บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

โรคใบจุดออลเทอนาเรีย (Alternaria leaf spot)

ลักษณะโดยทั่วไปของรา Alternaria

เชื้อราสกุล Alternaria Nees เป็นราจัดอยู่ใน (Agrios, 1997 อ้างอิงโดย สุคนทิพย์, 2543)

Kingdom Mycetae

Division Eumycota

Sub-Division Deuteromytina

Class Hyphomycetes

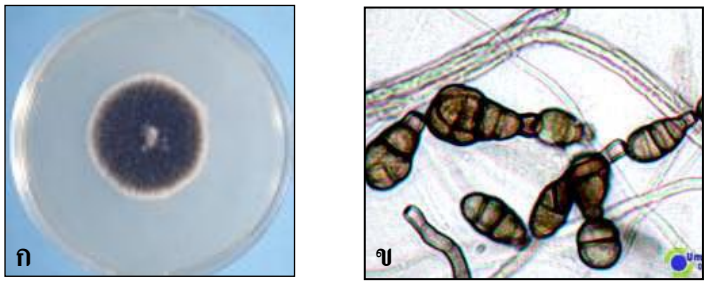
Order Hyphales (Moniliales)

Family Dematiaceae

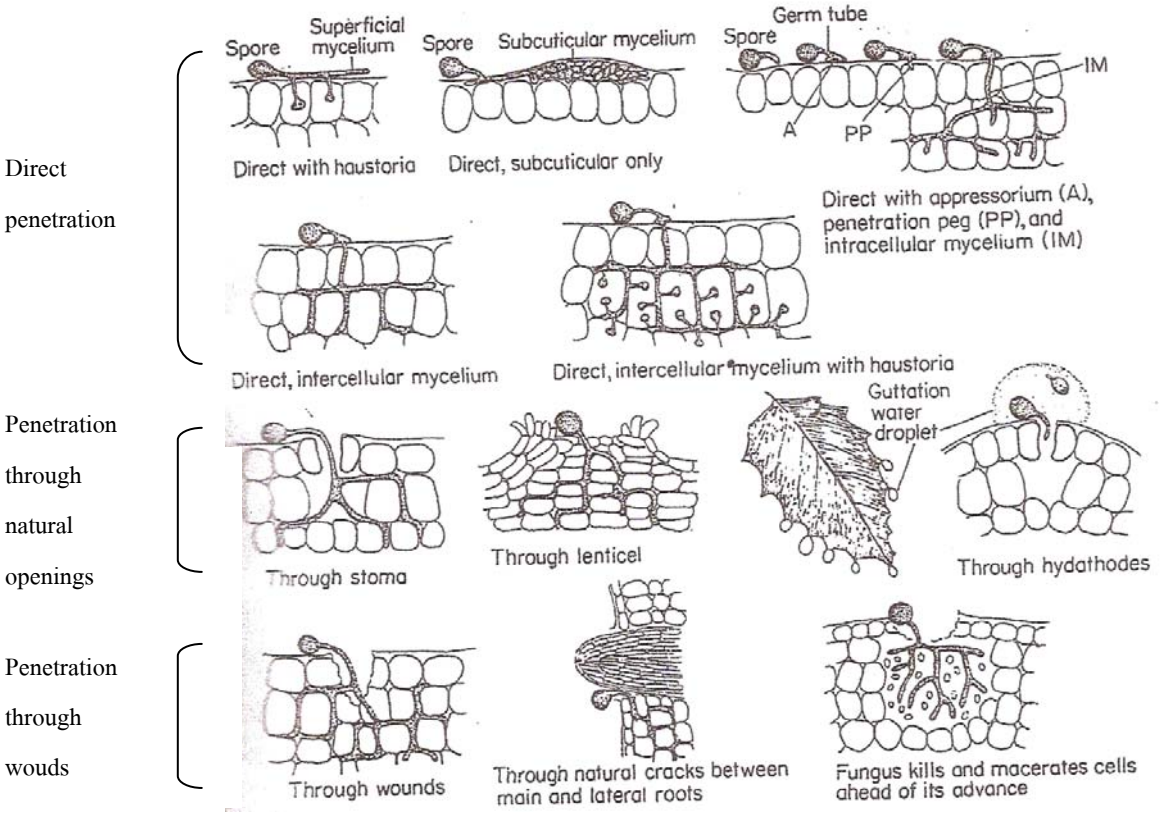
Genus Alternaria

เชื้อราในสกุล Alternaria มีลักษณะทั่วไป คือ conidia (Asexual spore) ปกติมีสีเทา สีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ เจริญในแนวราบอยู่บนผิวของใบพืช (effuse) กลุ่มเส้นใยฝังอยู่ใต้เนื้อเยื่อใบ หรือโผล่พ่นขึ้นมาบางส่วน เส้นใยมีสีซีดจนถึงสีน้ำตาลอมเขียว (olivaceous brown) หรือสีน้ำตาล ไม่สร้างโครงสร้างที่ให้กำเนิดสิ่งสืบพันธุ์ (stroma) conidia เกิดเดี่ยวๆ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ (catenulate) รูปร่างเป็นรูปไข่ (ovoid), กระบองหัวกลับ (obclavate), รูปทรงกระบอก (cylindrical) หรือมีส่วนปลายยื่นเป็นจงอยที่เรียกว่า rostrate ซึ่งมีลักษณะสีซีดจนถึงสีน้ำตาลอมเขียว รูปร่างอ้วนสั้น หรือยาวมากคล้ายเส้นด้าย (filifrom) ผนังเรียบหรือขรุขระ (verruculose) conidia มีผนังกั้นตามขวางเป็นระยะๆ ไปจนถึง beak นอกจากนี้ยังมีผนังกันตามยาวและผนังตามยาวกั้นเฉลียง (oblique septa) ก้านชูสปอร์ (conidiophore) มีลักษณะแตกต่างกับเส้นใยโดยทั่วไปอาจเป็นแบบอยู่เป็นกลุ่ม (macronematous) แบบธรรมดา (mononematous), (simple) หรือ ลักษณะไม่แน่นอน (Irregular) บางครั้งแตกกิ่งก้านสาขา สีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลเข้มเกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม (fasicles) conidiogenous cell (เซลล์ที่สร้าง conidia) มีลักษณะไม่แตกต่างไปจากเซลล์อื่น conidia เกิดได้โดยที่ผนังกั้นชั้นในของ conidiogenous cell ดันทะลุผนังชั้นนอกออกมาคล้ายลูกโป่ง (enteroblastic) สำหรับ Alternaria ส่วนมากการผลิต conidia เป็นแบบ polytretic คือ conidia ผลิตออกมาจาก conidiogenous cells หลายแห่ง เชื้อราจะสร้าง conidia จำนวนมากที่อุณหภูมิ 18 – 30 องศาเซลเซียส โดยเฉลี่ยเวลาที่สร้างสปอร์ คือ 13 ชั่วโมง ยกเว้น

