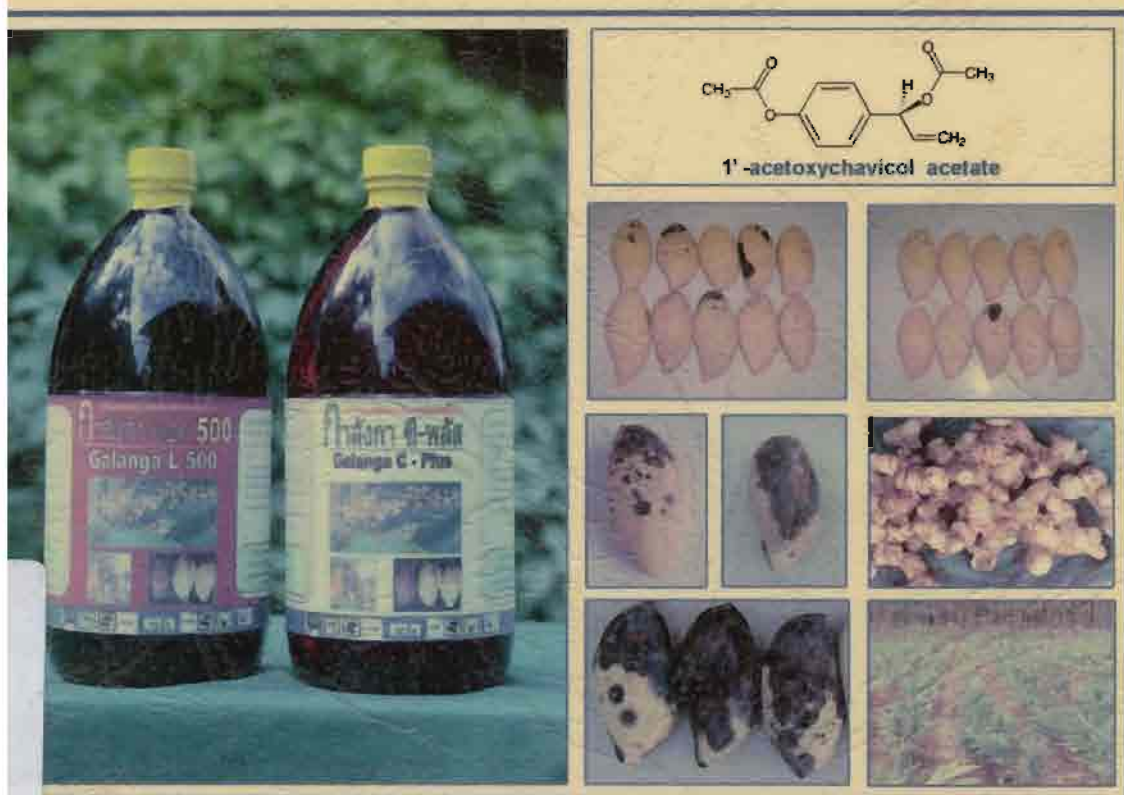




รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข่า
เพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง

Formulation Development of Extract from Galanga
(*Alpinia galanga* Sw.) to Control Postharvest Mango Fruit Rot



โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทยา สรวมศิริ
รองศาสตราจารย์ ดร. ญานี พงษ์ไพบูลย์
อาจารย์ ดร. จรรยา จริยานุสรณ์

เมษายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข่า
เพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง

Formulation Development of Extract from Galanga
(*Alpinia galanga* Sw.) to Control Postharvest Mango Fruit Rot

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร. พิทยา สรวมศิริ
2. รศ.ดร. ญานี พงษ์ไพบูลย์
3. อาจารย์ ดร. จรรยา จริยานุสรณ์

สังกัด

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
วิทยาลัยเกษตรกรรมเทคโนโลยีกำแพงเพชร

ชุดโครงการ การจัดการผลผลิตพืชสวน

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข้าวเพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง” เป็นโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ตลอดเวลาที่ได้ดำเนินงานตามโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้รับความสะดวกในการติดต่อประสานงานกับทาง สกว. โดยผ่านทางผู้ประสานงานชุดโครงการ “การจัดการผลผลิตพืชสวน” รศ.ดร.คณัย บุญเกียรติ ในส่วนของเนื้อหาทางวิชาการก็ได้รับคำชี้แนะเป็นอย่างดีจากผู้ทรงคุณวุฒิที่ทาง สกว. ได้แต่งตั้งขึ้น เพื่อติดตามประเมินผลและให้ข้อเสนอแนะต่างๆ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

การดำเนินการวิจัยได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากผู้วิจัยร่วมทุกท่าน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในคณะแพทยศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือต่างๆ ทำให้ได้ผลงานเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ท้ายที่สุด คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรของกรมส่งเสริมการเกษตร และเกษตรกรผู้ปลูกมะม่วงเพื่อการส่งออก ในพื้นที่จังหวัดพิจิตร และฉะเชิงเทรา ได้แก่ คุณสายันต์ บุญยิ่ง คุณสุวิทย์ คุณาวุฒิ และคุณศักดิ์ดา ชันติพะโล ที่ได้ให้ความร่วมมือและความสะดวกในการปฏิบัติงานทดสอบผลิตภัณฑ์กับมะม่วงในระดับแปลงเกษตรกร รวมทั้งเกษตรกรจังหวัดอ่างทอง ได้แก่ คุณสุนทร สมามิงคด คุณบุญเลื่อน รักญาติ และคุณวัลลภ ทองสดี ที่ได้กรุณาให้ความร่วมมือในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนช่อดอกและบนผล และขอขอบคุณบริษัท Siam Export Mart ที่ให้ความร่วมมือในการใช้โรงอบไอน้ำ

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2548

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. พิทยา สรวมศิริ

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ (053) 944058
โทรสาร (053) 892716
e-mail agipsrms@chiangmai.ac.th

นักวิจัยร่วม 1. รศ. ดร. ญานี พงษ์ไพบูลย์

เทคโนโลยีเกษตรกรรม
คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ (053) 944361, 944342 – 3
โทรสาร (053) 251111, 22741
วิทยาลัยเกษตรกรรมและเทคโนโลยี
กำแพงเพชร
โทรศัพท์ (055) 736198

2. อาจารย์ ดร. จรรยา จริยานุสรณ์

ผู้ช่วยนักวิจัย 1. นายอนุวัฒน์ จรัสรัตนไพบูลย์

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ (053) 944058
โทรสาร (053) 892716
ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ (053) 944058
โทรสาร (053) 892716

2. นางสาวพัชรพร ไชยชนะ

ที่ปรึกษาโครงการ 1. รศ.ดร. นุชนารถ จงเลขา

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ (053) 944031
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ (02) 579-1026, 942-8044
โทรสาร (02) 579-1026

2. รศ. นิพนธ์ วิสารทนนท์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ตั้งวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ ได้แก่

1) เพื่อตรวจสอบสารออกฤทธิ์จากข่า (L14 และ L15) ที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz.) และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *D. mangiferae*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger*

2) เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์เชิงการค้า และพัฒนาผลิตภัณฑ์ (formulation) สารออกฤทธิ์จากข่า เพื่อใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา ในระดับโรงงานบรรจุหีบห่อและแปลงปลูก

โดยเน้นศึกษากับมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 และน้ำดอกไม้สีทอง ซึ่งเป็นพันธุ์ส่งออกในปัจจุบัน

การศึกษตามวัตถุประสงค์ที่ 1) ดำเนินการโดยการสำรวจการแพร่ระบาดของโรค และรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคจากผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่สุก และแสดงอาการของโรคจากแหล่งรับซื้อในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคเหนือ รวมจำนวน 3 ครั้งใน 2 ปี และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากบริเวณแผล พบเชื้อราสาเหตุของโรค 5 ชนิด ไม่พบเชื้อรา *Dothiorella mangiferae* ซึ่งเชื่อว่าสภาพสิ่งแวดล้อมในปีที่ศึกษาอาจไม่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาด ชนิดเชื้อราที่พบมากที่สุด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส และเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* สาเหตุโรคขั้วผลเน่า ซึ่งพบมากในทุกภาค ที่พบรองลงไป คือ *Aspergillus* sp., *Phomopsis* sp. และ *Dothiorella dominicana* ซึ่งเมื่อนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (L14+L15) ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 1'-Acetoxychavicol acetate 80 % มาทดสอบฤทธิ์กับเชื้อราเหล่านี้ด้วยวิธี Poison food technique พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้านสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ได้ 100 %

ในส่วนของการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดข่า ตามวัตถุประสงค์ที่ 2) ได้เริ่มศึกษาโดยตรวจสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ (L14+L15) โดยใช้หนูขาวเป็นสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของข่า (L14+L15) มีความเป็นพิษบ้าง (slightly toxic) แต่ยังอยู่ในระดับยอมรับได้ในเชิงเภสัชกรรม โดยมีค่า $LD_{50} = 3.013$ กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวหนู ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากข่า (L14+L15) มีลักษณะเป็นน้ำมันไม่ละลายน้ำ จึงต้องพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ โดยใช้ตัวทำละลายร่วมผสม และเติมสารลดแรงตึงผิวตัวทำละลายร่วมที่ดีได้แก่ ethanol ผสมกับ propylene glycol ส่วนสารลดแรงตึงผิว อาจใช้ Tween 20 และ PEG-RH-40 ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีพิษ นิยมใช้ผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

ผลิตภัณฑ์สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากข้าที่ได้ เรียก ผลิตภัณฑ์ “EM-1” หากเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) มีอายุการใช้งาน 4 ปี แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) มีอายุการใช้งาน 4 เดือน โดยยังคงสารออกฤทธิ์ไว้ได้ 96.01% ของความเข้มข้นเริ่มต้น มีสี และความใสคงเดิม ทำการทดสอบ ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ไว้นาน 4 เดือน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน สามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella dominicana* และ *Phomopsis mangiferae* ได้ 100 % ในขณะที่ควบคุม *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* ได้ 59.26 และ 83.70 % ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ “EM-1” มีปัญหาด้านต้นทุนการผลิต ซึ่งมีราคาต้นทุนผลิตภัณฑ์สูงถึง 9,464 บาท/ลิตร จึงต้องปรับเปลี่ยนแนวทางไปพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบจนได้ผลิตภัณฑ์ เรียก “CE” ซึ่งมีสูตรผสมประกอบด้วยสารสกัดหยาบ 4.25% ผสมกับ De-EtOH : PG 85.10% และ PEG-RH-40 10.65% ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาถูกกว่ามาก และมีอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานกว่า โดยถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีอายุการใช้งาน 30 ปี แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะเก็บได้นาน 1 ปี ซึ่งเป็นเป้าหมายของการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในงานวิจัยนี้ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า 5 ชนิด พบว่า เมื่อผสม CE 500 ส่วนต่อล้าน กับ CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน ในระดับงานอาหารเลี้ยงเชื้อ CuSO_4 จะไปเสริมฤทธิ์ของ CE ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีขึ้น สูตรผสม CE 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วงได้ดีที่สุดเทียบเท่ากับสารเคมีเกษตรที่เกษตรกรนิยมใช้ คือ Prochloraz และดีกว่า benomyl

การศึกษา mode of action ของสารสกัดในประเด็น ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาบางชนิดของเชื้อรา พบว่า ผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบจากข้ามีฤทธิ์ทำให้การเจริญเติบโต น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ของเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ลดลงตามสัดส่วนความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสด : น้ำหนักแห้ง ลดลงด้วย แสดงว่า สายรา (hypha) ตกอยู่ในสภาวะการขาดน้ำแม้จะทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำอยู่มากก็ตาม เซลล์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เลี้ยงในผลิตภัณฑ์ความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน ไม่มีการเจริญเติบโต (ตาย) โดยสารออกฤทธิ์จากข้า ทำความเสียหายให้กับ tonoplast (membrane of the vacuole), cell membrane และ septate

ในกรณีของวัตถุดิบเหง้าข้าเพื่อการแปรรูปเชิงอุตสาหกรรม ได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสายพันธุ์ข้าที่เหมาะสม โดยทำการเก็บตัวอย่างข้า จาก 16 จังหวัด ในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคเหนือ ได้ตัวอย่างพืชรวม 34 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์มาก ได้สายพันธุ์ข้า 5 สายพันธุ์ที่มีปริมาณสารสกัดหยาบ 7.86 –

9.28% ได้แก่ ข้าตาแดง (ลพบุรี), ข้าหยวก (กำแพงเพชร), ข้าแดง (อุตรดิตถ์), ข้าลิง (กาฬสินธุ์) และ ข้าป่า (อุตรดิตถ์) จึงเป็นสายพันธุ์ข้าที่คัดเลือกไว้สำหรับเพาะปลูกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบต่อไป

Abstract

The studies were focused on 2 major objectives ; 1) to assess the efficiency of semi-purified active substances from galanga (L14 and L15) in control anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and other fungal diseases causing postharvest mango fruit rot (*Botryodiplodia theobromae* Pat., *Dothiorella dominicana*, *D. mangiferae*, *Phomopsis mangiferae* and *Aspergillus niger*). The second objective was to develop the protocol for galanga extraction, which could be economically used in fungicide formulation for control mango fruit rot diseases in fruit exporting industries. All measurements were carried out on Nam-Dok-Mai # 4 and Nam- Dok-Mai-Srithong, the exported mango cultivars.

The studies for objective 1) were firstly started with survey and collecting of fungal species from rotting Nam-Dok-Mai mango fruits in central, eastern, western and northern parts of Thailand. Fruit collections had been made three times in two years. Through purification technique, five from six above mentioned fungal species were separated and identified. Only *Dothiorella dominicana* was not found, which may be because of unfavourable environmental condition for the growth of this fungus in the studied years. The most common fungi found throughout the surveying areas were *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose fruit rot and *Botryodiplodia theobromae* causing stem end fruit rot. Less frequency of distribution was detected in *Aspergillus* sp., *Phomopsis* sp. and *Dothiorella dominicana*. All these collected and identified fungi were then used as bioassay-indicator to assess the efficiency to control fungi of extract from galanga. Semi-purified substance (L14+L15) containing 80 % 1'-Acetoxychavicol acetate were mixed into Potato Dextrose Agar (PDA) with variation of the L14+L15 concentration before inoculated the fungus mycelium. The result revealed that L14+L15 at the concentration of 5,000 ppm could completely (100%) inhibit mycelium growth of all the five species.

To develop the formulation from galanga extract, chronic toxicity test for L14+L15 was firstly carried out using white rat as bioindicator. It was found that L14+L15 had slightly toxic effect but still at the pharmaceutical acceptable safe-value. LD50-value was 3.013 g/kg body weight. L14+L15 substance had oily properties, could therefore not dissolve in water. Cosolvent was required, and ethanol + propylene glycol + surfactant (tween 20 or PEG-RH-40) were proved to be the best emulsifier. The achieved formulation was called "EM-1" which could retained 1'-Acetoxychavicol acetate content upto 96.01% of starting point for 4 years when kept at 4°C or

only 4 months when stored at 27 °C (room temperature). After 4 months storage under room temperature the product could still remain its physical properties of translucent-yellowish-brown colour and could completely control *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella dominicana* and *Phomopsis mangiferae* even at the concentration of 1,000 ppm but control *Botryodiplodia theobromae* and *Aspergillus niger* at only 59.26 and 83.70%, respectively.

The cost studies for “EM-1” produce showed, however, the unperceivable too high price of upto 9,464 baht/litre. New formulation based on a cheaper “crude extract” had to be further developed, called “CE” produce. The “CE” contained 4.25% dichloromethane crude extract, De-EtOH : PG 85.10% and :10.65% PEG-RH-40. The “CE” produce was proved to be much better than “EM-1” in the sense of longer storage life upto 30 years when kept under 4 °C condition or upto 1 year under room temperature (27 °C). To achieve the best efficiency to control mango fruit rot diseases, a mixture of 500 ppm CuSO₄ with 500 ppm “CE” was however developed. This mixture showed even the similar good result as the conventional agrochemical “Prochloraz” and better than “Benomyl”.

Mode of action studies revealed that the galanga formulation at 500 ppm totally inhibited growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. The major target hypha parts affected by the active substance from galanga extract were tonoplast, cell membrane and septate. Membrane crack was detected under electron microscope studies.

To study the galanga plant cultivar appropriated to used as raw material in “CE” producing industry, galanga plant specimens were collected from 16 provinces in central, eastern, western and northern Thailand. From total 34 plant samples only 5 cultivars / clones of galanga were selected after one year acclimatized under the same growing condition in Chiang Mai. They were Kha-Ta-Daeng (Lopburi), Kha-Yuak (Kampaengpet), Kha-Daeng (Uttaradit), Kha-Ling (Kalasin) and Kha-Pa (Uttaradit) ; which contained 7.86-9.28%DW of crude extract.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

มะม่วงเป็นไม้ผลเมืองร้อนที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจเพื่อการส่งออกของชาติ ด้วยเป็นพืชที่สามารถเพาะปลูกได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย ทุเรียนและทุเรียนกล้วยมีสายพันธุ์ที่มีคุณภาพดี สีสวย และรสชาติถูกปากคนไทยและชาวต่างชาติ รวมทั้งเป็นไม้ผลที่มีความต้องการสูงในตลาดโลก ทั่วโลกผลิตมะม่วงได้ปีละประมาณ 21,820,711 ตัน มีการส่งออกจากประเทศผู้ผลิตรวมกันประมาณ 493,739 ตัน ประเทศไทยผลิตได้ 1,350,000 ตัน ส่งออกได้เพียง 10,473 ตัน (ร้อยละ 0.78 ของผลผลิต)

สาเหตุสำคัญที่ทำให้มะม่วงจากประเทศไทยยังส่งออกได้น้อย เนื่องจากฤดูเก็บเกี่ยวมะม่วงของไทยสั้นเกินไป เพียงปีละ 6 เดือน นอกจากนี้ยังมีปัญหาการเน่าเสียเนื่องจากเชื้อราของผลผลิตระหว่างการขนส่ง ซึ่งปัจจุบันผู้ส่งออกใช้วิธีชุบผลไม้ด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น Benomyl, Carbendazim, Prochloraz ซึ่งมีฤทธิ์ตกค้างในผลผลิตนาน มักมีปัญหาเมื่อต้องผ่านการตรวจสอบความปลอดภัยด้านอาหาร การศึกษาเบื้องต้นนานถึง 2 ปี พบว่าสารสกัดจากข่ามีฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่ามะม่วงได้ดีพอควร จึงได้ดำเนินการวิจัยในโครงการนี้ โดยมีวัตถุประสงค์

1) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์จากข่า (Fraction ที่ L14 และ L15) ที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides*) และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *D. mangiferae*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger*

2) เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์สำหรับการผลิตเชิงการค้า และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ (Formulation) สารออกฤทธิ์จากข่า เพื่อนำไปใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนส และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา ในระดับโรงงานบรรจุหีบห่อ

การศึกษานี้ใช้ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 3 ปี 2 เดือน (1 ธันวาคม 2544 - 28 กุมภาพันธ์ 2548) และเน้นศึกษากับมะม่วงพันธุ์ส่งออก คือ พันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 และพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง โดยในส่วนของการผลิตได้ตั้งเป้าหมายการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณสมบัติสำคัญ 4 ประการ ได้แก่

1. มีประสิทธิภาพสูงและราคาถูกลงใกล้เคียงกับสารเคมีเกษตรที่เกษตรกร และผู้ส่งออกนิยมใช้
2. มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราได้หลายชนิด นอกเหนือจาก *Colletotrichum gloeosporioides*
3. มีความคงตัวสูง เพื่อสามารถวางจำหน่ายในร้านเคมีเกษตรได้ประมาณ 1 ปี
4. มีความปลอดภัยต่อมนุษย์

ซึ่งผลการวิจัยสามารถสรุปตามวัตถุประสงค์และความสำเร็จของโครงการได้ดังนี้

1. การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากสารสกัดจากเหง้าข่าในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง

จากการทดสอบด้วยวิธี Poison food technique โดยผสมสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่า สารสกัดจากข่าด้วย Dichloromethane สามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงได้ดีมาก โดยที่ระดับความเข้มข้นเพียง 100 ส่วนต่อล้าน ก็สามารถควบคุมการงอกของสปอร์ได้แล้ว ในขณะที่ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100% สารออกฤทธิ์สำคัญที่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อราได้ คือ สาร 1'-Acetoxychavicol acetate ซึ่งจะมีอยู่ในปริมาณ 3.75% ของน้ำหนักข่าแห้ง

2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดข่า

ผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ส่วนผสมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำสารสกัดหยาบจากข่าที่สกัดด้วย Dichloromethane ไปผสมกับตัวทำละลายรวม Ethanol : Propylene glycol อัตราส่วน 1 : 1 และสารผสมเติมแต่ง Polyethylene glycol 40 Hydrogenated Caster Oil (PEG-RH-40) ในอัตราส่วนสารสกัดข่า 4.25% ผสมกับตัวทำละลายรวม 85.10% และ PEG-RH-40 อีก 10.65% จะได้ผลิตภัณฑ์ สีน้ำตาลแดงใส ที่มีความคงตัวค่อนข้างดี มีอายุการใช้งาน 1 ปี เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หรือนานถึง 30 ปี ถ้าเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ มีค่า LD₅₀ เมื่อทดสอบกับหนูขาว 3.013 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวหนูขาว มีต้นทุนการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นลิตรละ 351 บาท โดยมีอัตราการใช้ที่เหมาะสม คือ ผสมน้ำเป็นสารละลาย ที่มีความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน และเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคโดยเสริม CuSO₄ เข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน พร้อมปรับ pH ของสารละลายเป็น 6 จะสามารถควบคุมโรคเน่าของผลมะม่วง เนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ได้ 95-100% โดยสามารถควบคุมได้นาน 7 วัน และไม่มีผลข้างเคียงต่อการสุก และคุณภาพของเนื้อผลแต่อย่างใด

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าของผลมะม่วง ในระดับแปลงเกษตรกรผู้ผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออก และการทดลองใช้ผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบจากข่าร่วมกับการอบไอน้ำตามวิธีการที่ผู้ส่งออกมะม่วงใช้กับพันธุ์น้ำดอกไม้ พบว่า เกษตรกรให้การยอมรับในสารชนิดนี้เมื่อทดสอบในระดับแปลง และมีข้อเสนอแนะในการประยุกต์ใช้แทนสารเคมีเกษตรใน

ระยะก่อนห่อผล ผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบจากข่ามีฤทธิ์ควบคุมโรคได้ดีเท่าสารเคมี Prochloraz ในการควบคุมโรคผลเน่า สามารถทนอุณหภูมิในการอบไอน้ำที่สูงถึง 50°C ได้เป็นอย่างดี และน่าจะใช้ทดแทนสารเคมีเกษตรในการชุบผลมะม่วงเพื่อการส่งออกได้ จึงได้พัฒนาบรรจุภัณฑ์ ตั้งชื่อเป็น “ Galanga C – Plus ” มีต้นทุนจำหน่ายหน้าโรงงาน เมื่อบรรจุขวดและติดสติ๊กเกอร์สินค้าเรียบร้อยแล้ว 370 บาท/ลิตร (Prochloraz 1,200 บาท/ลิตร) ซึ่งเมื่อนำไปผสมน้ำเป็นสารละลายชุบผลจะมีราคา 4.44 บาท/ลิตร (Prochloraz 3 บาท/ลิตร)

สารบัญ

เรื่อง		หน้า
บทที่ 1	บทนำ : ศักยภาพและปัญหาของมะม่วงเพื่อการส่งออกและโอกาสของผลิตภัณฑ์สารสกัดข่า	1
1.1	ความสำคัญทางเศรษฐกิจของมะม่วงและศักยภาพการพัฒนา	1
1.2	ข้อจำกัดการส่งออกเนื่องจากปัญหาโรคผลเน่าและเชื้อราสาเหตุ	4
1.3	ทำไมจึงต้องเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า	5
บทที่ 2	รายละเอียดงานวิจัย	10
2.1	วัตถุประสงค์ของโครงการ	10
2.2	เป้าหมายผลิตภัณฑ์ (formulation)	10
2.3	ขั้นตอนการศึกษาวิจัย	10
2.4	ระยะเวลาการศึกษาวิจัย	11
2.5	สถานที่ดำเนินการวิจัย	11
บทที่ 3	การพัฒนากระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์จากข่า	15
3.1	การสกัดสารออกฤทธิ์จากเหง้าข่า	15
3.2	การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารออกฤทธิ์จากข่า	16
3.3	การปรับปรุงเทคนิคการสกัดสารออกฤทธิ์จากข่า เพื่อลดต้นทุนการผลิต	17
3.4	การแยก fraction ของสารออกฤทธิ์ L14 และ L15 ด้วยวิธี Column chromatography (CC)	19
3.5	การศึกษาเกี่ยวกับสูตรผสมตัวชะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography	20
3.6	สรุปขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์จากข่าที่เหมาะสม	22
บทที่ 4	การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากข่าในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในมะม่วง	23
4.1	การตรวจสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของสาร L14, L15, L14+L15	23
4.2	การยืนยันสารออกฤทธิ์สำคัญใน fraction L14,L15 ด้วยวิธี GC-MS	26
4.3	สรุป	28
บทที่ 5	การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า	29
5.1	ขั้นตอนการศึกษาเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า	30
5.2	การเพิ่มประสิทธิภาพการละลายน้ำของสารสกัด L14 และ L15	31
5.3	การปรับปรุงสารช่วยการละลายน้ำ และสารลดแรงตึงผิว	33

สารบัญ

เรื่อง		หน้า
	5.4 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของ Formulation ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	50
	5.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ (Formulation) ชนิดเข้มข้น	51
	5.6 การทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation ที่ปรับปรุงใหม่	62
	5.7 การทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation หลังจากปรับปรุงครั้งที่ 2	66
บทที่ 6	การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ EM-1	71
	6.1 การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ (Stability studies) โดยวิธีมาตรฐานทางเภสัชกรรม	71
	6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ (เมื่อเก็บรักษาต่างกัน) ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในห้องปฏิบัติการ	84
	6.3 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ (EM-1) ที่เก็บรักษาไว้นานต่างกันในการควบคุมเชื้อราเมื่อใช้ในลักษณะการชุบผลมะม่วงในระดับห้องปฏิบัติการ	95
	6.4 สรุปผลการทดลอง	98
บทที่ 7	การปรับปรุงผลิตภัณฑ์เพื่อแก้ปัญหาคาบราบน้อย	99
	7.1 การศึกษาเบื้องต้นแนวทางการแก้ปัญหาคาบราบน้อย	99
	7.2 การปรับปรุงส่วนผสมผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา	105
	7.3 การทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ (EM-1) กับ CuSO_4 ในระดับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	111
	7.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวผลมะม่วงของสารละลาย EM-1 ผสมกับ CuSO_4	115
	7.5 การทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคผลเน่าของผลิตภัณฑ์ผสม EM-1 และ CuSO_4 ในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง ในระดับห้องปฏิบัติการ	118
	7.6 การทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคผลเน่าของผลิตภัณฑ์ผสม EM-1 และ CuSO_4 ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 ในระดับห้องปฏิบัติการ	125
	7.7 สรุป	131

สารบัญ

เรื่อง		หน้า
บทที่ 8	การศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาการควบคุมเชื้อรา (Mode of Action) และ ความปลอดภัยต่อมนุษย์ของสารสกัดจากข่า	132
8.1	ปฏิกิริยาการควบคุมเชื้อรา (Mode of Action) ของผลิตภัณฑ์	132
8.2	การทดสอบความเป็นพิษของ L14+L15 ในสารสกัดจากข่า	146
8.3	Mode of action and toxicity	151
บทที่ 9	การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข่าโดยผลิตจากสารสกัดหยาบ (CE)	152
9.1	กระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบ	152
9.2	การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ CE (Stability studies) โดยวิธี มาตรฐานทางเภสัชกรรม	153
9.3	ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ CE ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา สาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง หลังจากเก็บรักษาไว้นานต่างกัน	164
9.4	การทดสอบประสิทธิภาพควบคุมเชื้อราเมื่อผสมกับ CuSO_4 500 ส่วน- ต่อล้าน ในระดับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	174
บทที่ 10	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ EM-1 และ CE	176
บทที่ 11	การศึกษาต้นทุนผลิตภัณฑ์	179
11.1	ต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า EM-1	179
11.2	ราคาผลิตภัณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับ Benomyl	182
11.3	การคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์ CE	182
11.4	ราคาผลิตภัณฑ์ CE เมื่อเปรียบเทียบกับ Benomyl	185
บทที่ 12	การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ EM-1 และ CE กับผลมะม่วง ในระดับแปลงเกษตรกร	186
12.1	การทดสอบพื้นที่จังหวัดพิจิตรและฉะเชิงเทรา	186
12.2	การศึกษาการยอมรับของเกษตรกรต่อผลิตภัณฑ์ EM-1 และ CE และ ข้อเสนอแนะ	203
12.3	การทดสอบในพื้นที่จังหวัดอ่างทอง	204
12.4	การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ CE เมื่อใช้ร่วมกับกระบวนการ การอบไอน้ำ	212

สารบัญ

เรื่อง		หน้า
บทที่ 13	แนวทางวิจัยเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงอุตสาหกรรม	224
13.1	ศักยภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีที่เกษตรกรใช้	224
13.2	แนวทางพัฒนาเชิงอุตสาหกรรม	225
13.3	การปรับปรุงรูปแบบการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า	236
บทที่ 14	สรุปผลการวิจัยของโครงการ	237
14.1	การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากสารสกัดจากเหง้าข่าในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง	237
14.2	การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดข่า	238
14.3	รูปแบบบรรจุภัณฑ์ และชื่อผลิตภัณฑ์	238
เอกสารอ้างอิง		239
ภาคผนวก		
-	คำชี้แจงข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิ	242
-	การตรวจสอบคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง	250
-	การรวบรวมและแยกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในมะม่วง	254
-	การศึกษาลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราที่ผิวผลมะม่วง	266
-	การคัดเลือกสายพันธุ์ข่า	271

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 พื้นที่เพาะปลูกมะม่วงของประเทศไทย	3
1.2 ปริมาณผลผลิตมะม่วงของประเทศไทย	3
1.3 พื้นที่เพาะปลูกมะม่วงทั่วประเทศ	3
1.4 ราคาขายผลผลิตมะม่วงของประเทศไทย	4
3.1 ปริมาณผลผลิตและลักษณะทางกายภาพของ crude extract จากข่า	19
4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	25
5.1 การละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ	38
5.2 การละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายร่วมของน้ำ และ Propylene glycol	39
5.3 การละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Ethanol	41
5.4 การละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายร่วมของ Ethanol และ Propylene glycol	42
5.5 ผลของ PEG-RH-40 ต่อการละลายของสารสกัดข่าในน้ำ	43
5.6 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดข่าในน้ำ	45
5.7 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดข่าใน Glycerin	46
5.8 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดข่า ในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Propylene glycol	47
5.9 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดข่าเพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง	47
5.10 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดข่าชนิดเข้มข้น	48
5.11 สูตรผสมที่คัดเลือกไว้	49
5.12 ผลการทดสอบ Formulation ความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้าน ในการยับยั้ง การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	50
5.13 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดข่าชนิดเข้มข้น	52
5.14 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดข่าชนิดเข้มข้นที่ใช้สารช่วยละลายต่างกัน	52
5.15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	54
5.16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat	54
5.17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Dothiorella dominicana</i>	55
5.18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Phomopsis mangiferae</i>	55

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
5.19 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	56
5.20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation ในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลมะม่วง	60
5.21 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดชาชนิดเข้มข้นที่ใช้สาร antioxidant ต่างกันหลังจากปรับปรุงครั้งที่ 1	63
5.22 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา (ทดสอบ Formulation ครั้งที่ 2)	64
5.23 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดชาชนิดเข้มข้นที่ใช้สาร antioxidant ต่างกันหลังจากปรับปรุงครั้งที่ 2	66
5.24 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา (ทดสอบ Formulation ครั้งที่ 3)	67
6.1 ลักษณะความใสของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ	74
6.2 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์สูตร EM-1 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน	76
6.3 ปริมาณ 1'-ACA ในผลิตภัณฑ์หลังเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกัน	76
6.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1'-ACA ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ รวมทั้ง ค่า Slope และ Correlation coefficient ของกราฟระหว่างปริมาณ 1'-ACA กับเวลา	78
6.5 ค่า log ความเข้มข้นของ 1'-ACA ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ, ค่า slope และ ค่า correlation ของกราฟระหว่าง log ความเข้มข้น 1'-ACA กับเวลา	79
6.6 ค่า log ความเข้มข้นของ 1'-ACA เก็บที่อุณหภูมิ 27, 45 และ 60°C, ค่า Slope และค่าอัตราเร็วการสลายตัว (k)	81
6.7 ค่า T (°K) และค่า log k ของการสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับที่ 1	82
6.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>Dothiorella dominicana</i> , <i>Phomopsis mangiferae</i> และ <i>Aspergillus niger</i> ณ วันเริ่มต้นของการเก็บรักษา	85
6.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ของผลิตภัณฑ์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1-4 เดือน	88
6.10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Dothiorella dominicana</i> ของผลิตภัณฑ์ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1-4 เดือน	89

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
6.11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา <i>Phomopsis mangiferae</i> ของผลิตภัณฑ์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 – 4 เดือน	90
6.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Botryodiplodia theobromae</i> ของผลิตภัณฑ์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1- 4 เดือน	91
6.13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> ของผลิตภัณฑ์หลังจาก เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 – 4 เดือน	92
6.14 เปอร์เซ็นต์การตรวจการเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 7 และ 15 ของการเก็บรักษา	96
7.1 ประสิทธิภาพควบคุมการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ของผลิตภัณฑ์ EM-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ส่วนต่อล้าน	101
7.2 เปอร์เซ็นต์การตรวจการเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา เมื่อลดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ EM-1	103
7.3 เปอร์เซ็นต์การตรวจการเข้าทำลายของโรคในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา เมื่อผสมผลิตภัณฑ์ EM-1 กับสารอนินทรีย์	106
7.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ CuSO_4 และ KMnO_4 กับเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	108
7.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ NaHCO_3 กับเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	109
7.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ของส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ (EM-1) กับ CuSO_4	112
7.7 ประสิทธิภาพของส่วนผสมผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา	114
7.8 เปอร์เซ็นต์การตรวจการเข้าทำลายของโรค ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง หลังจากชุบในสารละลายอุณหภูมิปกติและปรับอุณหภูมิสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้นาน 5, 7 และ 10 วัน	119
7.9 จำนวนผลที่ถูกโรคเข้าทำลาย เปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธี ที่ชุบในสารละลายอุณหภูมิปกติ และปรับอุณหภูมิสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษาในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง	120
7.10 ร้อยละผลดีและผลที่เป็นโรค เมื่อ 10 วันหลังจากเก็บรักษาภายหลังจุ่มในสารละลายในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง	121

