา ยับยั้งการถูกกินเป็นอาหาร และป้องกันรังสี UV (พันธุ์ทิพย์ และ คณะ, 2548; Arnold and Targett, 2002) และเลือกสัตว์ทะเลที่พบได้ทั่วไปตามแนวน้ำขึ้นน้ำลง ที่มีรายงานการสร้างสารที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ และสามารถพบเห็นได้ทั่วไป

ตารางที่ 1 สิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องและสถานที่เก็บตัวอย่าง

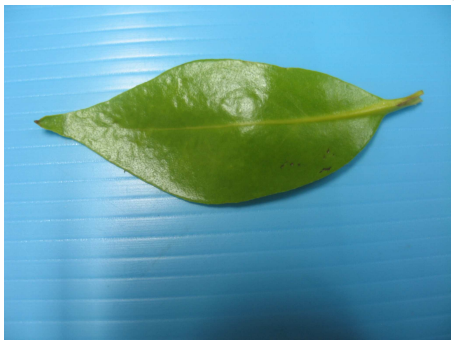
กลุ่มสิ่งมีชีวิต	ชนิดของสิ่งมีชีวิต	สถานที่เก็บตัวอย่าง
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน	เหงือกปลาหมอดอกขาว (*Acanthus ebracteatus*) แสมขาว (*Avicennia alba*) แสมดำ (*Avicennia officinalis*) ผลเถาถอบแถบ (*Derris trifoliata*) ตาตุ่มทะเล (*Excoecaria agallocha*) โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ลำพู (*Sonneratia caseolaris*) ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum*)	ป่าชายเลนที่บริเวณ อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ
สาหร่ายทะเล	*Acanthophora spicifera* *Brachytrichia quoyi* *Lobophora variegata* *Turbinaria conoides*	อ่าวธรรมชาติ และเกาะช้าง จ.ตราด
หญ้าทะเล	หญ้าชะเงาใบมน (*Cymodocea rotundata*) หญ้าชะเงาใบมน (*Cymodocea serrulata*) หญ้าชะเงาใบยาว (*Enhalus acoroides*) หญ้าชะเงาใบฝอย (*Halophila pinifolia*)	ป่าคลอก และอ่าวตังเข็น จ.ภูเก็ต
ฟองน้ำ	*Hyrtios erecta* *Iotrochota baculifera* ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) ฟองน้ำครก (*Xestospongia testudinaria*)	เกาะช้าง จ.ตราด
	Acanthella sp. *Auletta* sp. *Rhabderemia* sp.	เกาะราชาใหญ่ จ.ภูเก็ต
ปะการังอ่อน	*Alcyonium* sp. ปะการังหนัง (*Cladiella* sp.) *Nepthea* sp. ปะการังอ่อนนิ้วมือ (*Sinularia* sp.) unidentified soft coral01 unidentified soft coral02	เกาะช้าง จ.ตราด
กัลปังหา	unidentified sea fan01 unidentified sea fan02	เกาะราชาใหญ่ จ.ภูเก็ต
ปลิงทะเล	ปลิงทอง *Bahadschia vitiensis* ปลิงดำ *Holothuria atra*	เกาะสาก จ.ชลบุรี

ตารางที่ 1 (ต่อ)

กลุ่มสิ่งมีชีวิต	ชนิดของสิ่งมีชีวิต	สถานที่เก็บตัวอย่าง
ปลิงทะเล	ปลิงหิน *Stichopus horrens* ปลิงหิน *Stichopus* cf. *horrens* ปลิงสร้อยไข่มุก *Synaptula* cf. *recta*	เกาะสาก จ.ชลบุรี
	ปลิงหนวดต้นไม้ *Colochirus quadrangularis* ปลิงทะเลหนวดกิ่งไม้ *Cercodemas anceps*	อวนปูสวนสน จ.ระยอง
พรมทะเล	*Palythoa* sp.	เกาะสาก จ.ชลบุรี
ทากทะเล	*Jorunna funebris*	เกาะช้าง จ.ตราด
	Sea hare	อวนปูสวนสน จ.ระยอง
เห็ดทะเล	Corallimorph	เกาะสาก จ.ชลบุรี



ก



ข

ค

ง

จ

ฉ

ช

ซ

ภาพที่ 1 ตัวอย่างพันธุ์ไม้ป่าชายเลนที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. เหงือกปลาหมอดอกขาว (*Acanthus ebracteatus*)

ข. แสมขาว (*Avicennia alba*)

ค. แสมดำ (*Avicennia officinalis*)

ง. ผลเถาถอบแถบ (*Derris trifoliata*)

จ. ตาตุ่มทะเล (*Excoecaria agallocha*)

ฉ. โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*)

ช. ลำพู (*Sonneratia caseolaris*)

ซ. ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum*)

ก

ข

ค

ง

จ

ฉ

ช

ซ

ภาพที่ 2 ตัวอย่างสาหร่ายและหญ้าทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. *Acanthophora spicifera*

ข. *Brachytrichia quoyi*

ค. *Lobophora variegata*

ง. *Turbinaria conoides*

จ. หญ้าชะเงาใบมน (*Cymodocea rotundata*)

ฉ. หญ้าชะเงาใบมน (*Cymodocea serrulata*)

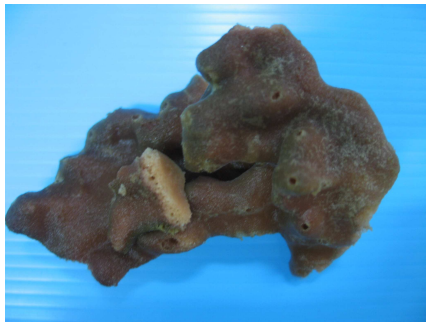
ช. หญ้าชะเงาใบยาว (*Enhalus acoroides*)

ซ. หญ้าชะเงาใบฝอย (*Halophila pinifolia*)

ก

ข

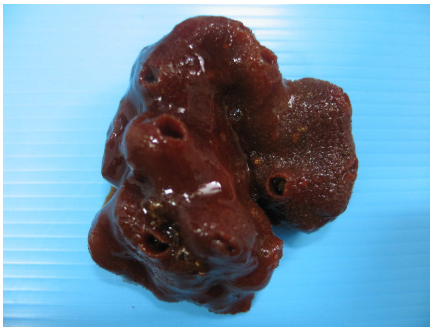
ค



ง

จ

ฉ



ช

ภาพที่ 3 ตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. *Hyrtios erecta*

ข. *Iotrochota baculifera*

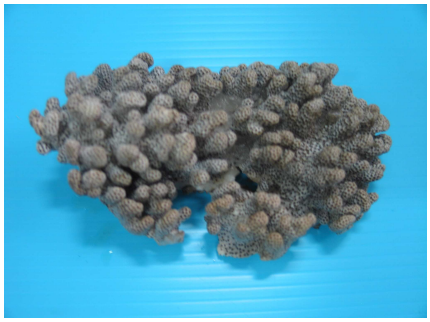
ค. ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.)

ง. ฟองน้ำครก (*Xestospongia testudinaria*)

จ. *Acanthella* sp.

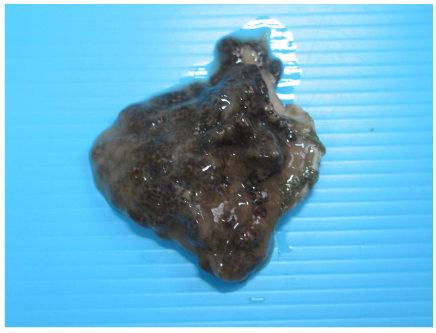
ฉ. *Auletta* sp.

ช. *Rhabderemia* sp.

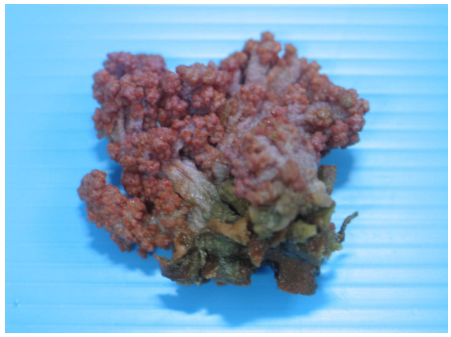


ก

ข



ค



ง

จ

ฉ

ช

ซ

ภาพที่ 4 ตัวอย่างปะการังอ่อนและกัลปังหาที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. *Alcyonium* sp.

ข. ปะการังหนัง (*Cladiella* sp.)

ค. *Nepthea* sp.

ง. ปะการังอ่อนนิ้วมือ (*Sinularia* sp.)

จ. unidentified soft coral01

ฉ. unidentified soft coral02

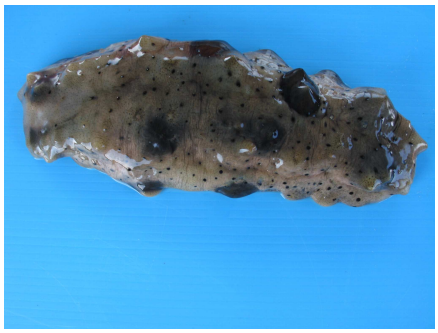
ช. unidentified sea fan01

ซ. unidentified sea fan02

ก

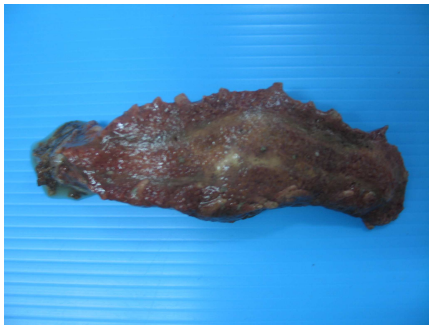
ข

ค

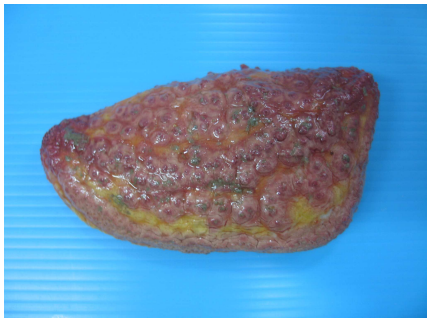


ง

จ



ฉ



ช

ภาพที่ 5 ตัวอย่างปลิงทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. ปลิงทอง *Bahadschia vitiensis*

ข. ปลิงดำ *Holothuria atra*

ค. ปลิงหิน *Stichopus horrens*

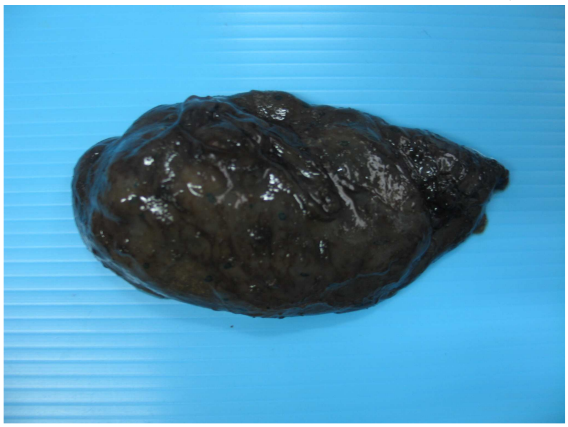
ง. ปลิงหิน *Stichopus* cf. *horrens*

จ. ปลิงสร้อยไข่มุก *Synaptulal* cf. *recta*

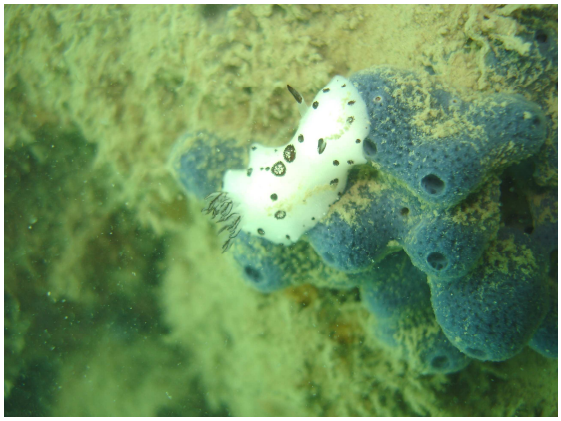
ฉ. ปลิงหนวดต้นไม้ *Colochirus quadrangularis*

ช. ปลิงทะเลหนวดกิ่งไม้ *Cercodemas anceps*

ก



ข



ค

ง

ภาพที่ 6 ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. พรมทะเล (*Palythoa* sp.)

ข. ทากเปลือย (*Jorunna funebris*)

ค. กระต่ายทะเล (sea hare)

ง. เห็ดทะเล (corallimorph)

2. การเตรียมสารสกัดในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

นำสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการสกัดมาล้างด้วยน้ำจืดและกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งเศษดินทรายและตะกอนออก แล้วนำไปผึ่งแห้งในที่ร่ม (air dried) เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง (ภาพที่ 7) จากนั้นนำไปสกัดด้วยสารละลาย 2 ชนิดคือน้ำและเอทธานอล โดยวิธีการหมัก (masceration) (ทรงพร, 2542; สัมภาษณ์, 2544; เพ็ญนภา และ คณะ, 2549; Tongtokit, 2004) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารดังนี้ (ภาพที่ 8)

2.1 การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ (aqueous extracts)

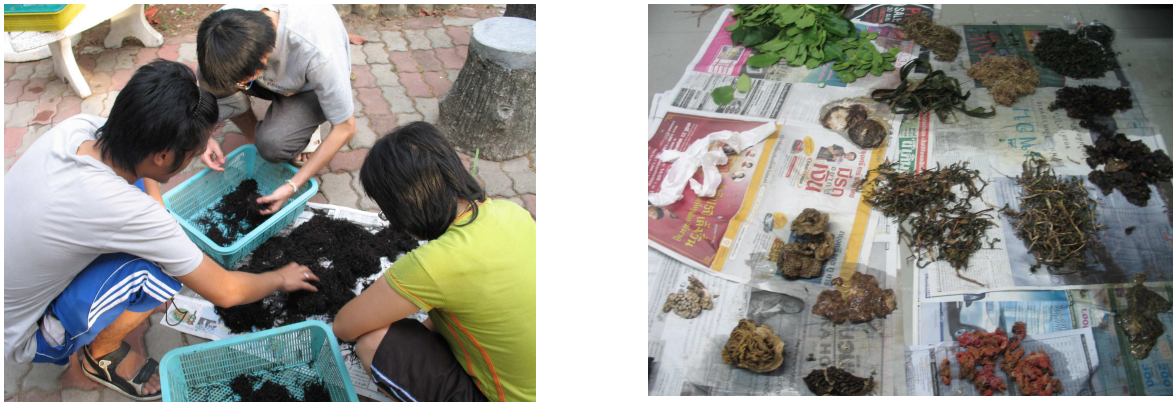
ชั่งตัวอย่างสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมา 20 กรัม แล้วหั่นให้ละเอียด จากนั้นนำไปสกัด โดยใส่ลงในขวดที่มีน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร (อัตราส่วนสิ่งมีชีวิตต่อน้ำ = 1:3) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีและผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออกจากสารสกัด ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบคิดเทียบจากน้ำหนักของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดสอบต่อปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการสกัด จะมีค่าเท่ากับ 333.33 กรัมต่อลิตร นำสารสกัดด้วยน้ำเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง เพื่อใช้ในการทดสอบกับลูกน้ำยุงก้นปล่องต่อไป

2.2 การเตรียมสารสกัดด้วยเอทธานอล (ethanol extracts)

ชั่งตัวอย่างสิ่งมีชีวิตและเอทธานอลในอัตราส่วน 1:3 จากนั้นนำไปสกัดและกรองแยกกากเช่นเดียวกับการสกัดด้วยน้ำ ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดจึงมีค่าเท่ากับ 333.33 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับสารสกัดด้วยน้ำ นำสารสกัดด้วยเอทธานอลเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง เพื่อใช้ในการทดสอบกับลูกน้ำยุงก้นปล่องต่อไป

3. การเตรียมลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ใช้ในการทดสอบ เป็นลูกน้ำที่มาจากการเพาะเลี้ยงโดยวิธีมาตรฐาน โดยจะทำการทดสอบกับลูกน้ำยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* B ที่อยู่ในระยะที่ 4 ตอนต้น (fourth instar larvae) (ภาพที่ 9) ซึ่งสามารถซื้อตัวอย่างลูกน้ำยุงก้นปล่องได้จากกลุ่มงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข



ก ข

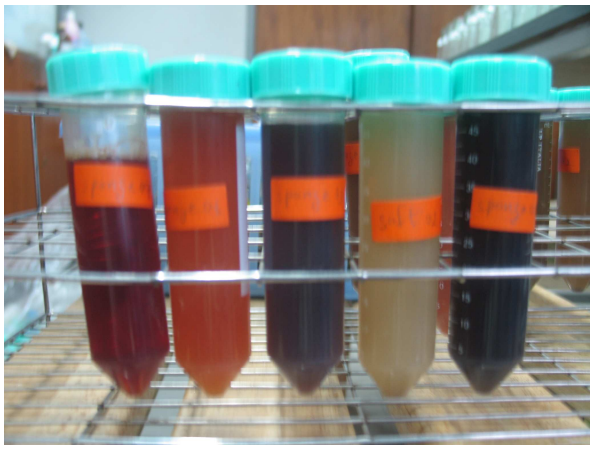
ภาพที่ 7 การเตรียมตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการทดสอบ
ก. การล้างและแยกสิ่งเจือปนออกจากตัวอย่าง
ข. ผึ่งตัวอย่างให้แห้งด้วยวิธี air-dried

ก

ข

ค

ง



จ

ฉ

ภาพที่ 8 การเตรียมสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการทำให้ตัวอย่างมีขนาดเล็ก

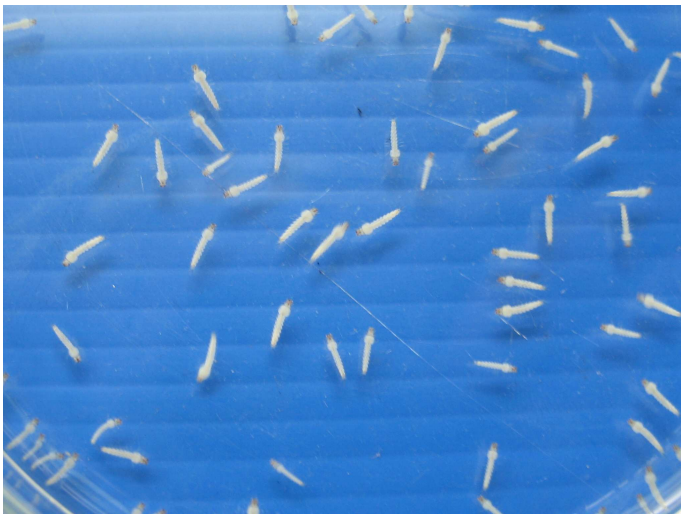
ข.การสกัดตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลด้วยน้ำ

ค. การสกัดตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลด้วยเอทธานอล

ง. การแยกสารละลายที่สกัดได้ออกจากกาก

จ. สารสกัดด้วยน้ำ (aqueous extracts)

ฉ. สารสกัดด้วยเอทธานอล (ethanol extracts)



ภาพที่ 9 ลูกน้ำยุงก้นปล่องระยะ fourth instar larvae ที่ใช้ในการทดสอบ

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ใช้วิธีการทดสอบตามวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1996) โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้