เมื่อมีฝนตกหรือความชื้นสูงจะสร้างสปอร์ที่ 9 – 18 ชั่วโมง conidia แพร่กระจายโดยลม น้ำที่ใช้รดต้นไม้ น้ำฝน หรือติดไปกับเครื่องมือเขตกรรม มนุษย์หรือสัตว์ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม conidia จะงอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายพืช โดยจะเข้าสู่พืชทางปากใบ และผ่านทางเคลือบผิวโดยตรง เส้นใยเชื้อราแตกแขนงเป็นจำนวนมากเจริญอยู่ระหว่างเซลล์พืช เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะให้กำเนิด conidia ได้ดีที่สุดในที่มีแสงสลับมืด แต่จะไม่ให้กำเนิดหากได้รับแสงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา (ขวัญเรือน, 2547)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อรา *Alternaria* sp.



ภาพที่ 2 การเข้าทำลายพืชของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (กัญชลี,2542)

ลักษณะอาการของโรค

ลักษณะอาการของโรคใบจุดออลเทอนาเรียที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถเข้าทำลายต้นกล้าทันทีที่งอกจากเมล็ด ปรากฏอาการจุดขนาดเล็กสีดำบนลำต้นคล้ายกับโรคโคนเน่าระดับดิน (Damping-off) ของต้นกล้า ทำให้ต้นกล้าเกิดอาการโคนเน่าหรือทำให้ต้นกล้าแคระแกร็น ชะงักการเจริญเติบโต เมื่อย้ายต้นกล้าที่เป็นโรคลงแปลงปลูกต้นกล้าจะไม่เจริญเติบโตเหมือนต้นกล้าปกติทั่วไป สำหรับลักษณะอาการของโรคที่บริเวณใบจะเริ่มจากใบแก่ที่อยู่ด้านล่างก่อน โดยจะมีลักษณะแผลเป็นจุดเนื้อเยื่อตายขนาดเล็กจนถึงแผลขนาดประมาณ 5 – 7.5 เซนติเมตร และมีสีเหลืองล้อมรอบบริเวณแผล บริเวณแผลจะปรากฏกลุ่มโคโลนีสีเข้มเรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น (สกุลศักดิ์, 2540) เมื่ออาการรุนแรงเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลจะบางคล้ายกระดาษ แผลสามารถขยายขนาดลามติดกันได้ทำให้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ (Dixon, 1981 อ้างอิงโดย อนงค์นาถ, 2547) โรคใบจุดออลเทอนาเรียพบในแหล่งปลูกทุกแหล่ง โดยเฉพาะในฤดูฝนหรือในแหล่งที่มีความชื้นสูง สภาพอากาศร้อนชื้น (จุมพล และอรพรรณ, 2541)

การป้องกันกำจัดโรคใบจุด

สำหรับการป้องกันกำจัดโรคใบจุดออลเทอนาเรียสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 – 25 นาที หรือการใช้สารเคมีในการคลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนการเพาะปลูกเพื่อควบคุมโรคที่จะเกิดขึ้น แต่ก็สามารถควบคุมโรคได้ในระดับหนึ่ง และ การศึกษาการควบคุมเชื้อรา *A. brassicicola* บนเมล็ดพันธุ์โดยใช้สารเคมีรอฟรัล (Rovral 50เปอร์เซ็นต์ WP) คลุกเมล็ดในปริมาณ 2.5 กรัมต่อน้ำหนักเมล็ด 1 กิโลกรัม พบว่า สามารถควบคุมโรคได้ 61.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการป้องกันการเกิดโรคสามารถทำได้โดยการปลูกพืชหมุนเวียน การทำลายวัชพืชในแปลงปลูก การทำลายตอซังและเศษซากพืช ภายหลังการเก็บเกี่ยวทันที หลีกเลี่ยงการใช้น้ำชลประทานระบบสปริงเกอร์ในพื้นที่ที่มีการเกิดโรคระบาดมาก่อน (สกุลศักดิ์, 2540) นอกจากการป้องกันด้วยวิธีการดังกล่าวแล้วยังมีการป้องกันโดยการใช้สารเคมีในการฉีดพ่น โดยสารเคมีใช้ทำการป้องกันกำจัด คือ ไอโพรไดโอน ดาโคนิล แมนโคเซบ เป็นต้น (จุมพล และอรพรรณ, 2541) และมีรายงานสนับสนุนว่าสารเคมีจากการสังเคราะห์สามารถควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรียได้ด้วยไอโปรไดโอล หรือรอฟรัล อัตรา 20 – 30 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร และแมนโคเซบ (Dithane M-45) อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (อรพรรณ และจุมพล, 2531) นอกจากนี้ยังมีวิธีการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีโดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ ได้แก่ *Aureobasidium pullulans* และ *Epicoccum nigrum* ซึ่งเป็นปรสิตของเชื้อรา *A. brassicicola* (สกุลศักดิ์, 2540) และการศึกษาของ อนงค์นาถ (2547) ได้ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum*, *T. viride* ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด ต้นกล้าปกติ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

ของต้นกล้าได้ดีไม่แตกต่างกัน นอกจากการควบคุมโรคในวิธีดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น การควบคุมโรคด้วยสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรคก็ได้รับความสนใจมากขึ้นทั้งนี้เพราะผู้บริโภคเริ่มตะหนักถึงสุขภาพอนามัยมากขึ้น