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
7.11 ร้อยละของชนิดของโรคที่ตรวจพบบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง หลังจาก ชุบในสารละลายอุนทุมิปกติ และ ปรับอุนทุมิปกติสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้นาน 10 วัน	122
7.12 การประเมินค่าระดับความเป็นพิษเนื่องจากสารละลายที่เปลือกผลมะม่วงพันธุ์ น้ำดอกไม้สีทอง เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษา	123
7.13 เปอร์เซ็นต์ครุชนิการเข้าทำลายของโรค ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 หลัง จากชุบในสารละลายอุนทุมิปกติและปรับอุนทุมิปกติสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้นาน 5, 7 และ 10 วัน	126
7.14 จำนวนผลที่ถูกโรคเข้าทำลาย เปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธี ที่ชุบในสารละลาย อุนทุมิปกติและปรับอุนทุมิปกติสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส เมื่อวันที่ 10 ของ การเก็บรักษา ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4	127
7.15 ร้อยละผลดีและผลที่เป็นโรค เมื่อ 10 วันหลังจากเก็บรักษาภายหลังจุ่มใน สารละลาย ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4	127
7.16 ร้อยละของชนิดของโรคที่ตรวจพบบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 หลังจาก ชุบในสารละลายอุนทุมิปกติ และ ปรับอุนทุมิปกติสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้นาน 10 วัน	128
7.17 การประเมินค่าระดับความเป็นพิษเนื่องจากสารละลายที่เปลือกมะม่วงพันธุ์ น้ำดอกไม้เบอร์ 4 เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษา	129
8.1 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	138
8.2 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อรา <i>Botryodiplodia theobromae</i>	138
8.3 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อรา <i>Dothiorella dominican</i>	138
8.4 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อรา <i>Phomopsis mangifera</i>	139
8.5 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	139
8.6 ค่า pH ก่อนและหลังเขย่าของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	140
8.7 ค่า pH ก่อนและหลังเขย่าของเชื้อรา <i>Botryodiplodia theobromae</i>	141
8.8 ค่า pH ก่อนและหลังเขย่าของเชื้อรา <i>Dothiorella dominicana</i>	141
8.9 ค่า pH ก่อนและหลังเขย่าของเชื้อรา <i>Phomopsis mangiferae</i>	142
8.10 ค่า pH ก่อนและหลังเขย่าของเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	142

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
8.11 แสดงจำนวนหนูที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากให้สารสกัดฆ่าเห็บหนูขาวทั้งเพศผู้ และเพศเมีย ในขนาด 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัม / กิโลกรัม น้ำหนักตัว	150
8.12 แสดงน้ำหนักตัวหนูขาวเพศผู้ที่ไม่ตายภายใน 24 ชั่วโมงในการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดฆ่า	150
8.13 แสดงน้ำหนักตัวหนูขาวเพศเมียที่ไม่ตายภายใน 24 ชั่วโมงในการทดสอบความเป็นพิษ แบบเฉียบพลันของสารสกัดฆ่า	150
8.14 การจัดหมู่สารพิษตามค่า LD ₅₀ โดยภูมิสม	151
9.1 ลักษณะความใสของผลิตภัณฑ์ CE เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ	155
9.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ CE ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ	156
9.3 ปริมาณ 1'-ACA ในผลิตภัณฑ์ CE หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ	156
9.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1'-ACA ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ รวมทั้ง ค่า Slope และ Correlation coefficient ของกราฟระหว่างปริมาณ 1'-ACA กับเวลา ของผลิตภัณฑ์ CE	158
9.5 ค่า log ความเข้มข้นของ 1'-ACA ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ, ค่า slope และค่า correlation ของกราฟระหว่าง log ความเข้มข้น 1'-ACA กับเวลาของผลิตภัณฑ์ CE	159
9.6 ค่า log ความเข้มข้นของ 1'-ACA เก็บที่อุณหภูมิ 27, 45 และ 60 °C, ค่า Slope และค่าอัตราเร็วการสลายตัว (k) ของผลิตภัณฑ์ CE	161
9.7 ค่า T (°K) และค่า log k ของการสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับที่ 1 ของผลิตภัณฑ์ CE	161
9.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง 5 ชนิด	165
9.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ของผลิตภัณฑ์ CE หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน	166
9.10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Dothiorella dominicana</i> ของผลิตภัณฑ์ CE หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน	167

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
9.11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Botryodiplodia theobromae</i> ของผลิตภัณฑ์ CE หลังจากเก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน	168
9.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Phomopsis mangiferae</i> ของผลิตภัณฑ์ CE หลังจากเก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน	169
9.13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> ของ ผลิตภัณฑ์ CE หลังจากเก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน	170
9.14 เปอร์เซ็นต์การตรวจการเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 7 และ 12 ของการเก็บรักษา	172
9.15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง 5 ชนิดเมื่อผสมผลิตภัณฑ์ CE กับ CuSO_4	175
10.1 เปอร์เซ็นต์การตรวจการเข้าทำลายของโรค เมื่อวันที่ 7 ของการเก็บรักษา	177
12.1 ความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนผิวผล หลังจากชุบสารละลายตามกรรมวิธีต่างๆ และเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 7 และ 10 วัน (สวนคุณสายนต์ จ. พิจิตร)	188
12.2 ความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนผิวผล หลังจากชุบสารละลายตามกรรมวิธีต่างๆ และเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 7 และ 10 วัน (สวนคุณสุวิทย์ จ. ฉะเชิงเทรา)	188
12.3 ความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนผิวผล หลังจากชุบสารละลายตามกรรมวิธีต่างๆ และเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 7 และ 10 วัน (สวนคุณศักดิ์ดา จ.ฉะเชิงเทรา)	188
12.4 เปอร์เซ็นต์การตรวจการเข้าทำลายของโรค ณ วันที่ 7 และ 10 ของการเก็บรักษา	190
12.5 ค่าสีผิวเปลือกในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงที่เก็บรักษานาน 10 วัน (คุณสายนต์ จ. พิจิตร)	197
12.6 ค่าสีผิวเปลือกในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงที่เก็บรักษานาน 10 วัน (คุณศักดิ์ดา จ. ฉะเชิงเทรา)	198
12.7 ค่าสีเนื้อในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงที่เก็บรักษานาน 10 วัน (คุณสายนต์ จ. พิจิตร)	198
12.8 ค่าสีเนื้อในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงที่เก็บรักษานาน 10 วัน (คุณศักดิ์ดา จ. ฉะเชิงเทรา)	199

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
12.9 ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solid, TSS) ณ วันที่ 10 หลังการเก็บรักษา	200
12.10 ค่าปริมาณกรดรวม (Total titrable acidity, TA) ณ วันที่ 10 ของการเก็บรักษา	201
12.11 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ณ วันที่ 10 ของการเก็บรักษา	202
12.12 ความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนผิวผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองหลังจากหุบสารละลายในกรรมวิธีต่างๆ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 และ 10 วัน	207
12.13 ความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนผิวผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 หลังจากหุบสารละลายในกรรมวิธีต่างๆ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 และ 10 วัน	207
12.14 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค เมื่อวันที่ 7 และ 10 ของการเก็บรักษา	207
12.15 ค่าสีผิวเปลือกในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่เก็บรักษานาน 10 วัน	209
12.16 ค่าสีผิวเปลือกในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 ที่เก็บรักษานาน 10 วัน	209
12.17 ค่าสีเนื้อในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่เก็บรักษานาน 10 วัน	210
12.18 ค่าสีเนื้อในรูปของค่า L, a*, b*, Chroma และ Hue ของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 ที่เก็บรักษานาน 10 วัน	210
12.19 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษา	210
12.20 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษา	211
12.21 ปริมาณกรดรวม ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษา	212
12.22 ความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองในวันที่ 5, 7 และ 10 ของการเก็บรักษา	217
12.23 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองในวันที่ 5, 7 และ 10 ของการเก็บรักษา	217
12.24 การเปลี่ยนแปลงค่า L ของสีเปลือกผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง	219

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
12.25 การเปลี่ยนแปลงค่า a^* ของสีเปลือกผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง	220
12.26 การเปลี่ยนแปลงค่า b^* ของสีเปลือกผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง	220
12.27 การเปลี่ยนแปลงค่า Chroma ของสีเปลือกผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง	221
12.28 การเปลี่ยนแปลงค่า Hue ของสีเปลือกผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง	221
12.29 สีเนื้อของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา	222
12.30 ค่า TSS, TA, pH และความแน่นเนื้อของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง เมื่อเก็บไว้นาน 7 วัน	223
13.1 ปริมาณผลผลิตเรียงลำดับจากเปอร์เซ็นต์ Crude extract มากไปหาน้อย และลักษณะทางกายภาพของ Crude extract จากข่า	231
13.2 ปริมาณสารสกัดหยาบของข่าเบอร์จากแหล่งปลูกเดิมและเมื่อนำมาปลูกยังพื้นที่เดียวกัน	234
13.3 เปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบและเปอร์เซ็นต์ L14 รวมกับ L15 จากข่าทั้ง 19 ตัวอย่าง	235

สารบัญตาราง

ตารางภาคผนวก	หน้า
1 เชื้อราที่พบในมะม่วงจาก 8 จังหวัด (ภาคกลาง ตะวันออก และตะวันตก) จาก การแยกเชื้อ	257
2 เชื้อราที่พบในมะม่วงจาก จ. พิจิตร ฉะเชิงเทรา และระยอง	261
3 เชื้อราที่พบในมะม่วงจาก ราชบุรี สุพรรณบุรี เพชรบุรี ชัยนาท และ สุราษฎร์ธานี	262
4 เปรียบเทียบผลการสำรวจโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง โดยคณะผู้วิจัยหลาย กลุ่ม	263
5 จังหวัดที่เข้าสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์ข้าว พร้อมเก็บตัวอย่างดิน	273
6 รายละเอียดของข้อมูลในแต่ละพื้นที่ที่สำรวจ	273
7 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินจากบริเวณโคนต้นของข้าวในแหล่งต่างๆ	278
8 ปริมาณผลผลิตเรียงลำดับจากเปอร์เซ็นต์ Crude extract มากไปหาน้อย และ ลักษณะทางกายภาพของ Crude extract จากข้าว	281
9 ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากข้าวที่ปลูกในแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย เปรียบเทียบกับความอุดมสมบูรณ์ของดิน	283
10 ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพดิน และปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากข้าว สายพันธุ์ต่างๆ (พื้นที่ที่มีปริมาณสารสกัดหยาบมาก 6 อันดับแรก)	285
11 ปริมาณสารสกัดหยาบของข้าวเบอร์จากแหล่งปลูกเดิมและเมื่อนำมาปลูกยังพื้นที่ เดียวกัน	288
12 เปอร์เซนต์สารสกัดหยาบและเปอร์เซ็นต์ L14 รวมกับ L15 จากข้าวทั้ง 19 ตัวอย่าง	293
13 ไพรเมอร์จำนวน 22 ไพรเมอร์ ที่ใช้ในการตรวจสอบ	299
14 แสดงสารองค์ประกอบและความเข้มข้นที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ของข้าว 37 ตัวอย่าง	305
15 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR	306

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1.1 กำลังการผลิต ปริมาณการส่งออกและการนำเข้ามะม่วง เปรียบเทียบรายทวีปกับสถานภาพของประเทศไทย	2
1.2 สภาพแปลงปลูกข้าวในรูปแบบต่างๆ	7
1.3 ส่วนที่เก็บเกี่ยวและใช้ประโยชน์ของข้าว	8
2.1 แผนภูมิขั้นตอนการศึกษาวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข้าว	13
3.1 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากข้าว	16
3.2 แล็บสารที่แยกได้หลังจากการอบด้วยไอของไอโอดีน (ข้าว) และหลังจากทำ TLC-bioassay (ข้าว) แสดงให้เห็นส่วน clear zone ที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน บริเวณที่มีสารออกฤทธิ์	17
3.3 ขั้นตอนการแยกสาร L14 , L15 ด้วยวิธี Column Chromatography	20
3.4 ผลการแยก fraction ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 80 : 20 :1 บนระบบ thin layer chromatography	21
3.5 ผลการแยก fraction ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 60 : 40 : 1	22
4.1 ผลของสารสกัด L14, L15, L14+L15 ที่ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	24
4.2 ลักษณะการงอกของสปอร์ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมสารต่าง ๆ	24
4.3 Chromatogram ของ fraction L14 (บน) และ fraction L15 (ล่าง)	27
5.1 แผนภูมิและขั้นตอนการศึกษาเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์พร้อมใช้จากสารออกฤทธิ์จากเหง้าข้าว	30
5.2 หยดน้ำมันที่เกิดบนชั้นผิวหน้าสารละลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ และเขย่าแล้ว	33
5.3 ลักษณะของ Formulation ที่ไม่ดี (ขุ่น และ เกิดการแยกชั้น)	38
5.4 ลักษณะของ Formulation ที่ดี (ใส)	38
5.5 ลักษณะการละลายของสารสกัดข้าวในตัวทำละลายร่วมของน้ำ และPropylene glycol	40
5.6 ลักษณะการละลายของสารสกัดข้าวในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Ethanol	41
5.7 ผลของ PEG-RH-40 ต่อการละลายของสารสกัดข้าวในน้ำ	44
5.8 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดข้าวในน้ำ	45

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
5.9 ผลการทดสอบ Formulation ความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้านในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	51
5.10 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ชนิดเข้มข้น สูตร A และ สูตร E	52
5.11 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	57
5.12 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.	57
5.13 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ <i>Dothiorella dominicana</i>	57
5.14 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ <i>Phomopsis mangiferae</i>	58
5.15 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ <i>Aspergillus niger</i>	58
5.16 เกณฑ์การให้คะแนนตามระดับความรุนแรงของโรคบนผลมะม่วง	61
5.17 ลักษณะผลมะม่วงภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง ในวันที่ 9 ของการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก หลังจากจุ่มใน Formulation และ Benomyl	62
5.18 คราบเปื้อนที่เกิดบนผิวผลมะม่วงหลังจุ่ม Formulation และเก็บรักษาในกล่องนาน 5 วัน	65
5.19 ลักษณะผลมะม่วงหลังจากจุ่ม Formulation สูตรต่างๆ หลังการปรับปรุง เมื่อ 10 วัน หลังจากการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง	68
5.20 ลักษณะผลมะม่วงหลังจากจุ่ม Formulation สูตรต่างๆ หลังการปรับปรุง (ครั้งที่ 3) ในวันที่ 10 หลังจากการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง	69
6.1 สีของผลิตภัณฑ์สารสกัด EM-1 เมื่อเริ่มต้นการทดลอง	75
6.2 สีของผลิตภัณฑ์ EM-1 เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กันนาน 4 เดือน	75
6.3 การสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับศูนย์ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ กัน	78
6.4 การสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่ง เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 4 เดือน	80
6.5 Arrhenius plot ของ 1'-ACA ที่มีการสลายตัวปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่ง	82

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
6.6 ผลการทดสอบ EM-1 ต่อเชื้อ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>Dothiorella dominicana</i> , <i>Phomopsis mangiferae</i> และ <i>Aspergillus niger</i> ณ วันเริ่มต้น ของการเก็บรักษา	86
6.7 ประสิทธิภาพของ formulation ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ	93
6.8 ประสิทธิภาพของ formulation ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ	94
6.9 ลักษณะการเข้าทำลายของโรคบนผลมะม่วงเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 14 วันหลังจากหุบผลด้วยสารละลายต่างๆ (สังเกตสีของคราบเปื้อนบนผลที่อยู่ในสารละลาย EM-1 เปรียบเทียบกับ control และ Benomy)	97
7.1 ลักษณะผลมะม่วงปกติ (ซ้าย) และผลมะม่วงที่เกิดคราบเปื้อนหลังจากจุ่มในผลิตภัณฑ์ ความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน (ขวา)	99
7.2 ปัญหาคราบเปื้อนบนผิวผลมะม่วง ไม่ได้เกิดจากส่วนผสมที่ใช้ในผลิตภัณฑ์	100
7.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของ เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เมื่อเลี้ยงในจานอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของ EM-1 ต่ำกว่า 1,000 ส่วนต่อล้าน	101
7.4 ลักษณะผลมะม่วงหลังจากหุบในสารละลาย EM-1 ในวันที่ 14 หลังจากการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก ภายใต้อุณหภูมิห้อง (ยังเกิดอาการคราบเปื้อนบนผิวผลเมื่อหุบในสารละลายความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 250 ส่วนต่อล้าน มีคราบเปื้อนเล็กน้อย)	104
7.5 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคของสารละลายของผลิตภัณฑ์ EM-1 ที่ผสมกับน้ำปูนใส หรือ ด่างทับทิม	107
7.6 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยสาร น้ำปูนใส (NaHCO_3), ด่างทับทิม (KMnO_4) และจุนสี (CuSO_4)	109
7.7 ประสิทธิภาพของสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ EM-1 ผสมกับ CuSO_4 ในการควบคุมเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	112
7.8 ประสิทธิภาพของสูตรผสมผลิตภัณฑ์ EM-1 กับ CuSO_4 ในการควบคุมเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	114

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
7.9	ลักษณะผิวผลมะม่วงหลังจากจุ่มในผลิตภัณฑ์ (EM-1) ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน หรือ EM-1 + Ascorbic acid หรือ EM-1 + CuSO ₄ ที่ปรับ pH ในระดับต่างๆ	117
7.10	ลักษณะผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง เมื่อจุ่มในสารละลายอุ่น (ซ่าย) และเย็น (ขวา) เก็บไว้นาน 10 วัน	124
7.11	ลักษณะผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 เมื่อจุ่มในสารละลายอุ่น (ซ่าย) และเย็น (ขวา) เก็บไว้เป็นเวลานาน 10 วัน	130
8.1	การเลี้ยงเชื้อราบนเครื่องเขย่าสารแบบหมุน	133
8.2	ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว นาน 7 วัน	137
8.3	ลักษณะของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ ธรรมดา (Microscope) กำลังขยาย 400 เท่า	144
8.4	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> แสดงผนังเซลล์ (W), เยื่อหุ้มเซลล์ (P) และ นิวเคลียส (N) กำลังขยาย 20,000 เท่า	145
8.5	ภาพตัดขวางเส้นใยของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ในชุดควบคุม (บน) และผลิตภัณฑ์ความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน (ล่าง)	146
8.6	ลักษณะหนูขาวที่ใช้ในการทดลอง	148
8.7	การชั่งน้ำหนักตัวหนูขาว	149
9.1	ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากข่า (CE) เปรียบเทียบกับลักษณะของ EM-1	151
9.2	สีของผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบจากข่า (CE) ณ วันเริ่มต้นของการเก็บรักษา	155
9.3	สีของผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบจากข่า (CE) เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลานาน 4 เดือน	155
9.4	การสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับศูนย์ ของผลิตภัณฑ์ CE	158
9.5	การสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่งของผลิตภัณฑ์ CE	160
9.6	Arrhenius plot ของ 1'-ACA ที่มีการสลายตัวปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่ง	162

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
9.7 ลักษณะผลมะม่วงหลังจากจุ่มในผลิตภัณฑ์ (CE) ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลานาน 4 เดือน ในวันที่ 12 ของการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง	173
9.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง 5 ชนิด	175
10.1 ลักษณะผลมะม่วงที่ทำการปลูกเชื้อ (ภายในวงกลม) แล้วชุบในสารละลายต่างๆ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน	178
12.1 เปอร์เซ็นต์การเน่าของการเข้าทำลายของโรค ณ วันที่ 7 และ 10 ของการเก็บรักษาที่ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์กับมะม่วงสวนคุณสายันต์ จ. พิจิตร	191
12.2 เปอร์เซ็นต์การเน่าของการเข้าทำลายของโรค ณ วันที่ 7 และ 10 ของการเก็บรักษาที่ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์กับมะม่วงสวนคุณสุวิทย์ จ. ฉะเชิงเทรา	191
12.3 เปอร์เซ็นต์การเน่าของการเข้าทำลายของโรค ณ วันที่ 7 และ 10 ของการเก็บรักษา ที่ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์กับมะม่วงสวนคุณศักดิ์ดา จ. ฉะเชิงเทรา	192
12.4 การเกิดโรคบนผลมะม่วงหลังจากชุบสารต่างๆ และเก็บไว้ในกล่องบรรจุผลเพื่อการส่งออก นาน 10 วัน ของคุณสายันต์ จ.พิจิตร	193
12.5 อัตราการเกิดโรคบนผลมะม่วงหลังจากชุบสารต่างๆ และทำการเก็บไว้ในกล่องบรรจุ นาน 10 วัน ของคุณสุวิทย์ จ. ฉะเชิงเทรา	194
12.6 อัตราการเกิดโรคบนผลมะม่วงหลังจากชุบสารต่างๆ และทำการเก็บไว้ในกล่องบรรจุ นาน 10 วัน ของคุณศักดิ์ดา จ. ฉะเชิงเทรา	195
12.7 สภาพพื้นที่ปลูกมะม่วงและการเก็บมะม่วงใน จ. อ่างทอง	204
12.8 การทดสอบมะม่วงในพื้นที่ จ. อ่างทอง และการนำมาวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ	205
12.9 การเกิดโรคบนผลมะม่วงหลังจากจุ่มในสารละลายต่างๆ แล้วเก็บไว้เป็นเวลานาน 7 วัน	208
12.10 การปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้ ก่อนขนส่งไปยังโรงอบไอน้ำ	214
12.11 ขั้นตอนการอบไอน้ำมะม่วงเพื่อการส่งออก	215
12.12 ผลมะม่วงที่ทำการชุบสารในกรรมวิธีต่างๆ และอบไอน้ำ เก็บรักษาไว้นาน 5 วัน	218
12.13 ผลมะม่วงที่ทำการชุบสารในกรรมวิธีต่างๆ และอบไอน้ำ เก็บรักษาไว้นาน 7 วัน	218

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
13.1 สภาพของแหล่งปลูกข้าวในพื้นที่จังหวัดต่างๆ	228
13.2 สายพันธุ์ข้าวที่พบในแหล่งต่างๆ และที่จำหน่ายในรูปหน่อกลางลำต้น	229

ภาพภาคผนวก

1	เกณฑ์การให้คะแนนตามระดับความรุนแรงของโรคบนผลมะม่วง	250
2	แผ่นเทียบสีของ Minolta (CR-200)	252
3	ลักษณะการเกิดโรคแบบต่าง ๆ บนผลมะม่วง	255
4	เชื้อราที่ทำการแยกได้จากผลมะม่วง เก็บในหลอดเพื่อส่งตรวจ	255
5	ลักษณะอาการของมะม่วงที่เป็นโรคและเชื้อราสาเหตุของโรค	265
6	สีเขียวเป็นชั้นของ Wax ที่ตรวจพบ (สีแดงเป็นชั้นของเซลล์ epidermis และเซลล์ parenchyma)	267
7	ลักษณะของเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่เกิดโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ Light microscope	269
8	ลักษณะการงอกของเส้นใยเชื้อราที่ทำการ Section ด้วยวิธี Freehand section	270
9	สภาพของแหล่งปลูกข้าวในพื้นที่จังหวัดต่างๆ	276
10	สายพันธุ์ข้าวที่พบในแหล่งต่างๆและข้าวที่จำหน่ายในรูปหน่อกลางลำต้น	277
11	ตัวอย่างสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากข้าวในพื้นที่จังหวัดต่างๆ	282
12	สภาพแปลงปลูกของข้าว ทั้ง 19 ตัวอย่าง	291
13	ลักษณะของสารสกัดหยาบจากข้าว	291
14	ลักษณะของสาร L14 และ L15 ของข้าวที่แยกด้วย column chromatography	293
15	แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวตัวอย่างที่ 1-5 ตามการทำ PCR เงื่อนไขที่ 1-3	296
16	แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวตามปฏิกิริยา PCR เงื่อนไขที่ 2 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบต่างๆ	297
17	การใช้ไพรเมอร์ OPA11, OPA15, OPA20 และ OPB18 ในการทำปฏิกิริยา PCR ของข้าวโดย 1-4 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPA11 5-8 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPA15 9-12 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPA20 13-16 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPB18 M คือ Molecular weight marker 100 bp step	300

สารบัญภาพ

ภาพภาคผนวก	หน้า
18 การใช้ไพรเมอร์ OPC09, OPD02, OPD11 และ OPG13 ในการทำปฏิกิริยา PCR ของข้าว โดย 1-4 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPC09 5-8 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPD02 9-12 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPD11 13-16 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPG13 M คือ Molecular weight marker 100 bp step	300
19 การใช้ไพรเมอร์ OPG14, OPK12, OPK16 และ OPV08 ในการทำปฏิกิริยา PCR ของข้าว โดย 1-4 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPG14 5-8 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPK12 9-12 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPK16 13-16 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPV08 M คือ Molecular weight marker 100 bp step ladder	300
20 การใช้ไพรเมอร์ OPAB03, OPAB04, OPAB05 และ OPAB08 ในการทำปฏิกิริยา PCR ของข้าว โดย 1-4 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAB03 5-8 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAB04 9-12 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAB05 13-16 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAB08 M คือ Molecular weight marker 100 bp step ladder	300
21 การใช้ไพรเมอร์ OPK10, OPAQ06, OPAQ12 และ OPAS10 ในการทำปฏิกิริยา PCR ของข้าว โดย 1-4 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPK10 5-8 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAQ06 9-12 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAQ12 13-16 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAS10 M คือ Molecular weight marker 100 bp step ladder	300
22 การใช้ไพรเมอร์ OPAX02 และ OPAX17 ในการทำปฏิกิริยา PCR ของข้าว โดย 1-4 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAX02 5-8 คือ ข้าว 4 ตัวอย่างจากการใช้ไพรเมอร์ OPAX17 M คือ Molecular weight marker 100 bp step	300
23 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข้าว 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA20 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข้าว ดังหมายเหตุ)	301
24 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข้าว 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPB18 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข้าว ดังหมายเหตุ)	302

สารบัญภาพ

ภาพภาคผนวก	หน้า
25 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข่า 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPC09 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข่า ดังหมายเหตุ)	302
26 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข่า 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPD02 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข่า ดังหมายเหตุ)	302
27 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข่า 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPD11 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข่า ดังหมายเหตุ)	303
28 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข่า 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPG13 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข่า ดังหมายเหตุ)	303
29 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข่า 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPK12 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข่า ดังหมายเหตุ)	303
30 แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของข่า 37 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPKX17 (ตัวเลขด้านบนสุด (1-37) แสดงตัวอย่างของข่า ดังหมายเหตุ)	304
31 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของข่าสายพันธุ์ต่างๆ 37 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ คือ OPA20, OPB18, OPC09, OPD02, OPD11, OPG13, OPK12 และ OPAX17	308
32 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของข่าสายพันธุ์ต่างๆ 37 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ คือ OPA20, OPB18, OPC09, OPD02, OPD11, OPG13, OPK12 และ OPAX17 โดยพิจารณาตามสีของเหง้าข่าพิจารณาตามสีของเหง้าข่า	319
33 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของข่าสายพันธุ์ต่างๆ 37 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ คือ OPA20, OPB18, OPC09, OPD02, OPD11, OPG13, OPK12 และ OPAX17 โดยพิจารณาตามชนิดของข่า	310

สารบัญภาพ

ภาพภาคผนวก	หน้า
34 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ 37 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรมอร์ 8 ไพรมอร์ คือ OPA20, OPB18, OPC09, OPD02, OPD11, OPG13, OPK12 และ OPA โดยพิจารณาตามแหล่งที่มาของข้าวในภาคต่างๆ ของประเทศไทย	311

บทที่ 1

บทนำ

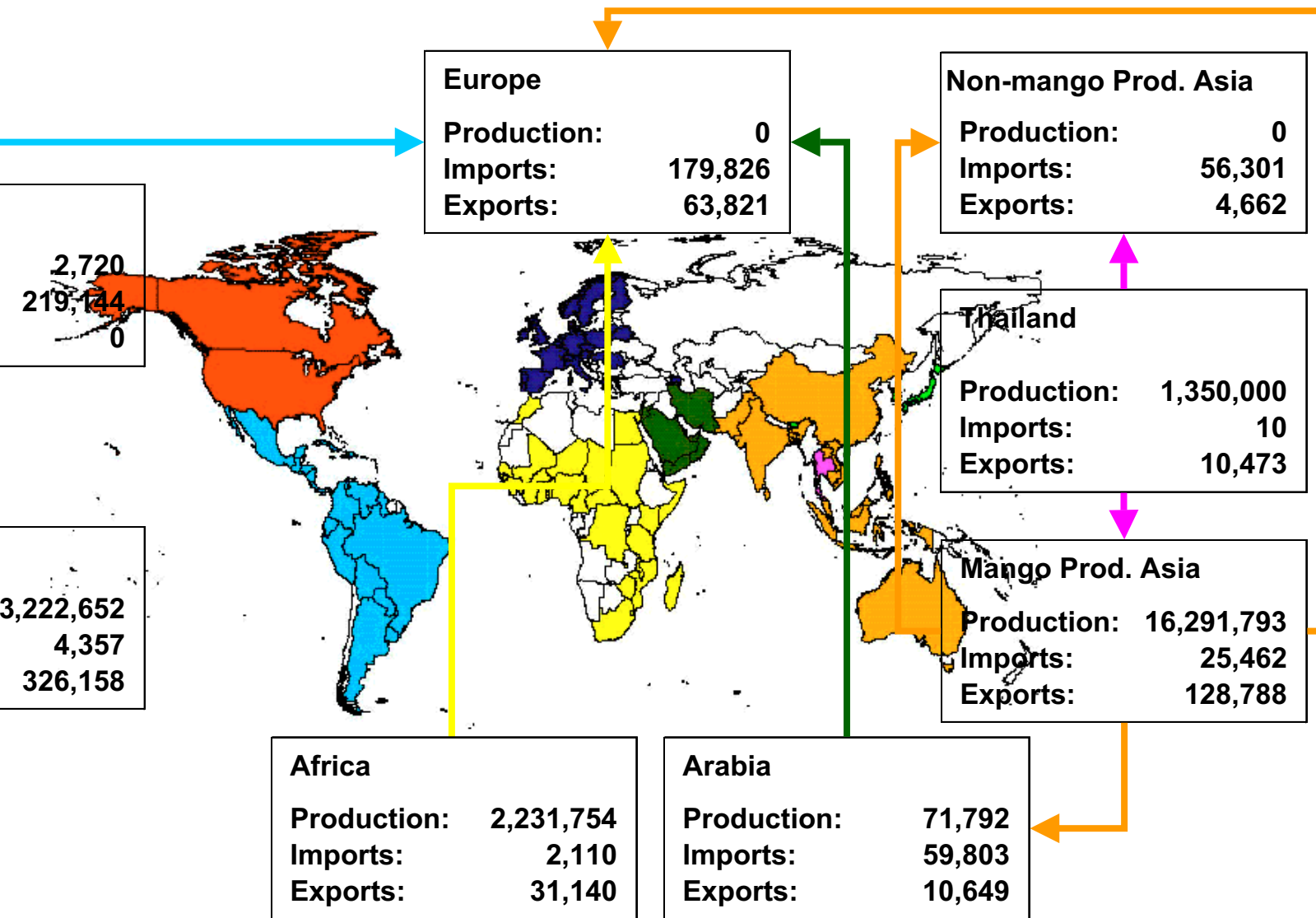
ศักยภาพและปัญหาของมะม่วงเพื่อการส่งออกและโอกาสของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดฆ่า

1.1 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของมะม่วงและศักยภาพการพัฒนา

มะม่วงเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก และได้รับความนิยมมากที่สุดในหมู่เกษตรกรตามโครงการปรับโครงสร้างและระบบการผลิตการเกษตร (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2540) ผลผลิตร้อยละ 95 ใช้บริโภคภายในประเทศ ที่เหลือส่งจำหน่ายต่างประเทศ ทั้งในรูปผลผลิตสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งปริมาณที่ส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามแนวโน้มการส่งออกผลไม้เมืองร้อนชนิดอื่นๆ ปริมาณการส่งออกของฤดูปลูกในปี พ.ศ. 2545 มีปริมาณ 16,129 ตัน มูลค่า 393 ล้านบาท เป็นตลาดในเอเชียถึง 90 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็นตลาดในยุโรป และอเมริกา (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547) มูลค่าส่งออกดังกล่าวนี้ว่ามีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมด 1.780 ล้านไร่ (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2539)

ผลมะม่วงสดที่เหลือจากการส่งออก จะถูกส่งไปโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปมะม่วง เช่น การแปรรูปมะม่วงแช่อิ่ม ตากแห้ง อบแห้ง คอง นอกจากนี้ยังมีการแปรรูปของกลุ่มแม่บ้านเพื่อผลิตเป็น สินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำรายได้เข้าประเทศมากพอสมควร

เมื่อพิจารณาถึงข้อมูลในองค์รวมของการผลิตและความต้องการบริโภคมะม่วงในทวีปต่างๆของโลก ดังแสดงในภาพที่ 1.1 จะเห็นได้ว่า ทั่วโลกมีผลผลิตมะม่วง 21,820,711 ตัน ประเทศไทยมีกำลังการผลิต 1,350,000 ตัน ในจำนวนนี้ถ้าดูสัดส่วนการส่งออก และนำเข้ามะม่วงเปรียบเทียบกับทวีป ประเทศไทยมีศักยภาพค่อนข้างสูงมากในการเป็นผู้ส่งออكمะม่วงรายใหญ่ของโลก ถ้าสามารถแข่งขันกับประเทศผู้ส่งออกรายอื่นๆ ของโลก เช่น ประเทศในกลุ่มลาตินอเมริกา (ส่งออก 236,169 ตัน) และประเทศอื่นๆ ในทวีปเอเชีย (ส่งออก 128,780 ตัน) ซึ่งแหล่งรับซื้อมะม่วงใหญ่ของโลก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา ประเทศกลุ่มอาหรับ (นำเข้า 59,803 ตัน) และประเทศในเอเชีย เช่น สิงคโปร์ฮ่องกง จีน ญี่ปุ่น (นำเข้ารวมกัน 69,301 ตัน) ในขณะที่ประเทศไทยส่งออกเพียง 10,473 ตัน



ภาพที่ 1.1 กำลังการผลิต ปริมาณการส่งออกและการนำเข้ามะม่วง เปรียบเทียบรายทวีป กับสถานภาพของประเทศไทย

ตารางที่ 1.1 พื้นที่เพาะปลูกมะม่วงของประเทศไทย

ภาค	พื้นที่เพาะปลูกรวม (x1000 ไร่)				
	2541	2542	2543	2544	2545
เหนือ	529	537	554	462	346
ตะวันออกเฉียงเหนือ	818	802	792	760	543
กลาง	165	171	176	144	93
ตะวันออก	370	373	367	378	241
ตะวันตก	277	267	275	270	133
ใต้	36	34	35	34	10
รวม	2,224	2,221	2,236	2,082	1,395

แหล่งที่มา : กรมส่งเสริมการเกษตร

ตารางที่ 1.2 ปริมาณผลผลิตมะม่วงของประเทศไทยแยกตามรายภาค

ภาค	ผลผลิตรวม (ตัน)				
	2541	2542	2543	2544	2545
เหนือ	224,168.14	373,166.11	410,386.37	361,766.79	250,249.80
ตะวันออกเฉียงเหนือ	293,451.19	450,559.78	502,688.26	498,075.73	407,036.58
กลาง	109,403.36	124,498.44	139,561.60	127,269.50	82,371.57
ตะวันออก	229,356.88	264,891.36	292,217.82	329,745.59	272,887.35
ตะวันตก	202,829.47	214,495.00	239,492.59	253,891.17	142,174.34
ใต้	15,604.04	13,512.06	14,112.12	15,027.92	7,984.23
รวม	1,087,775.85	1,461,773.16	1,623,141.04	1,606,212.93	1,183,677.41