4.1 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น (preliminary test) เพื่อคัดเลือก (screening) สารสกัดที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ทำการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สกัดด้วยน้ำและเอทธานอลจำนวน 84 สารที่เตรียมไว้ในข้อ 2 โดยทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นในช่วงกว้าง 3 ระดับคือ 500, 2000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วคัดเลือกสารสกัดที่ทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตายมากกว่า 50 % ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปทำการทดสอบในขั้นละเอียดต่อไป โดยเตรียมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนใส่ในขวดทดสอบ 250 มิลลิลิตร แล้วดูดสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ใส่ลงไปให้ได้ความเข้มข้น 500, 2000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงนำลูกน้ำยุงก้นปล่องจำนวน 25 ตัว ใส่ลงไปในขวดแต่ละความเข้มข้น โดยมีขวดทดสอบที่ไม่ได้ใส่สารใดๆ ขวดทดสอบที่มีเอทธานอล และขวดทดสอบที่ใส่ทรายอะเบทเป็นชุดควบคุมการทดสอบ วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ตายในแต่ละขวด (ภาพที่ 10) คำนวณหาค่าอัตราการตาย (%mortality)

4.2 การทดสอบความเป็นพิษขั้นละเอียด (full scale test) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพความเป็นพิษของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล

นำสารสกัดที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 มาทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโดยทำการทดสอบที่ช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตาย 0-100% ที่ความเข้มข้น 7 ระดับคือ 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 3000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีวิธีการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบเบื้องต้นในข้อ 4.1 แต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยมีขวดทดสอบที่ไม่ได้ใส่สารใดๆ ขวดทดสอบที่มีเอทธานอล และขวดทดสอบที่ใส่ทรายอะเบทเป็นชุดควบคุมการทดสอบ นับจำนวนลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ตายในแต่ละขวดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นพิษในรูปของ LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาความแตกต่างของความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบ

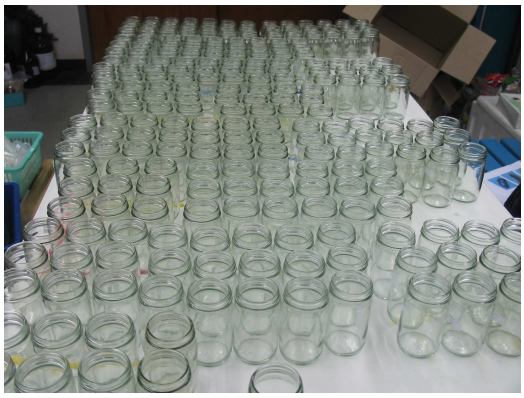
ในการทดสอบเบื้องต้นได้นำเอาเฉพาะส่วนของผลเถาถอบแถบมาทำการศึกษา และพบว่ามีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งส่วนอื่นๆ ของเถาถอบแถบ ได้แก่ ใบ และกิ่งก้าน ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าผลและพบได้ทุกฤดูกาล จึงน่าจะนำมาศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มแหล่งของวัตถุดิบจากเถาถอบแถบ โดยนำเถาถอบแถบมาแยกเป็นส่วนของใบ ก้าน และผล (ภาพที่ 11) แล้วนำไปเตรียมสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทธานอลตามวิธีในข้อ 2 จากนั้นนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ 8 ระดับความเข้มข้น คือ 100, 250, 500,1,000, 2,000, 3,000, 4,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 4.1 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบที่มีต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง แต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยมีขวดทดสอบที่ไม่ได้ใส่สารใดๆ ขวดทดสอบที่มีเอทธานอล และขวดทดสอบที่ใส่ทรายอะเบทเป็นชุดควบคุมการทดสอบ นับจำนวนลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ตายในแต่ละขวดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นพิษในรูปของ LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ว่าส่วนต่างๆของเถาถอบแถบและการใช้สารสกัดที่แตกต่างกันมีค่า LC_{50} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ด้วย Two-factors ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

4.4 การวิเคราะห์ความเป็นพิษ

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดที่มีต่อลูกน้ำยุง จะคำนวณหาค่า LC_{50} (lethal concentration at 50%) ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 50 ของจำนวนลูกน้ำทั้งหมด โดยการคำนวณจาก probit analysis transformation method จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %mortality (probit valve) และ log concentrations ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Musch, 1996)

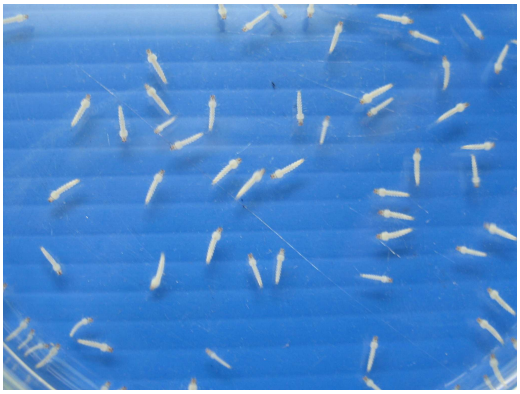
4.5 การทดสอบเบื้องต้นในการใช้เถาถอบแถบเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงในภาคสนาม

นำสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบคือใบ กิ่งก้าน และลำต้น ที่สกัดด้วยเอทธานอลและน้ำ ไปทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงในภาคสนามที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใส่สารทดสอบลงในอ่างพลาสติคเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ที่มีน้ำอยู่ 250 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ เตรียมชุดทดสอบ 2 ชุด โดยชุดแรกจะนำไปวางในห้องปฏิบัติการเปียกของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล โดยตำแหน่งที่วางจะวางแบบสุ่มกระจายทั่วห้องขนาด 6 X 8 เมตร และอีกชุดหนึ่งจะนำไปวางในบ้านเรือนของชาวบ้านที่อยู่ในบริเวณที่เก็บตัวอย่างไม้ป่าชายเลน (ภาพที่ 12) หลังจากวางทิ้งไว้ 3 วัน ทำการตรวจสอบชุดทดสอบและตรวจนับจำนวนลูกน้ำที่พบในแต่ละอ่างทดสอบไปทุกวันจนครบ 10 วัน



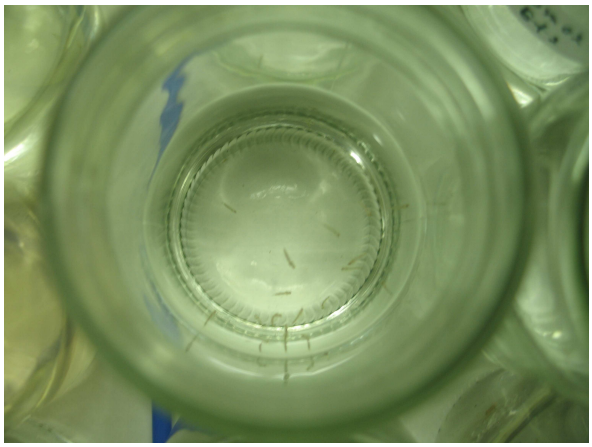
ก

ข



ค

ง



จ

ฉ

ภาพที่ 10 การทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ก. เตรียมน้ำใส่ในขวดทดสอบ

ข. ดูดสารสกัดใส่ในขวดทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

ค. ลูกน้ำยุงก้นปล่องระยะ fourth instar larvae ที่ใช้ในการทดสอบ

ง. นับลูกน้ำยุงก้นปล่องใส่ในขวดทดสอบ

จ. นับจำนวนลูกน้ำยุงที่ตายเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ฉ. ลูกน้ำยุงก้นปล่องในชุดควบคุมที่มีทรายอะเบทตายทั้งหมด

ก ข ค

ภาพที่ 11 ส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างของความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง
ก. ใบ
ข. กิ่งก้าน
ค. ผล

ก ข

ภาพที่ 12 การทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องในภาคสนาม
ก. ชุดทดสอบที่วางในห้องปฏิบัติการ
ข. ชุดทดสอบที่วางไว้ในบ้านที่อยู่อาศัย

II. การคัดเลือกสารต้านมาลาเรียจากสารสกัดที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเล

การศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธีการคัดเลือกสารต้านมาลาเรียโดยวิธีการทางเคมี โดยจะทำการศึกษาสารที่ยับยั้งสารที่ชื่อว่า β-Hematin ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบสาร Hemozoin ซึ่งเป็นสารที่โปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องตัวเองไม่ให้ได้รับพิษในขณะที่กินเลือดมนุษย์ โดยเมื่อมนุษย์ถูกยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำเชื้อกัด เชื้อโปรโตซัว *Plasmodium* ที่ทำให้เกิดมาลาเรียจะเข้าไปอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงและจะใช้ฮีโมโกลบิน (Haemoglobin) เป็นอาหาร และในกระบวนการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะทำให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อเซล์ของเจ้าบ้านคือมนุษย์และเป็นพิษต่อโปรโตซัวเองด้วยคือ Heme ซึ่งโปรโตซัวจะเปลี่ยนสารดังกล่าวให้เป็นรงควัตถุที่ไม่เป็นพิษมีชื่อว่า Haemozoin ดังนั้นสารที่มีกลไกในการยับยั้งการสร้าง Hemozoin ได้ ก็จะทำให้โปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียตาย ซึ่ง β-Hematin เป็นสารสังเคราะห์ที่เลียนแบบโครงสร้างของ Hemozoin ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ การทดสอบการยับยั้งสาร β-Hematin เป็นวิธีการ

ศึกษาเพื่อคัดเลือกสารต้านมาลาเรียที่นิยมศึกษามากวิธีหนึ่งเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรีย (Chong, *et al.*, 2003; Ncozaki and Egan, 2005; Trang *et al.*, 2006; Hemplemann, 2007) ในการทดสอบนี้จะใช้วิธีการทดสอบการยับยั้งสาร β-Hematin ตามวิธีของ Ncokazi and Egan (2005) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล

ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลจากบริเวณเดียวกับที่เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ได้ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตทั้งสิ้น 146 ชนิด ประกอบด้วยพืชทะเล 49 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายทะเล 30 ชนิด หญ้าทะเล 9 ชนิด พันธุ์ไม้ป่าชายเลน 10 ชนิด และกลุ่มสัตว์ทะเล 97 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำ 48 ชนิด ปะการังอ่อน 10 ชนิด กัลปังหา 21 ชนิด ทากทะเล 8 ชนิด ปลิงทะเล 9 ชนิด และพรมทะเล 1 ชนิด โดยจะเก็บตัวอย่างมาใช้ในการศึกษาตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม

2. การเตรียมสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล

นำตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลมาทำการสกัดโดยวิธีการหมัก (masceration) โดยนำสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการสกัดล้างด้วยน้ำจืดและกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งเศษดินทรายและตะกอนออก แล้วนำไปผึ่งแห้งในที่ร่ม (air dried) เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายทะเลและหญ้าทะเล สกัดด้วยเมทธานอล คลอโรฟอร์ม และน้ำ ในอัตราส่วน 12:5:3 (Simon-Colin *et al.*, 2002) และอีกส่วนหนึ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (Hellio *et al.,* 2001) ปะการังอ่อนและกัลปังหาสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยไดคลอโรมีเทน อะซีโตน และเมทธานอล (Henrikson *et al.*, 1995) ทากทะเลสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยอะซีโตนและเมทธานอลและแยกส่วนของเอทธิลอะซีเตท (Gunthorpe and Cameron, 1987) ส่วนสิ่งมีชีวิตอื่นๆ สกัดด้วยเมทธานอล โดยใช้ตัวทำละลาย 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3-5 วัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยแห้งภายใต้ความดันสุญญากาศด้วยเครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่เก็บไว้ใน vial โดยละลายในเมทธานอล 3 มิลลิลิตร รวมทั้งสิ้น 185 สาร และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้ง β-Hematin ต่อไป (ภาพที่ 13)

3. การเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ

นำสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ดูดใส่ใน vial ขนาดเล็ก แล้วนำไประเหยแห้งด้วยไนโตรเจนให้ได้น้ำหนักของสารสกัดใน vial ประมาณ 8-10 มิลลิกรัม จากนั้นเติมเมทธานอลลงไปให้ได้ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีการของ Ncokazi and Egan (2005) ซึ่งให้เตรียมสารทดสอบให้มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของ Hematin ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

4. การทดสอบการยับยั้งสาร β-Hematin (ภาพที่ 14)

4.1 เตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ

1) สารละลายฮีมาติน (Hematin) ความเข้มข้น 1.680 mM : ชั่งฮีมิน (Hemin) มา 15 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2) สารละลายโซเดียมอะซีเตทไตรไฮเดรต ($NaCOCH_3.3H_2O$) ความเข้มข้น 12.9 M : ชั่งโซเดียมอะซีเตทไตรไฮเดรตมา 63.14 กรัมละลายในกรดอะซีติค (glacial acetic acid) 47.28

มิลลิลิตร โดยอุ่นให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่ 60 °C พร้อมคนอย่างแรงตลอดเวลาเพื่อให้สารละลาย จากนั้นทิ้งให้เย็น และจะต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ pH เท่ากับ 5 อุ่นสารไว้ที่ 60 °C เพื่อกันไม่ให้สารตกตะกอน

3) สารละลายไพริดีน (Pyridine) ความเข้มข้น 12% และ 30% ใน 20 mM เฮเปส (Hepes) (v/v) : ชั่งสารเฮเปส มา 0.476 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ค่า 7.5 จากนั้นนำไปผสมกับไพริดีน โดยที่ความเข้มข้น 12% ใช้ไพริดีน 12 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเฮเปส 88 มิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 30 % ใช้ไพริดีน 30 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเฮเปส 70 มิลลิลิตร

4) ยาคลอโรควิน (Chloroquine) ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการทดสอบ (Control)

4.2 การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลด้วยวิธี High-throughput screening

ดูดสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมาตัวอย่างละ 2 ไมโครลิตร ใส่ลงใน well plate ขนาด 96 หลุม แล้วเติมสารละลายฮีมาตินลงไป 20.2 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมอะซีเตทไตรไฮเดรต 11.7 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารละลายไพริดีน 12 % ลงไป 250 ไมโครลิตร โดยเตรียมสารสกัดแต่ละสาร 3 หลุม (replication) และตัวควบคุมการทดสอบ ได้แก่ เมทธานอล และคลอโรควินอย่างละ 3 หลุมเช่นกัน สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง β-Hematin จะให้สีส้มแดง คัดเลือกสารที่ให้สีส้มแดงไปทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

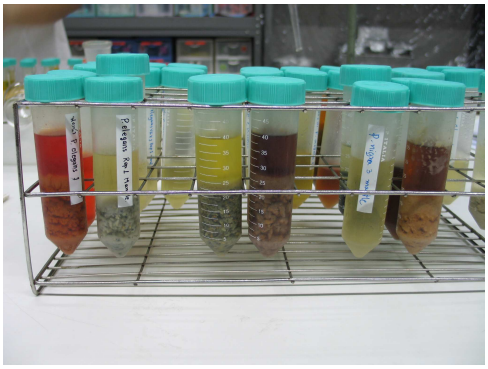
4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้ง β-Hematin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ทำการเตรียมสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลโดยเจือจางให้ได้ 4 ความเข้มข้น คือ 5,000, 2,500, 1,250 และ 625 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วดูดใส่ลงใน well plate ตัวอย่างละ 10.1 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายฮีมาตินลงไป 101.2 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมอะซีเตทไตรไฮเดรต 58.7 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเติมสารละลายไพริดีน 30 % ลงไป 80 ไมโครลิตร ทิ้งให้สารตกตะกอน 15 นาที จากนั้นดูดสารสกัดส่วนบนที่ไม่มีตะกอน 38 ไมโครลิตร ใส่ลงใน well plate หลุมใหม่ แล้วเติมสารละลายไพริดีน 30% ลงไป 212 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างละ 3 หลุม (replication) และตัวควบคุมการทดสอบ ได้แก่ เมทธานอล และยาคลอโรควิน อย่างละ 3 หลุมเช่นกัน

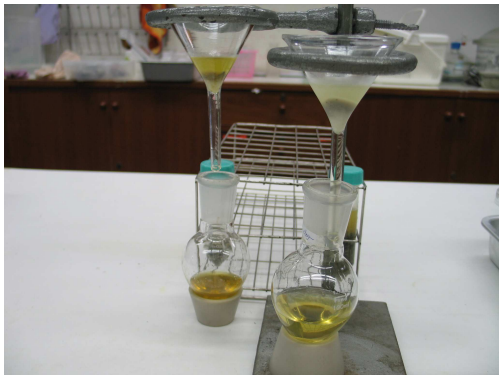
5. การศึกษากลุ่มของสารที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย TLC

ตรวจสอบหมู่ทางเคมีของสารสกัดด้วย TLC โดยใช้เฮปเทนและเอทธิลอะซีเตท ในอัตราส่วน 3:1 เป็น mobile phase และใช้สารตรวจสอบต่างๆ คือ สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloid) ใช้สาร Dragendorff สารกลุ่มแอนทราควิโนน (antraquinone) และคูมาริน (coumarin) ใช้สาร Borntrager สารกลุ่มเทอร์พีน (terpene) ใช้สาร vanillin-sulphuric และสารฟีนอล (phenol) ใช้สาร Fast blue salt B ซึ่งกลุ่มสาร

เหล่านี้มีรายงานว่าเป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารต้านมาลาเรียและยารักษามาลาเรีย (Touchstone and Dobbins, 1978; Wagner and Bladt, 1995)

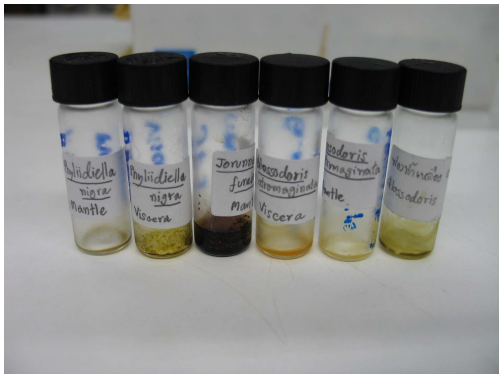


ก



ข

ค



ง

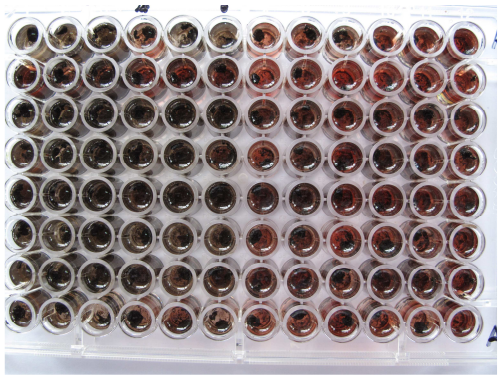
ภาพที่ 13 การเตรียมสารสกัด (crude extract) ที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้ง β-hematin

ก. การสกัดสารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลด้วยตัวทำละลายต่างๆ

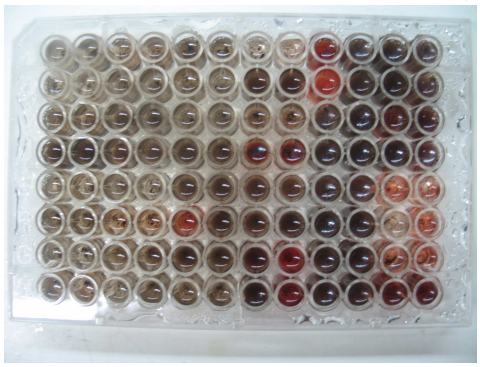
ข. แยกสารที่สกัดได้ออกจากกาก

ค. ทำการระเหยแห้งด้วย rotary evaporator

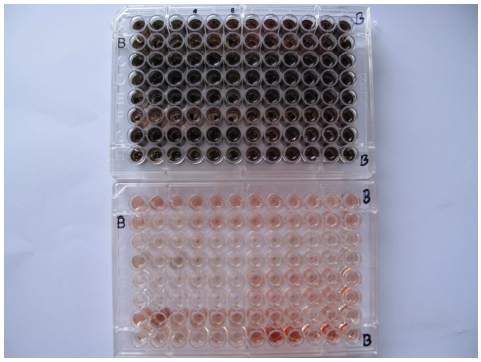
ง. การเตรียมสารสกัดให้ได้น้ำหนัก 8-10 มิลลิกรัม



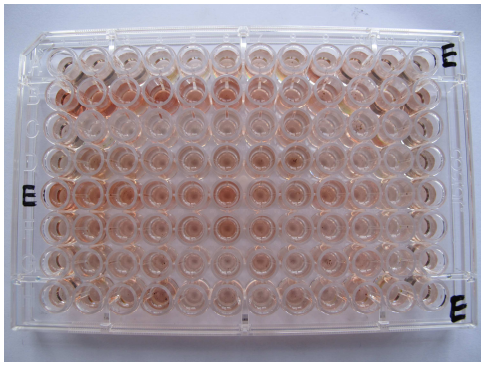
ก



ข



ค



ง

ภาพที่ 14 การทดสอบการยับยั้งสาร β-hematin

ก. well plate ที่หยดสารสกัดและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

ข. well plate หลังจากบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 1 ชม.