สารสกัดจากพืช

สารสกัดจากพืช หมายถึง สารที่ได้จากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น เปลือก ใบ ลำต้น ดอก ผล ราก และหัวหรือเหง้า มาสกัดเอาสารในรูปของสารละลาย เพื่อใช้ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร จากการสำรวจพบว่า มีพืชประมาณ 200 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตร ซึ่งพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มพืชสมุนไพรและพืชหอม ชนิดที่นิยมนำมาใช้ป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร ได้แก่ สะเดา ยาสูบ ไพรีทรัม หางไหล กระเพรา ขมิ้น ตะไคร้หอม เป็นต้น (รัชกรณ์, 2538) ในปัจจุบันการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ทางการเกษตรได้รับความนิยมมากขึ้นอันเนื่องมาจาก สารสกัดจากพืชไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นหรือมีพิษน้อย และสลายตัวง่าย ไม่มีพิษตกค้าง (ณรงค์, 2540) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นข้อดีในบางส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร สำหรับคุณสมบัติอื่นๆ สามารถเปรียบเทียบได้ดังนี้ (นิภาพร, 2546)

	สารสกัดจากพืช		สารเคมีสังเคราะห์
1.	เลือกทำลายหรือทำลายเฉพาะเจาะจง	1.	ทำลายครอบจักรวาล
2.	ความเป็นพิษต่ำหรือค่อนข้างต่ำ	2.	ความเป็นพิษมีตั้งแต่ต่ำ – สูง
3.	สลายตัวง่าย	3.	สลายตัวได้ยาก
4.	ไม่มีอิทธิพลต่อระบบนิเวศน์หรือมีน้อย	4.	มีอิทธิพลต่อระบบนิเวศน์มาก
5.	หาวัตถุดิบได้ยาก	5.	หาได้ง่าย
6.	ราคาถูก	6.	ราคาแพง
7.	มีโอกาสเกิดความต้านทานหรือดื้อยาน้อย	7.	เกิดความต้านทานหรือดื้อยาได้ง่าย
8.	ต้นทุนการผลิตต่ำ	8.	ต้นทุนการผลิตสูง
9.	ใช้เทคโนโลยีการผลิตที่ง่าย	9.	ใช้เทคโนโลยีที่ยุ่งยากซับซ้อน
10.	ใช้กับศัตรูในดินได้ประสิทธิภาพสูงกว่าและไม่มีพิษตกค้าง	10.	ใช้กับศัตรูในดินได้มีประสิทธิภาพและเกิดพิษกับจุลินทรีย์และสัตว์ที่มีประโยชน์ เกิดพิษตกค้างในดิน
11.	ไม่มีลิขสิทธิ์หรือกฎหมายควบคุม	11.	มีลิขสิทธิ์หรือกฎหมายควบคุม

สารสกัดจากพืช (Plant extract) ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์สามารถจำแนกได้ 2 พวก คือ (พัฒนา, 2539)

1. สารสกัดจากพืชพวกสมุนไพร เครื่องเทศ และพืชหอม เป็นสารธรรมชาติที่มีอยู่ในพืช หมายถึงตัวยาที่ได้จากพืชโดยมิได้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายใน สามารถนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ ได้ กลุ่มสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาได้แก่ Alkaloid, Glycoside, Cyanogenic glycoside, Flavanoid, Gum, Latex, Saponin, Steroid, Tannin และน้ำมันหอมระเหย (Essential oil)
2. สารสกัดจากพืชทั่วไป เป็นสารที่มีพืชสร้างขึ้น (Inducible substance) เมื่อถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลายหรือรุกราน สารนี้เรียกว่า Phytoalexin ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญของเชื้อในพืช เช่น สาร Pisatin จากถั่ว, Rishitin จากมันฝรั่ง, Phaseolin และ Keritone จากถั่ว

การใช้ประโยชน์จากสารสกัดพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคพืช

ดังการศึกษา ของรังสีและคณะ (2538) พบว่า สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก กานพลู กระเทียม สะระแหน่ จันทน์ทศ ตะไคร้หอม ว่านน้ำ ดีปลี และมังคุด สามารถยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้ เช่น *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., และ *Sclerotium rolfsii* และในปี 2539 ขจรศักดิ์ ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 8 ชนิด ได้แก่ กานพลู ว่านน้ำ โป๊ยกั๊ก ดองดึง สารภี หนอนตายหยาก ดีปลี และบัวบก ต่อการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า กานพลูและว่านน้ำที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10,000 ส่วนต่อล้านส่วน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ และนอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารสกัดจากกานพลูและว่านน้ำยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. และ *Aspergillus niger* ได้ ต่อมาในปี 2540 สุมาลีและคณะ ได้ศึกษาสารต้านเชื้อราของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ข่าลิง เสม็ด เมล็ดพริกไทยดำ กระดูกไก่ และปะคำดีควาย กับเชื้อรา *A. brassicicola* Schuw. สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า พบว่า สารพิเมอรีนจากเมล็ดพริกไทยดำสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ น้ำมันเสม็ด ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่ และผลมะคำดีควายมีผลในการยับยั้งได้เล็กน้อย จากรายงานการศึกษาของ สมพร ในปี 2541 ก็พบว่าสารสกัดจากเทียนบ้านที่สกัดด้วยวิธีปั่นกรองที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria brassicola* ได้สมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ นุชนารถ และคณะ (2542) ที่ศึกษาสารสกัดจากเทียนบ้านโดยใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำเช่นกัน โดยสารสกัดจากเทียนบ้านสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกะหล่ำปลีได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อราสาเหตุของโรคดังกล่าว