แหล่งที่มา : กรมส่งเสริมการเกษตร

ตารางที่ 1.3 ปริมาณผลผลิตมะม่วงต่อพื้นที่เพาะปลูกมะม่วงทั้งประเทศ

ภาค	ปริมาณผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่)				
	2541	2542	2543	2544	2545
เหนือ	682.50	1,026.51	1,009.15	1,031.05	873.06
ตะวันออกเฉียงเหนือ	599.23	866.69	871.99	860.71	925.48
กลาง	998.15	1,006.83	1,022.36	1,084.21	1,067.93
ตะวันออก	864.13	956.63	1,003.30	1,073.08	1,284.45
ตะวันตก	1,070.52	1,063.81	1,069.37	1,087.19	1,240.23
ใต้	784.04	675.64	652.76	638.89	1,185.48
รวม	765.73	955.61	964.34	982.40	1,019.92

แหล่งที่มา : กรมส่งเสริมการเกษตร

ตารางที่ 1.4 ราคาขายผลผลิตมะม่วงของประเทศไทย

ภาค	ราคาขายเฉลี่ย (บาท/กก.)				
	2541	2542	2543	2544	2545
เหนือ	14.29	10.63	8.80	9.52	8.77
ตะวันออกเฉียงเหนือ	17.73	12.72	11.82	13.76	14.69
กลาง	19.32	16.91	15.01	13.88	11.75
ตะวันออก	21.86	17.68	15.09	16.11	14.07
ตะวันตก	19.77	16.10	14.05	14.44	14.21
ใต้	22.99	20.22	18.29	18.99	17.62
รวม	17.84	13.71	12.17	13.23	12.80

แหล่งที่มา : กรมส่งเสริมการเกษตร

1.2 ข้อจำกัดการส่งออกเนื่องจากปัญหาโรคผลเน่าและเชื้อราสาเหตุ

สาเหตุสำคัญที่ทำให้ประเทศไทยยังไม่มีศักยภาพพอในการส่งออกมะม่วงถึงแม้ว่ามะม่วงของไทยจะมีรสชาติ สีสัน และลักษณะเนื้อผลที่เป็นที่ถูกปากของคนหลายๆ ชาติดีตาม อาจสรุปได้เป็นหลายประการ ตั้งแต่ระบบการผลิตที่ยังไม่มีการเก็บเกี่ยวผลผลิตกระจายตัวตลอดปี ยังมีความจำเพาะฤดูมากเกินไป ระบบการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวและการขนส่ง ตลอดจนการกระจายสินค้ายังไม่มีความเป็นมืออาชีพพอ นอกจากนี้ปัญหาความเน่าเสียเร็วของผลมะม่วงก็เป็นปัญหาที่ยังไม่มีวิธีแก้ไขที่ชัดเจนพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขนส่งไปจำหน่ายไกลๆ ถึงทวีปยุโรป และทวีปอเมริกาเหนือ

ปัญหาที่พบอยู่เสมอ คือ การเน่าเสียของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว อันเนื่องมาจากโรคที่เกิดจากเชื้อรา โดยเชื้อราสาเหตุอาจจะติดมากับผลผลิตตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูก และทำความเสียหายให้กับผลมะม่วงในระหว่างการเก็บรักษาเพื่อรอการขนส่งหรือระหว่างการขนส่งไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลมะม่วงทั้งด้านปริมาณและด้านคุณภาพ ทำให้ธุรกิจการส่งออกมะม่วงประสบปัญหาหนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีความเข้มงวดในการนำเข้าผักและผลไม้สด

โรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญ ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz ในประเทศไทยโรคจะกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งเพาะปลูกมะม่วง โดยเฉพาะมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ (ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริมจากรัฐบาลให้ปลูกเพื่อส่งออกและได้รับความนิยมนำเข้าจากประเทศผู้นำเข้ามะม่วง เช่น ฝรั่งเศส อังกฤษ) จะมีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก (นิพนธ์, 2542) รองลงมา ก็จะเป็นโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่น เช่น จากเชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* เป็นต้น

1.3 ทำไมจึงต้องเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า

1.3.1 ฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของสารสกัดจากข่า

ในตำรับยาสมุนไพรโบราณ คนไทยรู้จักนำเหง้าข่ามาฝนกับเหล้าโรง แล้วทาที่ผิวหนังเพื่อรักษาแผล กลาก เกื้อน ซึ่งเกิดจากเชื้อรา

มหาวิทยาลัยมหิดล (ม.ป.ป.) รายงานว่า ข่าเป็นพืชที่มีสรรพคุณที่ดี มีสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์และมีคุณสมบัติทางยาหลายชนิด เช่น Eugenol ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ และช่วยขับน้ำดี จึงช่วยในการย่อยอาหาร รวมทั้งลดการบีบตัวของลำไส้เล็ก นอกจากนี้องค์ประกอบที่เป็นสาร Cineole และ Camphor ก็ลดการบีบตัวของลำไส้เช่นกัน น้ำมันหอมระเหยจะช่วยให้การขับลม การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย เอทานอล 95% คลอโรฟอร์ม และปิโตรเลียมอีเธอร์ ได้สารที่ลดการอักเสบและมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราสาเหตุโรคกลากที่เกิดจากเชื้อ *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* ได้ดีมาก (สุริย์ลักษณ์ และ โสภิตา, 2525 ; เจริญ และ คณะ, 2526 ; ยุพา และ สารภี, 2526) สาร 1'-Acetoxychavicol acetate และ 1'-Acetoxyeugenol acetate ช่วยลดการอักเสบและแน่นจากแผลในกระเพาะอาหาร

ในตำรับยาโบราณ มีลักษณะการใช้ข่าเป็นยา ดังนี้

- 1) ใช้เหง้าสดตำให้ละเอียด ผสมกับน้ำมันงา รับประทานครั้งละครั้งแก้ว ช่วยขับลมแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ท้องเดิน และบรรเทาอาการคลื่นไส้อาเจียน
- 2) ใช้รักษาโรคผิวหนัง กลาก เกื้อนและแก้ลมพิษ โดยใช้เหง้าสดตำให้ละเอียดผสมกับเหล้าขาว ทาบริเวณที่เป็นโรคบ่อยๆ จนกว่าจะดีขึ้น
- 3) สารสกัดจากข่านำมาประกอบเป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด เช่น ยารักษาแผลสด แก้โรคปวดบวมตามข้อ แก้โรคหลอดลมอักเสบ ยาชาดูและยาขับลม
- 4) ใช้ไล่แมลง โดยนำเหง้ามาทุบหรือตำให้ละเอียดเพื่อให้น้ำมันหอมระเหยออกมา แล้วนำไปวางในบริเวณที่มีแมลง
- 5) ผลข่ามีสรรพคุณคล้ายกับเหง้า คือ ใช้เป็นยาแก้ปวดท้อง ท้องร่วง ฆ่าเชื้อบิด และช่วยย่อยอาหาร ผงจากผลแห้งสามารถรักษาอาการปวดฟันได้ โดยนำไปบดและทาบริเวณที่ปวด

อนุศักดิ์ (2539) และ สุวคนธ์ (2540) ได้รายงานการทดสอบสารที่สกัดจากข่าด้วย Dichloromethane และตรวจสอบโดยวิธี TLC-bioassay กับเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และนำแถบที่ด้านเชื้อราทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย Preparative-TLC ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีพบว่า เป็นสาร 1'-Acetoxychavicol acetate ธารทิพย์ (2540) ทดสอบสารสกัดที่สกัดด้วย Ethanol จากข่า ทองพันชั่ง และว่านน้ำ พบว่า ว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย *Colletotrichum gloeosporioides* ดีที่สุด ค่า ED_{50} ต่ำสุด 400 ส่วนต่อล้าน และสารสกัดจากข่าที่ความเข้มข้น 10,000 ส่วนต่อล้าน ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

1.3.2 ความสำคัญของข้าวในเชิงพืชเกษตรและวัตถุดิบสำหรับการแปรรูป

ข้าวเป็นพืชสมุนไพรและพืชเครื่องเทศ ที่มีปลูกกันทุกพื้นที่ของประเทศไทย โดยมีการปลูก 3 รูปแบบ คือ

- 1) ปลูกไว้ในสวนหลังบ้านหรือข้างบ้าน เพื่อใช้ประกอบอาหารภายในครัวเรือน
- 2) ปลูกผสมผสานกับไม้ยืนต้นอื่น เช่น มะม่วง เงาะ ลิ้นจี่ ลำไย กล้วย เป็นต้น
- 3) ปลูกเป็นการค้าอย่างจริงจัง

สำหรับการปลูกข้าวเชิงการค้า แหล่งปลูกข้าวที่ใหญ่ที่สุดของประเทศไทย อยู่ที่จังหวัดสมุทรปราการ มีพื้นที่ปลูกทั้งหมด 2,780 ไร่ (นับเฉพาะเกษตรกรที่ปลูก 3 ไร่ ไปจนถึง 20 ไร่) โดยส่วนใหญ่จะปลูกบริเวณพื้นที่ราบลุ่ม น้ำอุดมสมบูรณ์ หรือปลูกตามริมขอบสระ ขอบบ่อเลี้ยงปลา ริมคลองเป็นหลัก ข้าวที่เกษตรกรปลูกนั้น ปีหนึ่งเก็บเกี่ยวได้ 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละประมาณ 6 เดือน โดยในการเก็บเกี่ยวจะขุดให้เหลือเหง้าข้าวไว้ทำพันธุ์ส่วนหนึ่ง

ผลผลิตที่ได้ 1 กอประมาณ 3-5 กิโลกรัม ปีหนึ่งข้าว 1 กอ จะให้ผลตอบแทนแก่เจ้าของได้ 6-10 กิโลกรัม ในจำนวนนี้จะมีข้าวอ่อนราว 4-8 กิโลกรัม เหลืออีก 1 กิโลกรัม เป็นข้าวแก่ ราคาที่ซื้อขายจากแหล่งผลิต เมื่อวันที่ 8 กันยายน 2547 ราคา กิโลกรัมละ 12 บาท ส่วนข้าวแก่ กิโลกรัมละ 4 บาท ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่ พ่อค้าที่มารับซื้อถึงสวนจะส่งไปยังปากคลองตลาดหรือส่งไปยังโรงงานโดยตรง โดย โรงงานที่รับซื้อส่วนใหญ่จะเป็นโรงงานทำน้ำพริก โรงงานบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป ร้านอาหารในโรงแรม และมีบางส่วนส่งออกต่างประเทศ นอกจากใช้ประโยชน์จากเหง้าข้าวอ่อน-แก่แล้ว ยังมีการแยกเอาเฉพาะใบอ่อนในใสน้ำของลำต้นอ่อนขายเป็นเครื่องเคียงในอาหารประเภทน้ำพริกด้วย

จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่า การเพาะปลูกข้าวเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการแปรรูปเชิงอุตสาหกรรมเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข้าว เป็นเรื่องที่สามารถทำได้ เนื่องจากเกษตรกรคุ้นเคยเป็นอย่างดีอยู่แล้ว ข้าวเป็นพืชที่ไม่ต้องการการดูแลมากนัก และสามารถเพาะปลูกได้ทั่วประเทศ ต้นทุนวัตถุดิบจึงน่าจะถูกลง



ปลูกไว้ในสวนหลังบ้าน



ปลูกผสมผสานกับไม้ยืนต้น



ปลูกผสมผสานกับไม้ยืนต้น



ปลูกผสมผสานกับไม้ยืนต้น



ปลูกเป็นการค้า



ปลูกเป็นการค้า

ภาพที่ 1.2 สภาพแปลงปลูกข้าวในรูปแบบต่างๆ



เหง้าข่าแก่



เหง้าข่าอ่อน



เหง้าข่าอ่อน



ไส้ในของลำต้นอ่อน

ภาพที่ 1.3 ส่วนที่เก็บเกี่ยวและใช้ประโยชน์ของข่า

1.3.3 ความปลอดภัยของข่า

ข่าจัดได้ว่าเป็นพืชเครื่องเทศและพืชสมุนไพรที่ชาวเอเชียเราต่างก็รู้จักดี มีประวัติการนำมาบริโภคกันเป็นจำนวนมากและต่อเนื่องยาวนาน จึงเชื่อได้ว่ามีความปลอดภัย จากการทดลองใช้สารสกัดจากข่าที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขนาด 10 กรัมต่อกิโลกรัมในหนูถีบจักร โดยการกรอกปากและฉีดใต้ผิวหนัง พบว่าไม่เป็นพิษต่อหนู ซึ่งขนาดปริมาณยาที่ใช้ นั้นเป็น 250 เท่าของตำรายาไทยโบราณที่ได้บันทึกไว้ Trakoontivakorn and Nakuhara (No date) พบว่า สารสกัดจากข่าที่สกัดด้วย Methanol มีฤทธิ์ในการต้านการกลายพันธุ์ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 และพบอีกว่าหลังจากที่ได้ให้ความร้อนกับสารถึง 105 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปรากฏว่าสารสกัดยังมีความคงตัว (persistent) อยู่

Tanaka *et al.* (1997) พบว่าสาร 1'-Acetoxychavicol acetate จากข่าสามารถยับยั้งการ พัฒนาของเนื้องอกและการขยายตัวของเซลล์ในชั้น Mucosa ของลำไส้ของหนู ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย สาร Azoxymethane ได้ และมีผลชักนำให้ Glutathione S-transferase (GST) และ Quinone

reductase (QR) ในตับและลำไส้มีกิจกรรมมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ GST จะพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีหน้าที่ทำลายสารพิษ และสารก่อมะเร็ง โดยเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีพิษต่ำลงและขับออกจากร่างกาย ดังนั้นสารใดที่มีผลในการกระตุ้นให้เอนไซม์นี้ทำงาน จึงมีประโยชน์ต่อการต้านมะเร็ง Itokawa *et al* (1986) ก็ พบว่า สาร 1'-Acetoxychavicol acetate และ 1'-Acetoxyeugenol acetate จากข่ามีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็ง Sarcoma 180 ascites ในหนู Qureshi *et al.*(1992) ได้ทดสอบความเป็นพิษด้วยการให้สารสกัดจากข่าด้วย Ethanol ทางปาก โดยการทำ Acute (24 ชม.) ให้สารในปริมาณ 0.5, 1.0, และ 3 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู และทำ chronic (90 วัน) โดยให้สาร 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่า หนูมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เซลล์เม็ดเลือดแดงก็เพิ่มขึ้น น้ำหนักอวัยวะเพศและจำนวนอสุจิเพิ่มขึ้นเช่นกัน จากข้อมูลข้างต้นอาจกล่าวได้ว่า สารออกฤทธิ์ในข่ามีความปลอดภัยกว่าสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิด เช่น สารสกัดจากवानน้ำ ซึ่งพบว่ามีสาร β -asarone ในน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสารนี้เป็นสารที่ก่อมะเร็งในสัตว์ ดังนั้นในประเทศไทยสหรัฐอเมริกาจึงได้ประกาศยกเลิกการใช้ Calamus oil เป็นตัวผสมในยาต่างๆ (Harbone *et al.*, 1999)

จากข้อมูลดังกล่าวทั้งหมดในข้อ 1.3.1 ถึงข้อ 1.3.3 จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากข่ามีศักยภาพค่อนข้างสูง และมีความเหมาะสมที่จะพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสารสกัดพร้อมใช้เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในผลไม้ร่วง เนื่องจากมีฤทธิ์ควบคุมเชื้อราได้ค่อนข้างดี มีแหล่งวัตถุดิบ มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ เกษตรกรและผู้บริโภคคุ้นเคย และยอมรับความปลอดภัยกับพืชนี้อยู่แล้ว

อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังต้องการการศึกษาในรายละเอียดวิธีการแต่ละขั้นตอนอีกมาก รวมทั้งต้นทุนการผลิตและประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีควบคุมเชื้อราที่เกษตรกรและผู้ประกอบการนิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งจะได้รายงานในรายละเอียดในบทต่อไป

บทที่ 2

รายละเอียดการศึกษาวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์จากข่า (Fraction ที่ L14 และ L15) ที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides*) และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *D. mangiferae*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger*

2) เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์สำหรับการผลิตเชิงการค้า และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ (Formulation) สารออกฤทธิ์จากข่า เพื่อนำไปใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนส และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา ในระดับโรงงานบรรจุหีบห่อ

2.2 เป้าหมายผลิตภัณฑ์ (Formulation)

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ผลิตภัณฑ์จากสารอินทรีย์ธรรมชาติมักมีข้อจำกัดด้านอายุการเก็บรักษา เนื่องจากโดยปกติจะเสื่อมสลายเร็ว เมื่อกระทบกับความชื้นแสงสูง หรือถูกออกซิไดซ์เมื่อกระทบกับอากาศ หรือเมื่อเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิสูง ซึ่งล้วนเป็นสภาพสิ่งแวดล้อมที่ระบบการเกษตรไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ทั้งสิ้น จึงทำให้ผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ธรรมชาติที่ใช้ในการเกษตรหลายๆ ชนิดไม่ประสบความสำเร็จเมื่อทำการผลิตเชิงการค้าหรือเชิงอุตสาหกรรม คณะผู้วิจัยได้ตั้งเป้าหมายคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาไว้ 4 ประการ ได้แก่

- 1) มีประสิทธิภาพสูงและราคาถูกใกล้เคียงกับสารเคมี
- 2) มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราได้หลายชนิด นอกเหนือจาก *Colletotrichum gloeosporioides*
- 3) มีความคงตัวสูง เพื่อสามารถวางจำหน่ายในร้านเคมีเกษตรได้ประมาณ 1 ปี
- 4) มีความปลอดภัยต่อมนุษย์

2.3 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

เป้าหมายการศึกษาวิจัย คือ การศึกษาอย่างครบวงจรถึงแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข่า ตั้งแต่วัตถุดิบจนถึงการยอมรับในผลิตภัณฑ์ของเกษตรกรทั้งในด้านคุณภาพและราคา ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเริ่มศึกษาตามขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 2.1 เริ่มจากการจัดหาเหง้าข่าสดจากแหล่งรวบรวมหัวข่าของจังหวัดสำคัญ แล้วจึงนำมาเข้าสู่กระบวนการล้างทำความสะอาดอบแห้ง และบดละเอียด เพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสและการละลายของสารออกฤทธิ์เมื่อแช่ในสารตัวทำ

ละลาย Dichloromethane (CH_2Cl_2) หรือ Ethanol (EtOH) หลังจากกระเหยสารตัวทำละลายออกแล้ว จึงนำไปทดสอบต่อไป ทั้งด้านการตรวจสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง การตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วย GC-MS และการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้เหมือน สารเคมีควบคุมศัตรูพืชในท้องตลาด หลังจากนั้นจึงทดสอบผลิตภัณฑ์ในระดับแปลงหรือแหล่ง ประกอบการผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออกพร้อมคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์ เพื่อการยอมรับของ เกษตรกรในขั้นสุดท้าย ซึ่งรายละเอียดวิธีการทดลองและผลการทดลองจะได้รายงานต่อไป

2.4 ระยะเวลาการศึกษาวิจัย

รวมระยะเวลาการศึกษาวิจัย 3 ปี 2 เดือน คือ 1 ธันวาคม 2544 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2548

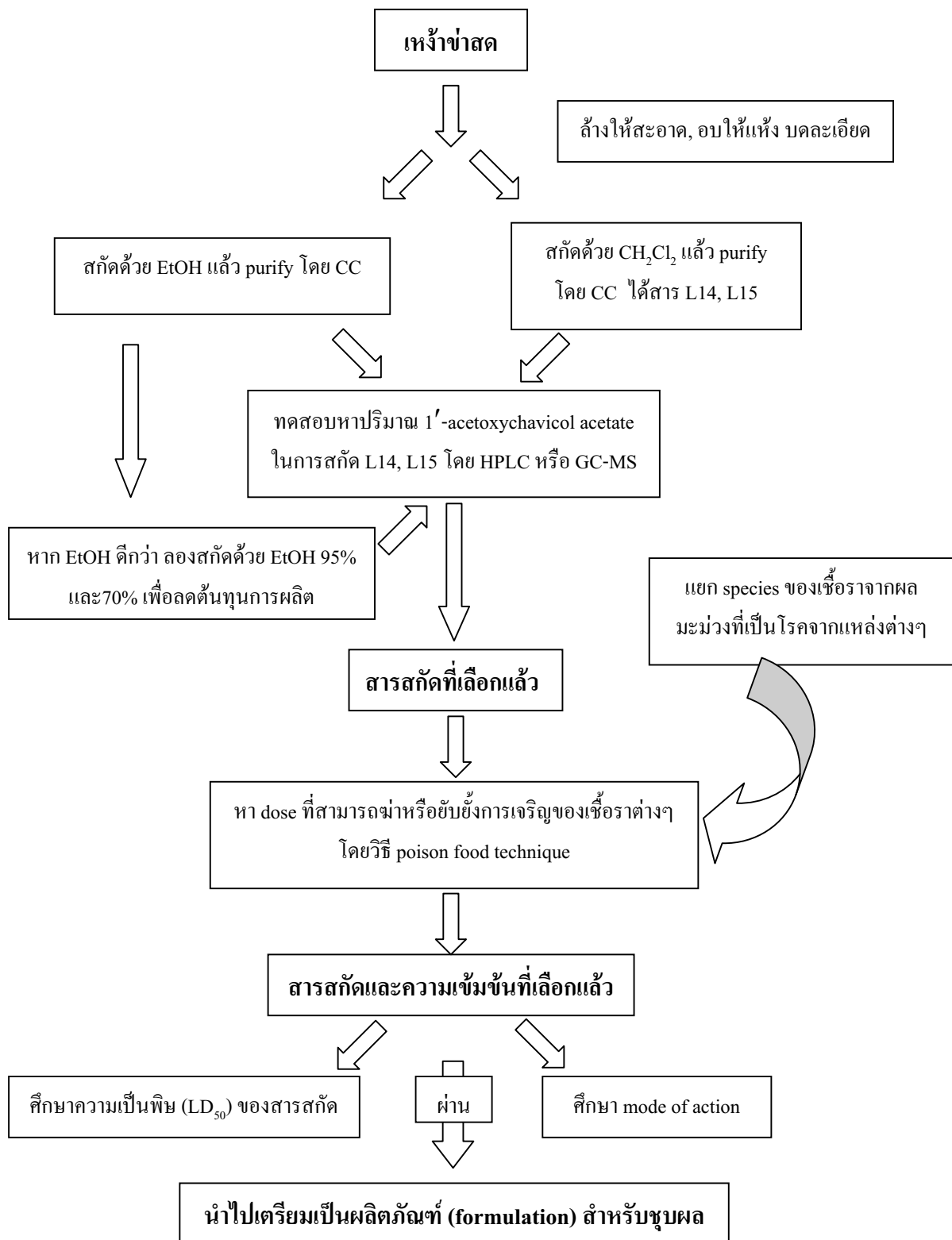
2.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย

- 1) การศึกษาในห้องปฏิบัติการ
 - คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (จำแนกเชื้อรา)
- 2) การศึกษาในระดับแปลงเกษตรกร
 - สวนคุณสายันต์ บุญยิ่ง จังหวัดพิจิตร
 - สวนคุณสุวิทย์ คุณาวุฒิ จังหวัดฉะเชิงเทรา
 - สวนคุณศักดิ์ดา ชันติพะโล จังหวัดฉะเชิงเทรา
 - สวนคุณสุนทร สมามิมงคล จังหวัดอ่างทอง
- 3) การศึกษารวบรวมเชื้อรา สาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วง
 - อำเภอวังทับไทร จังหวัดพิจิตร
 - อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ
 - อำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว
 - อำเภอโพธิ์ทอง จังหวัดอ่างทอง
 - อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี
 - อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี
 - อำเภอแปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา
 - อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา
 - อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา
 - อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี
 - อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี
 - อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี

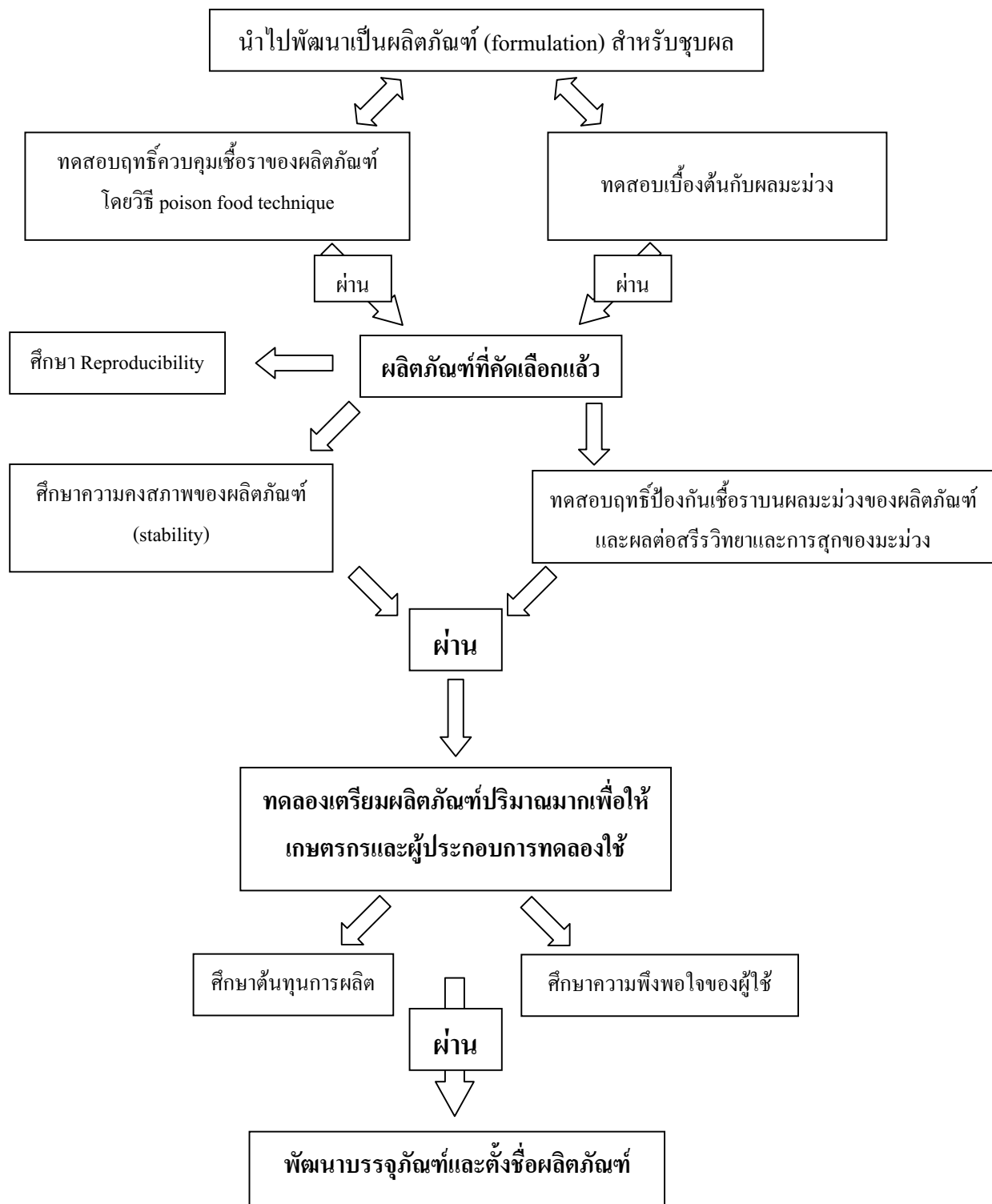
- อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี
- อำเภอลำดวน จังหวัดสุรินทร์
- อำเภอบ้านเพ จังหวัดระยอง
- อำเภอสามย่าน จังหวัดระยอง
- อำเภอเมือง จังหวัดระยอง
- อำเภอแกลง จังหวัดระยอง
- จังหวัดชัยนาท
- จังหวัดสุราษฎร์ธานี

4) การศึกษารวบรวมสายพันธุ์ข้าวในแหล่งปลูก

- ตำบลคู้งตะเภา อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี
- ตำบลวังแดง อำเภอตรอน จังหวัดอุดรธานี
- ตำบลลานดอกไม้ ตำบลโกสัมภินคร จังหวัดกำแพงเพชร
- ตำบลสระแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร
- ตำบลบ้านแก่ง อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์
- ตำบลตะลุง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี
- ตำบลคลองด่าน อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ
- ตำบลบางเปรี้ยว อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ
- ตำบลท่าไข่ อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา
- ตำบลหนองยาว อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา
- ตำบลวังโตนด อำเภอนายายอาม จังหวัดระยอง
- ตำบลบางสระเก้า อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี
- ตำบลหนองบอน อำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว
- ตำบลท่างาม อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี
- ตำบลป่าชะ อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก
- ตำบลแก้มอัน อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี
- ตำบลด่านมะขามเตี้ย อำเภอด่านมะขามเตี้ย จังหวัดกาญจนบุรี
- ตำบลคอนคา อำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี
- ตำบลลำนะสัก อำเภอโพธิ์ทอง จังหวัดอ่างทอง



ภาพที่ 2.1 แผนภูมิของขั้นตอนการศึกษาวินิจฉัยพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข่า



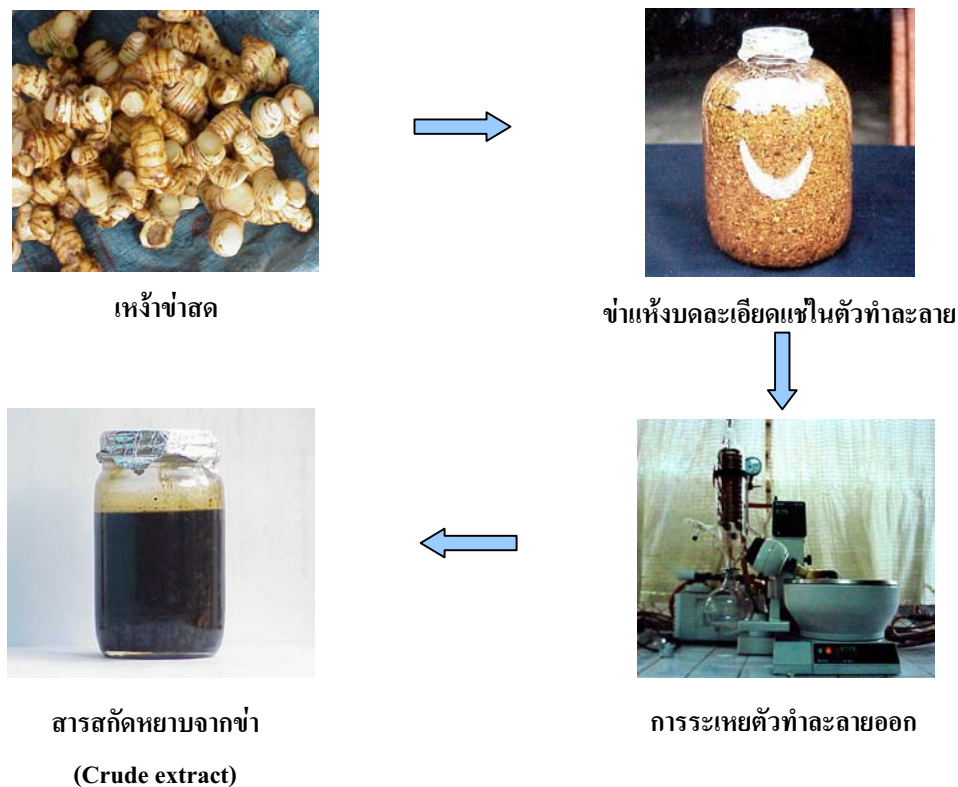
ภาพที่ 2.1(ต่อ) แผนภูมิของขั้นตอนการศึกษาวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข่า

บทที่ 3

การพัฒนากระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์จากข่า

3.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากเหง้าข่า

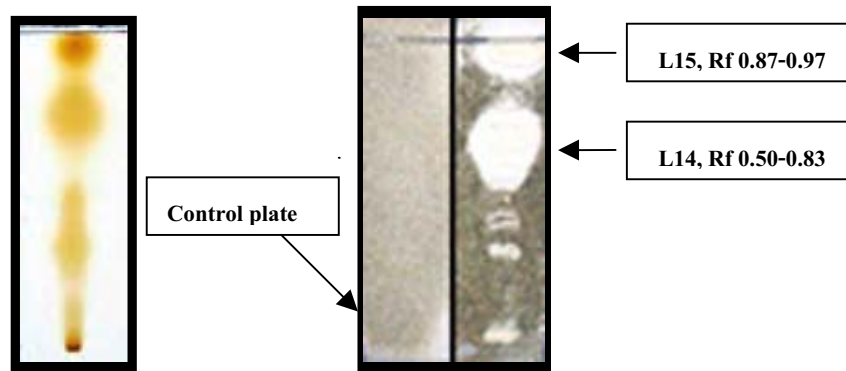
การแยกสารออกฤทธิ์จากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรและพืชให้กลิ่น อาจทำได้หลายวิธี ได้แก่ การกลั่น (Distillation), การสกัด (Extraction), การหีบ (Pressing), การใช้ไขมันดูดซับ (Enfleurage) หรือแม้กระทั่งการหมัก (Maceration หรือ Percolation) ในกรณีของข่า เมื่อทำการกลั่นด้วยไอน้ำ จะได้น้ำมันหอมระเหย 0.08%DW ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่ เป็นสารเมทิล-ซินนามेट (Methyl-cinnamate), ซีนีออล (Cineol), การบูร (Camphor), และยูจีนอล (Eugenol) แต่วิธีที่นิยมแยกสารออกฤทธิ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านพัฒนาผลิตภัณฑ์ จะนิยมใช้วิธีสกัด (Extraction) เนื่องจากได้ปริมาณสารออกฤทธิ์มากกว่า คือ ประมาณ 5%DW และมีชนิดของสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์ครบถ้วนมากกว่า โดยวิธีการสกัดดังกล่าวมีขั้นตอนที่สะดวกพอสมควร (รายละเอียดขั้นตอนในภาพที่ 3.1) และนิยมใช้สารตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent) เป็นตัวสกัดสารที่มีประโยชน์ออกจากเนื้อเยื่อของเหง้าข่า อย่างไรก็ตามยังมีข้อควรระวังในการเลือกใช้สารละลายอินทรีย์ค่อนข้างมาก ในกรณีที่ต้องการนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และเครื่องสำอาง ซึ่งจะต้องเป็นสารที่อนุญาตให้ใช้ใน ผลิตภัณฑ์เหล่านั้นเท่านั้น ในกรณีของการสกัดสารออกฤทธิ์จากข่า เพื่อนำไปทำผลิตภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร มีรายงานการใช้ แอลกอฮอล์ และ ไดคลอโรมีเทน (ธารทิพย์, 2540 ; อนุศักดิ์, 2539)