ค. ดูดสารละลายด้านบนไปใส่ใน well plate ใหม่

ง. นำ well plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ผลและวิจารณ์ผล

จากการนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมาทำการศึกษา เพื่อพัฒนาใช้ในการควบคุมมาลาเรีย โดยทำการศึกษา 2 หัวข้อคือ การใช้สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อกำจัดลูกน้ำยุง โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง และการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรีย โดยการทดสอบการยับยั้งสาร β-hematin ผลการศึกษามีดังนี้

I. การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง

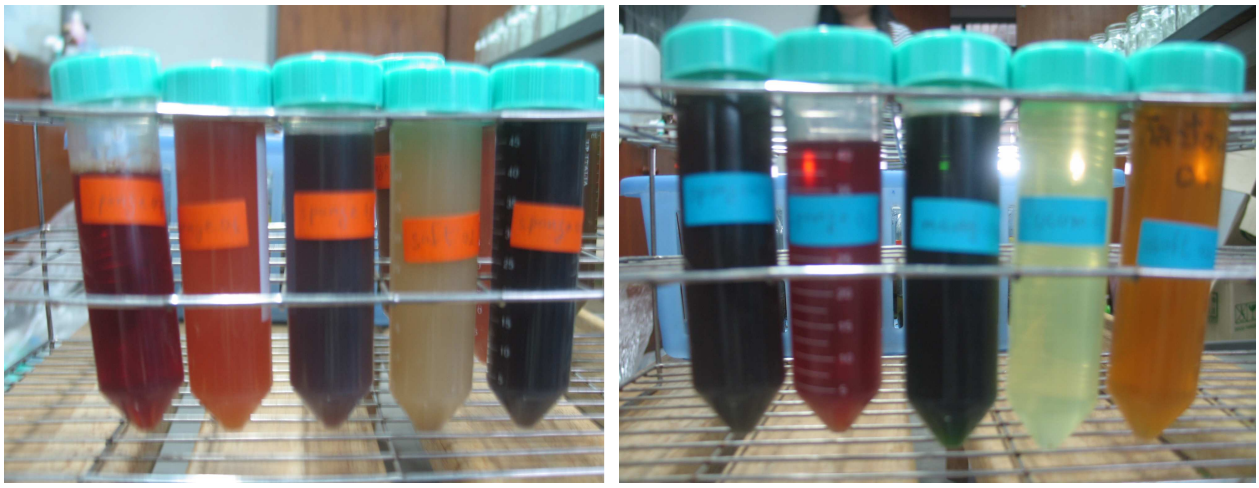
การศึกษาสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง จะทำการศึกษาเริ่มต้นจากการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องจากสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 84 สาร แล้วจึงศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ในรูปของค่า LC_{50} และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดที่มาจากส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบ ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตในทะเล ที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด เนื่องจากมีความเป็นพิษสูง และสามารถหาได้ง่ายในชุมชนท้องถิ่น ผลการศึกษามีดังนี้

<u>คุณลักษณะของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง</u>

สิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องในการศึกษานี้มีทั้งหมด 42 ชนิด ได้มาจากกลุ่มพืชทะเล 16 ชนิด คือ พันธุ์ไม้ป่าชายเลน 8 ชนิด สาหร่ายทะเล 4 ชนิด หญ้าทะเล 4 ชนิด กลุ่มสัตว์ทะเล 26 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำ 7 ชนิด ปะการังอ่อน 6 ชนิด กัลปังหา 2 ชนิด ปลิงทะเล 7 ชนิด พรมทะเล 1 ชนิด ทากเปลือย 1 ชนิด กระต่ายทะเล 1 ชนิด และเห็ดทะเล 1 ชนิด (ภาพที่ 1-6) โดยไม้ป่าชายเลนเลือกชนิดของพันธุ์ไม้ที่พบได้ทั่วไป เช่น โกงกาง แสม ตะบูน และพันธุ์ไม้ที่มีรายงานว่าเป็นพิษเช่นตาตุ่ม โดยมียางสีขาวที่ทำให้ตาบอดได้และยังทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง และพันธุ์ไม้ที่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้าน คือ เหงือกปลาหมอ ใช้ขับโลหิตระดู ขับพยาธิ แก้ฝี แก้โรคผิวหนังน้ำเหลืองเสีย ต้นเถาถอบแถบ เป็นยาระบาย แก้พิษตานซาง ตัดรากตานขโมย ขับเสมหะและลม (กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2553) เป็นต้น ส่วนกลุ่มหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเลเลือกชนิดที่พบได้ทั่วไปและมีรายงานว่ามีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *B. quoyi* ที่มีรายงานว่าเป็นพิษต่ออาร์ทีเมียตัวเต็มวัย (พันธุ์ทิพย์ และ คณะ, 2553) สำหรับกลุ่มสัตว์ทะเลจะคัดเลือกสัตว์ทะเล 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่รายงานว่าเป็นพิษ เช่น ฟองน้ำ ปะการังอ่อน ปลิงทะเล พรมทะเล ทากเปลือย เป็นต้น และอีกกลุ่มคือกลุ่มที่พบได้ทั่วไปในบริเวณแนวปะการังหรือแนวหินในเขตน้ำขึ้นน้ำลง เช่น ปลิงดำ เป็นต้น

สิ่งมีชีวิตในทะเลจำนวน 42 ชนิด จะนำมาสกัดด้วยสารละลาย 2 ชนิด คือ น้ำและเอทธานอล เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สารละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน และการเลือกใช้น้ำเป็นตัวสกัดได้คำนึงถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ในชุมชนท้องถิ่น ในกรณีที่สารสกัดด้วยน้ำสามารถ

แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องอย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารสกัดที่เตรียมได้จากสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันและใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันจะมีสีและความขุ่นใสแตกต่างกันไปดังแสดงในภาพที่ 15 โดยจะพบว่าสารสกัดด้วยน้ำมักจะเป็นสารละลายขุ่นและสีไม่เข้มมาก ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทธานอลมักจะเป็นสารละลายใสและบางสารมีสีเข้มมาก เช่น ในกลุ่มพืชทะเลที่สกัดด้วยเอทธานอลจะมีสีเขียวเข้มของคลอโรฟิลล์อย่างชัดเจน ซึ่งจากลักษณะสีเบื้องต้นเชื่อว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลแต่ละสารน่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่จะทำให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่สกัดด้วยสารต่างกันมีความแตกต่างกัน



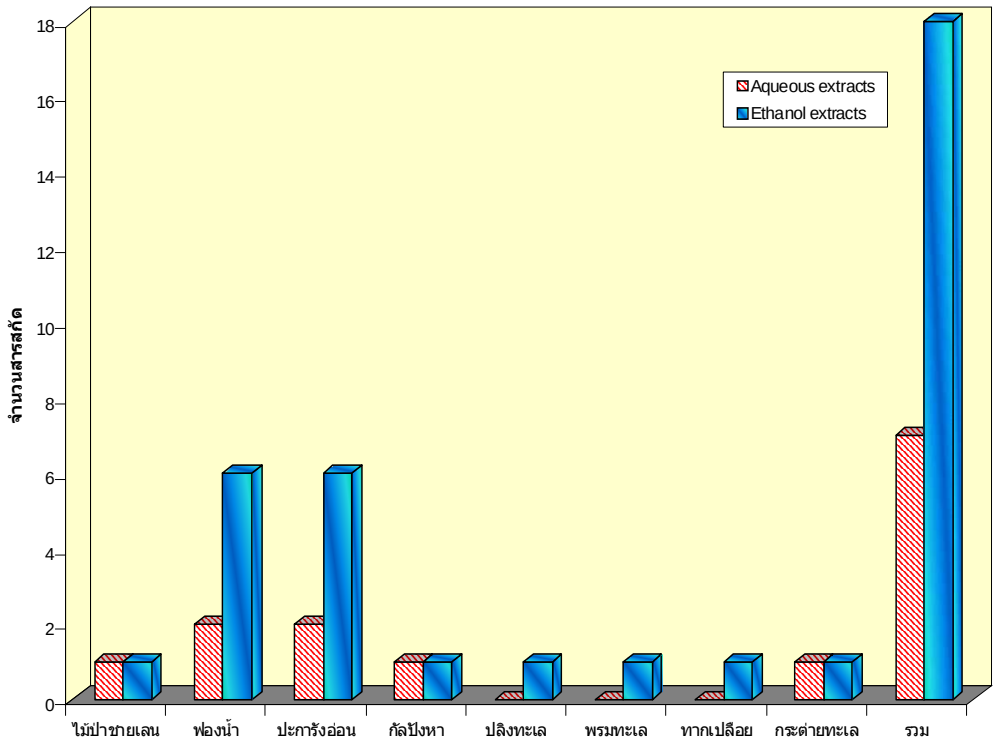
ก ข

ภาพที่ 15 ความแตกต่างของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง
ก. สารสกัดด้วยน้ำ (aqueous extracts)
ข. สารสกัดด้วยเอทธานอล (ethanol extracts)

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

จากการนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล 84 สาร มาทำการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 500, 2000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะคัดเลือกสารสกัดที่สามารถทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 50 ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตรไปทำการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นพิษที่ความเข้มข้นละเอียดต่อไป รวมทั้งเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นถึงประสิทธิภาพของสารที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง โดยสารที่ความเป็นพิษสูงควรจะต้องมีลูกน้ำยุงตายที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรด้วย

จากตารางที่ 2 และภาพที่ 16 สามารถคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตายอย่างน้อย 50% ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้รวม 25 สาร คิดเป็นร้อยละ 29.76 ของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ โดยเป็น



ภาพที่ 16 จำนวนสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลแต่ละกลุ่มที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารสกัดที่มาจากกลุ่มพืชทะเลเพียงชนิดเดียวคือจากผลเถาถอบแถบ ในกลุ่มสัตว์ทะเลมาจากลุ่มฟองน้ำและปะการังอ่อนมากที่สุดคือกลุ่มละ 8 สาร รวมเป็น 16 สาร คิดเป็นร้อยละ 72 ของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลทั้งหมดที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำและปะการังอ่อนเป็นแหล่งของสารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าฟองน้ำเป็นสัตว์ทะเลที่เป็นแหล่งสำคัญของสารที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง เช่น การศึกษาของ Selvin and Lipton (2004) ที่พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำ *Dendrilla nigra, Axinella* และ *Clathria gorgonoides* สามารถทำให้ลูกน้ำยุงตาย 100% ที่ระดับความเข้มข้น 6-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาของ Rao *et al*. (2008) ก็พบว่าฟองน้ำหลายชนิด เช่น *Psammaplysilla purpurea* และ *Haliclona cribricutis* เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย นอกจากนั้นยังมีรายงานสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลอื่นๆ ที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง เช่น สารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์จากกุ้ง *Nematopalaemon tenuipes* สารสกัดเมทธานอลจากปลิงทะเล *Holothuria scabra* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex pipens fatigans*) (Thakur *et al.,* 2004) และสารสกัดจากเพรียงหัวหอม *Didemnem* sp. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการขับไล่ยุงก้นปล่อง (*An. maculatus*) (Hussein, *et al*., 2002)

นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าปะการังอ่อนและกัลปังหาจำนวนมากสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการถูกกินเป็นอาหารและสารที่เป็นพิษ เช่น *Lobophytum* , *Sarcophyton, Cladiella, Sinularia* และ *Lemnalia* (Coll *et al.* 1982; La Barre *et al*., 1986; Pawlik *et al*., 1987; Sammarco *et al*., 1987) รวมทั้งทาก

เปลือยที่สร้างสารที่เป็นพิษต่อปลาและอาร์ทีเมีย (พันธุ์ทิพย์ และ คณะ, 2552) จึงทำให้สัตว์ในกลุ่มเหล่านี้สร้างสารที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องด้วย ข้อมูลที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือสัตว์ในกลุ่มปลิงทะเลซึ่งเป็นสัตว์กลุ่มหนึ่งมีรายงานว่ามีการสร้างสารที่เป็นพิษ (Stonik *et al*., 1999) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *B.quoyi* ที่เป็นพิษอย่างรุนแรงต่ออาร์ทีเมีย (พันธุ์ทิพย์ และ คณะ, 2552) แต่ในการศึกษานี้พบว่ามีการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องน้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเลือกใช้สารสกัดไม่เหมาะสมสำหรับกลุ่มสิ่งมีชีวิตนี้ และความเป็นพิษของสารจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมักมีผลต่อสิ่งมีชีวิตต่แต่ละกลุ่มได้แตกต่างกัน

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารสกัดที่ทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องตายทั้งหมดมีถึง 15 สาร คิดเป็นร้อยละ 60 ของจำนวนสารทั้งหมดที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ได้แก่ สารสกัดด้วยเอทธานอลจากผลเถาถอบแถบ จากฟองน้ำ *H. erecta*, *Acanthella* sp. *Auletta* sp., และ *Rhabderemia* sp. จากปะการังอ่อน *Alcyonium* sp., *Cladiella* sp., *Nepthea* sp. *Sinularia* sp., unidentified soft coral 01 และ 02 จากกัลปังหา unidentified seafan 01 และจากพรมทะเล *Palythoa* sp. และจากสารสกัดด้วยน้ำจากปะการังอ่อน *Alcyonium* sp., *Sinularia* sp., และจากกัลปังหา unidentified seafan 02 ซึ่งจะพบว่าส่วนใหญ่จะพบในสัตว์กลุ่มปะการังอ่อน กัลปังหา และฟองน้ำ ส่วนในพืชมีเพียงจากผลเถาถอบแถบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น

สารสกัดที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการศึกษานี้คือสารสกัดด้วยเอทธานอลจากกัลปังหา unidentified sea fan01 โดยทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องตายทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับที่ทำการทดสอบ และสารสกัดที่สามารถทำให้ลูกน้ำยุงตายมากกว่า 50 % ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบเบื้องต้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรมีอีก 3 สาร ได้แก่ ซึ่งเป็นสารสกัดด้วยเอทธานอลทั้งหมดมาจากผลของเถาถอบแถบ ฟองน้ำ *Acanthella* sp. และ *Auletta* sp.

สารสกัดจากกลุ่มพืชทะเลที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องตายที่ดีที่สุดคือสารสกัดด้วยเอทธานอลจากผลเถาถอบแถบ ซึ่งทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องตาย 53.33% ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำให้ลูกน้ำยุงตายทั้งหมดที่ความเข้มข้นสูงสุด 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำของเถาถอบแถบมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทธานอล โดยทำให้ลูกน้ำยุงตาย 73.33% ที่ความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่สารสกัดจากกลุ่มสาหร่ายและหญ้าทะเลที่ใช้ในการศึกษานี้มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องน้อยมาก ทั้งนี้มีรายงานว่าสารสกัดจากพืชทะเล เช่น สาหร่ายทะเล หญ้าทะเล และต้นไม้ในป่าชายเลนมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงชนิดต่าง ๆ เช่น สารสกัดจากสาหร่าย *Caulerpa scalpelliformis, Dictyota dichotoma* (Thangam and Kathiresan, 1996) สาร clionasterol จากสาหร่ายใบมะกรูด (*Halimeda macroloba*) (Dzeha *et al*., 2004) สารสกัดจากสาหร่าย *Ulva fasciata* และ *Hypnea musciformis* (Selvin and Lipton, 2004b) สารสกัดจากสาหร่าย *Microdictyon pseudohapteron*, *Acanthophora muscoides* และหญ้าทะเล *Syringodium isoetifolium* (Devi *et al*., 1997) นอกจากสารสกัดจากสาหร่ายขนาดใหญ่ ยังพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายเซลล์เดียวที่สร้างพิษเช่นไดโนแฟลกเจลเลต *Akashiwo sanguinea* ทำให้ลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ตาย ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

Microcystis aeruginosa สร้างสารพิษ microcystin ซึ่งทำให้ระยะเวลาในการพัฒนาการของลูกน้ำยุงลายใช้เวลานานกว่าปกติ (Rey *et al*., 2009) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Kiviranta *et al*. (2006) ที่พบว่าสารสกัดจาก *M. aeruginosa* มีประสิทธิภาพในการทำให้ลูกน้ำยุงตาย ซึ่งน่าจะมาจากสารพิษกลุ่ม Hepatotoxin ที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสร้างขึ้นมา และยังมีรายงานว่าสารสกัดจากรากของโกงกาง *Rhizophora apiculata* มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ดีที่สุดโดยมีค่า LC_{50} ต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารสกัดจากรากของโกงกาง *R. apiculata* สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลาย (*Ae. aegypti*) และลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 23 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Thangam and Kathiresan, 1996) แต่ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลและไม้โกงกางไม่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนที่นำมาสกัดแตกต่างกัน เช่น ในกรณีของโกงกางในการศึกษานี้ใช้ส่วนของใบแต่ในรายงานการศึกษาของ Thangam and Kathiresan (1996) ใช้ส่วนของราก แสดงว่าส่วนต่างๆ ของโกงกางมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ตลอดจนการใช้ชนิดของยุงทดสอบที่แตกต่างกัน ซึ่งยุงแต่ละชนิดมีความทนทานต่อสารสกัดได้แตกต่างกัน เช่น การศึกษาของทรงพล (2542) ที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากก้านสนสองใบ สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลาย ยุงรำคาญ และยุงก้นปล่องได้ดี โดยมีค่า LC_{50} แตกต่างกันคือ 209.96, 274.21 และ 144.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารสกัดด้วยเอทธานอลจากกูดเกี๊ยะก็ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน โดยแสดงเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ยุงลาย และยุงรำคาญที่ LC_{50} เท่ากับ 27.96, 67.90 และ 82.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (สัมภาษณ์, 2544)