คือ *Alternaria brassicola* และในปี 2543 นุชนารถ และคณะ ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของทองพันชั่งและช้าพลูที่สกัดสารด้วยน้ำในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ผลปรากฏว่า สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และในปีเดียวกันสุคนทิพย์ (2543) ได้ศึกษาการควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรียกด้วยสารสกัดหยาบจากสาบหมาและพลูคาว ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากสาบหมาและพลูคาวสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้น 10,000 ส่วนต่อล้านส่วน เมื่อนำมาทดสอบกับพืชในสภาพโรงเรือน ผลปรากฏว่าสามารถควบคุมโรคได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตะไคร้ต้น

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Litsea cubeba* Pers
ชื่อสามัญ : ตะไคร้ต้น
ชื่ออื่นๆ : สะไค้, เกล๋อ (ลัวะ), ฉือ (มูเซอแดง)
วงศ์ : : Lauraceae

ลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ (รสริน, 2547)

ลำต้น	ไม้พุ่ม สูง 3 – 5 เมตร ไม่ผลัดใบ
ใบ	ใบเนื้อบาง และอ่อน เมื่อขยี้มีกลิ่นหอม ใบรูปหอก ปลายใบสอบแหลม โคนใบเรียว ด้านบนของใบมีสีเขียวเข้ม ด้านใต้ใบมีสีอ่อน ผิวใบเรียบหรือมีขนอ่อนที่เส้นใบ
ดอก	ดอกเป็นช่อ แต่ละช่อมีดอกย่อย 5 –10 ดอก ก้านดอกย่อยแตกออกจากจุดเดียวกัน
ผล	ผลมีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.9 เซนติเมตร ผลตะไคร้ต้นจะมีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ในชั้น Mesocarp

ตะไคร้ต้นพบในประเทศไทยบริเวณป่าดิบเขาทั่วไปที่ระดับความสูง 950 – 1,600 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (เบญจวรรณ, 2542) สำหรับทางภาคเหนือของประเทศไทยพบตั้งแต่บริเวณ ต. โป่งแยง อ. แม่ริม (1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) ถึงสถานีวิจัยเกษตรหลวงอ่างขาง อ. ฝาง จ. เชียงใหม่ (1,500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) (สุพรรณ, 2544) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบ ตะไคร้ต้นในหลายประเทศ เช่น อินเดีย มาเลเซีย ไต้หวัน ที่ระดับความสูง 1,500 – 2,300 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (สสี และปราณี, 2524)

ภาพที่ 3 ลักษณะต้นของตะไคร้ต้น (ก) และ ผลตะไคร้ต้น (ข)

ประโยชน์

ผลและใบตะไคร้ต้นมีน้ำมันหอมระเหยที่สามารถสกัดด้วยไอน้ำ และนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิต Citral เป็นการค้า เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไอโอโนนส์ ใช้ในการผลิตวิตามินเอและใช้ปรุงแต่งกลิ่นเครื่องสำอาง ใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ยาสูบ และจากการที่มีกลิ่นและรสชาติคล้ายส้ม จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการปรุงแต่งรสชาติของผลิตภัณฑ์ที่มีรสส้ม

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้น

จากการตรวจสอบสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นพบสาร Citral ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ (จิตติมา และนพงษ์, 2543) พฤษภา (2546) ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันจากตะไคร้ต้นก็พบองค์ประกอบที่สำคัญ คือ Gernial (Citral a), Neral (Citral b) และ Limonene สสี และปราณี (2524) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้น พบองค์ประกอบหลักคล้ายคลึงกัน คือ Gernial (Citral a) และ Neral (Citral b) และการศึกษาของ สุภาพรรณ (2543) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ที่มีตัวทำละลาย คือ Pentane และ Diethyl ether ในอัตราส่วน 100 : 0, 97 : 3, 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20 และ 0 : 100 พบสาร Citral เป็นองค์ประกอบหลักในทุก faction ที่ทำการแยกได้ นอกจากนี้ยังพบสาร Citronellal, Linalool, Limonene, Myrcenol, ß-pinene และ 6-Methyl-5-hepten-2-one แต่เมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นสาร Ethyl acetate : Hexane ในอัตรา 75:25 จะได้สาร Geraniol (จิตติมา และนพงษ์, 2543) เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณสารด้วยเครื่องมือ Gas Chromatography พบสาร Citral 49. เปอร์เซ็นต์ และ Limonene 25.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณสารองค์ประกอบดังกล่าวใกล้เคียงกับการตรวจสอบของ กรมป่าไม้ (2531) ที่พบสาร Citral เป็นองค์ประกอบมากที่สุด เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์, Limonene 22 เปอร์เซ็นต์ และ Methyl heptenone 6.8 เปอร์เซ็นต์

การใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช

จากการศึกษาเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นมีสรรพคุณในการกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด เช่น *Alternaria alternat*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium* spp, *Helminthosporium* spp. (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2546) อนงค์นาถ และสมบัติ (2548) ทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุด พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นมาทำการควบคุมเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์ พบว่าสามารถลดการติดเชื้อของเมล็ด เพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ต้นกล้าปกติ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้า นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชในไม้ผลได้ ดังเช่นการศึกษาของรสริน (2547) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella dominicana*, และ *Botrydiplodia theobromae* ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วง ผลปรากฏว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Dothiorella dominicana*, และ *Botrydiplodia theobromae* ได้ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 100 ส่วนต่อล้านส่วน สำหรับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* นั้นต้องใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราดังกล่าวได้สมบูรณ์ และการศึกษาของ คมศักดิ์ (2542) ก็พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้ ทั้งนี้น้ำมันหอมระเหยดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aurese* และ *Micrococcus luteus* ได้อีกด้วย

จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการสกัดสารสำคัญจากตะไคร้ต้นด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้แล้ว ยังพบว่าการสกัดสารจากตะไคร้ต้นอย่างหยาบก็ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เช่นกัน ดังการศึกษาของ ขวัญเรือน (2547) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นในการควบคุมเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดวงแหวนและใบจุดตากบของพืชตระกูลกะหล่ำ พบว่าสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นสามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุของโรคดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นสามารถควบคุมการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส และเส้นใยเชื้อรา *Rhizopus* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของสตรอเบอรีได้ (ไพลิน, 2547)ในขณะเดียวกัน รสริน (2547) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วง ได้แก่ เชื้อรา