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากข่า

3.2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารออกฤทธิ์จากข่า

ก่อนดำเนินงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้นในระยะเวลาติดต่อกัน 2 ปี โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วย Dichloromethane พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราได้ ซึ่งการแยกสารสกัดด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) และตรวจสอบโดยวิธี TLC-bioassay ด้วยเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ได้วงใส (clear zone) 6 แถบ คือ L15, L14, L13, L12, L11 และ L10 มีค่า Rf เป็น 0.87-0.97, 0.5-0.83, 0.38-0.45, 0.27-0.33, 0-0.06 และ 0 ตามลำดับ ส่วนการแยกสารสกัดโดยวิธี column chromatography เก็บสารได้เพียง 3 สาร คือ L14, L12 และ L10 ซึ่งจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเชื้อรา พบว่าสารสกัดหยาบและ L14 ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 100 % และยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100 % ที่ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนต่อล้าน ขึ้นไป แต่ค่า ED_{50} ของสาร L14 มีค่าที่ต่ำที่สุด เท่ากับ 72 ส่วนต่อล้าน ซึ่งรายละเอียดเหล่านี้ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมพอสมควร



ภาพที่ 3.2 แลบบสารที่แยกได้หลังจากการอบด้วยไอของไอโอดีน (ซ้าย) และหลังจากทำ TLC-bioassay (ขวา) แสดงให้เห็นส่วน clear zone ที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีสารออกฤทธิ์

3.3 การปรับปรุงเทคนิคการสกัดสารออกฤทธิ์จากข่า เพื่อลดต้นทุนการผลิต

การสกัดสารออกฤทธิ์จากข่า โดยใช้ตัวทำละลาย Dichloromethane จะได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่เป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract) 1.48 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งเมื่อทำการแยก Fraction ต่อไป ด้วยวิธี Column chromatography (CC) จะได้เป็นสารออกฤทธิ์เรียกว่า L14 39.5 เปอร์เซ็นต์ และ L15 8.4 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการใช้สาร Dichloromethane จะมีข้อเสียอยู่ 2 ประการ คือ ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง เนื่องจาก Dichloromethane มีราคาเฉลี่ย 70 บาท เมื่อเปรียบเทียบกับ Ethanol ซึ่งมีราคาเพียง 45 บาทต่อลิตร นอกจากนี้ Dichloromethane ยังเป็นสารไวไฟ อาจมีปัญหาในเรื่องของการระเบิดในระหว่างขบวนการผลิตขึ้นได้ ถ้าเป็นการผลิตในปริมาณที่มาก และมีการควบคุมไม่ดีพอ ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาสารละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายใหม่ที่ดีกว่าทั้งทางด้านประสิทธิภาพและราคาต้นทุน จึงจำเป็น Janssen and Scheffer (1985) และ Qureshi *et al.* (1992) รายงานความสำเร็จในการสกัดสารออกฤทธิ์จากข่า โดยใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลายซึ่งในสารสกัดหยาบที่ได้ก็มีองค์ประกอบของสาร 1'-Acetoxychavicol acetate เช่นเดียวกัน

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น Ethanol จึงเป็นสารที่อยู่ในความสนใจ เนื่องจากต้นทุนถูก มีความปลอดภัยสูง เมื่อเทียบกับ Methanol, Chloroform อย่างไรก็ตามการศึกษาสารสกัดหยาบจากข่า ที่สกัดด้วย Ethanol ยังมีข้อมูลน้อยมากและไม่มีข้อมูลการศึกษาฤทธิ์การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค Anthracnose ดังนั้นการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเทคนิคการสกัดสารเชิงการค้าจากข่า (L14 และ L15) โดยใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลายเปรียบเทียบกับการใช้ Dichloromethane

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตั้งชื่อหัวข่าจากพ่อค้าคนกลางที่รวบรวมผลผลิตข่าจาก อำเภอบรรพตพิสัย จังหวัดนครสวรรค์ นำมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นหนา 2 มิลลิเมตร ก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในร่ม และอบแห้งด้วยตู้อบพลังงานแสงอาทิตย์ อุณหภูมิอากาศในตู้อบประมาณ 65 องศาเซลเซียส นำข่าแห้งที่ได้มาทำการบดละเอียดด้วยเครื่อง Grinder ได้ชิ้นข่าแห้งขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร นำข่าแห้งที่ได้ไปแช่ในตัวทำละลาย Ethanol โดยแช่นาน 36 ชั่วโมง ก่อนกรองแยกเอาเฉพาะของเหลวไปลดปริมาตร โดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ใช้อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยแยก Dichloromethane หรือ Ethanol ให้ได้สารสกัดหยาดต่อไป กากข่าแห้งที่กรองออกนำไปแช่ในตัวทำละลายเดิมต่ออีก 2 – 3 ครั้ง เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ให้ได้มากที่สุด

ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตในส่วนของสารสกัดหยาด (Crude extract) ที่ได้จากการสกัดด้วย Ethanol หรือ Dichloromethane พบว่าสารสกัดหยาดจาก Ethanol จะให้ผลผลิต 1.61 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ในขณะที่สารสกัดหยาดจาก Dichloromethane จะได้ 1.48 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ในกรณีนี้สารสกัดหยาดที่ได้จาก Ethanol จะมีน้ำปนมาด้วยส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถแยกออกได้โดยวิธีการระเหยแบบหมุน โดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตกค้างนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำหนักผลผลิตสูงกว่าสารสกัดหยาดจาก Dichloromethane

ในทางปฏิบัติการเจือปนของน้ำในสารสกัดหยาดจะส่งผลเสียต่อการแยก Fraction หรือการทำสารบริสุทธิ์ (Purification) ในอนาคต รวมถึงการแยก L14 และ L15 ออกจากสารองค์ประกอบอื่นๆ วิธีการกำจัดน้ำส่วนนี้ออกสามารถทำได้โดยใช้ Sodium sulphate anhydrous ดึงน้ำออกแต่ก็เป็นการเพิ่มขึ้นตอนและเพิ่มต้นทุนของการผลิตให้มากขึ้นไปอีก ด้วยเหตุนี้สารสกัดหยาดจาก Dichloromethane จึงดูน่าสนใจกว่าสารสกัดหยาดจาก Ethanol ซึ่งไม่สามารถนำ Fraction ไปฉีดเพื่อตรวจวิเคราะห์สาร ออกฤทธิ์ L14 และ L15 หรือแม้แต่ 1'-Acetoxychavicol acetate ด้วยเครื่อง GC/MS จึงไม่อาจยืนยัน ประสิทธิภาพของการใช้ Ethanol สกัดสารออกฤทธิ์จากเนื้อเยื่อของข่า

ธารทิพย์ (2540) ได้ศึกษาสารสกัดหยาดเพื่อควบคุมโรค Anthracnose ของมะม่วงเปรียบเทียบกับระหว่างสมุนไพรหลายชนิดได้แก่ ทองพันชั่ง วานน้ำ และข่า โดยใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดหยาดจากข่าที่ความเข้มข้น 10,000 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสุเทพ (2543) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วย Ethanol อัตราความเข้มข้น 10,000 ส่วนต่อล้านต่ออัตราการเกิดโรคแอนแทรคโนสในผลพริกยักษ์ พบว่า ควบคุมโรคได้เพียง 76 เปอร์เซ็นต์

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า การสกัดสารออกฤทธิ์จากข้าด้วย Dichloromethane และ Ethanol ให้ผลผลิตสารสกัดหยาบไม่แตกต่างกัน Ethanol อาจมีต้นทุนถูกกว่า แต่จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการใช้สาร Sodium sulphate anhydrous คั้นน้ำออกก่อนทำการแยกสาร L14 และ L15 ต่อไป ดังนั้นต้นทุนที่ถูกกว่าจึงอาจจะไม่ถูกกว่าดังที่ได้คาดไว้ นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดหยาบไปใช้ควบคุมโรคแอนแทรกซ์ พบว่า สารสกัดจากหยาบจากข้าด้วย Ethanol ต้องใช้ในความเข้มข้นที่สูงกว่าที่สกัดด้วย Dichloromethane อีกด้วย ด้วยเหตุของข้อจำกัดในการวิจัยตามโครงการ คณะผู้วิจัยได้หารือ และเห็นพ้องว่า ควรมุ่งเน้นการใช้สารสกัดหยาบด้วย Dichloromethane เป็นหลัก ซึ่งประเด็นความปลอดภัยอาจใช้เทคนิคทางเคมีอุตสาหกรรมเข้าช่วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มุ่งเน้นการสกัดสารออกฤทธิ์จากข้าด้วย Dichloromethane เป็นหลักต่อไป

ตารางที่ 3.1 ปริมาณผลผลิตและลักษณะทางกายภาพของ Crude extract จากข้า

ชนิดของตัวทำละลาย	Oleoresin (Crude extract)			
	ปริมาณที่ได้ (% w/w)	สี	กลิ่น	อื่นๆ
Dichloromethane	1.48	น้ำตาลเหลือง	ฉุนของข้า	เหนียวเหนียว
Ethanol	1.61 ^{1/}	น้ำตาลเหลือง	ฉุนของข้า	เหลวไม่ข้น

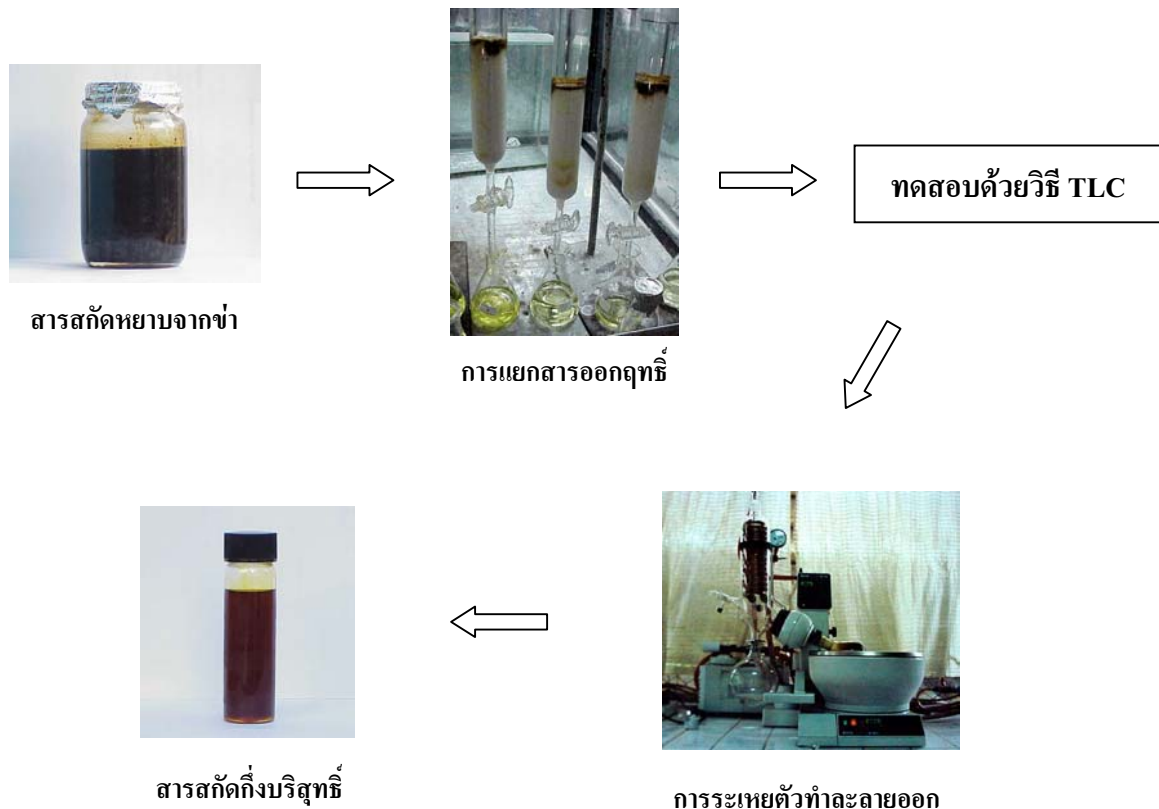
^{1/} มีน้ำปนอยู่ด้วยจำนวนหนึ่ง

3.4 การแยก Fraction ของสารออกฤทธิ์ L14 และ L15 ด้วยวิธี Column chromatography (CC)

เมื่อทราบตำแหน่ง (Rf)* ของสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อราจากวิธี TLC-bioassay แล้วจึงทำการแยกกลุ่มสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อรา (Fraction) ด้วยวิธี Column chromatography โดยใช้ Silica gel 60 G 30 กรัม ละลายด้วย Hexane จากนั้นจึงนำไปเทลงในคอลัมน์แก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร ที่ทำการล้างด้วย Acetone และทำการอบให้แห้งแล้ว จากนั้นใช้แท่งแก้วคนเพื่อไล่ฟองอากาศและไม่ให้ Silica gel แยกชั้นกัน ทั้งไว้สักครู่เพื่อรอให้ Silica gel เกิดการจับตัวกัน จากนั้นจึงค่อยๆ หยดสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์จำนวน 2 กรัม เติมตัวทำละลายที่จะนำพาสารด้านเชื้อราในข้าออกมา โดยตัวทำละลายเคลื่อนที่จะเป็นสารผสมประกอบด้วย Hexane, Ethyl acetate และ Methanol จากนั้นจึงใช้ขวดแก้วเก็บสารละลายที่ไหลออกมาครั้งละ 50 มิลลิลิตร

* หมายเหตุ $Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารประกอบที่แยกได้เคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}$

เมื่อเก็บสารละลายจนหมดจึงนำมาทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราด้วยวิธี TLC-bioassay อีกครั้ง เพื่อที่จะหาว่าสารในขวดใดมีค่า Rf เท่ากับสารต้านฤทธิ์เชื้อรา (L14 และ L15) จึงนำมารวมกัน และทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) เก็บสารต้านเชื้อราในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทดสอบต่อไป (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการแยกสาร L14 , L15 ด้วยวิธี Column Chromatography

3.5 การศึกษาเกี่ยวกับสูตรผสมตัวชะ ที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Column chromatography

ทำการศึกษเปรียบเทียบวิธีการแยกสารออกฤทธิ์ L14 และ L15 ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate : Methanol อัตราส่วน 80 : 20 : 1 และ 60 : 40 : 1 และตรวจสอบประสิทธิภาพการแยกของ Fraction ที่มีสาร (L14 และ L15) โดยวิธีอบด้วยไอโอดีน และวัดค่า Rf

3.5.1 ผลการแยก Fraction ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Developing solvent) 80 : 20 : 1 เป็นตัวชะสารในระบบ TLC

ดังแสดงในภาพที่ 3.4 ตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่มีองค์ประกอบเป็น Hexane : Ethyl acetate และ Methanol อัตราส่วน 80 : 20 : 1 ยังคงสามารถจะแยก Fraction สารสกัดหยาบจากข้าวด้วย Dichloromethane เหมือนที่เคยได้ผลดีในการวิจัยก่อนหน้านี้ แต่ไม่สามารถจะแยก Fraction สารสกัดหยาบที่ได้จากการใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลาย ซึ่งเมื่อศึกษาค่า Rf จาก Fraction ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากข้าวด้วย Dichloromethane พบว่า มีค่า Rf ของสาร L14 และ L15 ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (อนุวัฒน์, 2545)



ภาพที่ 3.4 ผลการแยก Fraction ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 80 : 20 : 1 บนระบบ Thin layer chromatography

3.5.2 ผลการแยก Fraction ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 60 : 40 : 1 เป็นตัวชะสารในระบบ TLC

เพื่อทำการเพิ่ม Polarity ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ ให้สามารถแยกสาร L14 และ L15 ในสารสกัดหยาบจาก Ethanol จึงได้ปรับสัดส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ เป็น 60 : 40 : 1 และใช้ Run เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่มีตัวทำละลายเป็น Dichloromethane และ Ethanol เปรียบเทียบอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งผลการศึกษาแสดงไว้ในภาพที่ 3.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเพิ่ม Polarity ของตัวทำละลายเคลื่อนที่ในอัตราส่วนดังกล่าวไม่สามารถแยกสาร L14 และ L15 ออกจากกันได้ (ภาพที่ 3.5) แสดงว่าถ้าใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลายผลิตสารสกัดหยาบจากข้าว จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่มี Polarity มากกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้อีกมาก



ภาพที่ 3.5 ผลการแยก Fraction ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 60 : 40 : 1

3.6 สรุปขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชที่เหมาะสม

นำเหง้าพืชสดมาล้างทำความสะอาด สับเป็นชิ้นบางๆ นำไปอบให้แห้งสนิทก่อนนำไปบดให้ละเอียด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูเครื่องบด 0.5 มิลลิเมตร แล้วนำไปแช่ในสารละลายอินทรีย์ Dichloromethane นาน 36 ชั่วโมง กรองแยกสารละลายออกจากกาก และนำไปลดปริมาตรโดยแยกสารละลายอินทรีย์ออกจากสารออกฤทธิ์ โดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ปรับอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส สารละลายอินทรีย์ที่ได้อาจนำไปแช่กากเหง้าพืช และแยกกลั่นซ้ำวิธีเดิมอีก 2-3 ครั้ง เพื่อเพิ่มผลผลิตสารสกัดหยาบ (Crude extract)

บทที่ 4

การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในมะม่วง

4.1 การตรวจสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของสาร L14, L15, L14+L15

L14, L15 เป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากข้าว ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสารออกฤทธิ์ที่พบคือ 1'-Acetoxychavicol acetate (อนุศักดิ์, 2538 ; สุวคนธ์, 2540) ดังนั้นการหาความเข้มข้นที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยและการงอกของสปอร์ จะเป็นข้อมูลที่นำไปใช้สำหรับการเตรียม Formulation ได้ ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในมะม่วง เนื่องจาก Fraction L14 และ L15 ต่างก็มีสาร 1'-Acetoxychavicol acetate เป็นองค์ประกอบ การผสม L14 กับ L15 เข้าด้วยกัน จะช่วยเพิ่มผลผลิตสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้จากเหง้าข้าว ถ้าผสมกันแล้วประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราไม่ลดลง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำสารสกัดที่แยกได้จาก Column chromatography ได้แก่ L14 , L15 และ L14 + L15 มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 100, 500, 1,000 5,000 ส่วนต่อล้าน ผสมในอาหาร PDA ทิ้งไว้ให้เส้นใยเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนจานอาหาร โดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยให้สัมผัสกับอาหาร เลียงไว้ที่อุณหภูมิ 25–28 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานเปรียบเทียบกับ (Control) แล้ว จึงทำการวัดขนาดของโคโลนี คำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง ตามสูตรคำนวณที่แนะนำโดยธรรมศักดิ์ (2528)

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = (A - B) / A \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบ (Control)

B = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัด

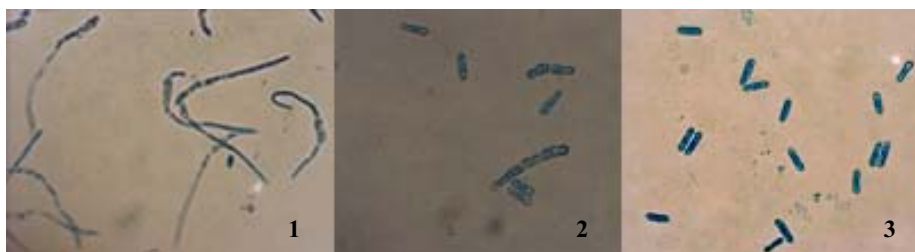
และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยเตรียมความเข้มข้นของสาร L14 , L15 และ L14 + L15 ที่ 100 ส่วนต่อล้าน และ Benomyl ซึ่งเป็นสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้ชุบผลมะม่วงก่อนส่งจำหน่าย อัตรา 500 ส่วนต่อล้าน ผสมในอาหาร PDA แล้วเทบนแผ่นสไลด์ทิ้งให้เส้นใย และหยดสปอร์ลงบนอาหาร นำแผ่นสไลด์บ่มในกล่องที่มีความชื้น 75% อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 6 ชั่วโมง หยดสาร Lactophenol cotton blue และทำการตรวจสอบการงอกของสปอร์ โดยทำการสุ่มนับสปอร์จำนวน 300 สปอร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า ทั้ง L14 , L15 และ L14 + L15 ที่ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.1) ในขณะที่การยับยั้งการงอกของสปอร์ จะใช้ความเข้มข้นเพียง 100 ส่วนต่อล้าน การใช้ benomyl ที่ความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน สปอร์เชื้อราสามารถงอกได้บ้าง แม้ว่าจะไม่สมบูรณ์ ในขณะที่สารสกัดจากข้าวที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน (500 ส่วนต่อล้าน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 ผลของสารสกัด L14, L15, L14+L15 ที่ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้านต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*



ภาพที่ 4.2 ลักษณะการงอกของสปอร์ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมสารต่างๆ

1. ชุดควบคุม 2. Benomyl 500 ส่วนต่อล้าน (อัตราแนะนำ)
3. L14, L15, L14+L15 100 ส่วนต่อล้าน

ตารางที่ 4.1 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

สารสกัด (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง							
	การเจริญเติบโตของเส้นใย				การงอกของสปอร์			
	100	500	1,000	5,000	100	500	1,000	5,000
L14	62.92	66.38	75.96	100	100	100	100	100
L15	60.40	66.33	73.56	100	100	100	100	100
L14+L15	61.22	66.67	76.52	100	100	100	100	100
Crude extract	7.77	20.55	28.88	100	100	100	100	100
benomyl	-	100	-	-	-	90.33	-	-
Control	0	0	0	0	0	0	0	0

สรุปผลการทดลอง

ทั้ง L14, L15 และ L14+L15 มีผลควบคุมการงอกของสปอร์ และควบคุมการงอกของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc ได้ดีเท่ากับ L14 อย่างเดียว โดยระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมการงอกของสปอร์ คือที่ 100 ส่วนต่อล้าน และการควบคุมการเจริญของเส้นใย ต้องใช้ถึง 5,000 ส่วนต่อล้าน

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่า การผสม L14 กับ L15 ไม่ทำให้ประสิทธิภาพของ L14 ลดลงแต่อย่างใด L14+L15 ที่ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน ยังแสดงผลดีเท่ากับ L14 อย่างเดียวที่ความเข้มข้นเท่ากัน แสดงว่าในทางปฏิบัติอาจนำ L15 เข้าผสมกับ L14 ได้ และผสมใช้ในอัตราเท่าเดิม นี่แสดงถึงโอกาสการลดต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจากข่าเชิงการค้า ดังที่เคยอธิบายไว้แล้ว

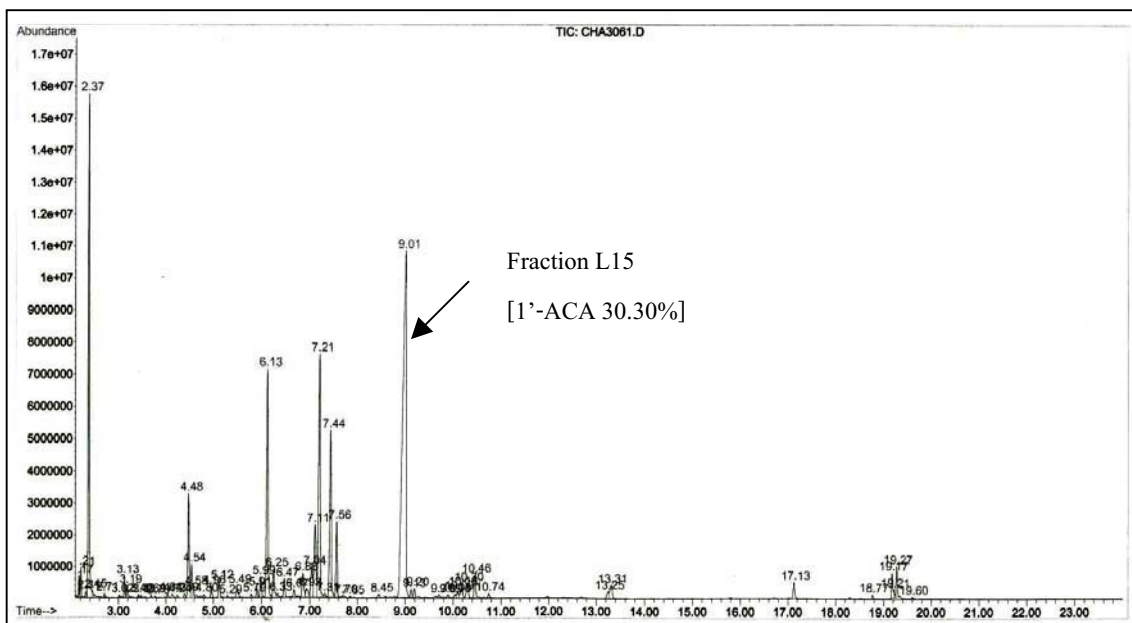
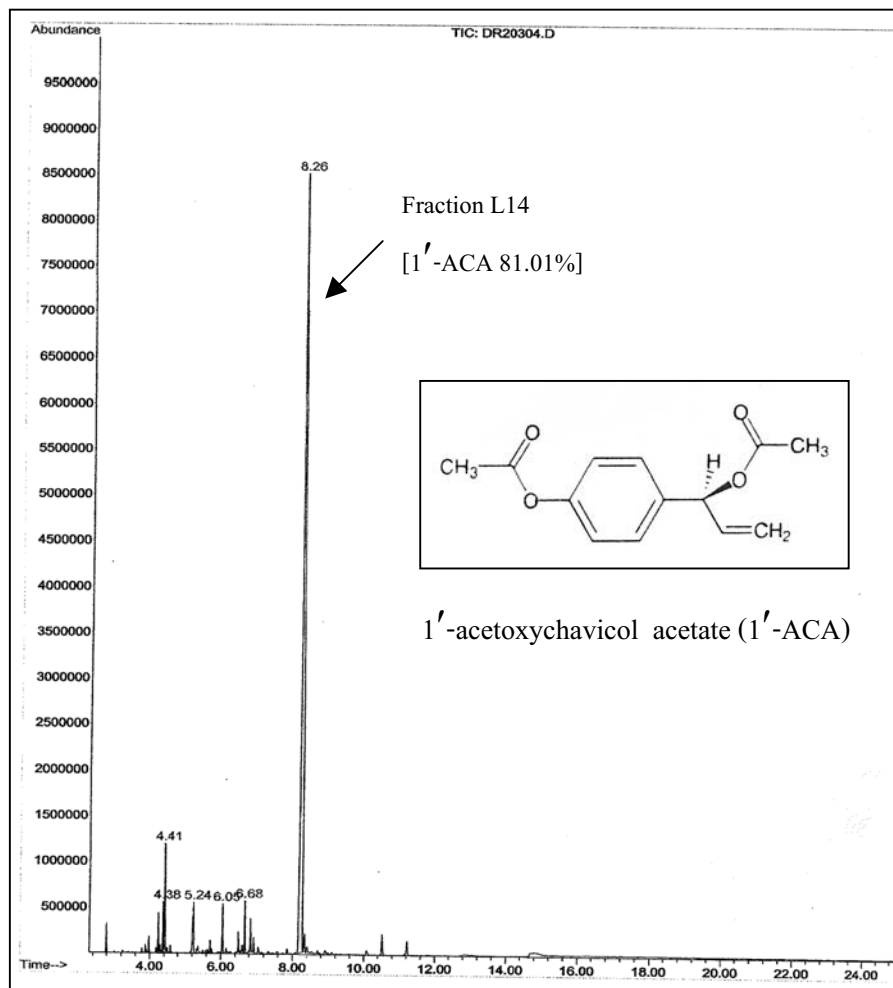
ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมการงอกของสปอร์กับการควบคุมการเจริญของเส้นใย แสดงว่าสารสกัดหยาบจากข่ามีประสิทธิภาพควบคุมการงอกของสปอร์ได้ดีกว่าการเจริญของเส้นใย โดยในกรณีควบคุมการงอกของสปอร์นี้ L14 และ L15 มีประสิทธิภาพดีกว่า benomyl ด้วยซ้ำไป เพราะฉะนั้นแนวทางการพัฒนา L14+L15 ไปเป็นสารละลายชุบผลเพื่อป้องกันโรคจึงเป็นแนวทางที่เป็นไปได้ โดยควรจะทำการชุบผลก่อนสุก หรือก่อนที่สปอร์บนผลจะงอกออกเป็นเส้นใย

4.2 การยืนยันสารออกฤทธิ์สำคัญใน Fraction L14, L15 ด้วยวิธี GC-MS

ทำการสกัดสารจากข่าโดยใช้ตัวทำละลาย Dichloromethane และแยกสารออกฤทธิ์โดย TLC ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Developing solvent) คือ Hexane : Ethyl acetate : Methanol อัตราส่วน 80 : 20 : 1 ตรวจสอบค่า R_f และรวบรวมสารโดยการดูดเฉพาะแถบสารที่เป็น L14 และ L15 นำไปละลายใน Acetone ก่อนกรองแยก Silica gel ออก นำสารออกฤทธิ์ที่ได้ไปเก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ 1'-Acetoxychavicol acetate โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ GC-MS ที่สถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต่อไป ซึ่งพบว่าโครงสร้างโครมาโตแกรม ดังแสดงในภาพที่ 4.3 และเมื่อตรวจสอบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่พบมากใน Fraction L14 พบว่า สารดังกล่าว คือ 1'-Acetoxychavicol acetate เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร 1'-Acetoxychavicol acetate ใน Fraction L15 พบว่าจะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ 1'-Acetoxychavicol acetate น้อยกว่าใน Fraction L14 คือ จะมีปริมาณ 30.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ 81.01 เปอร์เซ็นต์ใน Fraction L14 ทั้งนี้โดยใน Fraction L15 จะมีสารอีกชนิดหนึ่งที่พบมาก คือ 1,8-cineole (13.59 เปอร์เซ็นต์) และ พบสารอื่นอีกเล็กน้อยจำนวน 63 ชนิด ในกรณีของ Fraction L14 นอกเหนือจากสาร 1'-Acetoxychavicol acetate ที่พบมากที่สุดแล้วก็พบว่ามีสารชนิดอื่นอีกเพียงเล็กน้อยประมาณ 17 ชนิด โดยมีสาร 1,8-cineole เพียง 0.8 เปอร์เซ็นต์

ทั้งใน Fraction L14 และ L15 มีสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ สาร 1'-Acetoxychavicol acetate เหมือนกัน เพราะฉะนั้นการนำสาร Fraction L15 รวมกับ Fraction L14 จึงเป็นแนวทางที่จะเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้จากข่า ซึ่งเป็นแนวทางลดต้นทุนการผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ที่ได้ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารที่ได้ใน Fraction L14 และ L15 มารวมกันนั้นจะลดลง เมื่อเทียบกับปริมาณสารรวม ด้วยเหตุนี้ฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ก็อาจจะเปลี่ยนแปลงไปพอสมควร

จากการทดลองพบว่าสารที่ตรวจพบใน Fraction L15 และ Fraction L14 นั้นมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่สอดคล้องกับงานของ Pooter, *et al.*, 1985 ซึ่งได้ทำการตรวจสอบน้ำมันหอมระเหยจากข่าของประเทศมาเลเซีย ที่สกัดจากหัวสดและหัวแห้ง พบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 40 ชนิด แบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ Terpenes, Eugenol acetate, Chavicol, Chavical acetate และอื่นๆ อีก และสวคนซ์ (2540) และอนุศักดิ์ (2539) ก็พบว่าสารออกฤทธิ์จากข่าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียได้นั้นคือ 1'-Acetoxychavicol acetate



ภาพที่ 4.3 Chromatogram ของ Fraction L14 (บน) และ Fraction L15 (ล่าง)

4.3 สรุป

สารออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อราในเหง้าขาที่สกัดได้ (L14 และ L15) สามารถควบคุมการเจริญเติบโตได้ทั้งเส้นใย และ สปอร์ โดยในกรณีการควบคุมการเจริญของเส้นใยต้องใช้ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน ในขณะที่การควบคุมการงอกของสปอร์ต้องการสารออกฤทธิ์เข้มข้นเพียง 100 ส่วนต่อล้าน

Fraction L14 และ L15 สามารถผสมกันได้โดยไม่ทำให้ประสิทธิภาพควบคุมเชื้อราลดลง เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์สำคัญเหมือนกัน คือ 1'-Acetoxychavicol acetate โดย L14 จะมีสารดังกล่าวมากกว่า คือ 81.01% ในขณะที่ L15 จะมีเพียง 30.30%

บทที่ 5

การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข้าว

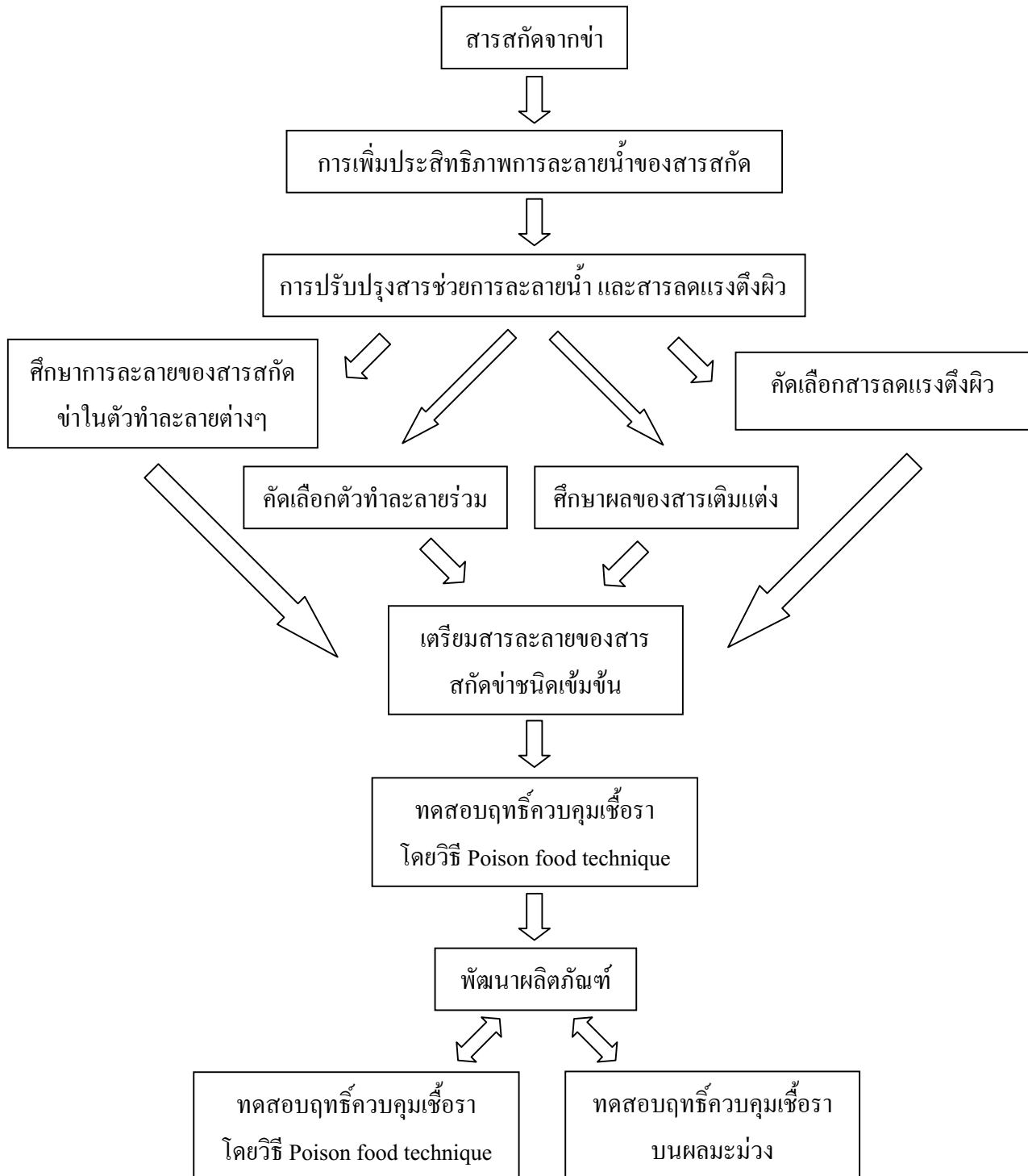
ในบทที่ 3 ได้รายงานถึงวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์จากเหง้าข้าวด้วย Dichloromethane และการแยก Fraction สารออกฤทธิ์ L14 และ L15 รวมทั้งได้ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารผสม L14+L15 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวเรียบร้อยแล้ว ในบทนี้จะเป็นการนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ดังกล่าวมาศึกษาเพิ่มเติม เพื่อหาแนวทางพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ ที่มีคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ดังได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข้าวที่ดีจะต้อง