จากผลการศึกษาข้างต้นจะพบว่ามีสารสกัด 25 สาร (ตารางที่ 2) ที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องอย่างเด่นชัด ดังนั้นกลุ่มสารสกัดที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องจำนวน 25 สาร ได้ถูกคัดเลือกไปศึกษาประสิทธิภาพความเป็นพิษในระดับความเข้มข้นต่ำลงต่อไป เพื่อศึกษาแนวโน้มความเป็นพิษและช่วงความเป็นพิษที่เหมาะสมต่อการคำนวณค่า LC_{50} ของสารสกัดแต่ละสาร

<u>การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง</u>

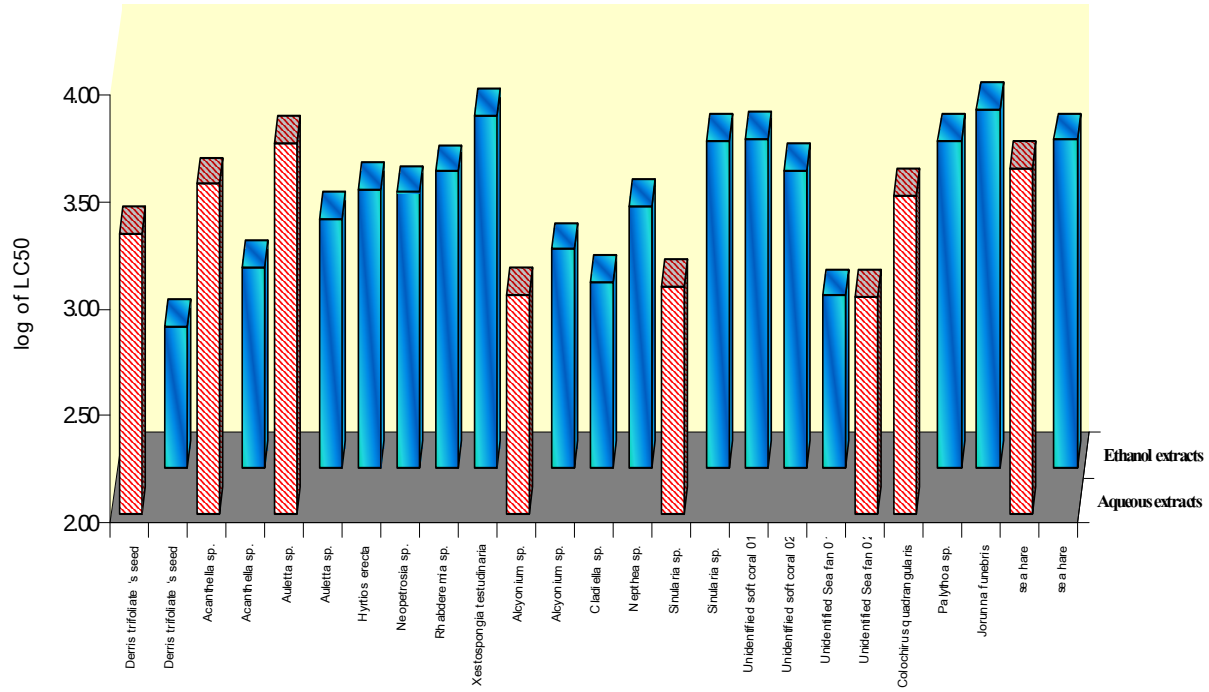
เมื่อนำสารสกัดที่คัดเลือกได้จากการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นจำนวน 25 สาร มาทำการทดสอบความเป็นพิษในช่วงละเอียด เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแสดงความเป็นพิษในรูปของค่า LC_{50} โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 3000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่มีประสิทธิภาพสูง ส่วนใหญ่เป็นสารสกัดด้วยเอทธานอลทั้งหมด ได้แก่ สารสกัดจากผลของเถาถอบแถบ กัลปังหา unidentified sea fan 01 ปะการังอ่อน *Cladiella* sp. และฟองน้ำ *Acanthella* sp. โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 462.27, 638.62, 736.53 และ 874.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากน้ำที่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด คือ สารสกัดจากกัลปังหา unidentified sea fan 02 ปะการังอ่อน *Alcyonium* sp. และ *Sinularia* sp. โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1,030.78, 1,051.60 และ 1,162.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวยังชี้ให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 17)

จากภาพที่ 17 ยังพบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ โดยสารสกัดที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง 25 สารเป็นสารสกัดด้วยเอทธานอล 17 สารและสารสกัดด้วยน้ำ 8 สาร คิดเป็นร้อยละ 68 และ 32 ตามลำดับ และสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องส่วนใหญ่จะเป็นสารสกัดด้วยเอทธานอลด้วย สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำและมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงมากกว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลมีเพียงสารสกัดจากปะการังอ่อน *Sinularia* sp. เท่านั้น ส่วนสารสกัดที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องทั้งที่สกัดด้วยเอทธานอลและน้ำ ได้แก่ สารสกัดจากผลเถาถอบแถบ ฟองน้ำ *Acanthella* sp., *Auletta* sp. ปะการังอ่อน *Alcyonium* sp. และ *Sinularia* sp. ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาซึ่งส่วนใหญ่เป็นการนำพืชกลุ่มสมุนไพรมาใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุง ก็พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลมีประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำเช่นเดียวกับในผลการศึกษานี้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของทรงพล (2542) ที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากสนสองใบมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และการศึกษาของเพ็ญนภา และ คณะ (2549) ที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากเมล็ดน้อยหน่า มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการฆ่าลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดน้อยหน่า

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องได้ดี ส่วนใหญ่มาจากกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นสัตว์คือปะการังอ่อน กัลปังหา และฟองน้ำ แต่สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ได้จากการศึกษานี้มาจากกลุ่มพืชทะเลได้แก่ไม้ป่าชายเลน ซึ่งก็คือสารสกัดจากผลของเถาถอบแถบ โดยสารสกัดด้วยเอทธานอลมีค่า LC_{50} ต่ำสุดเท่ากับ 462.27 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่สารสกัดด้วยน้ำมีความเป็นพิษน้อยกว่ามาก โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,036.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในการจะพัฒนานำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดลูกน้ำยุงนั้น นอกจากการคำนึงถึงระดับความเป็นพิษของสารสกัดแล้ว ปริมาณและการเข้าถึงตัวอย่างสิ่งมีชีวิตก็เป็นสิ่งที่สำคัญที่จะต้องพิจารณา ซึ่งเถาถอบแถบเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมาะสมมากที่สุดในการศึกษานี้ เนื่องจากเป็นพืชที่พบในป่าชายเลนทั่วไปมีปริมาณมาก สามารถเก็บตัวอย่างได้ง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือหรือเรือ จึงได้นำเถาถอบแถบมาทำการศึกษาต่อไปเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความเป็นพิษของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบ ได้แก่ ใบ กิ่งก้าน และผล เพื่อเพิ่มแหล่งของวัตถุดิบในการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในชุมชนท้องถิ่นต่อไป

อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลสามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้น้อยมาก โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำและทำให้ลูกน้ำยุงตายที่มาจากฟองน้ำ เช่น การศึกษาของ Selvin and Lipton (2004) ที่พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำ *Dendrilla nigra, Axinella* และ *Clathria gorgonoides* สามารถทำให้ลูกน้ำยุงตาย 100% ที่ระดับความเข้มข้น 6-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการศึกษาของ Rao *et al*. (2008) ก็พบว่าฟองน้ำหลายชนิด เช่น *Psammaplysilla purpurea* และ *Haliclona cribricutis* เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย ทั้งนี้สิ่งที่สำคัญในการเปรียบเทียบผลการศึกษากับรายงานที่ผ่านมา คือ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ โดยสารสกัดที่ใช้ในการศึกษานี้คิดเป็นน้ำหนักของสิ่งมีชีวิตในทะเลที่นำมาสกัดต่อปริมาตรของสารที่ใช้ในการสกัด ไม่ใช่น้ำหนักของสารสกัดที่ผ่านการทำให้เข้มข้นและอยู่ในรูปของ crude extract จึงอาจทำให้ค่าความเข้มข้นในการทำให้เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงมีค่าสูงกว่ารายงานที่ผ่านมา ซึ่งมักใช้สารสกัดที่ผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้น

นอกจากความแตกต่างของการออกฤทธิ์ของสารมาจากความแตกต่างของการใช้สารสกัด ยังมีการศึกษาพบว่าความแตกต่างของฤดูเก็บตัวอย่าง อายุ วิธีทำให้ตัวอย่างแห้ง และสารที่ใช้ในการสกัด พบว่าสารสกัดจากส่วนรากของต้นโกงกาง (*R. apiculata*) ที่เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูร้อน ผึ่งแห้งในที่ร่ม และสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลาย (*Ae. aegypti*) ได้ดีที่สุด โดยฤดูกาลมีอิทธิพลต่อความแตกต่างของประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายมากที่สุด (Thangam and Kathiresan, 2003)



ภาพที่ 17 ค่า log ของค่า LC_{50} ของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเปรียบเทียบความเป็นพิษที่มีต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ตารางที่ 2 อัตราการตายเฉลี่ยของลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ

กลุ่มสิ่งมีชีวิต	สิ่งมีชีวิตในทะเล	สารสกัด		ความเข้มข้น (mg/L)		
		Aqueous	Ethanol	500	2,000	5,000
ไม้ป่าชายเลน	*Acanthus ebracteatus*	X		0.00	0.00	10.00±4.71
			X	0.00	0.00	0.00
	Avicennia alba	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	23.33±4.71
	Avicennia officinalis	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	10.00±4.71
	Derris trifoliate' s seed	X		23.33±4.71	56.67±4.71	76.67±4.71
			X	56.67±4.71	76.67±4.71	100.00±0.00
	Excoecaria agallocha	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Rhizophora apiculata	X		0.00	0.00	16.67±4.71
			X	0.00	0.00	0.00
	Sonneratia caseolaris	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	13.33±0.00
	Xylocarpus granatum	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
สาหร่ายทะเล	*Acanthophora spicifera*	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Brachytrichia quoyi	X		0.00	0.00	16.67±4.71
			X	0.00	0.00	0.00
	Lobophora variegata	X		0.00	0.00	23.33±4.71
			X	0.00	0.00	0.00
	Turbinaria conoides	X		0.00	0.00	13.33±0.00
			X	0.00	0.00	0.00
หญ้าทะเล	*Cymodocea rotundata*	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	6.67±0.00
	Cymodocea serrulata	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 2 (ต่อ)

กลุ่มสิ่งมีชีวิต	สิ่งมีชีวิตในทะเล	สารสกัด		ความเข้มข้น (mg/L)		
		Aqueous	Ethanol	500	2,000	5,000
หญ้าทะเล	*Enhalus acoroides*	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Halophila pinifolia	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	16.67±4.71
ฟองน้ำ	*Acanthella* sp.	X		0.00	33.33±9.43	56.67±4.71
			X	56.67±4.71	100.00±0.00	100.00±0.00
	Auletta sp.	X		0.00	0.00	70.00±4.71
			X	56.67±4.71	66.67±9.43	100.00±0.00
	Hyrtios erecta	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	66.67±9.43	100.00±0.00
	Iotrochota baculifera	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Neopetrosia sp.	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	96.67±4.71
	Rhabderemia sp.	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	33.33±9.43	100.00±0.00
	Xestospongia testudinaria	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	83.33±4.71
ปะการังอ่อน	*Alcyonium* sp.	X		16.67±4.71	100.00±0.00	100.00±0.00
			X	23.33±4.71	100.00±0.00	100.00±0.00
	Cladiella sp.	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
	Nepthea sp.	X		0.00	10.00±4.71	40.00±9.43
			X	23.33±4.71	53.33±9.43	83.33±4.71
	Sinularia sp.	X		33.33±9.43	100.00±0.00	100.00±0.00
			X	0.00	0.00	1000.00
	Unidentified soft coral01	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	1000.00
	Unidentified soft coral02	X		0.00	0.00	0.00
			X	10.00±4.71	23.33±4.71	100.00±0.00

ตารางที่ 2 (ต่อ)

กลุ่มสิ่งมีชีวิต	สิ่งมีชีวิตในทะเล	สารสกัด		ความเข้มข้น (mg/L)		
		Aqueous	Ethanol	500	2,000	5,000
กัลปังหา	Unidentified sea fan01	X		0.00	0.00	0.00
			X	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
	Unidentified sea fan02	X		0.00	96.67±4.71	100.00±0.00
			X	0.00	0.00	0.00
ปลิงทะเล	*Bahadschia vitiensis*	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Colochirus	X		0.00	10.00±4.71	60.00±9.43
	quadrangularis		X	0.00	13.33±9.43	23.33±4.71
	Cercodemas anceps	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Holothuria atra	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Stichopus horrens	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Stichopus sp.	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
	Synaptura cf. *recta*	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	0.00
สัตว์ทะเลอื่นๆ	*Palythoa* sp.	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	100.00±0.00
	Jorunna funebris	X		0.00	0.00	0.00
			X	0.00	0.00	70.00±4.71
	Unidentified	X		0.00	0.00	83.33±4.71
	sea hare01		X	0.00	0.00	66.67±9.43
	Corallimorph	X		0.00	0.00	16.67±4.71
			X	0.00	0.00	0.00
	control			0.00		
	control+ethanol			0.00		
	control+abate sand			100.00±0.00		

ตารางที่ 3 ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องที่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 7 ระดับระหว่าง 100-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มสิ่งมีชีวิต	สิ่งมีชีวิต	สารสกัด		LC_{50} (mg/L)
		Aqueous	Ethanol	
ไม้ป่าชายเลน	*Derris trifoliate* 's seed	x		2,036.00
	Derris trifoliate 's seed		x	462.27
ฟองน้ำ	*Acanthella* sp.	x		3,479.50
	Acanthella sp.		x	874.16
	Auletta sp.	x		5,371.25
	Auletta sp.		x	1,472.80
	Hyrtios erecta		x	1,992.10
	Neopetrosia sp.		x	1,938.23
	Rhabderemia sp.		x	2,437.80
	Xestospongia testudinaria		x	4,414.28
ปะการังอ่อน	*Alcyonium* sp.	x		1,051.60
	Alcyonium sp.		x	1,051.10
	Cladiella sp.		x	736.53
	Nepthea sp.		x	1,686.60
	Sinularia sp.	x		1,162.50
	Sinularia sp.		x	3,402.16
	Unidentified soft coral 01		x	3,439.83
	Unidentified soft coral 02		x	2,452.80
กัลปังหา	Unidentified sea fan 01		x	638.62
	Unidentified sea fan 02	x		1,030.78
ปลิงทะเล	*Colochirus quadrangularis*	x		3,080.89
สัตว์ทะเลอื่นๆ	*Palythoa* sp.		x	3,402.16
	Jorunna funebris		x	4,726.31
	Unidentified sea hare 01	x		4,111.42
	Unidentified sea hare 01		x	3,436.50

ความแตกต่างของความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของผลเถาถอบแถบ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง พบว่าสารสกัดจากผลเถาถอบแถบมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง และสิ่งที่สำคัญที่สุดคือเถาถอบแถบเป็นไม้พื้นบ้านป่าชายเลนที่เป็นที่รู้จักในชุมชนชาวป่าชายเลนทั่วไป สามารถเก็บตัวอย่างได้ง่าย จึงเหมาะสมที่จะพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในชุมชนท้องถิ่น จึงได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบความแตกต่างของความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องจากส่วนที่แตกต่างกันของต้นเถาถอบแถบ ได้แก่ ใบ กิ่งก้าน และผล ซึ่งถ้าส่วนต่างๆ มีประสิทธิภาพที่เหมือนกัน การนำมาใช้ประโยชน์ก็จะมีศักยภาพมากขึ้น เนื่องจากมีแหล่งของวัตถุดิบที่เพียงพอและมีทุกฤดูกาล ไม่จำเป็นต้องรอเฉพาะส่วนของผลเถาถอบแถบเท่านั้น

เถาถอบแถบหรือถอบแถบน้ำ (*Derris trifoliata*) เป็นต้นไม้ที่มีต้นเป็นเถา ใบมีลักษณะเป็นรูปหอกท้องใบมีสีเขียวอมบรอนซ์ถึงเขียวเข้มมีดอกสีขาว ลักษณะผลแบนเล็กเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (ภาพที่ 11) เป็นไม้ที่พบในป่าชายเลนตอนบนบริเวณที่มีดินค่อนข้างแข็ง และมักพบมากในบริเวณป่าชายเลนที่ถูกทำลาย มีชื่อเรียกตามท้องถิ่น เช่น แควบทะเล ผักแถบ ถอบแถบทะเล ถั่วน้ำ ทับแถบ เป็นต้น มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน เช่น รากใช้เป็นยาระบาย แก้พิษตานซาง ถ่ายเสมหะ ขับผายลม ทำให้ถ่ายอุจจาระ แก้ปวดตามข้อ และแก้ปวดกระดูก เถาใช้แก้ตาลขโมย ถอนพิษสำแดง และขับลม ใบใช้เป็นยาระบาย และทั้งต้นใช้เป็นยาระบาย แก้อาการเกร็ง ขับพยาธิ และระบายพิษไข้ (กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2553; Bamroongrugsa, 1999) ในใบของเถาถอบแถบมีสาร rotenone ซึ่งสามารถฆ่าสิ่งมีชีวิตหลากหลายกลุ่มตั้งแต่แมลง ไส้เดือน และปลา จึงมีการใช้เถาถอบแถบเป็นยาถ่ายพยาธิในสัตว์ มีการนำเถาถอบแถบและพืชในสกุลเดียวกันไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตโรตีโนนในทางการค้าเพื่อใช้เป็นยาฆ่าแมลง นอกจากนั้นคนในท้องถิ่นมักใช้ใบที่หั่นแล้วไปทำให้สัตว์น้ำตายเพื่อใช้ในการจับกุ้งและปลา (Tan, 2010)

จากการเปรียบเทียบความเป็นพิษของใบ กิ่งก้าน และผลของเถาถอบแถบ ที่สกัดด้วยน้ำและเอทธานอลที่ความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 100, 250, 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเถาถอบแถบและการใช้สารสกัดที่แตกต่างกันมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น α = 0.05 (ตารางที่ 5) โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องเป็นสารที่มาจากส่วนของผล และสารสกัดด้วยเอทธานอลมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างชัดเจน โดยจะพบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากผลเถาถอบแถบมีความเป็นพิษสูงสุด โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 405.69 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทธานอลจากกิ่งก้านและใบ โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 1,431.13 และ 1,910.63 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 18) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำมีเพียงสารสกัดจากผลเถาถอบแถบที่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 1,616.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) ส่วนกิ่งก้านและใบมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องน้อยมาก ซึ่งการที่ผลเถาถอบแถบแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องนี้มีความคล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Yenesew *et al.* (2006) ที่รายงานว่าสารสกัดด้วยเมทธานอลจากผลของเถาถอบแถบสามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยคณะนักวิจัยนี้ได้ทำการแยกสารสกัดพบว่ามีองค์ประกอบของสารประเภท rotenoloid ที่ชื่อว่า 7a-*O*-methyl-12a-