Colletotrichum gloeosporioides, *Dothiorella dominicana*, และ *Botrydiplodia theobromae* พบว่า สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Dothiorella dominicana* และ *Botrydiplodia theobromae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน และในปีเดียวกัน โลมฤทัย (2547) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2,500 ส่วนต่อล้านส่วน มีผลยับยั้งแบคทีเรียได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Erwinia carotovara* pv. *carotovora* แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ (Soft rot) และ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุของโรคเน่าดำ (Black rot) ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมักพบในพืชตระกูลกะหล่ำ

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร (รัตนา, 2547)

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นจะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพรโดยการใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (Solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically active constituents) เรียกว่า สารสำคัญ (Active Constituents) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically inactive constituents) เรียกว่า สารเฉื่อย (Inert substances) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะแปรเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัดและสภาวะที่ใช้ในการสกัด วัตถุประสงค์ของการสกัดพืชสมุนไพร คือ

- เพื่อสกัดแยกสารสำคัญออกจากพืชสมุนไพร
- เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูง
- เพื่อลดขนาด (Dose) ของการใช้สมุนไพรลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

วิธีการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรนั้น มีวิธีการดังนี้ (กฤษณา, 2537)

1. Maceration คือ ขบวนการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรโดยการแช่พืชสมุนไพรในน้ำยาสกัดที่เหมาะสมเป็นเวลานาน 2 – 4 วัน หรือจนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและน้ำยาสกัดสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในพืชสมุนไพรออกมาได้หมด
2. Percolation คือ ขบวนการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพร โดยการปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายเอาองค์ประกอบจากพืชสมุนไพรออกมาด้วย วิธีการนี้เป็นการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดองค์ประกอบจากพืชสมุนไพรให้สมบูรณ์โดยไม่ใช้ความร้อน แต่วิธีการนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองน้ำยาสกัด แรงงาน และเวลาที่ใช้ในการสกัด

3. Continuous extraction (การสกัดแบบต่อเนื่อง) คือ ขบวนการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรเช่นเดียวกับ Percolation แต่ขบวนการนี้จะต้องใช้ความร้อนและใช้เครื่องมือที่เป็นระบบปิดโดยที่เมื่อน้ำยาสกัดไหลผ่านพืชสมุนไพรที่บรรจุอยู่ใน Extractor แล้วลงมารวมกันในขวดแก้วที่ได้รับความร้อนจนน้ำยาสกัดระเหยขึ้นไปและควบแน่นตกลงมาผ่านผงสมุนไพรซ้ำอีกไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมาหมด
4. Expression เป็นการบีบเอาองค์ประกอบที่เป็นของเหลวออกจากพืชสมุนไพร ส่วนใหญ่ใช้สกัดพวกน้ำมันต่างๆ เช่น น้ำมันหอมระเหย และน้ำมันที่ไม่ระเหย

การเลือกวิธีการสกัด

การเลือกวิธีสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี ซึ่งการคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมนับว่ามีความสำคัญเช่นกัน และความเหมาะสมนั้นก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง ได้แก่

1. ธรรมชาติของพืชสมุนไพร

- ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อ สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธี maceration หากเป็นพืชสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อแข็งและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธี continuous extraction หรือ percolation
- ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่ายนิยมใช้วิธีดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธี percolation หรือ continuous extraction
- ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นพืชที่ไม่ทนทานต่อความร้อน ควรใช้วิธี maceration หรือ percolation

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช่จ่ายในการสกัด หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีที่ง่ายไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่ได้

3. ความต้องการที่จะให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์ หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดที่เจือจาง การใช้วิธี maceration ก็เพียงพอ แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธี percolation หรือ continuous extraction

การคัดเลือกตัวทำละลายในการสกัด (ขจรศักดิ์, 2539)

เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกัน การเลือกตัวทำละลายที่จะให้ได้สารทุกกลุ่มที่ต้องการจึงทำได้ยาก การสกัดจะได้ผลดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยสารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกันและละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด

ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบสำคัญในพืชที่สกัดนอกเหนือจากที่ต้องการจะให้เป็น ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ราคาพอสมควร

สำหรับตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัด ได้แก่ (รัตนา, 2547)

1. น้ำ จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่ายและราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรมีข้อเสียหลายประการ คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่สำคัญออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารสำคัญที่ต้องการ สารเฉื่อยที่ละลายออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล, แป้ง ล้วนเป็นอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จึงอาจทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัด นอกจากนี้การทำให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยไล่น้ำออกไป ซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้
2. แอลกอฮอล์ จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ ซึ่งมีข้อดีกว่า ดังนี้
   - มีความจำเพาะ (selectivity) ในการละลายมากกว่าน้ำ
   - มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
   - ระเหยตัวทำละลายออกได้ง่ายกว่าเมื่อต้องการสารสกัดเข้มข้น
3. น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic mixture) เป็นน้ำยาที่ใช้สกัดอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่ราคาถูกกว่า และยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่างๆ ในการสกัดเมื่อทิ้งไว้ซึ่งมักเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้น้ำอย่างเดียวในการสกัด

นอกจากน้ำยาสกัดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ตัวทำละลายอินทรีย์อาจใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรได้ เช่น เฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น

การทำให้สารสกัดเข้มข้น (รัตนา, 2547 และ วีณา, 2534)

เมื่อทำการสกัดพืชจากตัวทำละลายที่เหมาะแล้ว จะได้สารสกัดที่มีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้การนำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องมีการนำสารดังกล่าวมาทำให้มีความเข้มข้น ด้วยวิธีการ ดังนี้

1. การระเหย (evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากสารสกัดจากพืช โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีการนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูง และหากใช้สารละลายอินทรีย์ในการสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรงบนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย

2. การกลั่นในภาวะสูญญากาศ (distillation in vacuum) เป็นวิธีการนำตัวทำละลายออกด้วยการกลั่นอุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ distillation flask, condenser และ receiving flask โดย distillation flask จะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสูญญากาศ ตัวทำละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณ condenser และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น
3. การทำให้แห้ง (drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dryer) ฯลฯ
4. อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผนเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000