1. มีประสิทธิภาพสูงและราคาถูกใกล้เคียงกับสารเคมี
2. มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราได้หลายชนิด นอกเหนือจาก *Colletotrichum gloeosporioides*
3. มีความคงตัวสูง เพื่อสามารถวางจำหน่ายในร้านเคมีเกษตรได้ประมาณ 1 ปี
4. มีความปลอดภัยต่อมนุษย์

การนำไปสู่ผลิตภัณฑ์ลักษณะดังกล่าวได้วางแนวทางศึกษาไว้ดังรายละเอียดแสดงในแผนภูมิที่ 5.1 ซึ่งแบ่งเป็นขั้นตอนการศึกษา 3 ขั้นตอนตามลำดับ คือ

- 1) ศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของสารที่จะช่วยให้ L14 และ L15 ละลายน้ำได้ดี และจับผิวผลมะม่วงได้ดี
- 2) ทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราและความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนผสมที่ได้
- 3) พัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์โดยใช้สารเติมแต่งและทดสอบฤทธิ์เป็นระยะๆ ทั้งฤทธิ์การควบคุมเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบนผลมะม่วง เพื่อปรับปรุงคุณภาพให้ดีขึ้นเป็นลำดับจนได้ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย

5.1 ขั้นตอนการศึกษาเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า



ภาพที่ 5.1 แผนภูมิขั้นตอนการศึกษาเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์พร้อมใช้จากสารออกฤทธิ์จากเหง้าข่า

5.2 การเพิ่มการละลายน้ำของสารสกัด L14 และ L15

สารสกัดจากข่าจะมีลักษณะเป็นน้ำมัน ดังนั้นการที่จะทำให้สารสกัดออกฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อราที่ผิวผลมะม่วงได้ดั่งนั้น จำเป็นต้องทำให้สารสกัดสามารถที่จะละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำได้ดี และสามารถที่จะเคลือบติดอยู่ที่ผิวของผลไม้ได้นาน หรือสามารถซึมผ่านชั้นของ Wax เข้าไปได้ จึงต้องมีการทดสอบหาสารเติมแต่งต่างๆ ที่ใช้ผสมกับสารออกฤทธิ์แล้วทำให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น หรืออย่างน้อยไม่ลดลงกว่าเดิม สามารถคงฤทธิ์อยู่ได้นาน

ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารละลายต่างๆ จะต้องศึกษาคุณสมบัติของตัวทำละลายที่จะนำมาใช้ ซึ่งหากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวใช้รับประทานจะต้องมั่นใจว่าตัวทำละลายที่เลือกใช้ไม่เป็นพิษ ตัวทำละลายที่นิยมใช้ได้แก่

น้ำ เป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้และมีราคาถูกที่สุด น้ำมีค่า Dielectric constant สูง สารที่ละลายน้ำเมื่อเก็บไว้นานอาจเสื่อมสภาพเนื่องจากเกิดขบวนการ Hydrolysis นอกจากนี้สารละลายดังกล่าวมีโอกาสปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย

Ethanol เป็นตัวทำละลายที่ใช้กันมาก รองลงมาจากน้ำ แต่มีข้อดีกว่าน้ำ คือ สารละลายที่มีสารอินทรีย์ละลายใน Ethanol จะคงสภาพอยู่ได้นานโดยไม่เกิดการสลาย นอกจากนี้ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ Ethanol มากพอจะไม่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ สารพวก Resine, น้ำมันระเหยง่าย, Alkaloid และ Glycoside สามารถละลายได้ใน Ethanol สารที่ไม่ละลายน้ำสามารถเพิ่มการละลายได้โดยใช้ส่วนผสม Ethanol เป็นตัวทำละลายร่วมผสม

Glycerin เป็นตัวทำละลายที่ดีชนิดหนึ่ง แต่ไม่นิยมใช้แทนน้ำและ Ethanol เนื่องจาก Glycerin มีความหนืดสูง หากใช้ Glycerin ในความเข้มข้นที่สูง จะมีฤทธิ์เป็นสารกันเสีย (Preservative) ได้ด้วย Glycerin สามารถละลายเกลือได้หลายชนิด สารสกัดจากพืช, ยางไม้ (Gum), Soluble carbohydrate และแป้ง (Starch) ก็สามารถละลายได้ใน Glycerin

Propylene glycol เป็นตัวทำละลายที่มักจะใช้ทดแทน Glycerin ซึ่ง Propylene glycol ผสมได้กับน้ำในทุกอัตราส่วน สามารถละลายน้ำมันหอมระเหยได้หลายชนิด แต่ผสมรวมกันได้กับน้ำมันที่ไม่ระเหย (Fixed oils) นอกจากนี้เป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ สารที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายเดี่ยวได้ สามารถเพิ่มการละลายโดยใช้ตัวทำละลายร่วมผสม หรือการใช้สารลดแรงตึงผิว

สำหรับการทดสอบสารเพิ่มประสิทธิภาพการละลายน้ำของ L14 และ L15 ในครั้งแรกนี้ คณะผู้วิจัยได้ทดลองใช้ **Petroleum oil** ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่ขอยสลายง่ายด้วยแสงอุตราไวโอเลต ก๊าซออกซิเจน และ จุลินทรีย์ต่างๆ ไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่น ไม่ตกค้างบนพืชศัตรูพืชสร้างความต้านทานได้ยาก (ชลิดา, 2541) โดยใช้เปรียบเทียบกับ Tween 20 ซึ่งเป็นสารจับใบที่นิยมใช้ในการเกษตรมากอยู่แล้ว

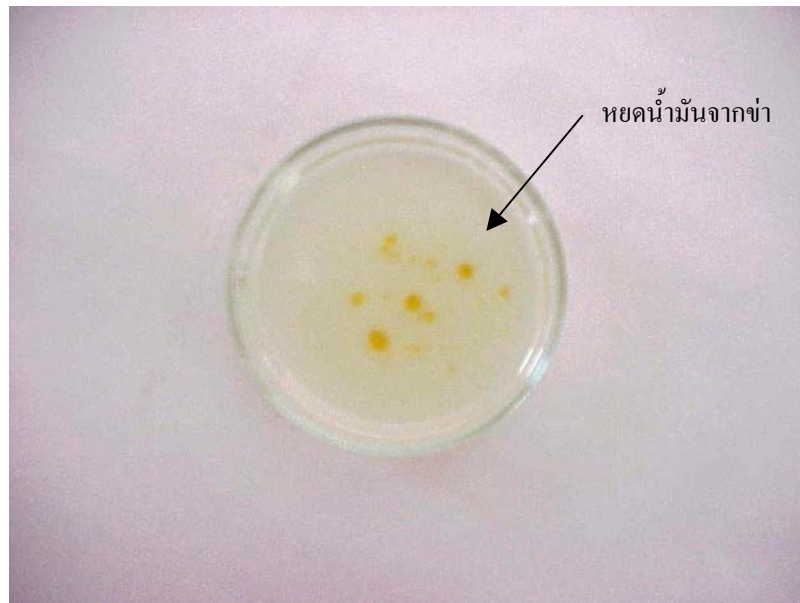
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการทดสอบสารที่จะนำมาผสมกับสารสกัด L14+L15 โดยเปรียบเทียบระหว่าง Petroleum oil (White oil) อัตราส่วน 30-40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (ตามคำแนะนำการใช้ข้างขวด) และ Tween 20 อัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ในการช่วยให้สารออกฤทธิ์ (L14+L15) ละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำได้ดี และมีความคงตัวอยู่ได้นาน

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองผสมสาร Petroleum oil (White oil) อัตราส่วน 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กับสารออกฤทธิ์ (L14+L15) พบว่า สามารถทำให้สารออกฤทธิ์สามารถรวมตัวกับน้ำได้ดี ซึ่งสารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองอ่อน ขุ่น แต่หากตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จะเกิดการแยกชั้นของสารเกิดขึ้น โดยชั้นบนจะเป็นสารออกฤทธิ์และ Petroleum oil (White oil) ลอยอยู่ แต่เมื่อเขย่าก็จะเกิดการรวมตัวกันอีกครั้งเช่นเดิม ส่วนการใช้สาร Tween 20 เป็นตัวผสมร่วมกับสารออกฤทธิ์ ปรากฏผลเช่นเดียวกัน คือ สามารถทำให้สารออกฤทธิ์รวมตัวกับน้ำได้ เป็นสารละลายสีเหลืองขุ่น แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จะเกิดการแยกชั้น มีหยดน้ำมันสีเหลืองกระจายอยู่ที่ผิวหน้าสารละลาย เมื่อเขย่า ก็สามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำได้อีกครั้ง แต่หากตั้งทิ้งไว้ นานสองสัปดาห์ ในทั้งสองการทดลองจะเห็นว่า มีหยดน้ำที่แยกชั้นเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเขย่า มีน้ำมันบางส่วนไม่สามารถจะรวมตัวกับน้ำได้ แยกชั้นอยู่ที่ด้านผิวหน้าของสารละลาย ดังภาพที่ 5.2

ดังนั้นถ้าใช้ Petroleum oil และ Tween 20 ก็สามารถใช้ได้ แต่จะต้องนำสารที่ทำการเตรียมแล้วไปใช้ทันทีหรือผสมแล้วก็ต้องนำไปใช้ทันที แต่คณะผู้วิจัยเห็นว่าต้องมีการปรับปรุงสูตรผสมใหม่เพื่อให้ได้สารละลายที่มีคุณสมบัติที่ดีกว่านี้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ปัจจุบันจะมีปัญหาด้าน Shelf life



ภาพที่ 5.2 หยดน้ำมันที่เกิดบนชั้นผิวหน้าสารละลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ และเขย่าแล้ว

5.3 การปรับปรุงสารช่วยการละลายน้ำ และสารลดแรงตึงผิว

จากการเกิดปัญหาการแยกชั้นของผลิตภัณฑ์เมื่อใช้ Petroleum oil และ Tween 20 เป็นตัวทำละลาย จึงได้ทดลองเพิ่มเติมเปรียบเทียบชนิดตัวทำละลายต่างชนิด ดังนี้

5.3.1 การศึกษาการละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายต่างๆ

จากผลการทดลองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราของสารสกัดข่าเบื้องต้น ดังได้รายงานไว้ในบทที่ 3 พบว่า สารสกัดหยาบจากข่าความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วงได้ ดังนั้นการหาค่าการละลายจึงเริ่มจากความเข้มข้นดังกล่าว

บรรจุตัวทำละลายชนิดต่างๆ จำนวน 2 กรัม ลงในขวดแก้วมีฝาปิดสนิท ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารสกัดข่าจำนวน 0.01 กรัม ลงในขวด พร้อมผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) หากสารสกัดข่าที่เติมลงไปละลายหมด จึงเติมสารสกัดข่าอีกครั้งละ 0.01 กรัม (ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมทุกครั้งหลังเติมสารสกัดข่า) จนกระทั่งสารละลายมีสารสกัดข่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ จึงหยุดเติมสารสกัดข่า

5.3.2 การคัดเลือกตัวทำละลายร่วม (Cosolvent)

ตัวทำละลายร่วม (Cosolvent) หมายถึง ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถรวมกับน้ำได้เพื่อเพิ่มการละลายของสารที่มีการละลายในน้ำได้น้อย หรือเพิ่มความคงสภาพของสารบางชนิด เนื่องจากสารที่ละลายน้ำเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลานานสารที่ละลายอยู่สามารถเสื่อมคุณภาพ เนื่องจากขบวนการ Hydrolysis ได้ ในการใช้ตัวทำละลายร่วมเพื่อเพิ่มการละลายของสารต่างๆ สิ่งที่สำคัญที่จะต้องพิจารณา คือ ความมีขั้ว (Polarity) ของสารละลาย ตัวชี้วัดความมีขั้วที่นิยมใช้มากชนิดหนึ่ง คือ ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (Dielectric constant, ϵ) ตัวทำละลายชนิดใดที่มีค่า Dielectric constant สูง แสดงว่ามีความมีขั้วมาก

เนื่องจากสารสกัดฆ่าละลายได้ดีใน Ethanol ซึ่งการใช้ Ethanol เพียงอย่างเดียวอาจไม่เหมาะสมในการเตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดฆ่าเพื่อใช้กับผลมะม่วง หากสามารถใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะทำให้ต้นทุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าลดลง จึงหาวิธีการเพิ่มการละลายของสารสกัดฆ่าในน้ำ โดยใช้ตัวทำละลายร่วม ระหว่าง น้ำ กับ Propylene glycol และ น้ำ กับ Ethanol

การทดลองเพื่อหาค่า Dielectric constant ของตัวทำละลายร่วมผสม ทำโดยใช้สารละลายผสม 2 ชนิด เช่น Propylene glycol กับ Ethanol ซึ่งสารสกัดฆ่าละลายได้ดี ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อให้ได้ค่า Dielectric constant ต่างๆ กัน นำสารสกัดฆ่าที่ทราบน้ำหนักแน่นอนมาละลายในตัวทำละลายร่วมผสมในปริมาตรจำกัดหนึ่ง สังเกตการละลายของสารสกัดในตัวทำละลายเหล่านั้น คัดเลือกตัวทำละลายร่วมผสมที่ละลายสารสกัดฆ่าได้ดี เพื่อคำนวณหาค่า Dielectric constant ของตัวทำละลายร่วมผสม ที่สามารถละลายสารสกัดฆ่าที่มีความเข้มข้นดังกล่าวได้ โดยแยกศึกษา ดังนี้

5.3.2.1 น้ำ และ Propylene glycol

ทดสอบการละลายของสารสกัดฆ่าในตัวทำละลายร่วม 2 ชนิด ทำโดยผสมน้ำ และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 เพื่อให้ได้ค่า Dielectric constant ต่างๆ ซึ่งตัวทำละลายร่วมผสมให้ได้ 7.96 กรัมใส่ในขวดแก้วมีฝาปิดสนิท ขนาด 20 มิลลิลิตร เติมสารสกัดฆ่า 0.04 กรัม ผสมกันด้วยเครื่องปั่นผสม ดูผลการละลายของสารสกัดฆ่า

5.3.2.2 น้ำ และ Ethanol

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.3.2.1 โดยใช้ตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Ethanol ในอัตราส่วน 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 1:2, 1:3 และ 1:4

5.3.2.3 Ethanol และ Propylene glycol

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.3.2.1 โดยใช้ตัวทำละลายร่วมผสมของ Ethanol และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4

5.3.2.4 น้ำ, Ethanol และ Propylene glycol

เมื่อทราบค่า Dielectric constant ของตัวทำละลายรวม 2 ชนิดที่ละลายสารสกัดเข้าได้ สามารถนำไปหาตัวทำละลายรวมอื่นๆ โดยเลือกตัวทำละลายรวมที่มีค่า Dielectric constant สูงกว่า และต่ำกว่าค่า Dielectric constant ที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเข้าที่คำนวณได้ เพื่อนำมาคำนวณ อัตราส่วนของ ตัวทำละลายรวมแต่ละอย่างโดยวิธีอัลลิเกชัน (Alligation method) (Stoklosa and Ansel, 1996) การเลือกใช้ตัวทำละลายรวมสามารถเลือกใช้ได้มากกว่า 2 ชนิด ในทางเภสัชกรรมการ เลือกตัวทำละลายรวมมากกว่า 2 ชนิด เพื่อต้องการลดปริมาณ Ethanol และเพื่อให้รสชาติของยา ดีขึ้น ในกรณีของผลิตภัณฑ์สารสกัดเข้าเพิ่ม Propylene glycol ลงในตัวทำละลายผสมของน้ำ และ Ethanol โดยคาดหวังให้สารสกัดเข้าติดผิวผลมะม่วงได้ดีขึ้น และไม่ทำให้ผิวผลมะม่วงเปลี่ยนสี

การคำนวณค่า Dielectric constant ของสารตัวทำละลายรวมผสม 3 ชนิด ทำโดยหาค่า Dielectric constant ของสารที่เลือกใช้จากที่มีรายงานไว้ (James, 1986) และคำนวณโดยวิธี Alligation

สาร	ค่า Dielectric constant
น้ำ	78.5
Propylene glycol	32.0
Ethanol	24.3

อัตราส่วนของตัวทำละลายรวมที่มีค่า Dielectric constant 29.43 คำนวณโดยวิธี Alligation

		สัดส่วนโดยน้ำหนัก	%โดยน้ำหนัก
น้ำ	78.5	2.57+5.13	7.7
Propylene glycol	32.0	49.07	46.36
Ethanol	24.3	49.07	46.36
		105.84	100.00

ทำการเตรียมตัวทำละลายรวมผสมของน้ำ, Propylene glycol และ Ethanol ในอัตราส่วน 7.7 : 49.07 : 49.07 กรัม โดยชั่งสารละลายแต่ละชนิดตามอัตราส่วนดังกล่าวผสมกัน ตัวทำละลายรวมผสมที่ได้มีค่า Dielectric constant เท่ากับ 29.43 แบ่งสารละลายดังกล่าวมา 7.96 กรัม เติมสารสกัดเข้า 0.04 กรัม ตรวจสอบการละลายได้ของสารสกัด

5.3.3 การใช้สารลดแรงตึงผิว (Surface active agents) ช่วยเพิ่มการละลาย

สารลดแรงตึงผิว เป็นสารประกอบที่มีส่วนที่ละลายน้ำและส่วนที่ละลายน้ำมันอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน นิยมใช้อย่างกว้างขวางในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง สารลดแรงตึงผิวนอกจากใช้เป็นสารช่วยเพิ่มการละลาย (Solubilizer) แล้ว ยังมีการใช้เป็นสารช่วยให้เปียก (Wetting agent) และเป็นสารที่ทำให้น้ำและน้ำมันผสมกันได้และคงสภาพอยู่ได้ สารลดแรงตึงผิวที่ทำหน้าที่นี้ เรียกว่า Emulsifier สารลดแรงตึงผิวที่นำมาศึกษาเพื่อช่วยเพิ่มการละลายของสารสกัดชาในตัวทำละลายต่างๆ คือ Tween 20 และ Polyethylene glycol 40 Hydrogenated Caster Oil (PEG-RH-40)

5.3.3.1 การหาความเข้มข้นของ PEG-RH-40 ที่สามารถละลายสารสกัดชาในน้ำ

เตรียมสารละลายสกัดชา 0.04 กรัม กับ น้ำ 5.97 กรัม เติม PEG-RH-40 ในปริมาณต่างๆ กันลงในสารละลายดังกล่าว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม และสังเกตการละลายของสารสกัดชา เพิ่มปริมาณ PEG-RH-40 จนกระทั่งสารสกัดชาละลายหมด

5.3.3.2 การหาความเข้มข้นของ Tween 20 ที่สามารถละลายสารสกัดชาในน้ำ

เตรียมสารละลายสกัดชา 0.04 กรัม กับ น้ำ 5.97 กรัม เติม Tween 20 ในปริมาณต่างๆ กันลงในสารละลายดังกล่าว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม และสังเกตการละลายของสารสกัดชา เพิ่มปริมาณ Tween 20 จนกระทั่งสารสกัดชาละลายหมด

5.3.3.3 การหาความเข้มข้นของ Tween 20 ที่สามารถละลายสารสกัดชาใน Glycerin

เตรียมสารละลายสกัดชา 0.03 กรัม กับ Glycerin 5.97 กรัม เติม Tween 20 ในปริมาณต่างๆ กัน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม และสังเกตการละลายของสารสกัดชา

5.3.3.4 การหาความเข้มข้นของ Tween 20 ที่สามารถละลายสารสกัดชา 0.5% ในตัวทำละลายร่วมของ น้ำ และ Propylene glycol ในอัตราส่วนต่างๆ

ในการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดชา อาจต้องใช้ตัวทำละลายร่วมผสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม จากการศึกษาการละลายของสารสกัดชาในตัวทำละลายร่วมของน้ำ และ Propylene glycol สารสกัดชาละลายได้บ้าง แต่ยังไม่ได้สารละลายใส หากเพิ่มสารลดแรงตึงผิวลงในสารละลายดังกล่าว จะทำให้สารสกัดชาละลายได้ดีขึ้น

เตรียมตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 2:1, 3:1 และ 4:1 แบ่งตัวทำละลายร่วมผสมที่ได้มา 7.96 กรัม ใส่ในขวดแก้วมีฝาปิดสนิท ขนาดเล็ก เติมสารสกัดชา 0.04 กรัม และ Tween 20 ในปริมาณต่างๆ จนกระทั่งสารสกัดชาละลายหมด ผสมกันโดยใช้เครื่องปั่นผสมทุกครั้งหลังการเติม Tween 20 สังเกตการละลายของสารสกัดชา

5.3.4 การศึกษาผลของสารเติมแต่ง (Additive) ในผลิตภัณฑ์

ในการใช้สารสกัดฆ่าจุลินทรีย์บนผลมะม่วงเพื่อป้องกันเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วง จำเป็นจะต้องทำให้สารสกัดฆ่าติดอยู่บนผลมะม่วงได้ หากสามารถติดอยู่นานขึ้น ก็จะเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อราได้ดีขึ้น เพื่อให้สารสกัดฆ่าติดผลมะม่วงได้นานขึ้น จึงหาสารที่สามารถเกาะติดผิวมะม่วงหลังจากตัวทำละลายระเหย สารที่นำมาศึกษาได้แก่ พวกไขมัน(Wax) เช่น ไขมันจากผึ้ง (Bees wax) ซึ่งละลายได้เล็กน้อยใน Ethanol แต่ไม่ละลายในน้ำ Polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) ซึ่งเป็นของแข็งที่มีลักษณะคล้ายไขมัน (Wax) ละลายได้ในน้ำ และ Alcohol

เตรียมตัวทำละลายร่วมผสมของ Ethanol และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1:1 แบ่งตัวทำละลายร่วมผสมที่ได้ในปริมาณ 10 กรัม นำไปใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กมีฝาปิดสนิท เติม Bees wax หรือ PEG 4000 นำไปอุ่นใน Water bath เล็กน้อย เพื่อให้ Bees wax และ PEG 4000 ละลายได้ง่าย ผสมด้วยเครื่องปั่นผสม จนกระทั่ง Bees wax และ PEG 4000 ละลายหมด เติมสารสกัดฆ่าและผสมให้เข้ากัน

5.3.5 การเตรียมสารละลายของสารสกัดฆ่าชนิดเข้มข้น

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วง พบว่า สารสกัดฆ่า 0.5% สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราดังกล่าวได้ ในการใช้สารละลายดังกล่าวเกษตรกรต้องใช้ในปริมาณมาก ไม่สะดวกในการขนส่งและเก็บรักษา หากสามารถเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อนำไปเจือจางด้วยน้ำก่อนใช้ก็จะเป็นการประหยัดเนื้อที่ในการเก็บรักษาและค่าขนส่ง นอกจากนี้เกษตรกรยังสามารถปรับความเข้มข้นของสารสกัดฆ่าได้ตามความต้องการ

เตรียมตัวทำละลายร่วมผสมของ Ethanol และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1:1 และแบ่งใส่ขวดแก้วขนาดเล็กที่มีฝาปิดสนิทเติมสารสกัดฆ่า แล้วจึงเติม Tween 20 หรือ PEG-RH-40 ที่เล็กน้อยจนกระทั่งได้สารละลายใส กรณีที่ในตำรับมี Bees wax ให้เติม Bees wax และนำไปอุ่นใน Water bath ให้ Bees wax ละลายก่อนเติม Tween 20 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมหลังการเติม Tween 20 หรือ PEG-RH-40 ทุกครั้ง สังเกตการละลายของสารสกัดฆ่า

ผลการทดลองและวิจารณ์

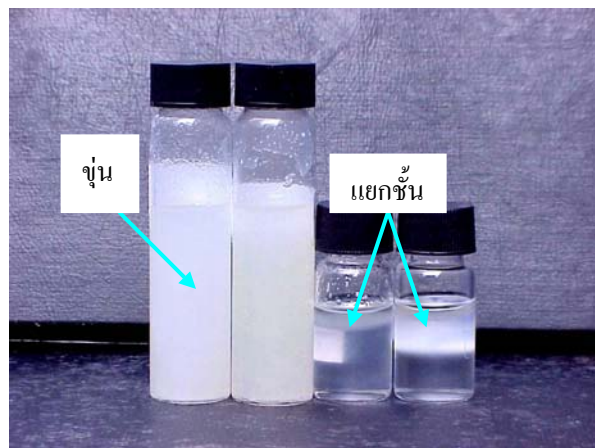
1. การละลายของสารสกัดฆ่าในตัวทำละลายต่างๆ

จากการทดลอง พบว่า สารสกัดฆ่าซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่ละลายได้ดีใน Ethanol , ละลายได้ใน Propylene glycol และ ละลายได้เล็กน้อยใน Glycerin สารสกัดฆ่าเมื่อผสมกับน้ำจะเห็นสารสกัดฆ่าแยกตัวลอยอยู่ที่ผิวของน้ำ ใน Ethanol สารสกัดฆ่าละลาย

ได้ดี ได้สารละลายสีเหลืองเข้ม ค่าการละลายของสารสกัดข่าใน Ethanol สูงกว่าที่ระบุในตารางที่ 5.1 แต่เนื่องจากสารละลายที่ต้องการใช้ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเชื้อจากมาก จึงหยุดทดสอบการละลายของสารสกัดข่าเมื่อมีความเข้มข้นถึง 0.5% (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 การละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลาย	ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม)	ปริมาณสารสกัดข่า (กรัม)	ผลการละลาย
น้ำ	2.00	0.01	ไม่ละลาย
Ethanol	2.00	0.01	ละลายได้ดีมาก
Propylene glycol	2.00	0.01	ละลาย
Glycerin	2.00	0.01	ละลายได้เล็กน้อย



ภาพที่ 5.3 ลักษณะของ Formulation ที่ไม่ดี (ขุ่น และ เกิดการแยกชั้น)



ภาพที่ 5.4 ลักษณะของ Formulation ที่ดี (ใส)

2. ผลการคัดเลือกตัวทำละลายร่วม

การละลายของสารสกัดข้าวในตัวทำละลายร่วมผสม 2 และ 3 ชนิด เพื่อเพิ่มการละลายของสารสกัดข้าว ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1) น้ำ และ Propylene glycol

น้ำ และ Propylene glycol ผสมกันได้ในทุกๆ อัตราส่วน ได้สารละลายใส เมื่อเติมสารสกัดข้าวลงในตัวทำละลายร่วม ได้สารละลายขุ่น แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้สารละลายจะใสขึ้น โดยสารสกัดข้าวส่วนที่ไม่ละลายจะลอยอยู่ที่ผิวของสารละลาย ในกรณีอัตราส่วนของน้ำ : Propylene glycol เท่ากับ 1:1 และจะขุ่นเล็กน้อยเมื่ออัตราส่วนของ Propylene glycol เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณสารสกัดข้าวที่ลอยอยู่ที่ผิวลดลง (ตารางที่ 5.2)

ตารางที่ 5.2 การละลายของสารสกัดข้าวในตัวทำละลายร่วมของน้ำ และ Propylene glycol

สารสกัดข้าว (กรัม)	อัตราส่วน น้ำ : Propylene glycol	ปริมาณตัวทำละลายร่วม (กรัม)	ลักษณะของสารละลาย *
0.04	1 : 1	7.96	สารละลายสีเหลืองใส มีสารสกัดข้าว ที่ไม่ละลายลอยอยู่ที่ผิว
0.04	1 : 2	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น มีสารสกัดข้าว ที่ไม่ละลายลอยอยู่ที่ผิว +
0.04	1 : 3	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น มีสารสกัดข้าว ที่ไม่ละลายลอยอยู่ที่ผิว ++
0.04	1 : 4	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น มีสารสกัดข้าว ที่ไม่ละลายลอยอยู่ที่ผิว ++

* + ขุ่นน้อยมาก

++ ขุ่นน้อย



ก ข ค ง

ภาพที่ 5.5 ลักษณะการละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายร่วมของน้ำ และ Propylene glycol

ก. น้ำ : Propylene glycol 1:1

ข. น้ำ : Propylene glycol 1:2

ค. น้ำ : Propylene glycol 1:3

ง. น้ำ : Propylene glycol 1:4

2) น้ำ และ Ethanol

สารสกัดข่าละลายในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Ethanol ได้ดีกว่าตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Propylene glycol เมื่ออัตราส่วนของ Ethanol สูง และอัตราส่วนของน้ำในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Ethanol เพิ่มขึ้นจาก 1 : 1 เป็น 2 : 1 , 3 : 1 และ 4 : 1 การละลายของสารสกัดข่าลดลง เมื่อตั้งสารละลายทิ้งไว้ สารสกัดข่าที่ไม่ละลายจะแยกตัวตกตะกอน เมื่ออัตราส่วนของ Ethanol ในตัวทำละลายร่วมผสมเพิ่มขึ้นจาก 1 : 1 เป็น 1 : 2 , 1 : 3 และ 1 : 4 สารละลายขุ่น แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้สารสกัดข่าจะตกตะกอน สารละลายส่วนที่ใสจะมีสีเข้มขึ้นตามปริมาณของ Ethanol ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณ Ethanol ที่ใช้ในการทดลองยังไม่สามารถทำให้สารสกัดข่าละลายได้อย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 5.3)

ตารางที่ 5.3 การละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Ethanol

สารสกัดข่า (กรัม)	อัตราส่วน น้ำ : Ethanol	ปริมาณตัวทำละลายร่วมผสม (กรัม)	ลักษณะของสารละลาย *
0.04	1 : 1	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น +
0.04	2 : 1	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น +
0.04	3 : 1	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น ++
0.04	4 : 1	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น ++
0.04	1 : 2	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น ++
0.04	1 : 3	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น +
0.04	1 : 4	7.96	สารละลายสีเหลืองขุ่น +

* สารละลายทุกตำรับเมื่อตั้งทิ้งไว้จะใสและมีสารสกัดข่าที่ไม่ละลายตกตะกอนเล็กน้อย

+ ขุ่นเล็กน้อย

++ ขุ่นน้อย



1:1 1:2 1:3 1:4

ภาพที่ 5.6 ลักษณะการละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Ethanol

3) Ethanol และ Propylene glycol

จากการทดลอง พบว่า สารสกัดฆ่าละลายได้ดีในตัวทำละลายร่วมของ Ethanol และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 เมื่อปริมาณ Propylene glycol เพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วน 1:3 สารละลายที่ได้เริ่มขุ่นเล็กน้อย และเมื่อเพิ่มขึ้นอีกเป็นอัตราส่วนของ Ethanol : Propylene glycol เป็น 1:4 สารละลายที่ได้ขุ่นมากขึ้น (ตารางที่ 5.4)

ตารางที่ 5.4 การละลายของสารสกัดฆ่าในตัวทำละลายร่วมของ Ethanol และ Propylene glycol

สารสกัดฆ่า (กรัม)	อัตราส่วน Ethanol : Propylene glycol	ปริมาณตัวทำละลายร่วม (กรัม)	ลักษณะของสารละลาย
0.04	1 : 1	7.96	สารละลายใส
0.04	1 : 2	7.96	สารละลายใส
0.04	1 : 3	7.96	สารละลายขุ่นเล็กน้อย
0.04	1 : 4	7.96	สารละลายขุ่น

จากผลการละลายดังกล่าวสามารถนำไปคำนวณค่า Dielectric constant ของสารละลายที่ทำให้ สารสกัดฆ่าละลายได้ดี และสามารถนำไปคำนวณหาตัวทำละลายร่วมอื่นๆ ที่สามารถละลายสารสกัด-ฆ่าได้ ดังนี้

สารละลายที่ใช้ Ethanol ต่ำสุด ที่ยังคงได้สารละลายใส คือ Ethanol : Propylene glycol อัตราส่วน 1 : 2

$$\text{ค่า Dielectric constant ของ Ethanol} = 24.3$$

$$\text{ค่า Dielectric constant ของ Propylene glycol} = 32.0$$

ค่า Dielectric constant ของ สารละลายร่วม Ethanol : Propylene glycol 1 : 2 ซึ่งเท่ากับผลรวมสัดส่วนโดยน้ำหนักของตัวทำละลายแต่ละชนิดคูณด้วยค่า Dielectric constant ของตัวทำละลายชนิดนั้น

$$\begin{aligned}
 &= \frac{33.33}{100} \times 24.3 + \frac{66.67}{100} \times 32 \\
 &= 8.10 + 21.33 \\
 &= 29.43
 \end{aligned}$$

$$\text{ค่า Dielectric constant ของสารละลายร่วมผสมที่ละลายสารสกัดฆ่าได้} = 29.43$$

4) น้ำ, Ethanol และ Propylene glycol

การทดสอบการละลายของสารสกัดข้าวในตัวทำละลายร่วมผสม 3 ชนิด พบว่า สารสกัดข้าว 0.5 % ละลายได้ในตัวทำละลายร่วมผสมที่มีค่า Dielectric constant 29.43 ซึ่งประกอบด้วย น้ำ , Ethanol และ Propylene glycol ในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก เท่ากับ 7.7 : 49.07 : 49.07

3. การใช้สารลดแรงตึงผิว (Surface active agent) ช่วยเพิ่มการละลาย

สารลดแรงตึงผิวที่นำมาศึกษาได้แก่ Tween 20 และ Polyethylene glycol 40 Hydrogenated Castor Oil (PEG-RH-40) การใช้สารลดแรงตึงผิวนอกจากช่วยละลายสารสกัดข้าวแล้ว คาดว่าจะทำให้สารละลายของสารสกัดข้าวเกาะติดผิวมะม่วง ซึ่งมีไขมันบนผิวได้

1) ความเข้มข้นของ PEG-RH-40 ที่สามารถละลายสารสกัดข้าวในน้ำ

PEG-RH-40 สามารถเพิ่มการละลายของสารสกัดข้าว 0.68% ในน้ำได้โดยใช้ความเข้มข้นสูงถึงประมาณ 27% ในสารละลาย PEG-RH-40 ในปริมาณน้อยกว่า 27% สามารถละลายสารสกัดข้าวได้ บางส่วน ได้สารละลายสีเหลืองเมื่อตั้งทิ้งไว้จะได้สารละลายสีเหลืองใส แต่มีสารสกัดข้าวที่ไม่ละลายลอยอยู่ที่ผิว เมื่อความเข้มข้นของ PEG-RH-40 เพิ่มขึ้น 1.60 – 2.00 กรัม จะได้สารละลายสีเหลืองขุ่น เมื่อตั้งทิ้งไว้จะได้สารละลายแยก 2 ชั้น ชั้นล่างใส ส่วนชั้นบนจะขุ่น แต่ไม่มีสารสกัดข้าวแยกออกมาลอยอยู่ที่ผิวของสารละลาย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PEG-RH-40 ถึง 2.20 กรัม หรือประมาณ 27% จะได้ สารละลายสีเหลืองใส สารสกัดข้าวละลายได้อย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 5.5)