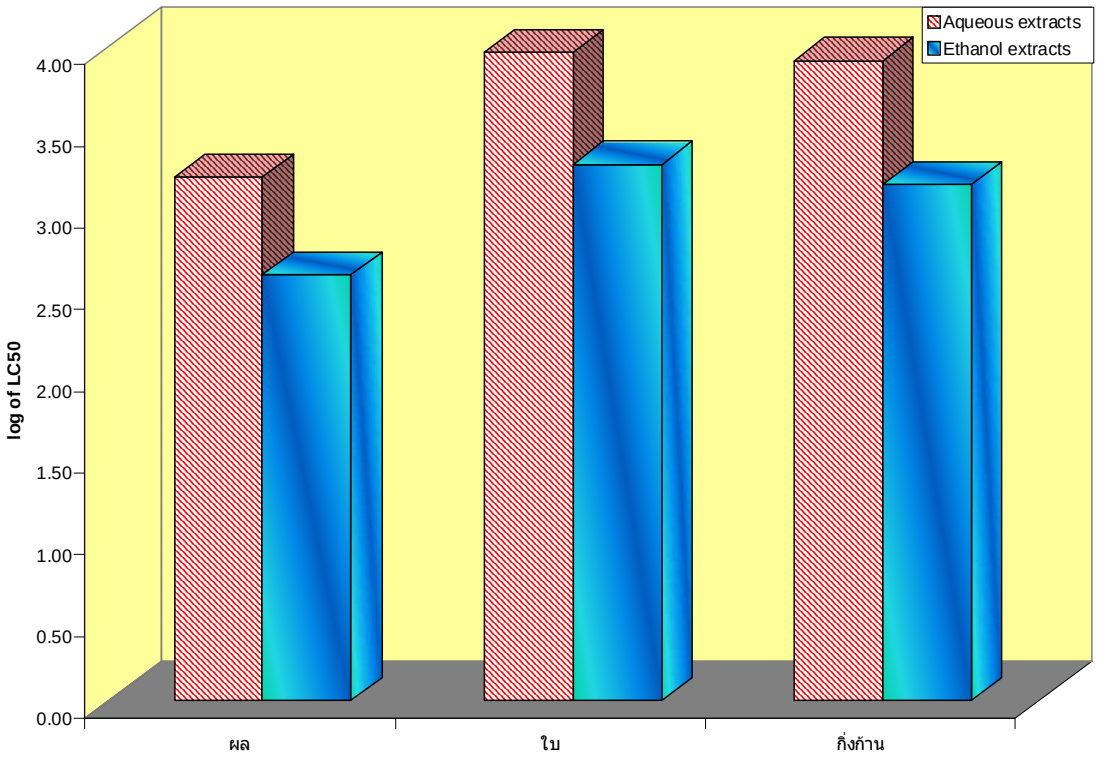
hydroxydeguelol และสารประเภท spirohomooxarotenoid ที่ชื่อว่า spiro-13-homo-13-oxaelliptone รวมทั้งสารประเภท chromanone (6,7-dimethoxy-4-chromanone) และสารที่เป็นที่รู้จักกันดีคือกลุ่ม rotenoids, rotenone, tephrosin และ dehydrodeguelin ซึ่งคณะนักวิจัยนี้เชื่อว่าสารที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายในสารสกัดของผลเถาถอบแถบน่าจะเกิดจากสารกลุ่ม rotenone

ความเป็นพิษของเถาถอบแถบน่าจะเกิดจากการมีองค์ประกอบหลักเป็นสารประเภท rotenone ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อสัตว์หลายหลายกลุ่มและมีการใช้เป็นยาฆ่าแมลง (Tan, 2010) และมีการใช้สาร rotenone จากเถาถอบแถบซึ่งมีความเป็นพิษต่อปลา ในการจัดการบ่อเลี้ยงปลาด้วย (Sumera and Conato, 2006a; 2006b) นอกจากนั้นยังมีรายงานการศึกษาพบสารประเภท rotenone, rotenoid และ rotenoloid จากส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบ ซึ่งมีการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางยา โดยเฉพาะคุณสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งจะพัฒนาไปใช้เป็นยาต้านมะเร็ง ตัวอย่างเช่นสารกลุ่ม deguelin ซึ่งเป็นสารประเภท rotenoid ทีมีศักยภาพในการยับยั้งมะเร็งจากส่วนรากของเถาถอบแถบ (Wenjie *et al*., 2009) สารกลุ่ม retenoloid ชนิดใหม่ที่ชื่อว่า 7a-O-methylelliptonol จากลำต้นของเถาถอบแถบ และเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) (Cheenpracha *et al*., 2007) และสารกลุ่ม rotenoid จากลำต้นของเถาถอบแถบ ได้แก่ สาร 12a-hydroxyrotenone ออกฤทธิ์ต้าน nitricoxide(NO) อย่างมีประสิทธิภาพ และสาร 6a,12a-dehydrodeguelin ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging activity ซึ่งน่าจะพัฒนาเป็นสาร anti-inflammatory (Tewtrakul *et al*. (2009) นอกจากนั้นยังมีรายงานพบสารประเภทฟลาโวนอยด์ (flavonoid) จากเถาถอบแถบ ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มักทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น สาร Trifolinone A,B, Lupinifolin , Dereticulatin , α-Toxicarol , Deguelin, Rotenone, 12a-Hydroxyrotenone, 12a-Hydroxyelliptone และ 1'''-Hydroxy-2''',3'''-epoxylupinifolin เป็นต้น (สาโรจน์, 2546) สารกลุ่ม flavonol triglycosides ประเภท kaempferol จากรากอากาศ (Xu *et al*., 2009) และสารกลุ่ม glycosidic 15 สารจากใบของเถาถอบแถบ (Takeda *et al*., 2008) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าสารสกัดจากเถาถอบแถบ ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพได้ด้วย (Khan *et al*., 2006)

ดังนั้นการนำสารสกัดจากผลเถาถอบแถบไปประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ต่อแหล่งชุมชนจึงมีความเป็นไปได้ เนื่องจากวิธีการเตรียมสารสกัดไม่ยุ่งยากและผลเถาถอบแถบพบได้ทั่วไปในป่าชายเลน ทั้งนี้การใช้สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตมาทดแทนสารเคมีที่เป็นพิษเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นที่ต้องการต่อโลกในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการใช้วิธีการสกัดสารที่ถูกวิธีย่อมเป็นแนวทางหนึ่งที่จะได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพและเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมแมลงพาหะนำโรคต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สมบูรณ์ และ คณะ, 2547) เนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงเป็นสารสกัดหยาบที่ประกอบด้วยสารหลากชนิด ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมวิธีการใช้ให้ถูกต้องโดยเน้นที่คุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสัมภาษณ์ (2544) พบว่าสารสกัดด้วยเอทธานอลจากกูดเกี๊ยะมีประสิทธิภาพที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง ยุงลาย และยุงรำคาญและยังออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลง แต่จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากูดเกี๊ยะมีสารเคมีหลายชนิดที่ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อคนและสัตว์ ดังนั้นในการนำมาใช้ควบคุมลูกน้ำยุงจะต้องศึกษาผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นต่อผู้ใช้ด้วย

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบที่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 8 ระดับ ระหว่าง 100-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนของเถาถอบแถบ	สารสกัด		LC_{50} (mg/L)
	Aqueous	Ethanol	
ผล	X		1,616.50
		X	405.69
ใบ	X		9,399.77
		X	1,910.63
กิ่งก้าน	X		8,247.35
		X	1,431.13



ภาพที่ 18 ค่า log ของ LC_{50} ของส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบที่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

ตารางที่ 5 ส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบและการใช้สารสกัดที่ต่างกัน มีความเป็นพิษแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย Two-factors ANOVA (α =0.05)

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*F crit*
Sample (ผล, ใบ, กิ่งก้าน)	73775316.54	2	36887658.27	2072.157	3.885294
Columns (Aqueous, ethanol)	120377162.2	1	120377162.2	6762.163	4.747225
Interaction	35646136.96	2	17823068.48	1001.207	3.885294
Within	213618.9289	12	17801.57741		
Total	230012234.6	17			

การศึกษาเบื้องต้นในการนำสารสกัดจากเถาถอบแถบไปใช้กำจัดลูกน้ำยุงในภาคสนาม

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง ซึ่งพบว่าเถาถอบแถบเป็นสิ่งมีชีวิตที่แสดงความเป็นพิษสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยมีความแตกต่างของความเป็นพิษจากส่วนของผล ใบ และกิ่งก้าน ดังที่ได้กล่าวไว้เบื้องต้นแล้วว่าการจะประยุกต์สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลไปใช้ประโยชน์ นอกจากจะต้องคำนึงถึงความเป็นพิษของสารสกัดที่มีต่อลูกน้ำยุงแล้ว ปริมาณวัตถุดิบและการเข้าถึงวัตถุดิบก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึง ซึ่งในกรณีของเถาถอบแถบมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ในชุมชนท้องถิ่น ด้วยคุณสมบัติตามที่กล่าวมาจึงได้นำสารสกัดจากเถาถอบแถบส่วนต่างๆ ที่สกัดด้วยน้ำและเอทธานอลไปทำการทดสอบในภาคสนาม โดยนำสารสกัดจากเถาถอบแถบไปทำการผสมลงในอ่างทดสอบ และนำไปวางตามบ้านเรือนที่อยู่อาศัยเพื่อเลียนแบบสภาพน้ำขัง ซึ่งจะทำให้ได้ผลการทดสอบที่สามารถประยุกต์ไปใช้ประโยชน์โดยชุมชนท้องถิ่นอย่างชัดเจนมากกว่าเฉพาะผลการทดสอบที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงได้มีการทดสอบเบื้องต้นในการใช้ประโยชน์จากสารสกัดเถาถอบแถบในชุมชนท้องถิ่น โดยได้เตรียมชุดทดสอบจากเถาถอบแถบส่วนต่างๆ ที่สกัดด้วยเอทธานอลและน้ำ และนำไปวางในห้องปฏิบัติการเปียกของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล 1 ชุด และนำไปวางในบ้านเรือนที่อยู่อาศัยบริเวณที่เก็บตัวอย่างเถาถอบแถบ ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าการทดสอบที่บริเวณห้องปฏิบัติการเปียกของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล พบว่าไม่มีลูกน้ำยุงในชุดทดสอบใดๆ เลย แม้แต่ในชุดที่เป็นชุดควบคุมการทดสอบ ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าปริมาณยุงในบริเวณศึกษาไม่มาก โดยเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 10 วันจึงเริ่มพบลูกน้ำยุงในชุดทดสอบที่ใส่สารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปสารสกัดด้วยน้ำสลายตัวและเริ่มเน่าเสีย ในขณะที่ชุดทดสอบที่วางในบ้านเรือนบริเวณที่เก็บตัวอย่าง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ชุดทดสอบที่เป็นชุดควบคุมมีลูกน้ำยุงเกิดขึ้น แต่ในชุดที่สารสกัดจากเถาถอบแถบส่วนต่างๆ ไม่พบลูกน้ำยุง (ภาพที่ 19) ดังนั้นการเพิ่มชุดทดสอบในบริเวณชุมชนที่อยู่อาศัยให้มากเพียงพอ โดยการขอความมือจากชุมชนบริเวณนั้นน่าจะทำให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น ในการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเถาถอบแถบในการกำจัดลูกน้ำยุงต่อไป

ก ข

ภาพที่ 19 การนำสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของเถาถอบแถบไปทดสอบในชุมชนท้องถิ่น
ก. ชุดทดสอบที่ใส่สารสกัดไม่มีลูกน้ำยุง
ข. ชุดทดสอบที่เป็นชุดควบคุมมีลูกน้ำยุง

II. การคัดเลือกสารต้านมาลาเรียจากสารสกัดที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเล

จากที่มีรายงานการศึกษาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องที่ชี้ให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นแหล่งที่สำคัญของสารที่มีคุณสมบัติต้านมาลาเรีย (Donia and Hamann, 2003; Mayer *et al.*, 2007; Fattorusso and Taglialatela-Scafati, 2009) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาการยับยั้งโปรโตซัวกลุ่ม *Plasmodium* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่มาจากยุงก้นปล่อง สำหรับการศึกษานี้จะทำการค้นหาแหล่งของสารต้านมาลาเรียจากสิ่งมีชีวิตในทะเล โดยทำการทดสอบทางเคมีด้วยวิธีทดสอบการยับยั้ง β-hematin ที่เป็นรงควัตถุที่โปรโตซัวสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองในขณะกินเลือดมนุษย์ ซึ่งกลไกดังกล่าวได้มีการค้นพบในยารักษามาลาเรียที่ใช้รักษามาลาเรียในปัจจุบันหลายชนิด และวิธีการทดสอบการยับยั้ง β-hematin เป็นวิธีการทางเคมีที่ง่ายและเป็นที่เชื่อถือได้สามารถทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ (Ncozaki and Egan, 2005)

ทำการทดสอบการยับยั้ง β-hematin เบื้องต้นโดยวิธี High-throughput screening เพื่อคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลจำนวนทั้งหมด 185 สาร พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งสาร β-hematin โดยสามารถสังเกตเห็นสีส้มอมชมพู (ภาพที่ 20) มีทั้งหมด 42 สาร คิดเป็นร้อยละ 22.70 ของสารสกัดทั้งหมด จากภาพที่ 21 แสดงให้เห็นว่าสารที่ยับยั้ง β-hematin มาจากฟองน้ำมากที่สุดคือ 13 สาร (ภาพที่ 24) รองลงมาคือ สารสกัดจากสาหร่ายทะเล 12 สาร (ภาพที่ 22) หญ้าทะเล 6 สาร (ภาพที่ 23ก-23จ) ปะการังอ่อน 3 สาร (ภาพที่ 25ก-25ค) กัลปังหา 2 สาร (ภาพที่ 25ง-25จ) ทากเปลือย 2 สาร (ภาพที่ 26ก-26ข) ปลิงทะเล 2 สาร (ภาพที่ 26ค-26ง) และพันธุ์ไม้ป่าชายเลน 2 สาร (ภาพที่ 23ฉ-23ช) ซึ่งผลการศึกษานี้คล้ายคลึงกับการรวบรวมรายงานสารต้านมาลาเรียจากสิ่งมีชีวิตในทะเลโดย Ravichandran (2007) และ Fatturasso and Taflialatela-Scaffati (2009) ที่ชี้ให้เห็นว่าฟองน้ำเป็นแหล่งที่สำคัญที่สุดของสารที่สามารถพัฒนาเป็นสารต้านมาลาเรีย มาจากฟองน้ำหลากชนิด เช่น *Mycale*, *Chondrilla*, *Sigmosceptrella*, *Plakortis*, *Plakiinastrlla*, *Latrunculia*, *Diacarnus* และ *Xestospongia* นอกจากฟองน้ำแล้วกัลปังหาก็เป็นสิ่งมีชีวิตในทะเลอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษาพบสารยับยั้งมาลาเรีย เช่น แส้ทะเล *Eunicea* (Wei *et al.*, 2004)

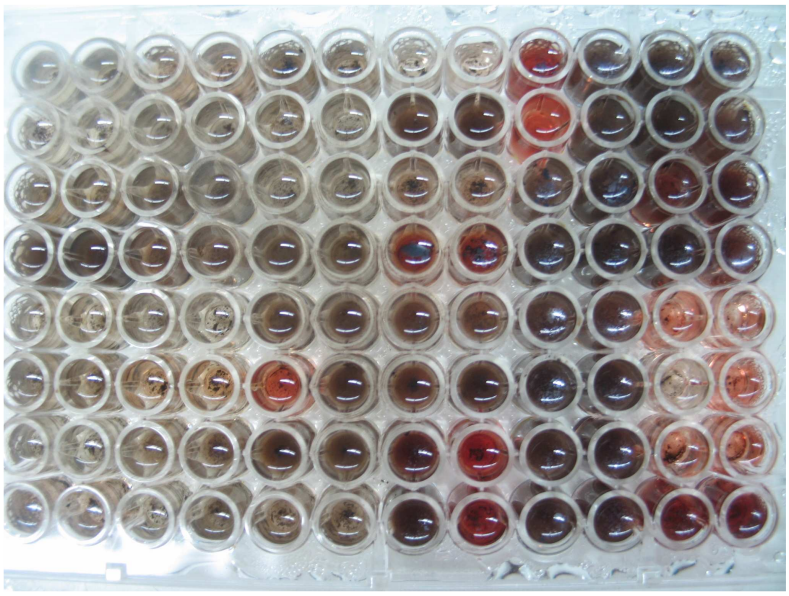
สาร Bielchowskysin จากกัลปังหา *Pseudopterogorgia kallos* (Marrero *et al*., 2004) สาร Briarellins 6 ชนิด และ Polyanthellin A จากกัลปังหา *Briareum polyanthes* (Ospina *et al*., 2003) ซึ่งกัลปังหาที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มี 2 ชนิดเท่านั้นที่สร้างสารยับยั้ง β-hematin นอกจากนั้นยังพบสารอัลคาลอยด์ที่ยับยั้งมาลาเรียได้ดีในกลุ่มเพรียงหัวหอม เช่น สารกลุ่ม Lepadins จากเพรียงหัวหอม *Clavelina lapadiformis* และ *Didemnum* sp. กลุ่มจุลินทรีย์ในทะเลซึ่งเป็นอีกแหล่งที่มีความสำคัญในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ก็พบว่าสร้างสารยับยั้งมาลาเรียด้วย เช่น สาร Salinosporamide A จากแบคทีเรียทะเลสกุล *Salinispora* สาร Venturamides จาก *Oscillatoria* สาร Dragomabin จาก *Lyngbya majuscula* และสาร Gallinamide A จาก *Schizothrix* (Fatturasso and Taflialatela-Scaffati, 2009) สำหรับสารสกัดจากพันธุ์ไม้ในป่าชายเลน 2 ชนิดคือฝาดขาวและเถาถอบแถบ เป็นสิ่งมีชีวิตที่ให้ผลการทดสอบที่น่าสนใจมากในการศึกษานี้ โดยสีที่ปรากฏเป็นสีส้มเข้มแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งที่ดี จึงได้นำสารที่ให้สีส้มในการทดสอบแบบ High-throughput screening มาทำการทดสอบระดับความสามารถในการยับยั้ง β-hematin โดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง

เมื่อนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่สามารถยับยั้งสาร β-hematin ที่คัดเลือกได้ 42 สาร มาทำการทดสอบใน well plate โดยทำการเจือจางความเข้มข้นให้ได้ 4 ระดับความเข้มข้นคือ 5,000, 2,500 1,250 และ 625 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปทดสอบการยับยั้ง β-hematin โดยมีการวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้ง (ตารางที่ 6 และภาพที่ 27) พบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล 4 กลุ่มหลักที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดคือ ฟองน้ำ ไม้ป่าชายเลน หญ้าทะเล และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยพบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีศักยภาพในการยับยั้ง β-hematin ได้ดีที่สุดมีจำนวน 10 สาร คือ ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) ต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) ฟองน้ำ *Pseudoceratina purpurea* ฟองน้ำ unidentified sponge 01 (Order Haplosclerida) ผลของเถาถอบแถบ (*D. trifoliata*) ฟองน้ำ *Haliclona* sp.1 ฟองน้ำ *Haliclona* sp.2 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) หญ้าทะเล *H. pinifolia* และ *C. rotundata* โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.976, 2.814, 2.764, 2.677, 2.540, 2.306, 2.289, 2.230, 2.218 และ 2.189 ตามลำดับ เมื่อลดความเข้มข้นลงมาครึ่งหนึ่งคือที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพในการยับยั้ง β-hematin ได้ดีที่สุดยังคงอยู่ในกลุ่มเดียวกับที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่มีจำนวนลดลงคือ 6 สาร คือ ต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) ผลของเถาถอบแถบ (*D. trifoliata*) หญ้าทะเล (*C. rotundata*) ฟองน้ำ *P. purpurea* และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 2.465, 2.283, 1.988, 1.973, 1.954 และ 1.911 ตามลำดับ เช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพในการยับยั้ง β-hematin ได้ดีที่สุดมี 5 สาร คือ ต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) หญ้าทะเล (*C. rotundata*) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) ผลของเถาถอบแถบ (*D. trifoliata*) และ ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 1.979, 1.921, 1.869, 1.809 และ 1.704 ตามลำดับ สำหรับการทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการศึกษานี้คือ 625 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพในการยับยั้ง β-hematin ได้ดีที่สุดมี 5 สาร คือ สารสกัดจาก