การแยกสารให้บริสุทธิ์

เนื่องจากสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ประกอบด้วยสารหลายชนิดมากมาย ซึ่งมีทั้งสารสำคัญและองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ ดังนั้นการแยกสารสำคัญให้อยู่ในสภาพบริสุทธิ์ จัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด ซึ่งสามารถทำได้ 2 แบบ คือ

- การแยกสารโดยใช้คุณสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมี (chemical means) เช่น ความเป็นกรด (acidity), ความเป็นด่าง (basicity), การละลาย (solubility) เป็นต้น
- การแยกสารโดยใช้คุณสมบัติทางฟิสิกส์ (physical means) เช่น การกลั่น (distillation), การเหวี่ยง (centrifugation), การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (liquid-liquid chromatography), การตกผลึกแยกส่วน (fractional crystallization), การตกตะกอน (precipitation) เป็นต้น

วิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์มีอยู่ด้วยกันหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย คือ โครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (distribution of partition) ของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งอาจเป็นแก๊ส (gas) หรือของเหลว (liquid) กับเฟสคงที่ (stationary phase) อาจเป็นของแข็ง (solid) หรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง (supporting material) ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ (รัตนา, 2547) โครมาโทกราฟีสามารถแบ่งออกโดยอาศัยเทคนิคได้ 2 ชนิด คือ (กฤษณา, 2529)

1. Column chromatography เป็นโครมาโทกราฟีซึ่งมี stationary phase บรรจุอยู่ในหลอดกลวง (column) ขนาดต่างๆ กัน เมื่อใส่สารที่จะแยกลงไปเหนือ column แล้วจึงผ่าน mobile phase ลงไป mobile phase ก็พาสารเคลื่อนที่ไปตามแท่ง
2. Open – bed chromatography เป็นโครมาโทกราฟีซึ่งทำเป็นแผ่นบาง mobile phase เคลื่อนที่ไปโดยอาศัยคุณสมบัติ capillary wetting โครมาโทกราฟีชนิดนี้ใช้กับ mobile phase ที่เป็นของเหลวเท่านั้น ได้แก่ เปเปอร์โครมาโทกราฟี (paper chromatography) และโครมาโท-กราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี คือ (รัตนา, 2547)

1. ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม
2. ตรวจความสม่ำเสมอ (homogeneity) ของสารตัวอย่าง
3. ทำให้สารบริสุทธิ์ (purification)
4. ตรวจเอกลักษณ์ของสาร
5. ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ (quantitative analysis)
6. ตรวจสารปนเปื้อน (impurity)

โครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) คือโครมาโทกราฟีชนิดที่ stationary phase มีลักษณะชั้นบางๆ แผ่กระจายอยู่บนสิ่งที่ยึดเหนี่ยว เช่น แผ่นแก้ว อะลูมิเนียม (Aluminium) หรือ โพลีเอทธิลีน (Polyethylene) การแยกสารทำโดยหยดสารบนแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC นี้ไปใส่ในภาชนะที่ปิดสนิทที่มีสารละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้สารละลายเคลื่อนที่ซึมผ่าน stationary phase ขึ้นไปพร้อมกับพาสารบางชนิดเคลื่อนที่ไปด้วย ขบวนการนี้เรียกว่า development โดยกระบวนการแยกมีความสามารถในการดูดซับและกระจายตัวต่างกัน เมื่อเวลาผ่านไปจึงเกิดการแยกสารออกจากกันในที่สุด (กฤษณา, 2529) โดยประเมินการแยกของสารด้วยค่ารีทาดเดชันแฟกเตอร์ (Retradation factor) หรือรีเลทีฟฟรอนต์หรือ (Relative front ,R_f) จะมีค่าคงที่เหมือนกันทุกครั้ง โดยประเมินจากค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต่ในบางกรณีอาจมีความคาดเคลื่อนของค่าดังกล่าวได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน ดังนี้ (กิตติพันธ์ และคณะ, 2529)

1. Adsorbent activity โดยปกติการทำแผ่น TLC เพื่อที่จะทำการ development จะมีการอบเพื่อไล่ความชื้นก่อน แต่เมื่อนำแผ่น TLC ทิ้งไว้ในอากาศแผ่น TLC ดังกล่าวมีโอกาสที่จะดูดความชื้นได้ง่าย น้ำหรือความชื้นจะทำให้ activity ของแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบางลดลง เนื่องจากน้ำเข้าไปยึด active site

ของ แผ่นโครมาโทกราฟีไว้บางส่วน ดังนั้นการที่ activity ของแผ่น โครมาโทกราฟีลดลงจึงมีผลทำให้ค่า R_f ของสารประกอบสูงขึ้นมากกว่าที่ควรจะเป็น

2. การอิ่มตัวของไอ mobile phase ใน chamber (chamber saturation) ถ้าบรรยากาศภายในแท้งค์ หรือ chamber ไม่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่เป็น mobile phase เมื่อทำ development ในขณะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปตาม stationary phase จะมีการระเหยออกจาก stationary phase ไปเรื่อยๆ ทำให้การเคลื่อนที่ของตัวทำละลายไม่สม่ำเสมอกัน และ solvent front ก็จะไม่อยู่ในแนวเดียวกันตลอดทำให้ค่า R_f เปลี่ยนแปลงไป

3. อุณหภูมิ ผลของอุณหภูมิต่อค่า R_f จะทำให้ค่าเปลี่ยนแปลง

4. ปริมาณของตัวอย่างที่ทำการแยก ถ้ามีปริมาณของสารที่จะทำการแยกมีน้อยเกินไปก็จะยากแก่การตรวจสอบแต่ถ้ามีมากเกินไป เมื่อ developed แล้วจะได้สารประกอบเป็นจุดใหญ่ ซึ่งทำให้ค่า R_f เปลี่ยนไป เพราะในการวัดระยะทางที่สารประกอบเคลื่อนที่ไปวัดจากจุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางของจุดที่แยกได้ ถ้าจุดดังกล่าวใหญ่มากเท่าไรค่า R_f ก็มีการเปลี่ยนแปลงไปได้มาก ในบางกรณีที่สารที่จะทำการแยกมากเกินกว่าที่ Adsorbent จะสามารถดูดซับเอาไว้ได้ก็จะเกิด Tailing คือแทนที่จะเห็นสารประกอบแยกออกมาเป็นจุดก็จะเป็นจุดที่มีหางยาวคล้ายดาวหาง