ตารางที่ 5.5 ผลของ PEG-RH-40 ต่อการละลายของสารสกัดข้าวในน้ำ

สารสกัดข้าว (กรัม)	น้ำ (กรัม)	PEG-RH-40 (กรัม)	ลักษณะของสารละลาย *
0.04	5.97	0.20	สารละลายสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย มีสารสกัดข้าวลอยอยู่ที่ผิว +
0.04	5.97	0.40	สารละลายสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย มีสารสกัดข้าวลอยอยู่ที่ผิว +
0.04	5.97	0.80	สารละลายสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย มีสารสกัดข้าวลอยอยู่ที่ผิว +
0.04	5.97	1.20	สารละลายสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย มีสารสกัดข้าวลอยอยู่ที่ผิว +
0.04	5.97	1.60	สารละลายสีเหลืองขุ่น ++
0.04	5.97	1.80	สารละลายสีเหลืองขุ่น ++
0.04	5.97	2.00	สารละลายสีเหลืองขุ่น ++
0.04	5.97	2.20	สารละลายสีเหลืองใส

* + สารละลายขุ่นน้อยมาก

++ สารละลายขุ่นน้อย



ก ข ค ง

ภาพที่ 5.7 ผลของ PEG-RH-40 ต่อการละลายของสารสักดข้าในน้ำ

- ก. น้ำ : PEG-RH-40 5.97:0.2
- ข. น้ำ : PEG-RH-40 5.97:1.2
- ค. น้ำ : PEG-RH-40 5.97:2.0
- ง. น้ำ : PEG-RH-40 5.97:2.2

2) ความเข้มข้นของ Tween 20 ที่สามารถละลายสารสักดข้าในน้ำ

Tween 20 สามารถเพิ่มการละลายของสารสักดข้าได้เช่นเดียวกัน แต่ประสิทธิภาพในการช่วยละลายน้อยกว่า PEG-RH-40 เมื่อใช้ PEG-RH-40 0.04 กรัม สารสักดข้าละลายได้เล็กน้อย ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน แต่มีสารสักดข้าที่ไม่ละลายแยกอยู่ที่ผิว เมื่อปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้น ปริมาณสารสักดข้าที่แยกออกอยู่ที่ผิวจะน้อยลง จนกระทั่งไม่มีสารสักดข้าแยกออกอยู่ที่ผิวให้เห็น แต่สารละลายที่ได้จะขุ่นเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการผสมเข้ากันได้ของสารสักดข้าและตัวทำละลายได้มากขึ้น เมื่อตั้งทิ้งไว้จะได้สารละลายใส โดยมีส่วนที่ไม่ละลายลอยอยู่ที่ผิวมองเห็นชัดเจน ในกรณีมี Tween 20 ความเข้มข้นต่ำ แต่มองเห็นเป็นชั้นลอยอยู่ที่ผิว ในกรณีมี Tween 20 ความเข้มข้นสูง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 20 ถึง 2.30 กรัม หรือประมาณ 30% ในตัวทำละลาย จึงสามารถละลายสารสักดข้าได้อย่างสมบูรณ์ ได้สารละลายสีเหลืองใส (ตารางที่ 5.6)

ตารางที่ 5.6 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดข่าในน้ำ

สารสกัดข่า (กรัม)	น้ำ (กรัม)	Tween 20 (กรัม)	ลักษณะของสารละลาย *
0.04	5.97	0.40	สารละลายสีเหลืองขุ่น มีสารสกัดข่าลอยอยู่ที่ผิว +
0.04	5.97	0.80	สารละลายสีเหลืองขุ่น มีสารสกัดข่าลอยอยู่ที่ผิว ++
0.04	5.97	1.20	สารละลายสีเหลืองขุ่น +++
0.04	5.97	1.60	สารละลายสีเหลืองขุ่น +++
0.04	5.97	1.80	สารละลายสีเหลืองขุ่น +++
0.04	5.97	2.00	สารละลายสีเหลืองขุ่น +++
0.04	5.97	2.20	สารละลายสีเหลืองขุ่น +++
0.04	5.97	2.50	สารละลายสีเหลืองใส

* +++ สารละลายขุ่นปานกลาง

++ สารละลายขุ่นน้อย

+ สารละลายขุ่นน้อยมาก



ก ข ค ง

ภาพที่ 5.8 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดข่าในน้ำ

ก. น้ำ : Tween 20 5.97:0.4

ข. น้ำ : Tween 20 5.97:1.80

ค. น้ำ : Tween 20 5.97:2.20

ง. น้ำ : Tween 20 5.97:2.50

3) ความเข้มข้นของ Tween 20 ที่สามารถจะละลายสารสกัดฆ่า 0.5% ใน Glycerin

Tween 20 สามารถเพิ่มการละลายของสารสกัดฆ่าใน Glycerin หากไม่เติม Tween 20 สารสกัดฆ่าละลายได้บ้างใน Glycerin แต่ยังไม่มองเห็นส่วนที่ไม่ละลายกระจายตัวอยู่ใน Glycerin เมื่อเติม Tween 20 0.72 กรัม หรือมากกว่า จะทำให้สารสกัดฆ่า 0.5% ละลายได้ใน Glycerin

ตารางที่ 5.7 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดฆ่าใน Glycerin

สารสกัดฆ่า (กรัม)	Glycerin (กรัม)	Tween 20 (กรัม)	ลักษณะของการ ละลาย
0.03	5.97	0.50	ละลายบางส่วน
0.03	5.97	0.72	ละลาย
0.03	5.97	0.80	ละลาย

4) หาความเข้มข้นของ Tween 20 ที่สามารถละลายสารสกัดฆ่า 0.5% ในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Propylene glycol ในอัตราส่วนต่างๆ

สารสกัดฆ่าซึ่งละลายได้น้อยในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Propylene glycol สามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อเติม Tween 20 ลงในสารละลาย แม้จะได้สารละลายสีเหลืองขุ่นแต่ไม่มีสารสกัดฆ่าที่ไม่ละลายแยกลอยอยู่ที่ผิวของสารละลายเลย เมื่ออัตราส่วนของ Propylene glycol ในตัวทำละลายร่วมผสมมากขึ้น จะใช้ปริมาณ Tween 20 ลดลงในการละลายสารสกัดฆ่า ในทางตรงกันข้าม เมื่อ อัตราส่วนของน้ำในตัวทำละลายร่วมผสมเพิ่มขึ้น จะใช้ปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ Tween 20 มีผลต่อการละลายของสารสกัดฆ่ามากกว่าปริมาณ Propylene glycol ในตัวทำละลายร่วมผสม (ตารางที่ 5.8) การใช้ Tween 20 นอกจากจะช่วยเพิ่มการละลายของสารสกัดฆ่าเพื่อให้ได้สารละลายใสมองดูสวยงามน่าใช้แล้ว ยังจะช่วยเพิ่มให้สารสกัดฆ่าติดผิวมะม่วงซึ่งมี Wax เคลือบอยู่ได้ดีขึ้น

ตารางที่ 5.8 ผลของ Tween 20 ต่อการละลายของสารสกัดข้าว ในตัวทำละลายร่วมผสมของน้ำ และ Propylene glycol

สารสกัดข้าว (กรัม)	อัตราส่วน น้ำ : Propylene glycol	ปริมาณตัวทำละลาย ร่วมผสม(กรัม)	ปริมาณ Tween 20 (กรัม)	ลักษณะของสารละลาย *
0.04	1 : 1	7.96	0.14	สารละลายสีเหลืองขุ่น++
0.04	1 : 2	7.96	0.06	สารละลายสีเหลืองขุ่น+
0.04	1 : 3	7.96	0.06	สารละลายสีเหลืองขุ่น++
0.04	1 : 4	7.96	0.06	สารละลายสีเหลืองขุ่น++
0.04	2 : 1	7.96	0.56	สารละลายสีเหลืองใส
0.04	3 : 1	7.96	0.62	สารละลายสีเหลืองใส
0.04	4 : 1	7.96	2.00	สารละลายสีเหลืองใส

* + สารละลายขุ่นน้อยมาก

++ สารละลายขุ่นน้อย

4. ผลของสารเติมแต่ง (Additive) ในผลิตภัณฑ์

เพื่อให้สารสกัดจากข้าวติดผิวผลมะม่วงได้นานขึ้น สารเติมแต่งที่นำมาทดลองได้แก่ Bees wax และ Polyethylene glycol 4000 (PEG-4000)

จากการทดลอง พบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวในตัวทำละลายร่วมผสมของ Propylene glycol และ Ethanol โดยมี Bees wax และ Polyethylene glycol 4000 เป็นสารเติมแต่ง มีลักษณะเป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน (ตารางที่ 5.9)

ตารางที่ 5.9 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดข้าวเพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง

สูตรที่	สารสกัดข้าว (กรัม)	ตัวทำละลายร่วม* (กรัม)	Bees wax (กรัม)	PEG 4000 (กรัม)	ลักษณะสารละลาย
4.1	0.05	9.95	-	-	สารละลายใส
4.2	0.05	9.90	0.05	-	สารละลายใส
4.3	0.05	9.90	-	0.05	สารละลายใส
4.4	0.05	9.90	-	0.05	สารละลายใส

* ตัวทำละลายร่วมของ Ethanol และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1 : 1 ยกเว้นสูตรที่ 4.1 อัตราส่วน 1 : 1.8

5. การเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารสกัดข่ามากขึ้น

สารละลายสารสกัดข่าที่มี Tween 20 เป็นสารช่วยละลาย หากความเข้มข้นของ Tween 20 มากพอจะได้สารละลายใส เมื่อลดปริมาณของ Tween 20 ลง จะทำให้สารละลายที่ได้ขุ่นเล็กน้อย ซึ่งเมื่อตั้งทิ้งไว้จะได้สารละลายใส และมีตะกอนขนาดเล็กจำนวนมาก ในตำรับที่มี Bees wax กับ Propylene glycol และ Ethanol เกิดเป็นอิมัลชันขุ่นขาว เมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้น โดยมีสีขาวขุ่นอยู่ชั้นบนและสารละลายใสอยู่ด้านล่าง แต่สามารถเขย่าให้รวมเป็นเนื้อเดียวกันได้ ในกรณีที่ใช้ PEG-RH-40 เป็นตัวช่วยละลายแทน Tween 20 พบว่า PEG-RH-40 ในความเข้มข้นที่ศึกษา สามารถละลายสารสกัดข่าได้หมด ได้สารละลายสีเหลืองใส (ตารางที่ 5.10)

ตารางที่ 5.10 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดข่าชนิดเข้มข้น

สูตรที่	สารสกัดข่า (กรัม)	ตัวทำละลายรวม (กรัม)	Tween 20 (กรัม)	PEG-RH-40 (กรัม)	Bees wax (กรัม)	ลักษณะสารละลาย *
5.1	0.12	11.42	3.46	-	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.2	0.12	12.36	2.52	-	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.3	0.14	13.50	1.36	-	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.4	0.14	14.14	0.71	-	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.5	0.15	14.53	0.32	-	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.6	0.12	13.62	1.26	-	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.7	0.12	13.50	1.26	-	0.12	ขุ่นขาว +++++
5.8	0.12	12.24	2.54	-	2.54	ขุ่นขาว +++++
5.9	0.25	12.25	2.50	-	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.10	0.26	12.85	-	1.89	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.11	0.62	11.86	-	2.52	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.12	0.64	12.25	-	2.11	-	สารละลายสีเหลืองใส
5.13	0.64	12.07	-	2.29	-	สารละลายสีเหลืองใส

* +++++ สารละลายขุ่นมาก

สรุปสูตรผสมที่คัดเลือกไว้และความปลอดภัยเมื่อใช้เคลือบผลไม้

สารสกัดชาสามารถเตรียมในรูปสารละลาย ซึ่งสามารถเจือจางด้วยน้ำได้ โดยใช้ตัวทำละลายร่วมผสมและสารลดแรงตึงผิว ตัวทำละลายร่วมผสมที่เหมาะสม ได้แก่ Ethanol และ Propylene glycol

สารลดแรงตึงผิวที่ศึกษาทั้ง Tween 20 และ PEG-RH-40 สามารถเพิ่มการละลายของสารสกัดชาในน้ำและตัวทำละลายร่วมผสม ทั้ง Tween 20 และ PEG-RH-40 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนละลายน้ำได้ในโมเลกุลมากกว่าส่วนที่ละลายในน้ำมัน จากการทดลอง พบว่า จะต้องใช้ Tween 20 และ PEG-RH-40 ในปริมาณค่อนข้างสูง จึงจะสามารถละลายสารสกัดชาได้สารละลายใส โดยมีสูตรผสมที่เหมาะสม ดังนี้

ตารางที่ 5.11 สูตรผสมที่คัดเลือกไว้

สูตรที่	สารสกัดชา (กรัม)	ตัวทำละลายร่วม (กรัม)	Tween 20 (กรัม)	PEG-RH-40 (กรัม)
1	0.12	12.36	2.52	-
2	0.25	12.25	2.50	-
3.1	0.26	12.85	-	1.89
3.2	0.64	12.07	-	2.29

ทั้ง Tween 20 และ PEG-RH-40 เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอาหาร ยา และเครื่องสำอางค์ LD₅₀ ของ Tween 20 ในหนูให้ทางปาก เท่ากับ 37 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ส่วน LD₅₀ ของ PEG-RH-40 ในหนูให้ทางปาก เท่ากับ มากกว่า 16 กรัม ต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม (Kibbe, 2000) ฉะนั้นแล้วจะต้องใช้ Tween 20 และ PEG-RH-40 ในปริมาณค่อนข้างสูง ในการช่วยละลายสารสกัดชา ก็จะไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษแต่อย่างใด

สารเติมแต่งเพื่อช่วยให้สารสกัดชาติดผิวผลไม้ได้ดีที่นำมาศึกษาสามารถละลายได้ในตัวทำละลายร่วมผสมของ Propylene glycol และ Ethanol ด้วย

ตำรับสารละลายสารสกัดชาในตัวทำละลายร่วมผสมที่ใส และรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งที่มีความเข้มข้นของสารสกัดชาต่างกัน และ/หรือ มีสารลดแรงตึงผิวต่างกัน จะคัดเลือกเพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วงต่อไป

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของ Formulation ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำผลิตภัณฑ์ (Formulation) สูตรต่างๆ มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้าน ผสมในอาหาร PDA ที่ทำให้เย็น เจาะเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร โดยเจาะบริเวณรอบๆ โคลนินเพื่อให้ได้เส้นใยใหม่ที่กำลังเจริญ จากนั้นใช้เข็มเย็บที่ผ่านการลนไฟมาเชื้อแล้ว ทำการย้ายชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใยเชื้อราไปวางบนจานอาหาร โดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยให้สัมผัสกับอาหาร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานเปรียบเทียบกับ (Control) แล้วจึงทำการวัดขนาดของโคลนินคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง ตามสูตรคำนวณที่แนะนำโดยธรรมศักดิ์ (2538)

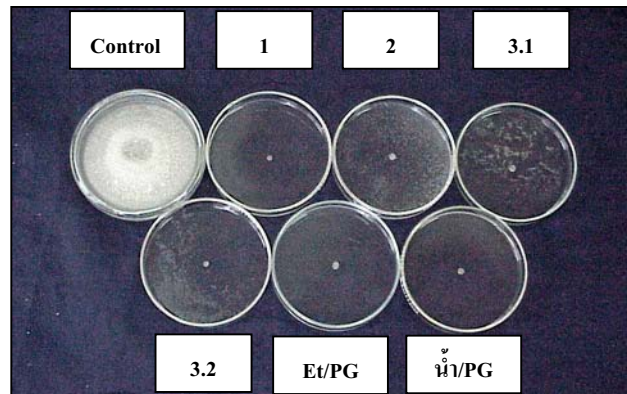
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า ผลิตภัณฑ์ (Formulation) ทุกสูตรสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้าน (ตารางที่ 5.12) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอนุวัฒน์ (2545) ที่พบว่า สารสกัดหยาบ และสาร L14 ที่ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้านสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสังเกตอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารหลังจากทำการผสมผลิตภัณฑ์ (Formulation) กับอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) แล้วรอให้เย็น พบว่า ในสูตร 2, 3.1, 3.2 จะเห็นเป็นคราบสีขาวเกิดขึ้น (ภาพที่ 5.9)

ตารางที่ 5.12 ผลการทดสอบ Formulation ความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้าน ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Colletotrichum gloeosporioides*

สูตร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	หมายเหตุ
Control	0	-
1	100	-
2	100	เมื่อผสมกับ PDA แล้ว เห็นเป็นคราบสีขาวขุ่น
3.1	100	เมื่อผสมกับ PDA แล้ว เห็นเป็นคราบสีขาวขุ่น
3.2	100	เมื่อผสมกับ PDA แล้ว เห็นเป็นคราบสีขาวขุ่น
Et/PG ^{1/}	100	-
น้ำ/PG	100	-

^{1/} Et = Ethanol , PG = Propylene glycol



ภาพที่ 5.9 ผลการทดสอบ Formulation ความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้านในการยับยั้งการเจริญของ
เส้นใย *Colletotrichum gloeosporioides*

สรุปผลการทดลอง

ผลิตภัณฑ์ (Formulation) ทุกสูตรที่ความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้านสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

5.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ (Formulation) ชนิดเข้มข้น

ในการเตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่าเพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า สารสกัดจากข่าความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วงได้ 100% ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ดังกล่าวควรที่จะทำในรูปแบบสารละลายเข้มข้น เพื่อลดต้นทุนในการขนส่งและการเก็บรักษา และเกษตรกรสามารถนำไปผสมน้ำใช้ในความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการและตามความรุนแรงของโรค

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

5.5.1 การเตรียมสารละลายจากการสกัดข่าชนิดเข้มข้น

ผสมสารสกัดข่าและสารช่วยทำละลายซึ่งได้แก่ Tween 20 และ PEG-RH-40 เติมตัวทำละลายร่วมของ Ethanol และ Propylene glycol ในอัตราส่วน 1:1 คนผสมให้ได้สารละลายในส่วนประกอบของตำรับสารสกัดข่าชนิดเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 5.13 และ 5.14

ตารางที่ 5.13 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดชาชนิดเข้มข้น

ตำรับที่	สารสกัดชา (%)	ตัวทำละลายร่วม* (%)	Tween 20 (%)	PEG-RH-40 (%)
ก	0.80	76.13	23.07	-
ข	0.80	90.80	8.40	-
ค	1.67	81.66	16.67	-
ง	1.73	85.67	-	12.60
จ	4.13	79.07	-	16.80

* ตัวทำละลายร่วม Ethanol : Propylene glycol = 1:1

ตารางที่ 5.14 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดชาชนิดเข้มข้นที่ใช้สารช่วยละลายต่างกัน

ตำรับที่	สารสกัดชา (%)	ตัวทำละลายร่วม (%)	Tween 20 (%)	PEG-RH-40 (%)
จ	4.13	79.07	-	16.80
จ*	4.13	79.07	16.80	-
ฉ	4.13	55.87	40.00	-

ตำรับที่ใช้ทดสอบกับผลมะม่วง ตำรับที่ จ = สูตร E และ ตำรับที่ จ* = สูตร A

ผลการทดลองและวิจารณ์

สารละลายสกัดชาชนิดเข้มข้นที่เตรียมได้ทุกตำรับมีลักษณะเป็นสารละลายสีเหลืองใส ผสมรวมกับน้ำได้ดี ซึ่งจะได้นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และทดสอบการป้องกันโรคดังกล่าวในผลมะม่วงต่อไป



ภาพที่ 5.10 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ชาชนิดเข้มข้น สูตร A และ สูตร E

5.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

จากการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของ Formulation ที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ส่วนต่อล้าน ต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า สามารถควบคุมการเจริญเส้นใยเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทดสอบกับเชื้อราทั้งหมด 5 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ที่ระดับความเข้มข้น 100, 500, 1,000 และ 2,500 ส่วนต่อล้าน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำผลิตภัณฑ์ (Formulation) สูตร A และ สูตร E ซึ่งได้คัดเลือกมาจาก Formulation หลากๆ สูตรที่ได้ทำการพัฒนาแล้ว มาเตรียมให้มีระดับความเข้มข้น 100, 500, 1,000 และ 2,500 ส่วนต่อล้าน ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) ที่ง้วนให้เย็นหรือสังเกตดูว่าอาหารแข็งตัวแล้ว จากนั้นเจาะเส้นใยของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดด้วย Cork borer โดยเจาะบริเวณรอบๆ โคโลนี หลังจากนั้นใช้เข็มเย็บที่ผ่านการนไฟฆ่าเชื้อแล้วทำการย้ายชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใยเชื้อราไปวางบนจานอาหาร โดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยให้สัมผัสกับอาหาร เลียงไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญเต็มจานเปรียบเทียบกับ (Control) แล้วจึงทำการวัดขนาดของโคโลนี คำนวณหาร้อยละของการยับยั้งตามสูตรคำนวณที่แนะนำโดยธรรมศักดิ์ (2538)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลอง พบว่า Formulation ทั้งสูตร A และ สูตร E สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ได้ ในระดับดีมาก โดยที่ระดับความเข้มข้น 1,000-2,000 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ได้อย่างสมบูรณ์

ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน สูตร E สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* Pat และ *Phomopsis mangiferae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อราอีก 2 ชนิด คือ *Dothiorella dominicana* และ *Aspergillus niger* สามารถยับยั้งได้ 71.39 และ 81.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนต่อล้าน พบว่า สูตร E สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดได้ 16.67 – 90.97 เปอร์เซ็นต์

สำหรับสูตร A นั้น พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* Pat ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อราอีก 4 ชนิด สามารถยับยั้งได้ 74.03 – 86.67 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดได้ 17.22 – 64.31 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5.15-5.19)

ตารางที่ 5.15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
	สูตร A	สูตร E
Control	0d ^{1/}	0c
100 ส่วนต่อล้าน	35.14c	35.14b
500 ส่วนต่อล้าน	74.03b	100a
1,000 ส่วนต่อล้าน	100a	100a
2,500 ส่วนต่อล้าน	100a	100a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 5.16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* Pat

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat	
	สูตร A	สูตร E
Control	0c ^{1/}	0c
100 ส่วนต่อล้าน	39.31b	90.97b
500 ส่วนต่อล้าน	100a	100a
1,000 ส่วนต่อล้าน	100a	100a
2,500 ส่วนต่อล้าน	100a	100a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 5.17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Dothiorella dominicana*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Dothiorella dominicana</i>	
	สูตร A	สูตร E
Control	0b ^{1/}	0d
100 ส่วนต่อล้าน	17.22b	16.67c
500 ส่วนต่อล้าน	83.33a	71.39b
1,000 ส่วนต่อล้าน	100a	100a
2,500 ส่วนต่อล้าน	100a	100a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 5.18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phomopsis mangiferae*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Phomopsis mangiferae</i>	
	สูตร A	สูตร E
Control	0d ^{1/}	0c
100 ส่วนต่อล้าน	48.33c	72.22b
500 ส่วนต่อล้าน	80.97b	100a
1,000 ส่วนต่อล้าน	100a	100a
2,500 ส่วนต่อล้าน	100a	100a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 5.19 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus niger*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Aspergillus niger</i>	
	สูตร A	สูตร E
Control	0d ^{1/}	0d
100 ส่วนต่อล้าน	64.31c	73.33c
500 ส่วนต่อล้าน	86.67b	81.53b
1,000 ส่วนต่อล้าน	100a	100a
2,500 ส่วนต่อล้าน	100a	100a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



สูตร A



สูตร E

ภาพที่ 5.11 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

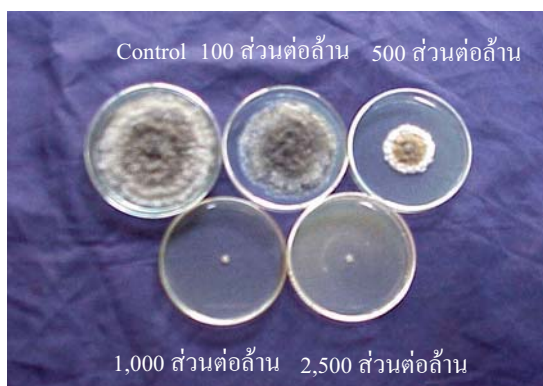


สูตร A

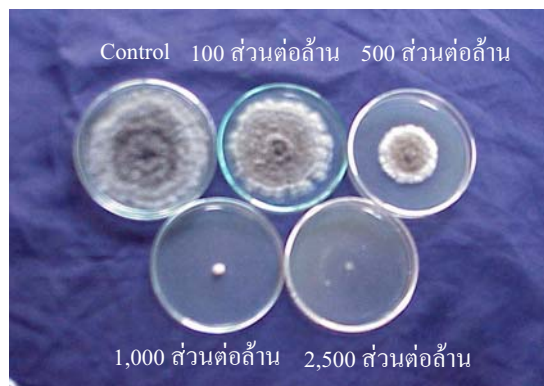


สูตร E

ภาพที่ 5.12 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* Pat

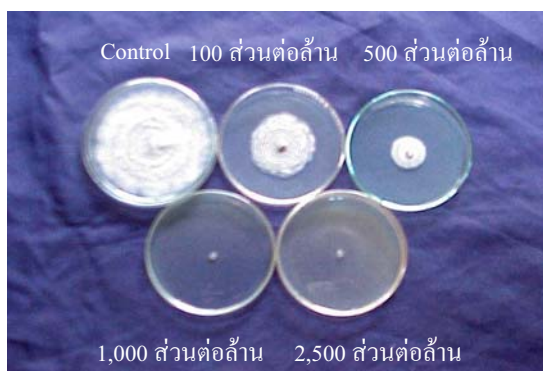


สูตร A



สูตร E

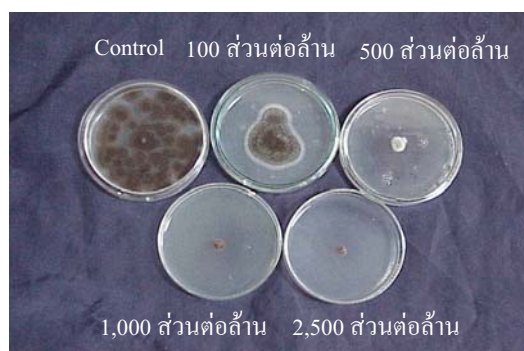
ภาพที่ 5.13 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ *Dothiorella dominicana*



สูตร A



สูตร E

ภาพที่ 5.14 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ *Phomopsis mangiferae*

สูตร A



สูตร E

ภาพที่ 5.15 ผลการทดสอบ Formulation ต่อเชื้อ *Aspergillus niger*

สรุปผลการทดลอง

Formulation สูตร A และ สูตร E สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในมะม่วงทั้ง 5 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ (100 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับความเข้มข้น 2,500 และ 1,000 ส่วนต่อล้าน ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 100 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้พอสมควร และได้นำ Formulation ทั้ง 2 สูตร ไปทดสอบยืนยันกับผลมะม่วงต่อไป

5.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของ Formulation ในการควบคุมโรคบนผลมะม่วง ใน ระดับห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการคัดเลือกผลมะม่วง โดยคัดเอาผลที่มีขนาดและความสุกแก่ใกล้เคียงกัน โดยความสุกแก่ นั้นดูจากการลอยหรือจมน้ำของผลมะม่วง แล้วทำการคัดเลือกผลมะม่วงที่จมน้ำ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นทำการล้างผลมะม่วงที่คัดเลือกให้สะอาด และทำการผึ่งให้แห้ง ในขณะที่รอผลมะม่วงแห้งนั้นก็ทำการผสม Formulation กับน้ำ โดยนำ Formulation ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุด ซึ่ง Formulation ดังกล่าว คือ สูตร A และ สูตร E จากนั้นนำ Formulation ดังกล่าว ปรับให้มีความเข้มข้นอยู่ 2 ระดับ คือ 1,000 และ 2,000 ส่วนต่อล้าน แล้วจึงทำการทดสอบโดยการนำผลมะม่วงมาจุ่ม Formulation ที่ทำการผสมแล้ว นาน 5 นาที และทำการจุ่มผลมะม่วงด้วยสาร Benomyl ตามอัตราแนะนำเพื่อเป็นตัวแทนเปรียบเทียบ จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้ง และนำไปเก็บในกล่อง เพื่อดูอัตราการเกิดโรค และลักษณะภายนอกที่เกิดขึ้นกับผลมะม่วงที่ทำการจุ่ม

โดยการประเมินระดับความรุนแรงของโรค ตามวิธีการของอนุวัฒน์ (2545) และประเมินเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายตามสูตรคำนวณของ สืบศักดิ์ (2540)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการจากการทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation บนผลมะม่วง พบว่า ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาจะเริ่มสังเกตเห็นอาการของโรคปรากฏขึ้นบนผิวผลมะม่วงได้ชัดเจนในแต่ละกรรมวิธี โดยชุดควบคุม (Control) มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายสูงสุด คือ 20 เปอร์เซ็นต์ และ A ที่ความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน มีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุดมี 5 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา ชุดควบคุม (Control) มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคสูงที่สุด ซึ่งมีค่า 63.33 เปอร์เซ็นต์ สูตร E ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคน้อยที่สุด คือ 50.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5.18) และ benomyl มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายอยู่ที่ 65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่า Formulation ที่ใช้ศึกษา

จากการสังเกตลักษณะภายนอกของผิวผลมะม่วงนั้น พบว่า ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาผลมะม่วงในกล่องบรรจุ มะม่วงที่จุ่ม Formulation สูตร A จะเกิดคราบเป็นจุดสีน้ำตาลดำเล็กๆ ทั่วผล ซึ่ง Formulation สูตร A ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน จะเกิดมากกว่าสูตร A 1,000 ส่วนต่อล้าน ส่วนมะม่วงที่จุ่ม Formulation สูตร E จะสังเกตเห็นคราบเป็นจุดชัดเจนในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา และพบว่ามะม่วงในทุกกรรมวิธีเริ่มแสดงการสุกพร้อมกันในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา ซึ่งสังเกตได้จากสีผิวที่เปลี่ยนแปลงไป และความอ่อนนุ่มที่เกิดขึ้น (กดด้วยมือ)

ตารางที่ 5.20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation ในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลมะม่วง

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค	
	วันที่ 4	วันที่ 9
Control	20.00a ^{1/}	68.33a
A 1,000 ส่วนต่อล้าน	6.67c	65.00b
A 2,000 ส่วนต่อล้าน	5.00d	51.67d
E 1,000 ส่วนต่อล้าน	8.33b	56.67c
E 2,000 ส่วนต่อล้าน	8.33b	50.00e
Benomyl	8.33b	65.00b

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



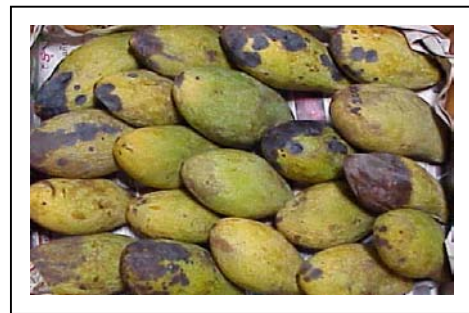
Control



benomyl



A 1,000 ส่วนต่อล้าน



A 2,000 ส่วนต่อล้าน



E 1,000 ส่วนต่อล้าน



E 2,000 ส่วนต่อล้าน

ภาพที่ 5.16 ลักษณะผลมะม่วงภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง ในวันที่ 9 ของการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก หลังจากจุ่มใน Formulation และ benomyl



ภาพที่ 5.17 คราบเปื้อนที่เกิดบนผิวผลมะม่วงหลังจุ่ม Formulation และเก็บรักษาในกล่องนาน 5 วัน

สรุปผลการทดลอง

Formulation สูตรต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสูงถึง 2,000 ส่วนต่อล้าน สามารถลดอัตราการเกิดโรคบนผลมะม่วงได้ดีกว่า Benomyl แต่ก็ยังไม่สามารถควบคุมโรคได้ในระดับที่น่าพอใจ (ไม่มีผลต่อการซื้อขาย) และยังพบว่า Formulation ทั้งสองสูตรทำให้ผิวผลเกิดคราบเปื้อนขึ้น และจะทำให้ไม่น่าซื้อ จึงได้ทำการพัฒนา Formulation ต่อไป

5.6 การทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation ที่ปรับปรุงใหม่

จากการทดสอบประสิทธิภาพ Formulation ครั้งที่ 1 พบว่า Formulation สูตร E ให้ผลในการควบคุมโรคดีกว่าสูตร A และเกิดคราบเปื้อนบนผิวผลน้อยกว่าด้วย ในครั้งนี้จึงเลือกเฉพาะ Formulation สูตร E มาทำการพัฒนาต่อ โดยใส่สาร Antioxidant เพิ่มเติมลงไป และเรียกชื่อใหม่ว่า สูตร C ซึ่งเติม Ascorbic acid และ สูตร S ซึ่งเติม Sodium metabisulfite ในปริมาณที่แตกต่างกันลงไป ดังตารางที่ 5.19 และนำ Formulation ดังกล่าวไปทดสอบกับผลมะม่วงโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน เพียงระดับเดียว

ตารางที่ 5.21 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดชาชนิดเข้มข้นที่ใช้สาร Antioxidant ต่างกัน หลังจากปรับปรุงครั้งที่ 1

สูตร	สารสกัดชา (%)	ตัวทำละลายรวม (%)	FEG RH-40 (%)	Antioxidant (%)
C1	4.13	79.07	16.08	0.06
C2	4.13	79.07	16.08	0.10
S1	4.13	79.07	16.08	0.10
S2	4.13	79.07	16.08	0.50

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation ที่ได้รับการปรับปรุงใหม่โดยการเติมหรือใส่สาร Antioxidant ลงไป พบว่า ผลมะม่วงที่ผ่านการจุ่ม Formulation ทั้ง 2 สูตรจะเริ่มแสดงอาการของโรครอยางเห็นได้ชัด และอัตราการเกิดโรคมีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป จนกระทั่งในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา ชุดควบคุม (Control) มีอัตราการเข้าทำลายของโรคสูงที่สุด คือ 96.99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมะม่วงที่จุ่ม Formulation สูตร S2 มีอัตราการเข้าทำลายของโรคน้อยที่สุด คือ 86.11 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 5.20 ทั้งนี้จะเห็นว่าอัตราการเกิดโรคจะเพิ่มขึ้นจากการทดลองครั้งที่ 1 อาจเนื่องมาจากมะม่วงที่นำมาทำการทดลองครั้งที่ 2 เป็นมะม่วงที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน ซึ่งเกษตรกรไม่ได้ดูแลเอาใจใส่ บำรุงรักษามากนัก และไม่มีการจัดการที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับมะม่วงที่ซื้อมาทำการทดลองครั้งที่ 1 ซึ่งเป็นมะม่วงที่มาจากพิษณุโลก ซึ่งเกษตรกรที่ปลูกมะม่วงทำการปลูกมะม่วงเพื่อการค้า มีการจัดการดูแลที่ดีกว่า