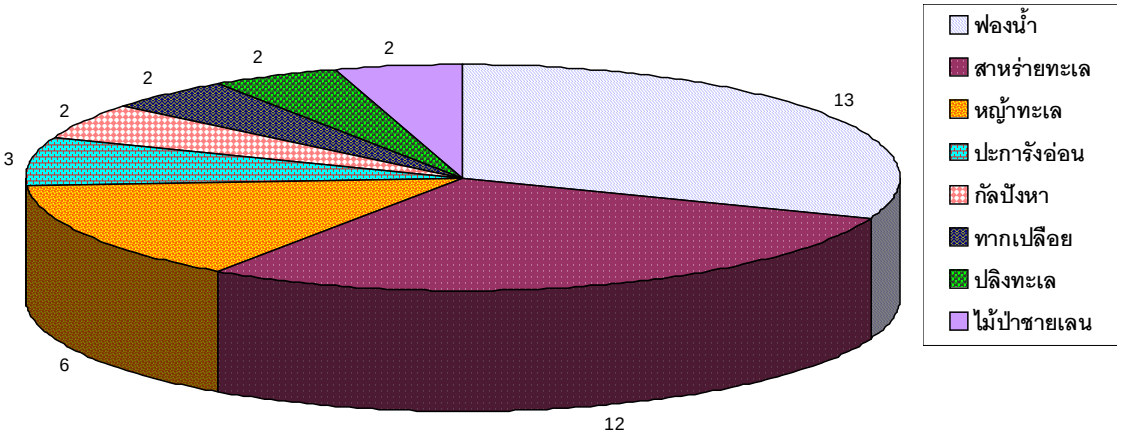
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) หญ้าทะเล (*C. rotundata*) ต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) ฟองน้ำ *Mycale (Zygomycale) parishii* และ unidentified sponge 03 (Order Dictyoceratida) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.899, 1.698, 1.538, 1.505 และ 1.443 ตามลำดับ

ดังนั้นจากผลการทดสอบการยับยั้งสาร β-hematin ที่ความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับ พบว่าสารสกัดที่สามารถยับยั้งสาร β-hematin ได้ดีมาจากกลุ่มสาหร่าย 1 ชนิด หญ้าทะเล 2 ชนิด ไม้ป่าชายเลน 2 ชนิด และฟองน้ำ 6 ชนิด โดยสามารถคัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพในการจะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่โดดเด่นที่ความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับ คือ สารสกัดจากต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) หญ้าทะเล (*C. rotundata*) ผลของเถาถอบแถบ (*D. trifoliata*) และฟองน้ำ *P. purpurea* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลในการศึกษานี้มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารที่จะพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียต่อไป

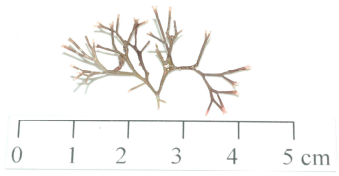
จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียในการศึกษานี้เป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ เช่น Bandaranayake (2002) ได้รวบรวมรายงานสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นไม้ป่าชายเลน ได้รายงานว่ามีการใช้สารจากฝาดขาวเป็นยาพื้นบ้าน เช่น ป้องกันการเป็นหมัน รักษาหอบ เบาหวาน งูกัด และมีคุณสมบัติต้านไวรัสด้วย รวมทั้งมีรายงานการศึกษาว่าฝาดขาวมีคุณสมบัติลดความดันโลหิตด้วย (Lin *et al*., 1993) ส่วนสารจากเถาถอบแถบ นอกจากผลการศึกษาในส่วนที่ 1 ที่พบว่าเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด ยังมีรายงานการใช้เป็นยาถ่าย เป็นยากำจัดวัชพืช และเป็นพิษต่อปลา (Bandaranayake, 2002) ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) สร้างสารต้านจุลชีพในวงกว้าง (Gulavita *et al.,* 1987; Kubo *et al*., 1989; Prommas *et al*., 2009) และสารที่เป็นพิษต่อเซลล์และมีคุณสมบัติทางยาในกลุ่ม Isoquinoline alkaloid หลายชนิด (Gulavita *et al*., 1991; Fontana *et al*., 2001; Oku *et al*., 2003) หญ้าทะเล *C. rotundata* สร้างสารยับยั้งจุลชีพ (Bhosale *et al*., 2002) และยับยั้งการสร้าง byssus ของหอยแมลงภู่ (พันธุ์ทิพย์ และ คณะ, 2553) ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงต้องค้นหาสารที่ทำหน้าที่หลักในการยับยั้ง β-hematin โดยจะต้องเข้าสู่ขั้นตอนการแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์ต่อไป รวมทั้งควรมีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นลดลงจนถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง β-hematin เพื่อหาค่า MIC (Minimum inhibition concentration) เพื่อใช้เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้งที่ชัดเจนมากขึ้น



ภาพที่ 20 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง β- hematin จะให้สีสีส้มแดงในการทดสอบ



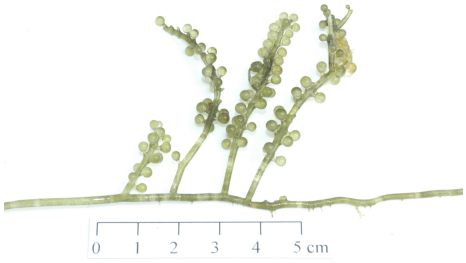
ภาพที่ 21 จำนวนสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มที่สร้างสารยับยั้ง β-hematin



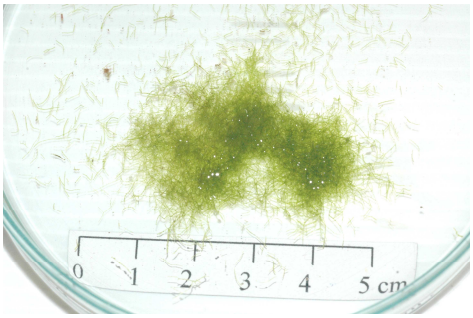
ก

ข

ค



ง



จ

ฉ

ช

ซ

<u>ภาพที่ 22</u> สาหร่ายทะเลที่สร้างสารยับยั้ง β- hematin

ก. *Amphiroa fragillisima*

ข. *Brachytrichia quoyi*

ค. *Calpomenia sinuosa*

ง. *Caulerpa lentillifera*

จ. *Cladophora* sp.

ฉ. *Dictyota cervicornis*

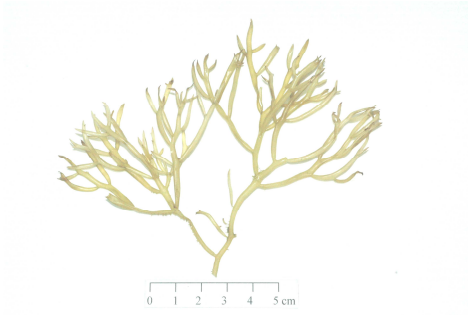
ช. *Gelidiella acerosa*

ซ. *Gracilaria* sp.

ฌ

ญ

ฎ



ฏ

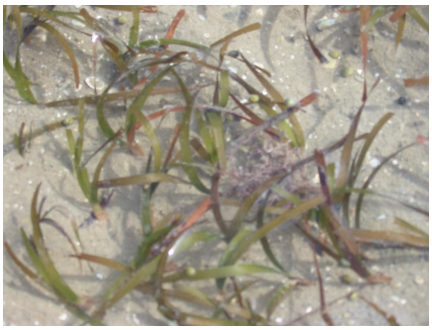
ภาพที่ 22 (ต่อ)

ฌ. *Hydroclathrus clathratus*

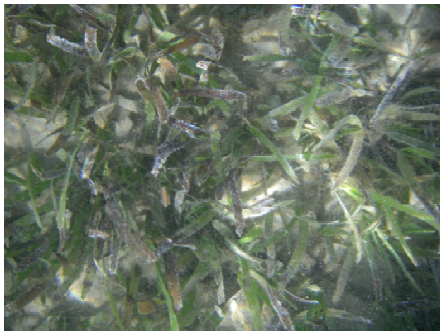
ญ. *Lobophora variegata*

ฎ. *Sargassum polycystum*

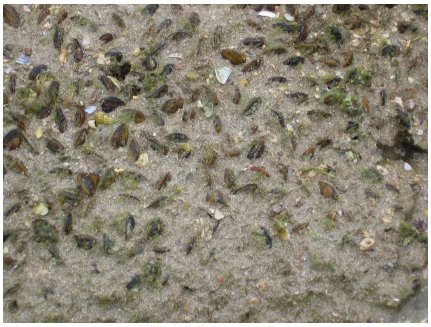
ฏ. *Solieria robusta*



ก



ข



ค

ง

จ

ฉ

ย

ร

ภาพที่ 23 หญ้าทะเลและไม้ป่าชายเลนที่สร้างสารยับยั้ง β- hematin

ก. *Cymodocea rotundata*

ข. *Cymodocea serrulata*

ค. *Halophila beccharii*

ง. *Halophila ovalis*

จ. *Halophila pinifolia*

ฉ. *Thalassia hemphrichii*

ช. *Derris trifoliate*

ซ. *Lumnitzera racemosa*

ก

ข

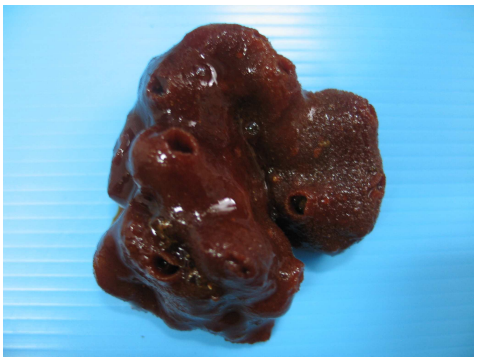
ค

ง

จ

ฉ

ช



ซ

ภาพที่ 24 ฟองน้ำทะเลที่สร้างสารยับยั้ง β- hematin

ก. *Acanthella* sp.

ข. *Auletta* sp.

ค. *Haliclona* sp.1

ง. *Haliclona* sp.2

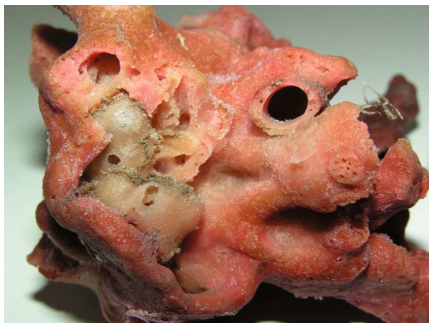
จ. *Mycale (Zygomycale) parishii*

ฉ. *Neopetrosia* sp.

ช. *Pseudoceratina purpurea*

ซ. *Rhabderemia* sp.

ฌ



ญ

ฎ

ฏ

ฐ

ภาพที่ 24 (ต่อ)

ฌ. *Xestrospongia testudinaria*

ญ. unidentified sponge 01 (Order Haplosclerida)

ฎ. unidentified sponge 02 (Order Dendroceratida)

ฏ. unidentified sponge 03 (Order Dictyoceratida)

ฐ. unidentified sponge 04 (Order Dictyoceratida)

ก

ข

ค

ง

จ

ภาพที่ 25 ปะการังอ่อนและกัลปังหาที่สร้างสารยับยั้ง β- hematin

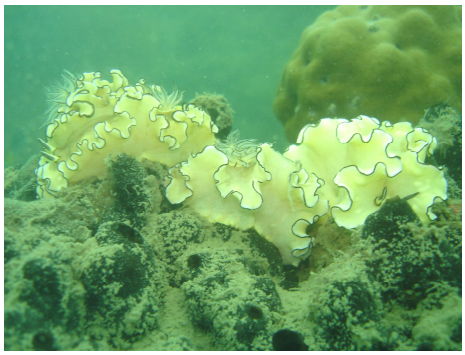
ก. *Cladiella* sp.

ข. *Sarcophyton* sp.

ค. unidentified soft coral01

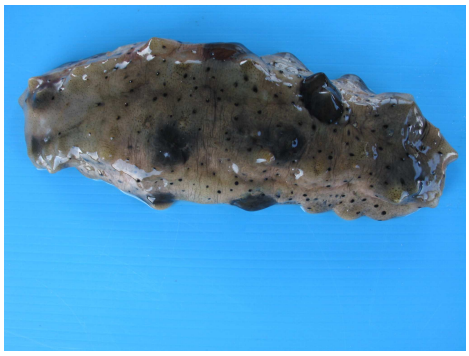
ง. unidentified sea fan01

จ. unidentified sea fan02

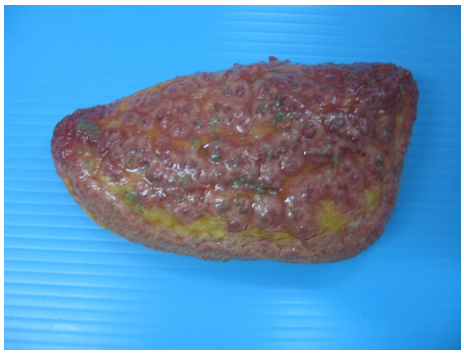


ค

ง



ค



ง

ภาพที่ 26 ทากเปลือยและปลิงทะเลที่สร้างสารยับยั้ง β- hematin

ก. *Glossodoris atromarginata*

ข. *Phylidiella nigra*

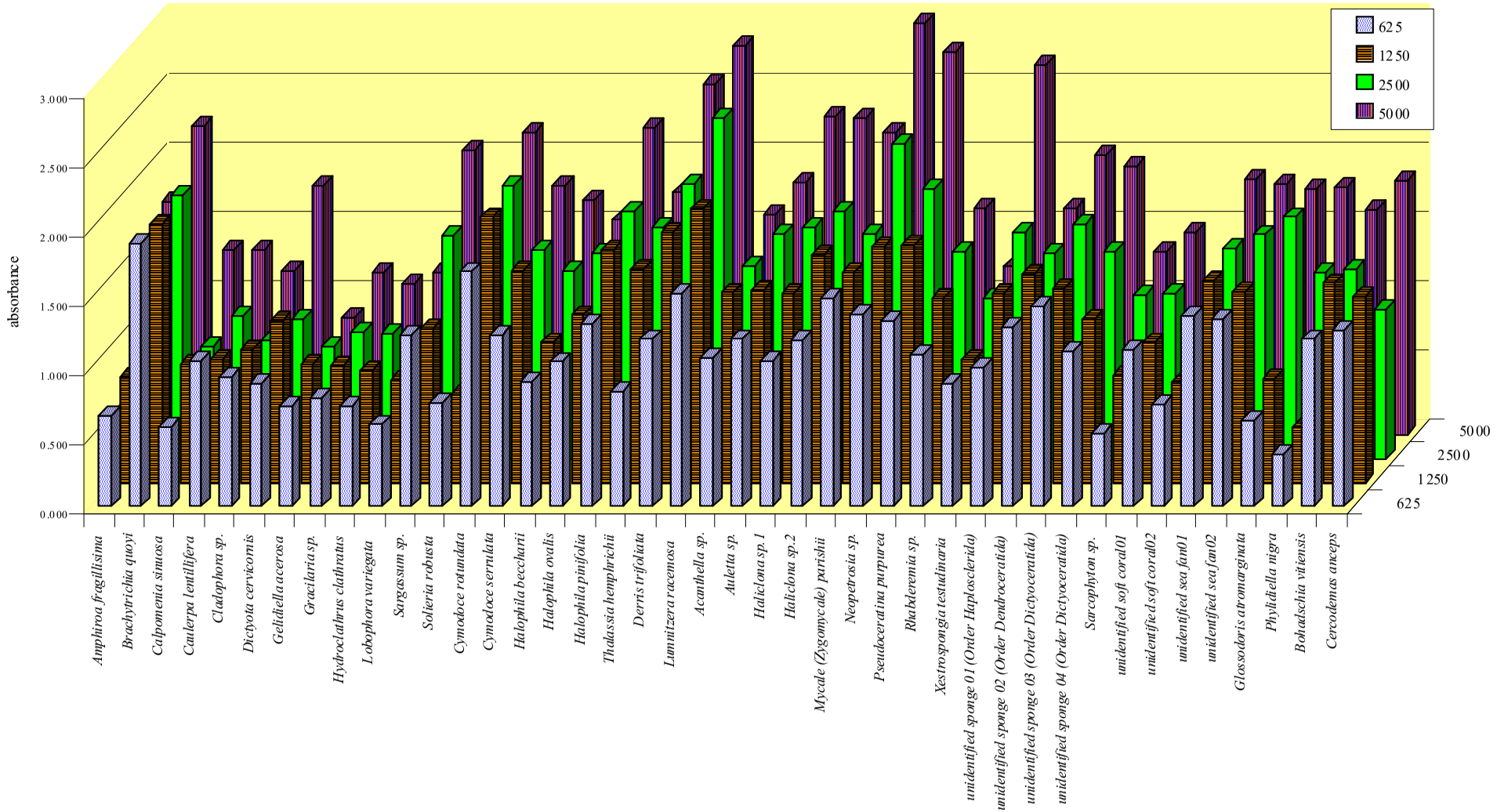
ค. *Bohadschia vitiensis*

ง. *Cercodemas anceps*

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง β-hematin ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ

กลุ่มสิ่งมีชีวิต	ชื่อวิทยาศาสตร์	ความเข้มข้น (mg/L)			
		625	1250	2500	5000
สาหร่ายทะเล	*Amphiroa fragillisima*	0.652	0.761	0.890	1.689
	Brachytrichia quoyi	1.899	1.869	1.911	2.230
	Calpomenia sinuosa	0.577	0.851	0.807	1.339
	Caulerpa lentillifera	1.055	0.896	1.038	1.342
	Cladophora sp.	0.937	0.964	0.859	1.190
	Dictyota cervicornis	0.894	1.176	1.012	1.806
	Gelidiella acerosa	0.728	0.853	0.810	0.848
	Gracilaria sp.	0.788	0.842	0.917	1.172
	Hydroclathrus clathratus	0.724	0.814	0.905	1.090
	Lobophora variegata	0.594	0.744	0.852	1.173
	Sargassum sp.	1.241	1.112	1.620	2.061
	Solieria robusta	0.747	0.633	0.665	1.015
หญ้าทะเล	*Cymodoce rotundata*	1.698	1.921	1.973	2.189
	Cymodoce serrulata	1.238	1.528	1.512	1.805
	Halophila beccharii	0.899	1.014	1.355	1.702
	Halophila ovalis	1.047	1.211	1.486	1.554
	Halophila pinifolia	1.323	1.685	1.784	2.218
	Thalassia hemphrichii	0.835	1.548	1.677	1.750
ไม้ป่าชายเลน	*Derris trifoliata*	1.210	1.809	1.988	2.540
	Lumnitzera racemosa	1.538	1.979	2.465	2.814
ฟองน้ำ	*Acanthella* sp.	1.080	1.374	1.398	1.592
	Auletta sp.	1.210	1.396	1.625	1.827
	Haliclona sp.1	1.053	1.369	1.675	2.306
	Haliclona sp.2	1.205	1.650	1.792	2.289
	Mycale (Zygomycale) parishii	1.505	1.517	1.622	2.185
	Neopetrosia sp.	1.386	1.704	2.283	2.976
	Pseudoceratina purpurea	1.344	1.723	1.954	2.764