การประยุกต์ใช้ TLC ในการศึกษาสารเคมีจากสมุนไพร (วนัสนันท์, 2547)

1. ใช้วิเคราะห์หาสารเบื้องต้นว่ามีกี่ชนิด และบางครั้งอาจบอกได้ว่าเป็นสารประเภทใด
2. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อหา solvent system สำหรับ column chromatography
3. ใช้ตรวจสอบ Fraction ที่ได้จาก column chromatography เพื่อร่วม fraction ที่เหมือนกัน
4. แยกสารบางชนิดที่มีปริมาณน้อย
5. ใช้แยกสารปริมาณมาก ซึ่งแยกโดยวิธี column chromatography ไม่ได้
6. ใช้หาปริมาณสารในสารผสม

แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) โครมาโทกราฟีเกี่ยวข้องกับกลไกของการกระจายตัวหรือการแจกแจงของสารประกอบอยู่ระหว่างตัวกลางที่แตกต่างกันสองชนิดโดยตัวกลางชนิดหนึ่งอยู่กับที่และตัวกลางอีกชนิดหนึ่งเคลื่อนที่ แต่สารประกอบในของผสมจะมีการกระจายตัวแตกต่างกันไปในตัวกลางทั้งสองทำให้กระบวนการแยกเกิดนานขึ้นเท่าใดก็ทำให้การแยกส่วนประกอบผสมดีขึ้น จนกระทั่งสารถูกแยกผ่านตัวกลางอยู่กับที่ออกมาทีละสารไปสู่อุปกรณ์ตรวจวัดสัญญาณหรือดีเทคเตอร์ (Detector) สารตัวอย่างจะถูกทำให้ระเหยกลายเป็นไอ ก่อนที่จะถูกแยกองค์ประกอบด้วยกลไกดังกล่าว (คงเดช, 2544)

การเพิ่มการละลาย (Solubility Enhancement)

การเพิ่มการละลายประกอบด้วย 4 วิธีการหลัก คือ (อุรชา, 2546)

1. การใช้สารลดแรงตึงผิว (micellar solubilization) เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มการละลายโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิว หรือที่นิยมเรียกว่า surfactants หรือ surface active agent หรือ amphiphile ซึ่ง คือ โมเลกุลหรือไอออนซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งทั้งสองส่วนนี้ต้องสมดุลกันทำให้ถูกดูดซับที่พื้นผิวหรือระหว่างพื้นผิวของของเหลว ทำให้ความเข้มข้นที่พื้นผิวสูงกว่าความเข้มข้นภายในเนื้อของของเหลว และแรงตึงผิวลดลง

2. การใช้ตัวทำละลายร่วม (cosolvency) คือ การนำเอาตัวทำละลาย 2 ชนิดหรือมากกว่ามาผสมกัน เพื่อนำมาละลายสารที่ละลายน้ำได้น้อยทำให้เกิดการละลายที่ดีขึ้น โดยเรียกตัวทำละลายที่นำมาผสมว่า ตัวทำละลายร่วม (cosolvents) การใช้ตัวทำละลายร่วมจะช่วยแก้ปัญหาการละลายได้น้อยหรือไม่คงตัวในระบบที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง

3. การปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH adjustment) ผลของกรดและด่างต่อสารละลายมีผลมากในกรณีที่สารเป็นอิเล็คทรอไลท์อ่อน (weak electrolytes) โดยค่าความเป็นกรดด่างจะมีความสำคัญในด้านการละลายและความคงตัว

4. การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) สารประกอบเชิงซ้อน (complexes or coordination compounds) คือ สารประกอบที่เกิดจากสาร 2 ชนิด หรือมากกว่า ที่มีส่วนประกอบทางเคมีแตกต่างกันมารวมตัวกัน โดยผ่านกลไกลการให้-การรับอิเล็คตรอน (donor-acceptor mechanism) หรือ Lewis acid-base reaction โดยสารที่สามารถทำหน้าที่ให้คู่อิเล็คตรอน (electron pair) เรียกว่า electron donor หรือ ligand ส่วนสารที่ทำหน้าที่รับคู่อิเล็กตรอนเรียกว่า electron acceptor

ตัวทำละลายทางเภสัชกรรม (Pharmaceutical Solvent) (สุวิภา, 2540)

ปัจจุบันตัวทำละลายที่ใช้ในทางอุตสาหกรรมมีมากกว่า 300 ชนิด ส่วนประกอบทางเคมีแตกต่างกันไปตั้งแต่สารประกอบอินทรีย์ชนิดไฮโดรคาร์บอน แอลกฮอล์ อีสเทอร์ อีเทอร์ และกรดจนถึงไนโทรพารัฟฟิน การใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในโรงงานอุตสาหกรรมและการสังเคราะห์สารอินทรีย์เคมี แต่ในทางเภสัชกรรมมีตัวทำละลายที่ใช้อยู่ในจำนวนเล็กน้อยอันเนื่องมาจากความเป็นพิษ การระเหย ความไม่คงตัว และ ความสามารถในการติดไฟ ตัวทำละลายที่ใช้กันในทางเภสัชกรรม มีดังนี้

- Acetone
- Alcohol (Ethanol)
- Denatured Alcohol
- Rose Water Ointment
- Diluted Alcohol
- Glycerin
- Methyl Alcohol
- Water
- Chloroform
- Ether
- Ethyl acetate
- Methyl Isobutyl Ketone
- Monoethanolamine
- Propylene Glycol
- Trolamine (Triethanolamine)

สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่

น้ำ เป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้และมีราคาถูกที่สุด น้ำมีค่า dielectric constant สูง สารที่ละลายน้ำเมื่อเก็บไว้นานอาจเสื่อมสภาพเนื่องจากเกิดกระบวนการ hydrolysis นอกจากนี้สารละลายดังกล่าวมีโอกาสปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย

Ethanol เป็นตัวทำละลายที่ใช้กันมากรองลงมาจากน้ำ แต่มีข้อดีกว่าน้ำ คือ สารละลายที่มีสารอินทรีย์ละลายใน ethanol จะคงสภาพอยู่ได้นานโดยไม่เกิดการสลาย นอกจากนี้สารละลายที่มี ethanol มากพอจะไม่เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

Glycerin เป็นตัวทำละลายที่ดีชนิดหนึ่ง แต่ไม่นิยมใช้เท่าน้ำและ ethanol เนื่องจาก glycerin มีความหนืดสูง หากใช้ Glycerin ในความเข้มข้นที่สูง จะมีฤทธิ์เป็นสารกันเสีย (preservative) ได้ด้วย glycerin สามารถละลายเกลือได้หลายชนิด สารสกัดจากพืช, ยางไม้ (gum), soluble carbohydrate และแป้ง (starch) ก็สามารถละลายได้ใน glycerin

Propylene glycol เป็นตัวทำละลายที่มักใช้ทดแทน glycerin ซึ่ง propylene glycol ผสมได้กับน้ำในทุกอัตราส่วน สามารถละลายน้ำมันหอมระเหยได้หลายชนิด และผสมรวมกันได้กับน้ำมันที่ไม่ระเหย (fixed oil) นอกจากนี้ยังเป็นสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้

สารลดแรงตึงผิว (surface active agent)

สารลดแรงตึงผิว เป็นสารประกอบที่มีส่วนที่ละลายน้ำและส่วนที่ละลายน้ำมันอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน นิยมใช้อย่างกว้างขวางในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง สารลดแรงตึงผิวนอกจากจะใช้เป็นสารช่วยเพิ่มการละลาย (solubilizer) แล้วยังใช้เป็นสารช่วยให้เปียก (wetting agent) และเป็นสารที่ทำให้น้ำและน้ำมันผสมกันได้และคงสภาพอยู่ได้ สารลดแรงตึงผิวทำหน้าที่นี้ เรียกว่า emulsifier หลักการทำงานของสารลดแรงตึงผิว คือ ส่วนที่ละลายน้ำจะทำการจับกับน้ำ และส่วนที่ละลายน้ำมันจะทำ

การจับกับน้ำมัน หรือไขมันที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ สารลดแรงตึงผิวแบ่งออกได้หลายกลุ่ม ขึ้นอยู่กับประจุไฟฟ้าบนส่วนประกอบที่ละลายน้ำ (hydrophilic) โดยสามารถแยกได้ 4 ประเภท ได้แก่

1. Anionic surfactant เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประจุไฟฟ้าบน hydrophilic ให้ประจุลบส่วนมากแสดงอยู่ในรูป carboxylate, sulfate, sulfonate หรือ phosphate สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้ใช้มากในอุตสาหกรรมประเภทผงซักฟอก, ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด, น้ำยาล้างจาน เป็นต้น
2. Cationic surfactant เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประจุไฟฟ้าบน hydrophilic ให้ประจุบวกส่วนมากมักจะเป็นพวก quaternary ammonium สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้จะไม่สามารถทำงานได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่างสูง (pH 10 - 11) เนื่องจาก ammonium salt จะมีการสูญเสียประจุบวก ทำให้เกิดการตกตะกอนได้
3. Nonionic surfactant สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้จะต่างจากสารลดแรงตึงผิวประเภท anionic และ cationic ตรงที่เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุ โดยมีพวก polyether หรือ polyhydroxyl เป็นกลุ่มที่แสดงคุณสมบัติคล้ายพวกที่มีประจุ ใช้มากในผงซักฟอก น้ำยาล้างถ้วยชาม ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดพื้นผิว เป็นต้น
4. Amphoteric surfactant หรือ Zwitterions เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประจุไฟฟ้าบน hydrophilic สามารถให้ได้ทั้งประจุบวกและลบ โดยจะแสดงคุณสมบัติประเภทใดขึ้นอยู่กับสภาพความเป็นกรด – ด่าง ของสภาวะแวดล้อม ถ้าในสภาวะเป็นกรด (pH < 7) ประจุไฟฟ้าบน hydrophilic จะให้ประจุบวก และในสภาวะที่เป็นกลางจะไม่เกิดการให้ประจุไฟฟ้าบน hydrophilic สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับผิว หรือ ผม

จากการตรวจเอกสารข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากตะไคร้ต้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้ และที่สำคัญสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดในพืชตระกูลกะหล่ำได้ ซึ่งโรคดังกล่าวมักทำให้เกิดความเสียหายกับพืชตระกูลกะหล่ำ โดยโรคดังกล่าวจะเกิดได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต และพบได้เกือบทุกฤดูกาลปลูก ซึ่งการควบคุมโรคดังกล่าวเกษตรกรมักใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งมีการสลายตัวช้าอาจทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยกับเกษตรกรที่ใช้สารเคมีและผู้บริโภคที่บริโภคผัก

จากข้อมูลการตรวจเอกสารข้างต้น จะเห็นได้ว่ามีการรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารออกฤทธิ์จากตะไคร้ต้นในการควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรีย แต่ก็พบว่า ข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถนำมาปฏิบัติใช้ได้ในระดับแปลงปลูก เพราะส่วนใหญ่ผลการทดสอบเป็นผลในระดับห้องปฏิบัติการ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองไปใช้ได้โดยตรง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษา

และพัฒนาสารสกัดจากตะไคร้ต้นเพื่อใช้ควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรียในระดับแปลงปลูก โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกับสารแมนโคเซบและสารลาร์มิน่า (ชื่อสามัญ บาซิลลัส ซับทีลิส) ดังวิธีการทดลองที่จะได้กล่าวต่อไป