ในการทดสอบจุ่มผลมะม่วงใน Formulation ครั้งนี้ จะสังเกตได้ว่า มะม่วงมีคราบเปื้อนลดน้อยลงจากการใช้ Formulation ในครั้งแรกซึ่งเป็น Formulation อีกลูตรหนึ่ง ซึ่งคราบเปื้อนจะปรากฏให้เห็นได้ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา โดยสูตร S มีเปอร์เซ็นต์ของคราบเปื้อนน้อยกว่า C ปรากฏการณ์ดังกล่าว อาจเป็นผลดีของสาร Antioxidant ที่เติมลงไปใน Formulation ซึ่งในกรณีนี้ Sodium metabisulfite มีแนวโน้มดีกว่าการใช้ Ascorbic acid โดยใช้ Sodium metabisulfite 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดีกว่าที่ระดับ 0.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5.22)

ตารางที่ 5.22 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา (ทดสอบ Formulation ครั้งที่ 2)

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค
Control	96.99a ^{1/}
C1 2,000 ส่วนต่อล้าน	94.44b
C2 2,000 ส่วนต่อล้าน	94.87b
S1 2,000 ส่วนต่อล้าน	86.11d
S2 2,000 ส่วนต่อล้าน	90.90c

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



Control



C1 2,000 ส่วนต่อล้าน



C2 2,000 ส่วนต่อล้าน



S1 2,000 ส่วนต่อล้าน



S2 2,000 ส่วนต่อล้าน

ภาพที่ 5.18 ลักษณะผลมะม่วงหลังจากจุ่ม Formulation สูตรต่างๆหลังการปรับปรุง เมื่อ 10 วัน หลังจากการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก ภายได้สภาพอุณหภูมิห้อง

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลอง พบว่า Formulation ที่พัฒนาจากครั้งแรก เมื่อนำมาจุ่มผลมะม่วงแล้ว จะปรากฏคราบเปื้อนลดลงจากครั้งแรก โดยสูตร S จะเป็นสูตรที่มีคราบเปื้อนน้อยกว่าสูตร C ส่วนระดับการเกิดโรคนั้น ทั้ง 2 สูตร ยังไม่สามารถควบคุมโรคได้ในระดับที่น่าพอใจ (ไม่สามารถซื้อขายได้)

5.7 การทดสอบประสิทธิภาพของ Formulation หลังจากปรับปรุงครั้งที่ 2

จากการทดสอบประสิทธิภาพ Formulation ที่ทำการพัฒนานั้นจะพบคราบเปื้อนบนผลมะม่วงน้อยลงจากครั้งที่ 1 โดยสูตร S จะพบคราบเปื้อนน้อยกว่า สูตร C ดังนั้นในครั้งที่ 3 นี้ จึงได้นำสูตร S มาพัฒนาอีกเพื่อที่จะลดคราบเปื้อนให้น้อยที่สุด หรือไม่มีเลย

สำหรับการควบคุมระดับการเกิดโรคนั้น ใช้วิธีจุ่มผลมะม่วง โดยทำร่วมกับการจุ่มน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ซึ่ง นิพนธ์ (2542) กล่าวว่า การเพิ่มมาตรการควบคุมโรคระยะหลังการเก็บเกี่ยวในกรณีที่ต้องใช้เวลาเก็บรักษานานหรือส่งออกต่างประเทศ ควรมีการใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับไม้ผลชนิดต่างๆ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาผลเน่าเนื่องจากโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงได้

วิธีการทดลอง

จากผลการทดลองครั้งที่ 2 สรุปได้ว่า สูตร S มีประสิทธิภาพดีกว่าสูตร C ดังนั้นในครั้งนี้อจึงได้นำ Formulation สูตร S มาปรับปรุง โดยเติมปริมาณของ Sodium metabisulfite เป็นสูตร ES-3 และเติม DL malic acid เป็นสูตร EM-1 ดังตารางที่ 5.23

ตารางที่ 5.23 ส่วนประกอบของตำรับสารสกัดฆ่าชนิดเข้มข้นที่ใช้สาร antioxidant ต่างกัน หลังจากปรับปรุงครั้งที่ 2

สูตร	สารสกัดฆ่า (%)	ตัวทำละลายรวม (%)	PEG RH-40 (%)	Antioxidant (%)	H ₂ O
EM-1	4.13	79.07	16.80	DL malic acid 1.00	5.00
ES-3	4.13	79.07	16.80	Sodium metabisulfite 1.00	5.00

ในการทดลองปรับปรุง Formulation ครั้งที่ 3 นี้ ได้เตรียม Formulation ให้มีความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 2,000 และ 3,000 ส่วนต่อล้าน โดยเตรียม Formulation ให้มีระดับความเข้มข้นดังกล่าว ร่วมกับการจุ่มน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้น เก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผล และบันทึกผลการทดลอง โดยการบันทึกผลการทดลองนั้นเหมือนกับการทดลองที่ 5.5.3

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลอง พบว่า ในวันที่ 5 หลังการเก็บรักษา ชุดควบคุม (Control) จะปรากฏอาการของโรค โดยจะเห็นเป็นจุดสีดำเล็กๆ ขึ้น ส่วนในชุดที่จุ่มน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก็สังเกตเห็นจุดเช่นกันแต่จะน้อยกว่าในชุดควบคุม และในชุดที่จุ่ม Formulation ทั้งที่ระดับ 2,000 และ 3,000 ส่วนต่อล้าน ยังไม่ปรากฏอาการของโรค จนถึงวันที่ 9 ของการเก็บรักษา ชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคสูงที่สุด คือ 74.07 ส่วนชุดที่จุ่ม Formulation สูตร EM-1 ที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ส่วนต่อล้าน ร่วมกับน้ำอุ่น มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคน้อยที่สุด คือ 7.41 (ตารางที่ 5.24) จากการสังเกตลักษณะการสุก พบว่า ทั้ง 2 สูตร ที่ความเข้มข้น 3,000 ส่วนต่อล้าน มีผลทั้งการสุกของมะม่วงโดยเร่งให้มะม่วงสุกเร็วขึ้นกว่าที่ระดับ 2,000 ส่วนต่อล้าน ประมาณ 2 วัน ทั้งนี้ยังสังเกตเห็นคราบเปื้อนบนผิวผลมะม่วงอยู่ ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากข่าที่สูงเกินไป แต่เมื่อลองปอกดูเนื้อข้างในก็ไม่เห็นความผิดปกติเกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 5.19)

ตารางที่ 5.24 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา (ทดสอบ Formulation ครั้งที่ 3)

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค
Control	74.07a ^{1/}
น้ำอุ่น 55 องศาเซลเซียส	62.96b
EM-1 2,000 ส่วนต่อล้าน + น้ำอุ่น 55 องศาเซลเซียส	14.81d
EM-1 3,000 ส่วนต่อล้าน + น้ำอุ่น 55 องศาเซลเซียส	7.41f
ES-3 2,000 ส่วนต่อล้าน + น้ำอุ่น 55 องศาเซลเซียส	18.52c
ES-3 3,000 ส่วนต่อล้าน + น้ำอุ่น 55 องศาเซลเซียส	11.11e

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5.19 เนื้อผลไม้ม่วงหลังจากจุ่ม Formulation สูตรต่างๆ ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา



Control



น้ำอุ่น 55 องศาเซลเซียส



EM-1 2,000 ส่วนต่อล้าน



EM-1 3,000 ส่วนต่อล้าน



ES-3 2,000 ส่วนต่อล้าน



ES-3 3,000 ส่วนต่อล้าน

ภาพที่ 5.20 ลักษณะผลมะม่วงหลังจากจุ่ม Formulation สูตรต่างๆหลังการปรับปรุง (ครั้งที่ 3) ในวันที่ 10 หลังจากการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง

การจุ่มผลมะม่วงใน Formulation ร่วมกับน้ำอุ่น 55 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วงได้ แต่ยังพบคราบเปื้อนอยู่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไป ทั้งนี้จะได้ทำการลดความเข้มข้นของ Formulation ที่ใช้ในการจุ่มมะม่วง เพื่อลดคราบเปื้อนและยืนยันประสิทธิภาพของ Formulation ต่อไป

ผลิตภัณฑ์สูตร EM-1 สามารถควบคุมโรคได้ดีกว่า ES-3 ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ EM-1 เพื่อศึกษาในเรื่องความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ต่อไป

บทที่ 6

การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ EM-1

จากการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคบนผลมะม่วงแล้ว พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดคือ EM-1 ดังนั้นจึงเลือก EM-1 เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบต่อไป ทั้งนี้โดยเริ่มศึกษาด้านความคงตัวของผลิตภัณฑ์เป็นลำดับแรก

6.1 การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ (Stability studies) โดยวิธีมาตรฐานทางเภสัชกรรม

การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ มีจุดประสงค์หลักเพื่อกำหนดอายุการใช้งาน (Shelf life) ของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้จะทำให้ทราบสถานะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วย โดยหลักวิชาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากจะขึ้นกับภาชนะบรรจุแล้วยังขึ้นกับสถานะแวดล้อมในการเก็บรักษาด้วย ที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสง ทั้งนี้อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความคงสภาพมากกว่าปัจจัยอื่น จึงจำเป็นต้องศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงสภาพของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ในสถานะปกติจะต้องใช้เวลานานมากเป็นปีหรือหลายปี เพื่อลดระยะเวลาในการทดสอบ จึงนิยมทำการทดสอบความคงสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นการศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง เพื่อให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เร็วขึ้น อุณหภูมิที่ใช้ศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง เช่น 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส ทั้งนี้การเลือกอุณหภูมิใดขึ้นกับอัตราการเสื่อมสลายของสารสำคัญในตำรับ ช่วงระยะเวลานานในการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์แต่ละอุณหภูมิต้องยาวนานที่จะเห็นการสลายตัวได้ชัดเจน สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารละลาย ต้องเพิ่มการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วย เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ และใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง โดยถือว่าที่ 4 องศาเซลเซียส การสลายตัวของสารจะต่ำมากเมื่อเทียบกับอุณหภูมิปกติ

การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจำ Fraction L14+L15 ครั้งนี้เลือกศึกษาความคงสภาพที่อุณหภูมิ 4, 45, 60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง กำหนดตัวชี้วัดคุณภาพโดยวิเคราะห์ปริมาณ 1'-Acetoxychavicol acetate (1'-ACA) ซึ่งเป็นสารสำคัญ ณ เวลาเก็บรักษาต่างๆ ของแต่ละอุณหภูมิ เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราเร็วของการเสื่อมสลายของสารในแต่ละอุณหภูมิ และใช้สมการอาร์เรเนียส (Arrhenius equation) ช่วยคาดคะเนค่าอัตราเร็วการเสื่อมสลายที่อุณหภูมิที่ต้องการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นี้ เพื่อใช้คำนวณหาอายุการใช้ (Shelf life) ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

- ตู้เย็น
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส (Mettler, Germany)
- pH-meter (Horiba, Japan)
- เครื่อง GC-MS (Agilent – Hewlett Packard)

วิธีการทดลอง

สูตรตำรับผลิตภัณฑ์สารสกัดข่าที่นำมาทดสอบความคงสภาพประกอบด้วย

สารสกัด fraction L ₁₄ +L ₁₅	4.15	เปอร์เซ็นต์
De-EtOH : PG = 1 : 1	73.10	เปอร์เซ็นต์
PEG-RH-40	16.75	เปอร์เซ็นต์
dl-Malic acid	1.00	เปอร์เซ็นต์
Water	5.00	เปอร์เซ็นต์

- 1) นำผลิตภัณฑ์สารสกัดข่าบรรจุขวดแก้วสีน้ำตาลขนาด 60 มิลลิเมตร ปิดฝาเกลียว
- 2) เก็บผลิตภัณฑ์ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิห้อง และในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส โดยวางขวดในแนวตั้ง เป็นเวลา 4 เดือน
- 3) เก็บตัวอย่างโดยการสุ่มเก็บทั้งขวด เมื่อเริ่มต้นการทดลอง และหลังการเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน เพื่อทำการศึกษาต่อไปนี้
 - 3.1) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สี และความใสของผลิตภัณฑ์
 - 3.2) วัด pH ของผลิตภัณฑ์ด้วย pH-meter
 - 3.3) วิเคราะห์หาปริมาณ 1'-ACA ซึ่งเป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง GC-MS

การวิเคราะห์หาปริมาณ 1'-ACA ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) โดยส่วน GC เป็นของ Agilent model 6890 และ MS เป็นของ Hewlett Packard model 5973 ทั้งนี้โดยใช้สภาวะการทำงานของเครื่องมือ ดังนี้

Column	Capillary column ชนิด HP- 5MS (5เปอร์เซ็นต์ Phenyl Methyl Siloxane) เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. โดยมีความหนาของฟิล์ม 0.25 μm ความยาว 30 ม. ของบริษัท Hewlett Packard																							
Carrier gas	Helium อัตราเร็ว 1 ml / min																							
Temperature Program	<table><tr><th>Rate (degree/min)</th><th>Initial Temp.</th><th>Final Temp.</th><th>Final Time</th></tr><tr><td>-</td><td>140</td><td>-</td><td>2</td></tr><tr><td>5</td><td>140</td><td>185</td><td>4</td></tr><tr><td>15</td><td>185</td><td>245</td><td>5</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td><td>260</td><td>6</td></tr></table>				Rate (degree/min)	Initial Temp.	Final Temp.	Final Time	-	140	-	2	5	140	185	4	15	185	245	5	-	-	260	6
Rate (degree/min)	Initial Temp.	Final Temp.	Final Time																					
-	140	-	2																					
5	140	185	4																					
15	185	245	5																					
-	-	260	6																					
Detector	Mass Spectrometer																							
	Scan range 35 – 420																							
	Temperature of Quadrupol		150 องศาเซลเซียส																					
	Temperature of Ion Source		230 องศาเซลเซียส (Electron Ionization)																					
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง	100 เปอร์เซ็นต์																							
ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีด	0.1 ไมโครลิตร																							

ผลการทดลองและวิจารณ์

1) ลักษณะทางกายภาพ

ผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์จากข้าที่เตรียมโดยใช้สารสกัด fraction L14 และ L15 (EM-1) มีสีเหลือง เมื่อนำผลิตภัณฑ์เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (ในระยะเวลาที่ทำการศึกษา อุณหภูมิห้องอยู่ในช่วง 22 – 32 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 27 องศาเซลเซียส) และในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ ดังนี้

1.1) ความใสของผลิตภัณฑ์

หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า ความใสของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 ลักษณะความใสของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

ระยะเวลา	ลักษณะที่อุณหภูมิต่างๆ			
	4 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
เริ่มต้น	ใส	ใส	ใส	ใส
1 เดือน	++++	++	+	ใส
2 เดือน	++++	++	+	ใส
3 เดือน	++++	++	+	ใส
4 เดือน	++++	++	+	ใส
หมายเหตุ :	++++	มีตะกอนเล็กน้อย		
	++	มีตะกอนน้อยมาก		
	+	มีตะกอนน้อยที่สุด		

ตะกอนมีลักษณะเป็นผงละเอียดมาก ผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีตะกอนที่สังเกตได้ชัด ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่ 27 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส มองเห็นไม่ชัดเจน ต้องเอียงขวดจึงจะมองเห็น ทั้งนี้ตะกอนที่เกิดขึ้นสามารถเขย่าให้กลับละลายในผลิตภัณฑ์ได้ง่าย

1.2) ลักษณะสีของผลิตภัณฑ์

ความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่ 4 , 27 , 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน ไม่แตกต่างจากสีของผลิตภัณฑ์เมื่อเริ่มต้น ดังแสดงในภาพที่ 6.1 และ 6.2



ภาพที่ 6.1 สีของผลิตภัณฑ์สารสกัดจำ EM-1 เมื่อเริ่มต้นการทดลอง



ภาพที่ 6.2 สีของผลิตภัณฑ์ EM-1 เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กันนาน 4 เดือน

2) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์

pH ของผลิตภัณฑ์มีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 4 เดือน ในทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษา ซึ่งอาจเนื่องมาจากการสลายตัวของ 1'-Acetoxychavicol acetate โดยไฮโดรไลซิสที่ Ester linkage ได้ Acetic acid ซึ่งเป็นกรดอ่อน จึงทำให้ pH ของผลิตภัณฑ์ลดลงเพียงเล็กน้อยหรือไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 4 เดือน ค่า pH ที่ลดลงมากเมื่อเก็บรักษาที่ 4 และ 27 องศาเซลเซียส น่าจะเกิดจากการวัดที่ผิดพลาด

ตารางที่ 6.2 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์สูตร EM-1 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ กัน

ระยะเวลา	pH ที่อุณหภูมิเก็บรักษาต่างๆ			
	4 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
เริ่มต้น	4.00	4.00	4.00	4.00
1 เดือน	3.99	4.08	4.14	4.11
2 เดือน	4.62	4.23	4.50	4.55
3 เดือน	3.21	3.25	3.62	3.80
4 เดือน	2.88	3.07	3.61	3.33

3) การวิเคราะห์ปริมาณ 1-Acetoxychavicol acetate (1'-ACA)

จากการวิเคราะห์ปริมาณ 1'-ACA โดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่าปริมาณ 1'-ACA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิสูง ดังแสดงในตารางที่ 6.3

ตารางที่ 6.3 ปริมาณ 1'-ACA ในผลิตภัณฑ์หลังเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

ระยะเวลา	เปอร์เซ็นต์ Concentration			
	4 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
0 เดือน	100.00	100.00	100.00	100.00
1 เดือน	102.05	100.93	93.43	51.72
2 เดือน	98.36	96.01	78.86	25.37
3 เดือน	97.89	92.77	66.60	12.32
4 เดือน	99.56	94.34	60.86	5.66

การหาลำดับปฏิกิริยาการสลายตัว (Order of reaction kinetic) ของ 1'-ACA

จากค่าปริมาณ 1'-ACA ที่เหลือที่อุณหภูมิต่างๆ นำมาทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ 1'-ACA ที่เหลือกับเวลาของแต่ละอุณหภูมิ จากข้อมูลแต่ละชุดหาอันดับปฏิกิริยาด้วยสมการถดถอยแบบเส้นตรง (Linear regression) โดยการหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ระหว่างค่าเวลา (X) กับปริมาณ 1'-ACA (Y) สำหรับปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ส่วนปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าเวลา (X) กับค่า log ของปริมาณ 1'-ACA

สมการปฏิกิริยาลำดับศูนย์

$$C_t = C_o - kt$$

C_t เป็นความเข้มข้นของ 1'-ACA ที่เวลา t

C_o เป็นความเข้มข้นของ 1'-ACA เริ่มต้น ($t = 0$)

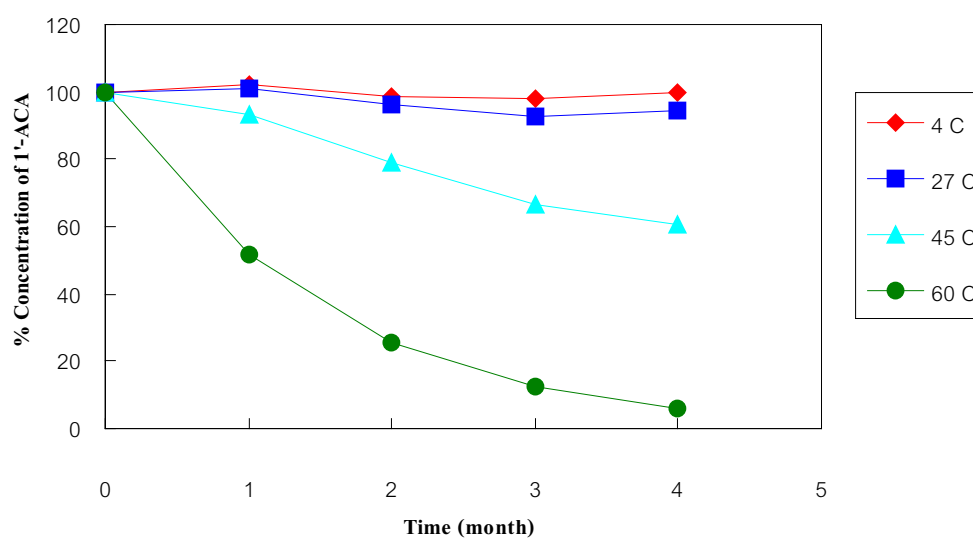
k เป็นค่าคงที่ของอัตราเร็วของปฏิกิริยาการสลายตัวของ 1'-ACA

t ระยะเวลาที่เก็บรักษา

เมื่อ Plot กราฟระหว่าง C_t เทียบกับเวลา t ได้กราฟเป็นเส้นตรง แสดงว่าปฏิกิริยาการสลายตัวเป็นปฏิกิริยาลำดับศูนย์ (Zero – order of reaction) ซึ่งมีอัตราเร็วในการสลายตัวเท่ากับ slope เท่ากับ k จากผลการทดลอง เมื่อนำข้อมูลแต่ละชุดมาหาอันดับปฏิกิริยาลำดับศูนย์ด้วยสมการทดลองแบบเส้นตรง และหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ดังแสดงในตารางที่ 6.4

ตารางที่ 6.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1'-ACA ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ รวมทั้ง ค่า Slope และ Correlation coefficient ของกราฟระหว่างปริมาณ 1'-ACA กับเวลา

ระยะเวลา (เดือน)	เปอร์เซ็นต์ Concentration			
	4 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	102.05	100.93	93.43	51.72
2	98.36	96.01	78.86	25.37
3	97.89	92.77	66.60	12.32
4	99.56	94.34	60.86	5.66
Slope	-0.5054	-1.9476	-10.5104	-22.8077
Correlation	-0.4898	-0.8694	-0.9899	-0.9396



ภาพที่ 6.3 การสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับศูนย์ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ กัน

ในการทำเดียวกันเมื่อ Plot กราฟระหว่าง $\log (c)$ เทียบกับเวลา t ได้กราฟเส้นตรงแสดงว่า ปฏิกิริยาการสลายตัวเป็นปฏิกิริยาลำดับหนึ่ง (First-order reaction)

สมการปฏิกิริยาลำดับหนึ่ง

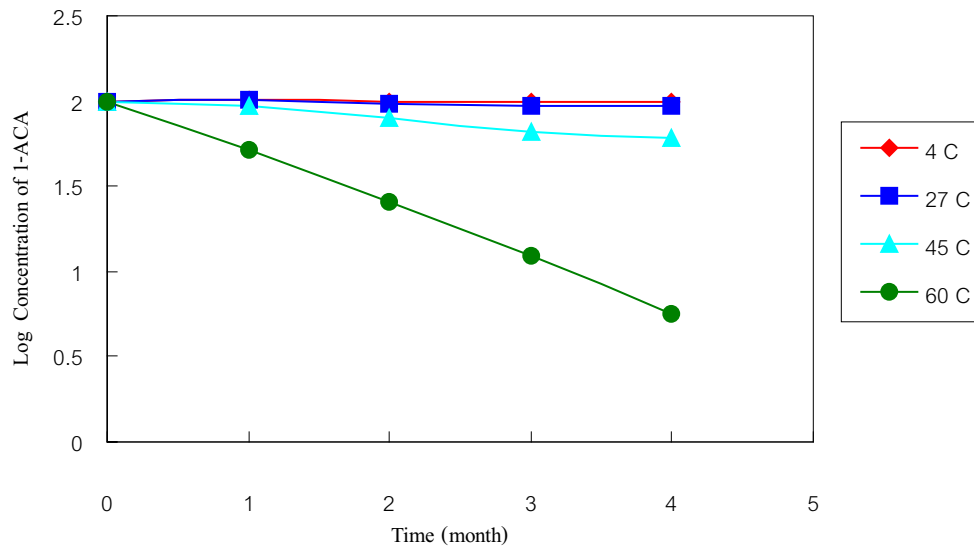
$$\log (C_t) = \log C_0 - \frac{k}{2.303} t$$

Slope มีค่าเท่ากับ $-\frac{k}{2.303}$ โดย k มีหน่วยเป็น $(\text{หน่วยเวลา})^{-1}$

จากผลการทดลองเมื่อนำข้อมูลแต่ละชุดมาหาอันดับปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่งด้วยสมการทดลองแบบเส้นตรง และหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ปรากฏผล ดังแสดงในตารางที่ 6.5

ตารางที่ 6.5 ค่า $\log$ ความเข้มข้นของ 1'-ACA ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ, ค่า slope และ ค่า correlation ของกราฟระหว่าง $\log$ ความเข้มข้น 1'-ACA กับเวลา

ระยะเวลา (เดือน)	Log concentration			
	4 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
0	2.00	2.00	2.00	2.00
1	2.01	2.00	1.97	1.71
2	1.99	1.98	1.90	1.40
3	1.99	1.97	1.82	1.09
4	2.00	1.97	1.78	0.75
Slope	-0.0022	-0.0087	-0.0578	-0.3117
Correlation	-0.4900	-0.8691	-0.9905	-0.9996



ภาพที่ 6.4 การสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่ง เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 4 เดือน

จากตารางที่ 6.5 และ ค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ที่คำนวณได้ที่อุณหภูมิ 27, 45 และ 60 องศาเซลเซียส ของปฏิกิริยาลำดับที่ 1 ใกล้เคียง 1 มากกว่าของแบบปฏิกิริยาลำดับศูนย์ แสดงว่าการสลายตัวของ 1'-ACA เป็นแบบปฏิกิริยาลำดับที่ 1 ซึ่งเป็นลักษณะการสลายตัวของสารละลายโดยทั่วไป

การหาค่าอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์จากสมการ Arrhenius ทำโดยนำค่า slope ของแต่ละสมการแบบปฏิกิริยาลำดับที่ 1 ซึ่งคืออัตราเร็วของปฏิกิริยาการสลายตัวของ 1'-ACA ของแต่ละอุณหภูมิสัมบูรณ์ ($^{\circ}\text{K}$) ที่ทำการทดลองตามสมการ Arrhenius' s equation เพื่อใช้พยากรณ์อายุการใช้งานผลิตภัณฑ์

Arrhenius' s equation

$$k = Ae^{-E_a / RT}$$

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.303R} \frac{1}{T}$$

k = อัตราเร็วการเสื่อมสลาย

A = Frequency factor

R = gas constant (1.987 กิโลแคลอรี / องศา. โมล)

T = อุณหภูมิสัมบูรณ์ (Absolute temperature, $^{\circ}\text{C} + 273$)

Ea = พลังงานกระตุ้น (Arrhenius activation energy)

การพยากรณ์อายุการใช้ของผลิตภัณฑ์โดยสมการ Arrhenius ควรทำอย่างน้อยที่สุด 3 อุณหภูมิ คำนวณค่าอัตราการสลายตัว (Slope x 2.303) ของ 1'-ACA ตามปฏิกิริยาลำดับที่ 1 ต่อจำนวนวันในการเก็บรักษา ดังแสดงในตารางที่ 6.6 จากค่าอัตราการสลายตัวที่อุณหภูมิ 27, 45 และ 60 องศาเซลเซียส นำไปคำนวณ $\log k$ (ตารางที่ 6.7) และ Plot เปรียบเทียบกับส่วนกลับของอุณหภูมิสัมบูรณ์ ($1/T$) ที่ทำการศึกษา ได้กราฟเส้นตรงดังภาพที่ 6.6

ตารางที่ 6.6 ค่า $\log$ ความเข้มข้นของ 1'-ACA เก็บที่อุณหภูมิ 27, 45 และ 60 องศาเซลเซียส, ค่า Slope และค่าอัตราเร็วการสลายตัว (k)

ระยะเวลา (วัน)	Log concentration		
	27 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
0	2.00	2.00	2.00
30	2.00	1.97	1.71
60	1.98	1.90	1.40
90	1.97	1.82	1.09
120	1.97	1.78	0.75
Slope	-0.0003	-0.0019	-0.0104
Correlation	-0.8691	-0.9905	-0.9996
K (day)	-0.0007	-0.0044	-0.0239

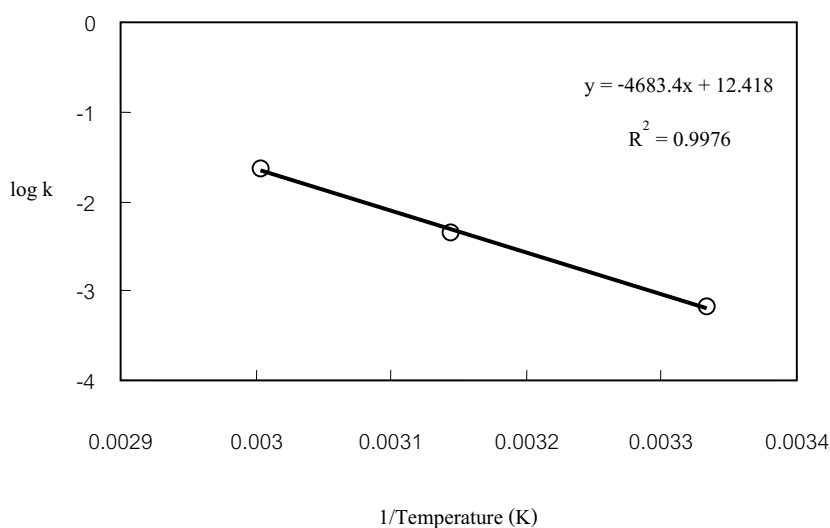
ตารางที่ 6.7 ค่า T (°K) และค่า log k ของการสลายตัวของ 1'-ACA แบบปฏิกิริยาลำดับที่ 1

Temp (°C)	Temp (°K)	1/T (°K)	K	log k
27	300	0.003333	0.00067	-3.174293
45	318	0.003145	0.00444	-2.352664
60	333	0.003003	0.02393	-1.621037

สมการเส้นตรงของ Arrhenius plot เท่ากับ

$$Y = -4683.4 X + 12.418$$

$$\log k = -4683.4 \cdot \frac{1}{T} + 12.418$$



ภาพที่ 6.5 Arrhenius plot ของ 1'-ACA ที่มีการสลายตัวปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่ง

จากสมการดังกล่าวสามารถคาดคะเนเวลาที่ 1'-ACA เหลืออยู่เป็นเปอร์เซ็นต์ต่างๆของ ความเข้มข้นเริ่มต้นที่อุณหภูมิต่างๆ เช่นที่ T = 10°C ซึ่งเท่ากับ 283°K

$$\log k = -4683.4 \cdot \frac{1}{T} + 12.418$$

$$\log k = -4683.4 \cdot \frac{1}{283} + 12.418$$

$$\log k = -4.1311$$

$$k = 7.3941 \times 10^{-5}$$

การกำหนดอายุการใช้ผลิตภัณฑ์ยาโดยทั่วไป จะกำหนดเท่ากับระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์เหลืออยู่ร้อยละ 90 ของความเข้มข้นเริ่มต้น

$$\begin{aligned}
 T_{90\%} &= \frac{0.105}{K} \\
 &= \frac{0.105}{7.3941 \times 10^{-5}} \\
 &= 1420.06 \text{ วัน} \\
 &= 3.94 \text{ ปี}
 \end{aligned}$$

ในทำนองเดียวกันหากเก็บผลิตภัณฑ์นี้ที่ 30°C (303°K) ซึ่งเป็นสภาวะภูมิอากาศของประเทศไทย สามารถหาอายุการใช้ของผลิตภัณฑ์ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 \log k &= -4683.4 * \frac{1}{303} + 12.418 \\
 \log k &= -3.0388 \\
 k &= 0.00092 \\
 T_{90\%} &= \frac{0.105}{K} \\
 T_{90\%} &= \frac{0.105}{0.00092} \\
 &= 114.80 \text{ วัน} \\
 &= 3.83 \text{ เดือน}
 \end{aligned}$$

$T_{90\%}$ คือ เวลาที่ 1'-ACA ในผลิตภัณฑ์เหลือ 90เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นเริ่มต้น

ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดฆ่าเห็บเห็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) มีอายุการใช้งานได้นานประมาณ 4 ปี และที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) ผลิตภัณฑ์นี้มีอายุการใช้งานนานประมาณ 4 เดือน

การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การสลายตัวของ 1'-ACA น้อยมาก ไม่ใช้ในการคำนวณการพยากรณ์อายุการใช้ผลิตภัณฑ์โดย Arrhenius plot แต่เก็บเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงการตกตะกอนของสารละลายที่อุณหภูมิต่ำ

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ (เมื่อเก็บรักษาต่างกัน) ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง, 45 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส ในส่วนของฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา 5 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* โดยทำการทดสอบ ณ วันเริ่มต้น, เก็บไว้ 1, 2, 3 และ 4 เดือน ตามลำดับ โดยผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) เตรียมให้มีระดับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 ส่วนต่อล้าน ทั้งไว้นานอาหารแข็งตัวแล้ว ทำการย้ายชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใยเชื้อราไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยให้สัมผัสกับอาหาร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานอาหารเปรียบเทียบกับ (control) จึงทำการวัดขนาดของโคโลนี คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง ตามสูตรคำนวณ ที่แนะนำโดยธรรมศักดิ์ (2538)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1) ฤทธิ์ควบคุมเชื้อราเมื่อผสมเป็นผลิตภัณฑ์เสร็จใหม่ ๆ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในวันเริ่มต้น พบว่า ผลิตภัณฑ์ (Formulation) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 ส่วนต่อล้าน ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella dominicana* และ *Phomopsis mangiferae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* ต้องใช้ระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน จึงจะยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6.8 และภาพที่ 6.6)

ตารางที่ 6.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ณ วันเริ่มต้นของการเก็บรักษา

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา				
	Co ^{2/}	Bo	Do	Pho	As
control	0c ^{1/}	0d	0c	0c	0d
500	78.70b	54.44c	55.56b	55.74b	46.67c
1000	100a	77.04b	100a	100a	84.63b
2000	100a	100a	100a	100a	100a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

^{2/} Co = *Colletotrichum gloeosporioides* Pho = *Phomopsis mangiferae*

Bo = *Botryodiplodia theobromae* As = *Aspergillus niger*

Do = *Dothiorella dominicana*



Colletotrichum gloeosporioides



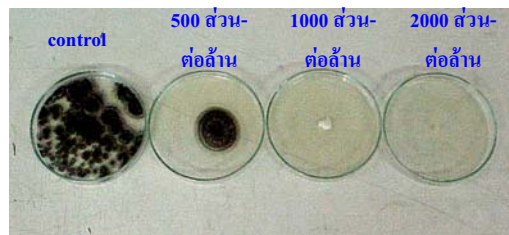
Botryodiplodia theobromae



Dothiorella dominicana



Phomopsis mangiferae



Aspergillus niger

ภาพที่ 6.6 ผลการทดสอบ EM-1 ต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Dothiorella dominicana*, *Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ณ วันเริ่มต้น ของการเก็บรักษา

2) ฤทธิ์ควบคุมเชื้อราเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ภายใต้สภาวะเร่งการเสื่อมสภาพตามวิธีการศึกษาทางเภสัชกรรม

การทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อรานี้ทำควบคู่ไปกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารออกฤทธิ์ 1'-ACA ดังรายงานไว้แล้ว โดยทยอยนำผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง, 45 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส นาน 1, 2, 3 และ 4 เดือน ออกมาทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ศึกษา ทั้งนี้เพื่อทดสอบความคงสภาพของฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา และความสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ในระหว่างการเก็บรักษา โดยทำการศึกษาเหมือนกับการทดลองในข้อ 1)

ผลการศึกษาสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ดังรายงานไว้ก่อนหน้านี้ กล่าวคือ ฤทธิ์ควบคุมเชื้อราจะลดลงแปรผกผันกับอุณหภูมิที่สูงขึ้นและระยะเวลาเก็บรักษาที่นานออกไป ผลิตภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์น้อย (500 ส่วนต่อล้าน) จะมีการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์เร็วกว่าที่ 1,000 และ 2,000 ส่วนต่อล้าน ตามลำดับ กระบวนการเสื่อมสภาพนี้จะเกิดเหมือนกันกับเชื้อราที่ทำการศึกษาทั้ง 5 ชนิด (ตาราง 6.9-6.13)