กลุ่มสิ่งมีชีวิต	ชื่อวิทยาศาสตร์	ความเข้มข้น (mg/L)			
		625	1250	2500	5000
ฟองน้ำ	*Rhabderemia* sp.	1.095	1.338	1.498	1.639
	Xestrospongia testudinaria	0.890	0.887	1.166	1.216
	unidentified sponge 01 (Order Haplosclerida)	1.003	1.365	1.640	2.677
	unidentified sponge 02 (Order Dendroceratida)	1.296	1.509	1.490	1.644
	unidentified sponge 03 (Order Dictyoceratida)	1.443	1.403	1.692	2.022
	unidentified sponge 04 (Order Dictyoceratida)	1.127	1.185	1.499	1.941
ปะการังอ่อน	*Sarcophyton* sp.	0.527	0.781	1.186	1.325
	unidentified soft coral01	1.130	1.014	1.195	1.462
	unidentified soft coral02	0.742	0.727	0.832	1.077
กัลปังหา	unidentified sea fan01	1.376	1.459	1.526	1.846
	unidentified sea fan02	1.357	1.384	1.621	1.815
ทากเปลือย	*Glossodoris atromarginata*	0.618	0.749	1.749	1.784
	Phylidiella nigra	0.373	0.403	1.352	1.790
ปลิงทะเล	*Bohadschia vitiensis*	1.209	1.443	1.374	1.632
	Cercodemas anceps	1.275	1.344	1.081	1.836

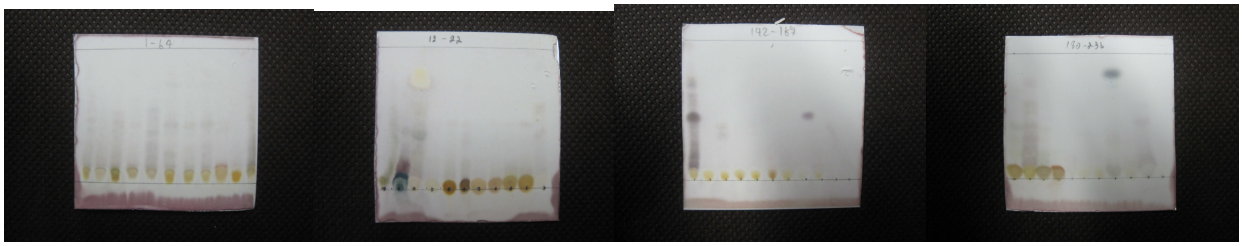


ภาพที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งสาร β-hematin

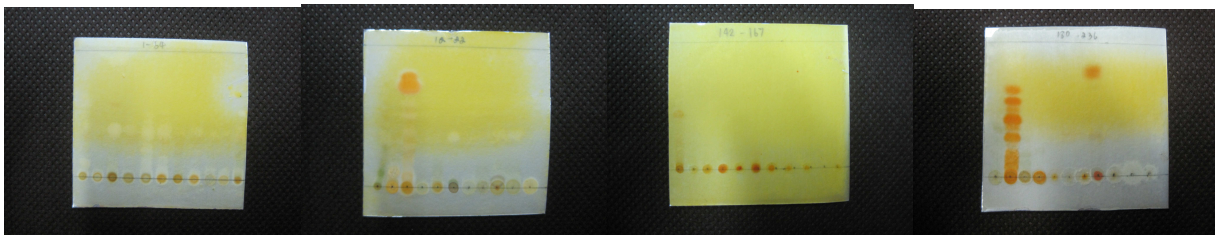
การศึกษาเบื้องต้นทางเคมีในการหาหมู่ของสารที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในปี ค.ศ. 2009 Fattorusso and Taglialatela-Scafati ได้รวบรวมรายงานการศึกษาการพัฒนาสารต้านมาลาเรียจากสิ่งมีชีวิตในทะเล พบว่ามีรายงานการพบสารต้านมาลาเรียจนถึงขณะนี้ประมาณ 60 สาร โดยแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีเป็น 3 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่มีไอโซไนไตรล์ (isonitrile) กลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloid) และกลุ่มเอนโดเปอร์ออกไซด์ (endoperoxide) โดยมีการศึกษาพบว่าฟองน้ำเป็นแหล่งสำคัญที่สุดที่พบสารยับยั้งมาลาเรียจำนวนมาก โดยฉพาะสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียในขณะนี้คือสารในกลุ่ม Manzamines มีการค้นพบครั้งแรกจากฟองน้ำ *Haliclona* sp. ในปี ค.ศ. 1986 และจากนั้นมาก็พบสารในกลุ่ม Manzamines อีกมากกว่า 60 สาร จากฟองน้ำอีกหลายสกุล เช่น *Xestospongia, Ircinia* และ *Amphimedon* ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดที่มีศักยภาพที่ดีจากความค่าการดูดกลืนแสงที่โดดเด่น ในการจะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียได้ที่มาจากฟองน้ำ 2 ชนิด คือ สารสกัดจากฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) และฟองน้ำ *P. purpurea* จากการใช้ TLC เพื่อศึกษาหมู่ของสารที่พบในสารสกัดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพที่ 28) พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) ให้จุดสีส้มกับสาร dragendorff แสดงว่ามีหมู่ alkaloid และให้สีเหลืองกับ Brontrager reagent ภายใต้แสง UV (long wave) แสดงว่ามีหมู่ anthrone ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าฟองน้ำชนิดนี้มีสารกลุ่ม Isoquinoloine alkaloid ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางยาที่เด่นชัดจำนวนมาก (Gulavita *et al.,* 1987; Kubo *et al*., 1989 Fontana *et al*., 2001; Oku *et al*., 2003) สำหรับฟองน้ำ *P. purpurea* ให้จุดสีน้ำเงินกับการทดสอบด้วย Brontrager reagent แสดงว่ามีหมู่ coumarin เป็นองค์ประกอบ

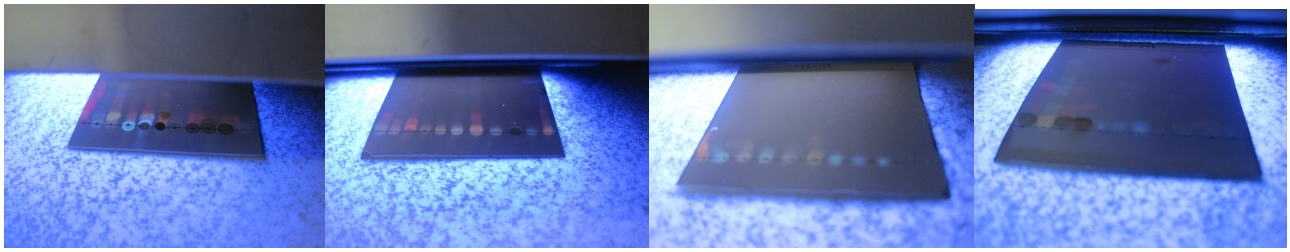
ในกลุ่มของต้นไม้ป่าชายเลนโดยเฉพาะต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) ที่แสดงผลการยับยั้ง β- hematin อย่างโดดเด่น จากรายงานของ Bandaranayake (2002) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในฝาดขาว ได้แก่ cyclitols, sugars และ tannin ซึ่งจากการตรวจสอบหมู่ของสารในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากฝาดขาวให้จุดสีน้ำตาลกับสาร Fast blue salt B แสดงว่ามี phenol เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง phenol เป็นหมู่สารย่อยที่รวมกันเป็น tannin สำหรับสารสกัดจากผลเถาถอบแถบ ซึ่งนอกจากจะเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด ยังยับยั้ง β- hematin ได้ดีด้วย ซึ่งจากรายงานของ Bandaranayake (2002) พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีจำนวนมาก ได้แก่ alkaloid, carbohydrate, flavonoids, flavonol glycosides, lipids, polysaccharides, proteins, rotenone, steroids และ triterpene (Bandaranayake, 2002) ซึ่งในการศึกษานี้ให้จุดสีส้มกับสาร dragendorff แสดงว่ามีกลุ่ม alkaloid เป็นองค์ประกอบ ส่วนพืชทะเลอีก 2 ชนิด คือ หญ้าทะเล (*C. rotundata*) ให้จุดสีน้ำตาลกับสาร Fast blue salt B แสดงว่ามี phenol เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับฝาดขาว ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) ให้จุดสีแดงกับการทดสอบด้วย Bontrager reagent แสดงว่ามีกลุ่ม anthraquinone



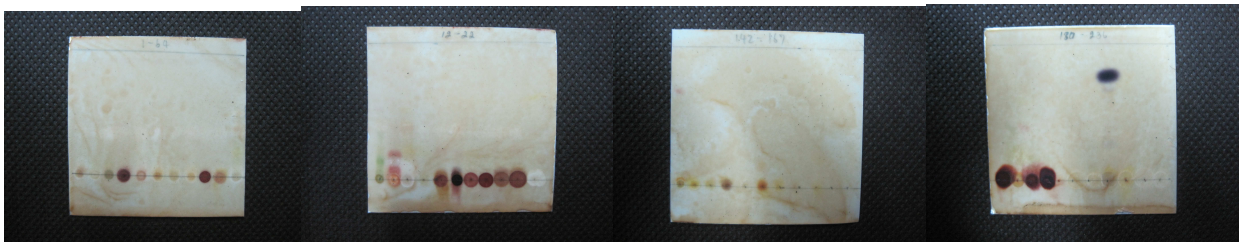
ก



ข



ค



ง

ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมที่ได้จากการแยกสารด้วย TLC พร้อมจุดสีที่ได้จากการทดสอบด้วยสารต่างๆ

ก. การตรวจสอบด้วยสาร vanillin sulphuric โดยสารกลุ่ม terpene จะให้สีน้ำเงิน

ข. การตรวจสอบด้วยสาร Dragendorff โดยสารกลุ่ม alkaloid จะให้สีส้ม

ค. การตรวจสอบด้วยสาร Brontrager reagent โดยสารกลุ่ม anthraquinone จะให้สีแดง สารกลุ่ม anthrone จะให้สีเหลือง และสารกลุ่ม coumarin จะให้สีน้ำเงินภายใต้แสง UV long wave

ง. การตรวจสอบด้วยสาร Fast Blue salt B โดยสารกลุ่ม phenol จะให้สีน้ำตาล

สรุป

การศึกษาการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อใช้ในการป้องกันมาลาเรียในการศึกษานี้ ได้ทำการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลทั้งกลุ่มพืชและสัตว์ทะเล โดยทำการศึกษาการป้องกันมาลาเรีย 2 ด้านคือ การคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง และการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อการพัฒนาเป็นสารต้านมาลาเรีย โดยศึกษาจากกลไกการยับยั้งสาร β-hematin ซึ่งเป็นรงควัตถุที่โปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียจะสร้างขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดเป็นพิษกับตัวเองในขณะที่กินเลือดมนุษย์เป็นอาหาร ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลหลายชนิดมีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันมาลาเรีย โดยสามารถสรุปผลการศึกษาที่น่าสนใจดังนี้

1. ในการคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องเบื้องต้น สามารถคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยทำให้ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตายอย่างน้อย 50% ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้รวม 25 สาร คิดเป็นร้อยละ 29.76 ของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ โดยเป็นสารสกัดที่มาจากกลุ่มฟองน้ำและปะการังอ่อนมากที่สุดคือกลุ่มละ 8 สาร คิดเป็นร้อยละ 72 ของสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลทั้งหมดที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง

2. สารสกัดจากผลเถาถอบแถบด้วยเอทธานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยทำให้ลูกน้ำยุงตายที่ LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 462.27 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 7 ระดับคือ 250-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความเป็นพิษของใบ กิ่งก้าน และผลของเถาถอบแถบโดยการทดสอบที่ความเข้มข้น 8 ระดับคือ 100-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ส่วนต่างๆของเถาถอบแถบและสารที่ใช้สกัดแตกต่างกัน มีผลทำให้ความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดด้วยเอทธานอลจากผลเถาถอบแถบมีความเป็นพิษสูงสุดแตกต่างจากสารสกัดจากส่วนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 405.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนกิ่งก้านและใบมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องน้อยมาก และจากการทดสอบเบื้องต้นในภาคสนามบริเวณบ้านที่อยู่ในบริเวณเก็บตัวอย่าง ก็มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงในชุมชนท้องถิ่น

3. สารสกัดจากกลุ่มสัตว์ทะเลที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง คือ สารสกัดด้วยเอทธานอลจากกัลปังหา unidentified sea fan 01 ปะการังอ่อน *Cladiella* sp. และฟองน้ำ *Acanthella* sp. โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 638.62, 736.53 และ 874.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากน้ำที่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องมากที่สุด คือ สารสกัดจากกัลปังหา unidentified sea fan 02 ปะการังอ่อน *Alcyonium* sp. และ *Sinularia* sp. โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1,030.78, 1,051.60 และ 1,162.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4. สารละลายที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกันมีผลทำให้ระดับความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องแตกต่างกัน โดยสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องส่วนใหญ่จะเป็นสารสกัดด้วยเอทธานอล

5. เถาถอบแถบเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในชุมชนท้องถิ่นมากที่สุด ด้วยคุณสมบัติมีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง เป็นพืชที่พบได้ง่ายในป่าชายเลน มีปริมาณมากเพียงพอ สามารถเข้าถึงตัวอย่างได้ง่าย และเป็นที่รู้จักในชุมชนพื้นบ้าน ส่วนกลุ่มของสัตว์ทะเลที่มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง การนำไปใช้ประโยชน์โดยชุมชนพื้นบ้านอาจมีข้อจำกัด เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่อยู่ในแนวปะการัง การเข้าถึงตัวอย่างยาก และมักมีปริมาณไม่มากนัก ดังนั้นสารสกัดจากฟองน้ำและปะการังอ่อนที่มี

ประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง ควรจะนำไปศึกษาพัฒนาต่อไปในรูปของสารกำจัดลูกน้ำยุง โดยจะต้องมีขั้นตอนการแยกสาร การศึกษาโครงสร้าง ในกรณีที่สามารถกำจัดลูกน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ก็ควรจะมีการศึกษาต่อไปสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์

6. สิ่งมีชีวิตในทะเลมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารที่จะพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียด้วยกลไกการยับยั้ง β-hematin โดยมีสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเล 42 สาร คิดเป็นร้อยละ 22.70 ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งสาร ematin มาจากฟองน้ำ สาหร่ายทะเล และหญ้าทะเลมากที่สุดคือ 13, 12 และ 6 สาร ตามลำดับ โดยสามารถคัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพในการจะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียได้ จากค่าการดูดกลืนแสงที่โดดเด่น คือ สารสกัดจากต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) หญ้าทะเล (*C. rotundata*) ผลของเถาถอบแถบ (*D. trifoliata*) และฟองน้ำ *P. purpurea*

7. สารสกัดที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรีย เป็นสารที่มีหมู่ทางเคมีที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง β-hematin ได้แตกต่างกัน โดยพบหมู่ alkaloid ใน ฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) ผลของเถาถอบแถบ (*D. trifoliata*) หมู่ฟีนอลใน ต้นฝาดขาว (*L. racemosa*) หญ้าทะเล (*C. rotundata*) หมู่แอนทราควิโนนในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*B. quoyi*) หมู่แอนโทรนในฟองน้ำสีม่วง (*Neopetrosia* sp.) หมู่คูมารินใน ฟองน้ำ *P. purpurea* และหมู่เทอร์พีนใน

ในการศึกษาการใช้สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลเพื่อกำจัดลูกน้ำยุง ควรจะนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ได้จากการศึกษานี้ไปทำการทดสอบความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงที่เป็นพาหะนำโรคอื่น ๆ ซึ่งยุงต่างชนิดกันมักมีความไวหรือความต้านทานต่อสารชนิดเดียวกันได้แตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาความแปรผันของสารสกัดที่มาสิ่งมีชีวิตต่างแหล่งและต่างฤดูกาล และเนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในการศึกษานี้อยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมวิธีการใช้ให้ถูกต้องโดยเน้นที่คุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นควรศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเถาถอบแถบที่มีต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ประโยชน์ในธรรมชาติ นอกจากนั้นในการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ โดยสารสกัดที่ใช้ในการศึกษานี้คิดเป็นน้ำหนักของสิ่งมีชีวิตในทะเลที่นำมาสกัดต่อปริมาตรของสารที่ใช้ในการสกัด ไม่ใช่น้ำหนักของสารสกัดที่ผ่านการทำให้เข้มข้นและอยู่ในรูปของ crude extract จึงอาจทำให้ค่าความเข้มข้นในการทำให้เป็นพิษต่อลูกน้ำยุงมีค่าสูงกว่ารายงานที่ผ่านมา ซึ่งมักใช้สารสกัดที่ผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้น

การคัดเลือกสารควบคุมลูกน้ำยุงก้นปล่องและลูกน้ำยุงลายในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรีย ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย การศึกษานี้มุ่งเน้นในการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อที่จะให้ชุมชนท้องถิ่นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาพัฒนาสารกำจัดลูกน้ำยุงและสารต้านมาลาเรีย ด้วยเทคนิคการแยกสารให้บริสุทธิ์ การศึกษาโครงสร้างของสาร และการสังเคราะห์สารต่อไป ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือจากนักวิทยาศาสตร์ในหลายๆ แขนงมาร่วมกันพัฒนาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช. 2553. **สมุนไพร (ด-บ) ถอบแถบน้ำ**. แหล่งที่มา http://www.dnp.go.th/mfcd20/heab-3.htm, 2 เม.ย 53.

เครือข่ายข้อมูลข่าวสาร โรคติดต่อนำโดยแมลง. 2550. **สถิติมาลาเรียปี 48-52**. สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง. กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งที่มา: http://www.thaivbd.org/cms/index.php, 15 กุมภาพันธ์ 2553

กลุ่มงานเฝ้าระวังและเทคโนโลยีสารสนเทศ สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง. 2550. **มาลาเรีย**. กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งที่มา: http://www.thaivbd.org/cms/index.php, 9 ตุลาคม 2550

กลุ่มควบคุมโรคติดต่อโดยแมลง. 2550. **ยุงพาหะนำโรคไข้มาลาเรีย**. สำนักงานป้องกันควบคุมโรคเขต 6, จังหวัดขอนแก่น. แหล่งที่มา: http://dpc6.ddc.moph.go.th/VBDC/insect1.html, 9 ตุลาคม 2550.

กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ. 2550. **การวิจัยเพื่อค้นหาสารต้านมาลาเรียจากพืชสมุนไพรไทย**. แหล่งที่มา: http://www.trf.or.th/research/abstract.asp?PROJECTID=PUG4180009, 14 ตุลาคม 2550.

ชารุณี พรมแสนปัง. 2550. **โครงการ : 235 ศึกษาผลการใช้มะกรูดควบคุมและกำจัดลูกน้ำยุงลาย. สถานีอนามัยพันดอน จ. อุดรธานี**. แหล่งที่มา: **http://www.pcuinnovation.com/pcu/562**, 15 ตุลาคม 2550.

ทรงพร จุลเจนวิทย์. 2542. **การใช้สารสกัดจากสนสองใบในการควบคุมลูกน้ำยุงพาหะนำโรค**. วิทยานิพนธ์ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ประคอง พันธ์อุไร. 2550. **การพัฒนาการผลิตจุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำยุง**. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งที่มา: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/, 10 ตุลาคม 2550.

พาลาภ สิงหเสนีย์. 2537. **พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร. 157 หน้า.

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์, ทิพมาส ศรีสมบัติ, สุนันท์ ภัทรจินดา และ จิตติมา อายุตตะกะ. 2548. การสร้างสารป้องกันตัวของหญ้าทะเล, น. 283-293. ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์, ภัสสรีนาถ นิธิเบญญาภิสมัย และ ฤทธิรงค์ พรหมมาศ. 2552. กลไกการป้องกันตัวทางกายภาพและเคมีของทากเปลือยกลุ่ม Dorid, น. 553-562. ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, อรรถวุฒิ กันทะวงศ์ และ สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ . 2553. การคัดเลือกสารสกัดจากพืชทะเลที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการลงเกาะ, น. 447-457. ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (เล่มที่ 4 สาขาประมง)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

เพ็ญนภา ชมะวิต, ชำนาญ อภิวัฒนศร, นฤมล โกมลมิศร์, ยุวดี ตรงต่อกิจ, ขวัญชนก ชูจิตต์, พรพรรณ นฤภัย และ สาวิตรี บุตรี. 2549. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ, น. 703-709.ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่** 44 : **สาขาพืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ศูนย์ข้อมูลเชื้อดื้อยา. 2550. ยามาลาเรีย. สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งที่มา: http://www-ddc.moph.go.th/drug_travel/d_1.htm, 12 ตุลาคม 2550.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2550. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง-สารเคมีสูตรซีโอไลท์. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งที่มา: http://www.dmsc. moph. go.th/webroot/secretary/Homepage/news48/june/6.htm, 16 ตุลาคม 2550.

สาโรจน์ จีนประชา. 2546. องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดตีนเป็ดทรายและเถาถอบแถบ วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สมบูรณ์ แสงมณีเดช, ขวัญเกศ กนิษฐานนท์, วัฒนวิทย์ นาคต้อย, วารุธ สกุลตาล, ศักดา กาบคำ, สมจิตร บุษดี และ สายัญ อันภูวงศ์. 2547. การใช้สารสกัดจากรากหางไหลแห้งในการควบคุมลูกน้ำยุง. **วารสารวิจัย มข**. 9(1): 10-15.

สัมภาษณ์ นิชรัตน์. 2544. **การใช้กูดเกี๊ยะเพื่อควบคุมยุงพาหะนำโรค**. วิทยานิพนธ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

โสมฤทัย บุญสืบสกุล, ดลนภา แก้วภา และ พรพิมล รงค์นพรัตน์. 2550. การศึกษาการต้านทานยาฆ่าแมลงของ *Anopheles minimus* CYP6P8 ในระบบ Baculovirus expression. ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล. แหล่งที่มา: http://www.scisoc.or.th/stt/31/sec_b/paper/stt31_B0069.pdf, 12 ตุลาคม 2550

อภิวัฏ ธวัชสิน, อุษาวดี ถาวระ และ เย็นจิตร เตชะดำรงสิน. 2550. ขมิ้นชัน : ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดยุง. ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งที่มา: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_5_001c.asp?info_id=409, 10 ตุลาคม 2550.

Aouinty, B., S. Oufara, F. Mellouki and S. Mahari. 2006. Preliminary evaluation of larvicidal activity of aqueous extracts from leaves of *Ricinus communis* L. and from wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. on the larvae of four mosquito species: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas),*Culiseta longiareolata* (Aitken) and *Anopheles maculipennis* (Meigen). **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 10(2): 67 – 71.

Arnold, T.M. and N.M. Targett. 2002. Marine tannins : the importance of a mechanistic framework for predicting ecological roles. **J. Chem. Ecol.** 28(10): 1919-1934.

Bamroongrugsa, N. 1999. Bioactive compounds from mangrove plants. **Songklanakarin Journal of Science and Technology.** (21): 300–377.

Bhosale, S.H., V.L. Nagle and T.G. Jagtap. 2002. Antifouling potential of some marine organisms from India against species of *Bacillus* and *Pseudomonas.* **Mar. Biotechnol.** 4: 111-118.

Cheenpracha, S, C. Karalai, C. Ponglimanont; K. Chantrapromma. 2007. Cytotoxic rotenoloids from the stems of Derris trifoliata. **Canadian Journal of Chemistry**. 85(12): 1019-1022(4).

Chong, C.R. and D.J. Sullivan. 2003. Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: implications for drug discovery. **Biochem. Pharmacol**. 66: 2201–2212.

Claudia A. Ospina, C.A. A.D. Rodríguez, E. Ortega-Barria and T.L. Capson. 2003. Briarellins J-P and Polyanthellin A: new eunicellin-based diterpenes from the gorgonian coral *Briareum polyanthes* and their antimalarial activity. **J. Nat. Prod.** 66(3): 357-363.

Coll, J.C., S. La Barre, P.W. Sammarco, W.T. William and G.J. Bakus. 1982. Chemical defenses in soft corals (coelenterata : octocorallia) of the great barrier reef : a study of comparative toxicities. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 8 : 271-278.

David, J.P., M. Tilquin, D. Rey, P. Ravanel and J.C. Meyran. 2003. Mosquito larval consumption of toxic arborescent leaf-litter, and its biocontrol potential. **Med. Vet. Entomol**. 17: 151–157.

Devi, P., W. Solimabi, L. D'Souza and S. Y. Kamat. 1997. Toxic effects of coastal and marine plant extracts on mosquito larvae. **Bot. Mar.** 40: 533-535.

Donia M. and M.T. Hamann. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **Infectious Diseases**. 3: 338-348.

Dzeha, T., M. Jaspars and J. Tabudravu. Clionasterol, a triterpenoid from the Kenyan marine green macroalga *Halimeda macroloba.* **Journal of Marine Science and Technology** 12(1): 1-6.

Egan, T.J. 2002. Physico-chemical aspects of hemozoin (malaria pigment) structure and formation. **J. Inorg. Biochem**. 91: 19-26.

Egan, T.J., D.C. Ross and P.A. Adams. 1994. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of β-haematin (malaria pigment). **FEBS Letters** 352: 54-57.

Farah, M.A., B. Atee, M.N. Ali, R. Sabir and W. Ahmad. 2004. Studies on lethal concentrations and toxicity stress of some xenobiotics on aquatic organisms. **Chemosphere** 55: 257–265.

Fattorusso, E., S. Parapini, C. Campagnuolo, N. Basilico, O. Taglialatela-Scafati and D. Taramelli. 2002. Activity against *Plasmodium falciparum* of cycloperoxide compounds obtained from the sponge *Plakortis simplex*. **J. Antimicrob. Chemother.** 50: 883–888.

Faulkner, D.J. 2000. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). **Nat. Prod. Rep.** 17: 1-6.

Fennell, B.J., S. Carolan, G.R. Pettit and A. Bell. 2003. Effects of the antimitotic natural product dolastatin 10, and related peptides, on the human malarial parasite *Plasmodium falciparum* **J. Antimicrob. Chemother.** 51: 833-841.

Fontana A., Cavaliere, P., Wahidulla, S., Chandrakant, G.N. and Cimino, G. 2000. A new antitumor isoquinoline alkaloid from the marine nudibranch *Jorunna funebris*. **Tetrahedron** 56: 7305-7308.

Gulavita, N.K., Scheuer, P.J. and De Silva, E.D. 1991. Antimicrobial constituents of a sponge-nudibranch pair from Sri Lanka, pp. 229-33. *In* **Bioactive Compounds from Marine Organisms, With Emphasis on the Indian Ocean.** Thompson, M.F. *et al*. (eds),. New Delhi: Oxford & IBH Publishing.

Gunthorpe, L. and Cameron, A.M. 1987. Bioactive properties of extracts from Australian dorid nudibranch. **Mar. Biol.** 94: 39-49.

Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae : potential use for environmentally friendly antifouling paints. **Mar. Envi. Res.** 52: 231-247.

Henrikson, A.A. and J.R. Pawlik. 1995. A new antifouling assay method : results from field experiments using extracts of four marine organisms. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 194 : 157-165.

Hempelmann, E. 2007. Hemozoin biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. **Parasitol. Res.** 100:671–676.

Hussein, Z. A. M., I.B. Jantan, A. Awaludin and N.W. Ahmad. 2002. Mosquito repellent Activity of the methanol extracts of some ascidian species. **Pharmaceutical Biology** 40(5): 358-361.

Huy, N.T., D.T. Uyen, A. Maeda, D.T.X. Trang, T. Oida, S. Harada, and K. Kamei. 2007. Simple colorimetric inhibition assay of heme crystallization for high-throughput screening of antimalarial compounds. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51(1): 350–353.

Key, P.B. and G.I. Scott. 1992. Acute toxicity of the mosquito larvicide, *Bacillus sphaericus,* to the grass shrimp, *Palaemonetes pugio,* and mummichog, *Fundulus heteroclitus.* **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 49:425-430.

Khan, M.R., Omoloso, A.D. and Barewai, Y. 2006. Antimicrobial activity of the *Derris elliptica*, *Derris indica* and *Derris trifoliata* extractives. **Fitoterapia** 77(4) : 327-330.

Kiviranta, J., A. Abdel-Hameed , K. Sivonen , S.I. Niemelä and G. Carlberg. 2006. Toxicity of cyanobacteria to mosquito larvae - screening of active compounds. **Environmental Toxicology and Water Quality** 8(1): 63 – 71.

La Barre, S.C., J.C.Coll and P.W. Sammarco. 1986. Defensive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef. II. The relationship between toxicity and feeding deterrence. **Biol. Bull.** 171 : 565-576.

Lawler, S.P., D.A. Dritz , J.A. Christiansen and A.J. Cornel. Effects of lambda-cyhalothrin on mosquito larvae and predatory aquatic insects. **Pest Manag. Sci.** 63(3): 234–240.

Lin, T., F. Hsu and J. Cheng. 1993. Antihypertensive Activity of Corilagin and Chebulinic Acid, Tannins from Lumnitzera, racemosa. **J. Nat. Prod.** 56 (4): 629–632.

Marrero, J., A.D. Rodríguez, P. Baran, R.G. Raptis, J.A. Sánchez, E. Ortega-Barria, and T.L. Capson. 2004. Bielschowskysin, a gorgonian-derived biologically active diterpene with an unprecedented carbon skeleton. **Org. Lett.** 6(10): 1661 -1664.

Maskey, R.P., E. Helmke, O. Kayser, H.H. Fiebig, A. Maier, A. Busche and H. Laatsch. 2004. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. **J. Antibiot.** 57(2): 771.779.

Mathur, S.J.N. 2003. Prospects of using herbal products in the control of mosquito vectors. **ICMR bulletin** 33(1): 1-12.

Mayer, A.M.S., A.D. Rodríguez, R.G.S. Berlinck and M.T. Hamann. 2007. Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. 145(4)**: 553-581.

Musch, A. 1996. Dose–time–effect relationships. *In*: R.J.M. Niesink, J. de Vries and M.A. Hollinger, eds, **Toxicology Principles and Applications**, CRC Press, Boca Raton, USA pp. 187–219.

Nazar, S., S. Ravikumar, G.P. Williams, M.S. Ali and P. Suganthi. 2008. Screening of Indian coastal plant extracts for larvicidal activity of *Culex quinquefasciatus*. **African Journal of Biotechnology** 7(2): 109-113.

Ncokazi, K.K. and T.J. Egan. 2005. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. **Anal. Biochem.** 338: 306-319.

Oku, N., S. Matsunaga, R.W.M. van Soest and N. Fusetani. 2003. Renieramycin J, a Highly Cytotoxic Tetrahydroisoquinoline Alkaloid, from a Marine Sponge *Neopetrosia* sp. **J. Nat. Prod.** 66(8): 1136–1139.

Pawlik, J.R., M.T. Burch and W. Fenical. 1987. Patterns of chemical defense among Caribbean gorgonian corals : a preliminary survey. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 108 : 55-66.

Prommas, R. P. Wisespongpand, S. Tankijjanukij and P. Wilaipun. 2009. Antimicrobial Substances from Marine Blue Sponge, *Neopetrosia* sp., pp. 453-462. In **Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries**. Kasetsart university, Bangkok.

Rao, K.V., B.D. Santarsiero, A.D. Mesecar, R.F. Schinazi, B.L. Tekwani, and M.T. Hamann. 2003. New manzamine alkaloids with activity against infectious and tropical parasitic diseases from an indonesian sponge. **J. Nat. Prod**. 66(6): 823 -828.

Rao, J.V., P.K. Usman and J.B. Kumar. 2008. Larvicidal and insecticidal prpperties of some marine sponges collected in Palk bay and Gulf of Mannar waters. **African Journal of Biotechnology**. 7(2): 109-113.

Ravichandran, S., K. Kathiresan and H. Balaram. 2007. Anti-malarials from marine sponges. **Biotechnology and Molecular Biology Review** 2(2): 33-38.

Rey, J R., P.E. Hargraves and S.M. O'Connell. 2009. Effect of selected marine and freshwater microalgae on development and survival of the mosquito *Aedes aegypti* . **Aquat. Ecol**. 43:987–997.

.Selvin, J. and A.P. Lipton. 2004a. Biopotentials of secondary metabolites isolated from marine sponges. **Hydrobiologia** 513: 231–238.

Selvin, J. and A.P. Lipton. 2004b. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. **Journal of Marine Science and Technology** 12(1): 1-6.

Simon-Colin, C., Kervarec, V., Pichon, R. and Deslandes, E. 2004. Purification and characterization of 4-methanesulfinyl-2-methylamino butyric acid from the red alga *Grateloupia doryphora* Howe. **Phytochem. Rev.** (2004) 3: 367–370.

Sammarco, P.W., S. La Barre and J.C. Coll. 1987. Defensive strategies of soft corals (coelenterate : octocorallia) of the Great Barrier Reef III. The relationship between ichthyotoxicityand morphology. **Oecologia** 74 : 93-101.

Stonik, V.A., V.I. Kalinin and S.A.Avilov. 1999. Toxins from sea cucumbers (holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. **J. Nat. Toxins.** 8(2): 235-248.

Sumera, F.C. and M.T. Conato. 2006a. Ichthyotoxicity and rotenone stability of *Derris trifoliate* (Leguminosae) acetone formulations. **Asian Fisheries Science** 19(3-4): 363-375.

Sumera, F.C. and M.T. Conato. 2006b. Use of *Derris trifoliate* (Leguminosae) root extracts for fishpond management. **Asian Fisheries Science** 19(1-2): 75-89.

Takeda, Y., K. Yano, H. Ayabe, T. Masuda, H. Otsuka, E. Sueyoshi, T. Shinzato and M. Aramoto. 2008. Glycosidic constituents of the leaves of an Okinawan Leguminosae plant,

Derris trifoliata Lour. **J. Nat. Med.** 62: 476–478.

Tan, R. 2010. **Common Derris**. Available at http://www.naturia.per.sg/buloh/plants/ derris.htm, 1 April 2010.

Tawatsin, A., P. Asavadachanukorn, U. Thavara, P. Wongsinkongman, J. Bansidhi, T. Boonruad, P. Chavalit-tumrong, N. Soonthornchareonnon, N. Komalamisra and M.S. Mulla. 2006. Repellency of essential oils extracted from plants in thailand against four mosquito vectors (diptera: culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegyptl* (diptera: culicidae). Southeast Asian. **J. Trop. Med. Public. Health.** 37(5): 915-931.

Tawatsin, A., S. D. Wrattten, R. R. Scott, U. Thavara, and Y. Techadamrongsin. 2001. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **J. Vector Ecol**. 26(1): 76-82.

Tewtrakul, S., S. Cheenpracha and C. Karalai. 2009. Nitric oxide inhibitory principles from *Derris trifoliata* stems. **Phytomedicine**. 16: 568–572.

Thakur, N.L., S.P. Mainkar, R.A. Pandit and M.M. Indap. 2004. Mosquito larvicidal potential of some extracts prawn and sea cucumber obtained from the marine organisms. **Indian Journal of Marine Science** 33(3): 303-306.

Thangam, T.S. and K. Kathiresan. 1996. Marine plants for mosquito control, pp. 431-435. *In* K.B. Wildey (ed.) **Proceedings of the Second International Conference on Urban Pests**.

Thangam, T.S. and K. Kathiresan. 2003. Studies on mosquito larvicidal activity of *Rhizophora apiculata* Western Indian Ocean. **J. Mar. Sci.** 2(2): 157–161.

Tongtokit, Y. 2004. **Promising insecticidal activity of Thai phytochemical plants for control mosquito vectors of diseases.** Ph.D. Thesis. Faculty of Tropical Medicine. Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Touchstone, J.C. and M. F. Dobbins. 1978. **Practice of Thin Layer Chromatography**. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 170-215.

Trang, D.T.X., N.T. Huy, D.T. Uyen, M. Sasai, T. Shiono, S. Harada and K. Kamei. 2006. Inhibition assay of β-hematin formation initiated by lecithin for screening new antimalarial drugs. **Anal. Biochem**. 349: 292–296.

Wenjie, J., F. Yuchun, G. Chunji, W. Yunhui, P. Jie. 2009. Extraction and purification of deguelin from *Derris trifoliate* Lour root. **Int. J. Agric. & Biol. Eng.**, 2(4): 98-103.

Wei, X., A.D. Rodrı´guez,a, P. Baran, R.G. Raptis, J.A. Sa´nchez, E. Ortega-Barriac and J. Gonza´lez. 2004. Antiplasmodial cembradiene diterpenoids from a Southwestern Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Eunice*. **Tetrahedron** 60: 11813–11819.

World Health Organization. 1996. **Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides.** CTD/WHOPES/IC/96.1, 69 pp.

World Health Organization (WHO). 2007. **Malaria,** Fact sheet Number 94. Available source: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/, 9 October 2007

World Health Organization (WHO). 2010. Malaria. Available source: http://www.who.int/malaria/en/ , 4 March 2010.

Wagner, H. and S. Bladt. 1995. **Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas**. Springer-Verlag, Berlin.

Xu, L., P. Zhou, Y. Zhi, J. Wu, S. Zhang. 2009. Three new flavonol triglycosides from *Derris trifoliata*. **Journal of Asian Natural Products Research. 11(1)**: 79 – 84.

Yenesew, A., J.T. Kiplagat, S. Derese, J.O. Midiwo, J.M. Kabaru, M. Heydenreich and M. G. Peter. 2006. Two unusual rotenoid derivatives, 7a-*O*-methyl-12a-hydroxydeguelol and spiro-13-homo-13-oxaelliptone, from the seeds of *Derris trifoliata* . **Phytochemistry**. 67(10): 988-991.