เมื่อพิจารณาเฉพาะกรณีเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังออกฤทธิ์ได้ดีและสอดคล้องกับสภาพการเก็บรักษาจริง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella dominicana* และ *Phomopsis mangiferae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน แต่ถ้าลดความเข้มข้นลงเป็น 500 ส่วนต่อล้าน จะควบคุมเชื้อราได้เพียง 70.74, 52.59 และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน นี้จะควบคุม เชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* ได้เพียง 15.00 และ 45.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภาพการลดลงอย่างรวดเร็วของฤทธิ์ควบคุมเชื้อรานี้ได้แสดงไว้เชิงเปรียบเทียบอย่างชัดเจนในภาพที่ 6.7 และภาพที่ 6.8 สำหรับความเข้มข้นสารออกฤทธิ์ 1,000 และ 500 ส่วนต่อล้าน ตามลำดับ

ตารางที่ 6.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของผลิตภัณฑ์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1-4 เดือน

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (1 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
Control	0c ^{1/}	0c	0c	0c
500	78.33b	77.78b	74.81b	59.07b
1000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (2 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
Control	0c ^{1/}	0c	0c	0d
500	77.96b	70.74b	52.96b	43.70c
1000	100.00a	100.00a	93.15a	80.56b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (3 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0d	0d
500	58.89b	57.96b	48.89c	40.00c
1000	100.00a	100.00a	82.04b	70.37b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (4 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0d ^{1/}	0c	0d	0d
500	57.78c	57.22b	46.11c	33.33c
1000	100.00b	100.00a	79.07b	66.67b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 6.10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Dothiorella dominicana* ของผลิตภัณฑ์ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 – 4 เดือน

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (1 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0c	0d
500	54.07b	54.26b	39.07b	25.37c
1000	100.00a	100.00a	100.00a	63.52b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (2 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0d	0d
500	52.78b	52.59b	22.78c	13.89c
1000	100.00a	100.00a	68.15b	37.04b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (3 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0b ^{1/}	0b	0c	0c
500	0b	0b	0c	0c
1000	100.00a	100.00a	52.78b	29.81b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (4 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0c	0b
500	0c	0c	0c	0b
1000	72.96b	72.59b	45.19b	0b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	66.85a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 6.11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phomopsis mangiferae* ของผลิตภัณฑ์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 1 – 4 เดือน

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (1 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0c	0d
500	54.63b	55.37b	47.41b	38.15c
1000	100.00a	100.00a	100.00a	80.93b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (2 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0c	0d
500	53.33b	53.33b	42.22b	32.41c
1000	100.00a	100.00a	100.00a	72.59b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (3 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0d	0d
500	52.96b	52.59b	34.63c	27.22c
1000	100.00a	100.00a	75.93b	70.37b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (4 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0d	0d
500	49.81b	49.07b	33.33c	23.70c
1000	100.00a	100.00a	71.85b	65.00b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 6.12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* ของผลิตภัณฑ์หลัง จากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1- 4 เดือน

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (1 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0d ^{1/}	0d	0d	0d
500	53.70c	53.15c	46.30c	42.59c
1000	76.48b	75.74b	68.33b	65.74b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (2 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0d ^{1/}	0d	0d	0d
500	15.19c	15.00c	11.48c	3.52c
1000	60.19b	59.26b	44.07b	34.07b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (3 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0c	0c
500	0c	0c	0c	0c
1000	57.22b	57.22b	40.19b	24.81b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	76.67a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (4 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0c ^{1/}	0c	0c	0c
500	0c	0c	0c	0c
1000	54.63b	53.89b	22.96b	0.00b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	68.15a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 6.13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus niger* ของผลิตภัณฑ์หลังจาก เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 – 4 เดือน

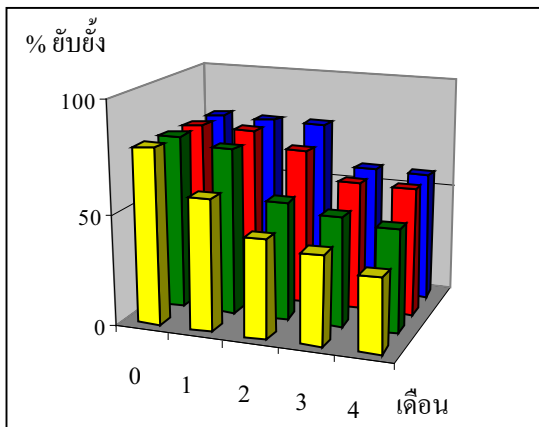
ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (1 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0d ^{1/}	0d	0d	0d
500	46.30c	47.22c	42.96c	40.37c
1000	85.19b	85.19b	74.81b	71.85b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (2 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0d ^{1/}	0d	0d	0d
500	45.00c	45.19c	32.59c	20.74c
1000	83.89b	83.70b	70.74b	47.78b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a

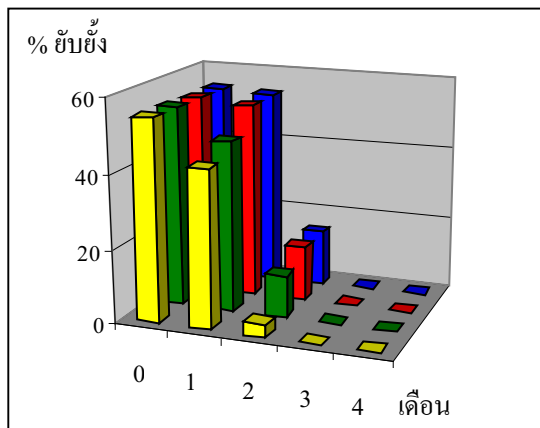
ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (3 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0d ^{1/}	0d	0d	0d
500	40.93c	40.74c	30.93c	9.81c
1000	81.11b	73.33b	61.67b	26.85b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	87.41a

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (4 เดือน)			
	EM-1 (4 °C)	EM-1 (RT)	EM-1 (45 °C)	EM-1 (60 °C)
control	0d	0d	0d	0c
500	40.37c	40.19c	24.26c	0c
1000	80.19b	74.81b	50.93b	25.00b
2000	100.00a	100.00a	100.00a	82.78a

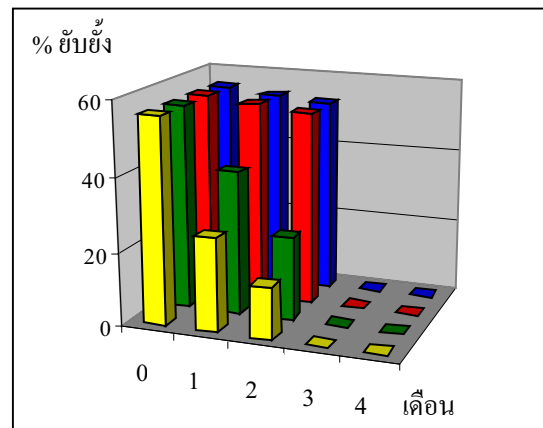
^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



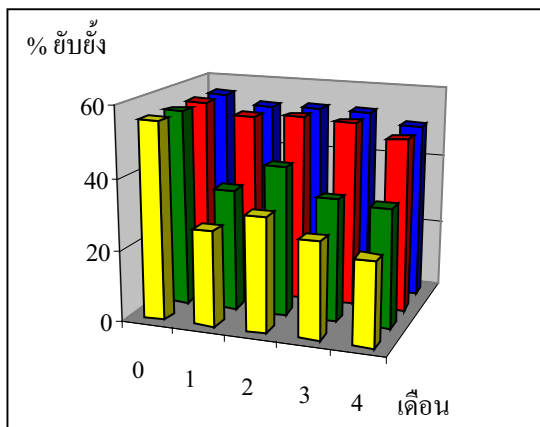
Colletotrichum gloeosporioides



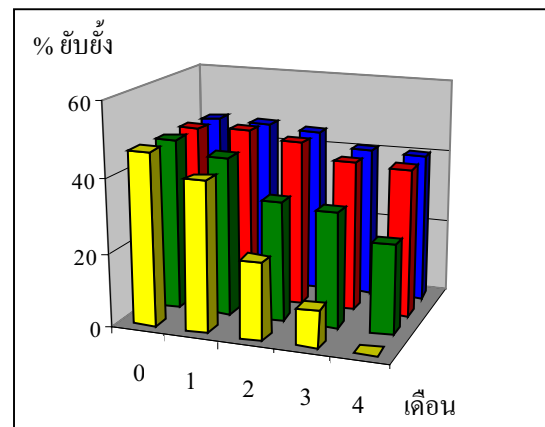
Botryodiplodia theobromae



Dothiorella dominicana

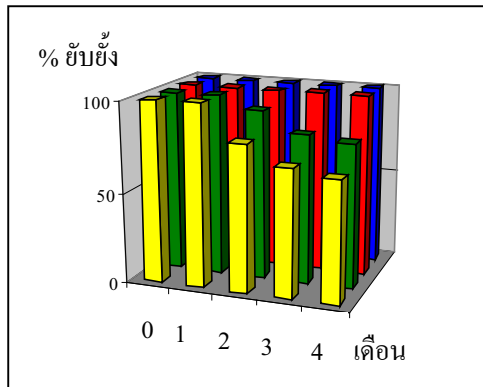


Phomopsis mangiferae

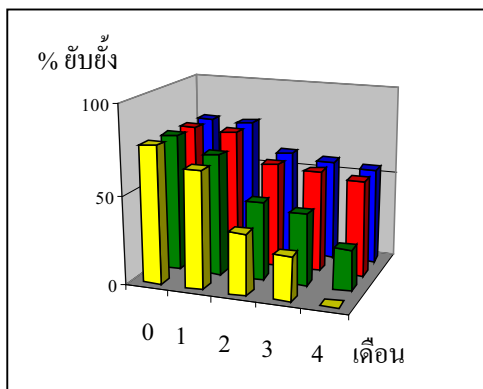
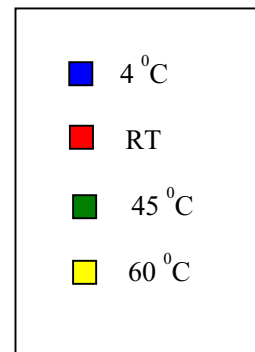


Aspergillus niger

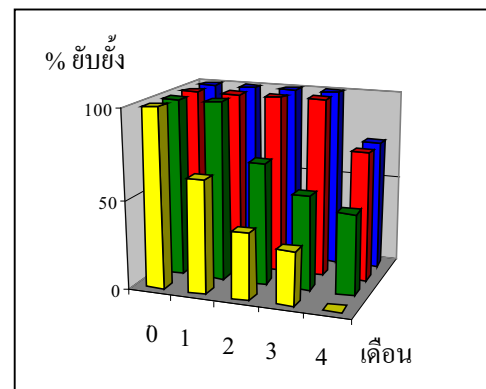
ภาพที่ 6.7 ประสิทธิภาพของ Formulation ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ



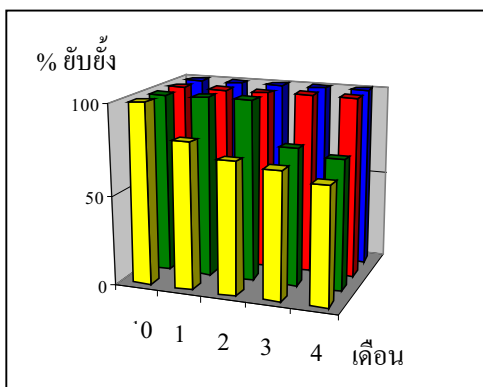
Colletotrichum gloeosporioides



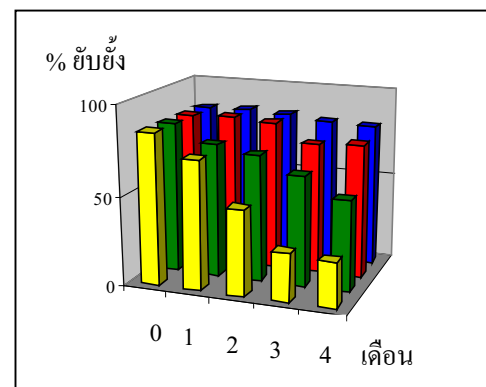
Botryodiplodia theobromae



Dothiorella dominicana



Phomopsis mangiferae



Aspergillus niger

ภาพที่ 6.8 ประสิทธิภาพของ Formulation ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

6.3 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ (EM-1) ที่เก็บรักษาไว้นานต่างๆ กันในการควบคุมเชื้อราเมื่อใช้ในลักษณะการชุบผลมะม่วงในระดับห้องปฏิบัติการ

หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ เป็นระยะเวลา 4 เดือน แล้ว นำผลิตภัณฑ์เหล่านั้นมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคบนผลมะม่วง โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 1,000 และ 2,000 ส่วนต่อล้าน สาเหตุที่เลือกความเข้มข้น 2 ระดับนี้ เนื่องจากเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ความเข้มข้น 2 ระดับ นี้ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองนี้ดำเนินการก่อนที่จะได้ข้อมูลวิเคราะห์ GC-MS ในส่วนคงเหลือของสารออกฤทธิ์ และยังไม่ได้ข้อมูลอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการคัดเลือกผลมะม่วง โดยคัดเลือกผลที่มีขนาดและความสุกแก่ใกล้เคียงกัน ทำการคัดเลือกผลมะม่วงที่จมน้ำ หลังจากทำการล้างผลมะม่วงที่คัดเลือกให้สะอาดและทำการผึ่งให้แห้ง ในขณะที่รอผลมะม่วงแห้งทำการผสมผลิตภัณฑ์กับน้ำ โดยนำผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 45, 60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 เดือน มาปรับให้มีความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 1,000 และ 2,000 ส่วนต่อล้าน แล้วจึงนำผลมะม่วง กรรมวิธีละ 10 ผล มาจุ่มในผลิตภัณฑ์ที่ทำการผสมแล้ว (โดยปรับอุณหภูมิสารละลายให้เป็น 50 องศาเซลเซียส) นาน 5 นาที จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้ง และนำไปเก็บไว้ในกล่อง เพื่อดูอัตราการเกิดโรค และลักษณะภายนอกที่เกิดขึ้นกับมะม่วงที่ทำการจุ่มในผลิตภัณฑ์

โดยการประเมินระดับความรุนแรงของโรค ตามวิธีการของอนุวัฒน์ (2545) และประเมินเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายตามสูตรคำนวณของ สืบศักดิ์ (2540)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลอง พบว่า ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาจะเริ่มสังเกตเห็นว่าผลมะม่วงเริ่มเกิดคราบเปื้อนขึ้นเห็นได้ชัดเจนเมื่อชุบผลด้วย EM-1 (4 องศาเซลเซียส) 1,000 ส่วนต่อล้าน, EM-1 (4 องศาเซลเซียส) 2,000 ส่วนต่อล้าน, EM-1 (RT) 1,000, EM-1 (RT) 2,000, EM-1 (45 องศาเซลเซียส) 1,000 ส่วนต่อล้าน และ EM-1 (45 องศาเซลเซียส) 2,000 ส่วนต่อล้าน ส่วนมะม่วงที่ชุบผลด้วย EM-1 (60 องศาเซลเซียส) 1,000 ส่วนต่อล้าน และ EM-1 (60 องศาเซลเซียส) 2,000 ส่วนต่อล้าน ไม่เกิดคราบเปื้อนที่ผลเลย

ผลมะม่วงในทุกกรรมวิธียังไม่ปรากฏอาการของโรคจนกระทั่งวันที่ 7 ของการเก็บรักษา โดยในชุดควบคุมมีอัตราการเข้าทำลายของโรค 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีอื่นมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย ในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา พบว่า ในชุดควบคุม (control) มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคสูงที่สุด คือ 89.95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมะม่วงที่ชุบ EM-1 (4 องศาเซลเซียส) 2,000 ส่วนต่อล้าน มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคต่ำที่สุด คือ

60.00เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือในชุด EM-1 (4 องศาเซลเซียส) 1,000 ส่วนต่อล้าน, น้ำอุ่น 50 องศาเซลเซียส และ EM-1 (RT) 2,000 ส่วนต่อล้าน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ 66.67, 66.67 และ 72.32 ตามลำดับ (ตารางที่ 6.14 และภาพที่ 6.9)

ตารางที่ 6.14 เปอร์เซนต์การเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 7 และ 15 ของการเก็บรักษา

กรรมวิธี	เปอร์เซนต์การเข้าทำลายของโรค	
	วันที่ 7	วันที่ 14
Control (ชุดควบคุม)	10a ^{1/}	89.95a
น้ำอุ่น 50°C	0.00d	66.67f
EM-1 4°C 1,000 ส่วนต่อล้าน	0.00d	66.67f
EM-1 4°C 2,000 ส่วนต่อล้าน	0.00d	60.00g
EM-1 RT 1,000 ส่วนต่อล้าน	3.33c	76.67d
EM-1 RT 2,000 ส่วนต่อล้าน	0.00d	72.32e
EM-1 45°C 1,000 ส่วนต่อล้าน	0.00d	86.63b
EM-1 45°C 2,000 ส่วนต่อล้าน	3.33c	79.65c
EM-1 60°C 1,000 ส่วนต่อล้าน	3.33c	86.67b
EM-1 60°C 2,000 ส่วนต่อล้าน	3.33c	80.00c
Benomyl	6.69b	86.67b

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี LSD



Control



น้ำอุ่น



benomyl



EM-1 4°C 1,000 ส่วนต่อล้าน



EM-1 4°C 2,000 ส่วนต่อล้าน



EM1 -RT 1,000 ส่วนต่อล้าน



EM-1 RT 2,000 ส่วนต่อล้าน



EM-1 45°C 1,000 ส่วนต่อล้าน



EM-1 45°C 2,000 ส่วนต่อล้าน



EM-1 60°C 1,000 ส่วนต่อล้าน



EM-1 60°C 2,000 ส่วนต่อล้าน

ภาพที่ 6.9 ลักษณะการเข้าทำลายของโรคบนผลมะม่วงเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 14 วันหลังจากชุบผลด้วยสารละลายต่างๆ (สังเกตสีของคราบเปื้อนบนผลที่ชุบในสารละลาย EM-1 เปรียบเทียบกับ Control และ Benomyl)

เป็นที่น่าสังเกตว่า ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความสามารถในการควบคุมโรคได้ดีกว่า control และ benomyl (ซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันมากในมะม่วงในปัจจุบัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงแนวโน้มที่น่าสนใจของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่าได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามสาร 1'-ACA ยังมีข้อที่ควรจะต้องหาทางแก้ไขต่อไป คือ ปัญหาความ Toxic ของสารที่ทำให้เกิดคราบเปื้อนบนผิวผลมะม่วง ซึ่งเป็นที่รังเกียจและไม่สามารถขายได้ในท้องตลาด ซึ่งควรจะได้หาทางแก้ไขต่อไป

6.4 สรุปผลการทดลอง

ผลิตภัณฑ์สารสกัดข่า EM-1 มีความคงสภาพค่อนข้างดีถ้าเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิต่ำถึง 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสารออกฤทธิ์ (1'-ACA) จะคงสภาพอยู่มากกว่า 90เปอร์เซ็นต์ แม้จะเก็บไว้นาน 4 ปี แต่ถ้าเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) ความคงสภาพของสารออกฤทธิ์จะอยู่ได้นานเพียงประมาณ 4 เดือน

การทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา โดยนำไปใช้ชุบผลมะม่วง ได้แสดงผลสอดคล้องกัน โดยสารละลาย EM-1 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-2,000 ส่วนต่อล้าน จะควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีกว่า control และ benomyl

อย่างไรก็ตามการใช้ EM-1 ในระดับความเข้มข้นดังกล่าว ทำให้เกิดคราบเปื้อนบนผิวผลมะม่วง ซึ่งจะส่งผลเสียต่อการยอมรับของผู้บริโภค จึงจำเป็นต้องหาแนวทางพัฒนาการใช้ประโยชน์ต่อไป เช่น ลดความเข้มข้นลง โดยยังคงฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา หรือพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบอื่นต่อไป

บทที่ 7

การปรับปรุงผลิตภัณฑ์เพื่อแก้ปัญหาการเกิดคราบเปื้อน

7.1 การศึกษาเบื้องต้นแนวทางการแก้ปัญหาการเกิดคราบเปื้อน

7.1.1 การลดความเข้มข้นของ EM-1

หลังจากที่ทำการชุบมะม่วงด้วย EM-1 แล้ว พบว่า เมื่อชุบมะม่วงที่ระดับความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ส่วนต่อล้าน จะเกิดคราบเปื้อนบนผิวผลมะม่วง ซึ่งทำให้เกิดปัญหาในการวางขายในตลาด ดังนั้นการทดลองนี้จะศึกษาหาระดับความเข้มข้นสูงสุดของผลิตภัณฑ์ที่จะไม่เป็นพิษต่อผิวผล (ไม่เกิดคราบเปื้อน) ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่อไป



ภาพที่ 7.1 ลักษณะผลมะม่วงปกติ (ซ้าย) และผลมะม่วงที่เกิดคราบเปื้อนหลังจากจุ่มในผลิตภัณฑ์ความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน (ขวา)

7.1.2 การตรวจสอบความเป็นพิษของสารที่เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ EM-1

เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีองค์ประกอบหลัก 2 กลุ่ม คือ สารสกัดจากข้าว และสารที่เป็นส่วนผสมอื่นๆ ซึ่งคราบเปื้อนที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากส่วนผสมที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้แก่ Ethanol, Propylene glycol, PEG-RH-40 และ DL malic acid ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบจุ่มผลมะม่วงในผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมเหล่านั้นในอัตราส่วนปกติแต่ไม่มีสารสกัดจากข้าวรวมอยู่ด้วย (Blank) โดยเตรียมให้มีระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้าน โดยเปรียบเทียบกับ Control เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อผิวผลมะม่วงของสารองค์ประกอบดังกล่าว

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังจากจุ่มผลมะม่วงในส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ (Blank) พบว่า ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ผลมะม่วงยังไม่เกิดการ Toxic (คราบเปื้อน) ขึ้น ซึ่งถ้าเป็น Formulation ปกติในวันนี้จะเริ่มสังเกตเห็นคราบเปื้อนเกิดขึ้นบนผิวผลมะม่วงแล้ว และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 10 วัน ผิวผลมะม่วงก็ยังคงอยู่ในสภาพปกติเหมือนกับ Control ถึงแม้ว่าจะใช้ในระดับความเข้มข้นสูงถึง 2,000 ส่วนต่อล้าน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า ส่วนผสมของ Formulation ไม่เป็นพิษกับผิวผลมะม่วง นอกจากนี้สารผสมเหล่านี้ก็ไม่แสดงฤทธิ์ควบคุมเชื้อราแต่อย่างใด (ภาพที่ 7.2)



Control



Blank

ภาพที่ 7.2 ปัญหาคราบเปื้อนบนผิวผลมะม่วง ไม่ได้เกิดจากส่วนผสมที่ใช้ในผลิตภัณฑ์

7.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ EM-1 ใน PDA เมื่อลดความเข้มข้นลงต่ำกว่า 1,000 ส่วนต่อล้าน

ความเป็นพิษ (Toxic) ของผลิตภัณฑ์ต่อผิวผลมะม่วง อาจเกิดจากความเข้มข้นที่สูงเกินไป การลดความเข้มข้นของ 1'-ACA อาจช่วยลดความเป็นพิษต่อผิวผลมะม่วงได้บ้าง แต่ฤทธิ์ควบคุมเชื้อราจะเสียไป จึงควรได้มีการศึกษา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปฏิบัติต่อไปและเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายจึงเลือกศึกษาเชื้อราที่สำคัญที่สุด เพียง 1 ชนิด คือ เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

นำ EM-1 มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ส่วนต่อล้าน ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) ทิ้งไว้ให้เย็นหรือสังเกตดูว่าอาหารแข็งตัวแล้ว จากนั้นทดสอบกับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25–28 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานเปรียบเทียบกับ (Control) แล้วจึงทำการวัดขนาดของโคโลนี คำนวณหาร้อยละการยับยั้งตามสูตรคำนวณของ ธรรมศักดิ์(2538)

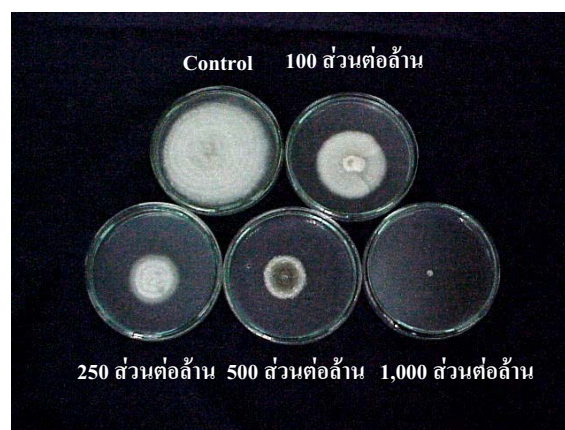
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลอง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน EM-1 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ 100% ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 100, 250 และ 500 ส่วนต่อล้าน สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 64.44, 52.22 และ 41.89% ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคน่าจะอยู่ที่ 1,000 ส่วนต่อล้าน ถ้าลดความเข้มข้นลงเหลือ 500 ส่วนต่อล้าน จะยังสามารถควบคุมเชื้อโรคได้เพียงร้อยละ 64.44 และ 52.22 เท่านั้น (ตารางที่ 7.1)

ตารางที่ 7.1 ประสิทธิภาพควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของผลิตภัณฑ์ EM-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ส่วนต่อล้าน

ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Control	0e ^{1/}
100	41.89d
250	52.22c
500	64.44b
1,000	100a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี LSD



ภาพที่ 7.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เมื่อเลี้ยงในจานอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของ EM-1 ต่ำกว่า 1,000 ส่วนต่อล้าน

7.1.4 การลดความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์เพื่อลดความเป็นพิษและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ เมื่อหุบผลมะม่วง

แนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยลดปัญหาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ต่อเปลือกผลมะม่วง (การเกิดคราบเปื้อน) คือการลดความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ใช้หุบผลมะม่วงลง แต่ลดเท่าใดยังไม่อาจระบุได้แน่ชัด จึงได้มีการศึกษาวิจัย ดังนี้

ทำการคัดเลือกผลมะม่วงที่จมน้ำ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นทำการล้างผลมะม่วงที่คัดเลือกให้สะอาดและทำการผึ่งให้แห้ง แล้วจุ่มในผลิตภัณฑ์ระดับความเข้มข้น 100, 250 และ 500 ส่วนต่อล้าน ปรับอุณหภูมิสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้ง และนำไปเก็บไว้ในกล่อง เพื่อดูอัตราการเกิดโรค และลักษณะภายนอกที่เกิดขึ้นกับมะม่วงที่ทำการจุ่มในผลิตภัณฑ์

โดยการประเมินระดับความรุนแรงของโรค ตามวิธีการของอนุวัฒน์ (2545) และประเมินเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายตามสูตรคำนวณของ สืบศักดิ์ (2540)

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังจากทำการหุบผลมะม่วงด้วย EM-1 แล้ว พบว่า เมื่อวันที่ 14 ของการเก็บรักษา มะม่วงที่หุบ สารละลาย EM-1 ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน มะม่วงยังเกิดคราบเปื้อนที่ผิวมะม่วงสังเกตเห็นได้ชัดเจน ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 250 ส่วนต่อล้าน ผิวมะม่วงเกิดคราบเปื้อนเล็กน้อย ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนต่อล้าน ไม่เกิดคราบเปื้อนเลย และปรากฏอาการของโรคในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา จนกระทั่งวันที่ 14 ของการเก็บรักษา พบว่า ในชุดควบคุม และชุดสาร Benomyl มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคสูงที่สุด คือ 90.00% ส่วนในชุด EM-1 100 ส่วนต่อล้าน, EM-1 250 ส่วนต่อล้าน และ EM-1 500 ส่วนต่อล้าน มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค 86.67, 66.67 และ 53.33% ตามลำดับ (ตารางที่ 7.2)

ตารางที่ 7.2 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค ในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา เมื่อลดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ EM-1

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรค (%)
Control (ชุดควบคุม)	90.00a ^{1/}
น้ำอุ่น 50°C	80.00c
EM-1 100 ส่วนต่อล้าน	86.67b
EM-1 250 ส่วนต่อล้าน	66.67d
EM-1 500 ส่วนต่อล้าน	53.33e
Benomyl	90.00a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



Control



น้ำอุ่น 45°C



EM-1 100 ส่วนต่อล้าน



EM-1 250 ส่วนต่อล้าน



EM-1 500 ส่วนต่อล้าน



Benomyl

ภาพที่ 7.4 ลักษณะผลมะม่วงหลังจากชุบในสารละลาย EM-1 ในวันที่ 14 หลังจากการเก็บรักษาในกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อการส่งออก ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง (ยังเกิดอาการคราบเหี่ยวบนผิวผลเมื่อชุบในสารละลายความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 250 ส่วนต่อล้าน มีคราบเหี่ยวเล็กน้อย)

7.2 การปรับปรุงส่วนผสมผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา

คณะผู้วิจัยได้ประชุมหารือถึงแนวทางเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องถูกลดระดับความเข้มข้นลงเพื่อลดความเป็นพิษที่เกิดกับผิวผลมะม่วง ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้ ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ที่อาจใช้ได้โดยไม่เกิดปัญหากับผิวผล คือ ประมาณ 250 ส่วนต่อล้าน ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่น่าจะใช้เพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ คือ การทดแทนสารที่หายไป ด้วยสารอินทรีย์บางชนิด ที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ และเป็นสารที่มีรายงานฤทธิ์ควบคุมเชื้อราได้บ้าง เช่น น้ำปูนใส, จุนสี (CuSO_4), ผงฟู, ค่างทับทิม เป็นต้น ซึ่งจำเป็นจะต้องศึกษาเบื้องต้นด้านพิษและประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราเสียก่อน ดังนี้

7.2.1 การทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของค่างทับทิมและน้ำปูนใส

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการคัดเลือกผลมะม่วงที่จมน้ำ มาทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง ก่อนจุ่มในสารละลายค่างทับทิม 1,000 ส่วนต่อล้าน, น้ำปูนใส 1,000 ส่วนต่อล้าน, ค่างทับทิม+EM-1 100 ส่วนต่อล้าน หรือน้ำปูนใส+EM-1 100 ส่วนต่อล้าน เปรียบเทียบกับการจุ่มน้ำอุ่น 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้ง และนำไปเก็บไว้ในกล่อง เพื่อดูอัตราการเกิดโรค และลักษณะภายนอกที่เกิดขึ้นกับผลมะม่วงที่ศึกษา

โดยการประเมินระดับความรุนแรงของโรค ตามวิธีการของอนุวัฒน์ (2545) และประเมินเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายตามสูตรคำนวณของ สืบศักดิ์ (2540)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7.3 พบว่า มะม่วงเริ่มแสดงอาการของโรคเมื่อวันที่ 7 ของการเก็บรักษา และผลมะม่วงเริ่มสุกพร้อมกันในทุกกรรมวิธี โดยในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา ในชุดควบคุมจะมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคสูงสุด คือ 60% และผลมะม่วงที่ชุบด้วยค่างทับทิม+EM-1 100 ส่วนต่อล้าน มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคต่ำที่สุด คือ 36.67% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ค่างทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้และประกอบกับฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด

ทั้งนี้ พบว่าการจุ่มผลมะม่วงในกรรมวิธีดังกล่าว ไม่เกิดคราบเปื้อนบนผิวผลมะม่วงเลยทั้ง 4 กรรมวิธี

ตารางที่ 7.3 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา เมื่อผสม
ผลิตภัณฑ์ EM-1 กับสารอินทรีย์

กรรมวิธี	การเข้าทำลายของโรค(%)
Control (ชุดควบคุม)	60.00a ^{1/}
น้ำอุ่น 50°C	46.67b
ค้างทับทิม	40.00c
น้ำปูนใส	46.67b
ค้างทับทิม+EM-1 100 ส่วนต่อล้าน	36.67d
น้ำปูนใส+EM-1 100 ส่วนต่อล้าน	40.00c

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

หมายเหตุ : ปรับอุณหภูมิสารละลายเป็น 50°C ทุกกรณี



Control



น้ำอุ่น 50 °C



น้ำปูนใส



น้ำปูนใส + EM-1



ด่างทับทิม



ด่างทับทิม + EM-1

ภาพที่ 7.5 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคของสารละลายของผลิตภัณฑ์ EM-1 ที่ผสมกับน้ำปูนใส หรือ ด่างทับทิม

7.2.2 การทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของผงฟู, ด่างทับทิม และ จุนลี

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำผงฟู (NaHCO_3), ด่างทับทิม (KMnO_4) และ จุนลี (CuSO_4) มาเตรียมความเข้มข้น ดังนี้ ผงฟู(NaHCO_3) ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 5,000 และ 10,000 ส่วนต่อล้าน ส่วนด่างทับทิม (KMnO_4) และ จุนลี (CuSO_4) ที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ส่วนต่อล้าน ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) ที่ใช้งานอาหารแข็ง จากนั้นเจาะเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* มาวางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานเปรียบเทียบกับ (Control) จึงทำการวัดขนาดของโคโลนี คำนวณหาร้อยละของการยับยั้งเชื้อราตามวิธีการของ ธรรมศักดิ์ (2538)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการทดสอบ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม CuSO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 64.89, 70.37 และ 82.22 % ตามลำดับ ส่วนอาหารที่ผสมด่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 27.78, 42.22 และ 56.89 % ตามลำดับ สำหรับ NaHCO_3 ที่ระดับความเข้มข้นถึง 10,000 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เพียง 48.89% (ตามตารางที่ 7.4, 7.5 และ ภาพที่ 7.6)

ตารางที่ 7.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ CuSO_4 และ KMnO_4 กับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

กรรมวิธี (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา	
	CuSO_4	KMnO_4
0 (Control)	0d ^{1/}	0d
250	64.89c	27.78c
500	70.37b	42.22b
1,000	82.22a	56.89a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี LSD

ตารางที่ 7.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ NaHCO_3 กับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

กรรมวิธี (ส่วนต่อล้าน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
0 (Control)	0d ^{1/}
1,000	22.6c
5,000	34.67b
10,000	48.89a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



ด่างทับทิม



CuSO_4



ผงฟู

ภาพที่ 7.6 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยสาร น้ำปูนใส (NaHCO_3), ด่างทับทิม (KMnO_4) และจุลินทรีย์ (CuSO_4)

สรุปผลการทดลอง

แนวทางเบื้องต้นในการเพิ่มฤทธิ์ควบคุมเชื้อราให้กับผลิตภัณฑ์ที่ลดความเข้มข้นเหลือเพียง 200 – 250 ส่วนต่อล้าน คือ การผสมกับด่างทับทิมหรือ CuSO_4 ซึ่งกรณีของด่างทับทิมจะไม่ใช่เป็นพิษต่อผิวผลมะม่วงแต่ความสามารถควบคุมโรคต่ำกว่า CuSO_4 ส่วนผงฟูมีประสิทธิภาพควบคุมโรคได้ต่ำเกินไป

7.2.3 การทดสอบความเป็นพิษของสาร CuSO_4 กับผิวผลมะม่วง

จุนสี (CuSO_4) เป็นสารปลอดภัยต่อมนุษย์ ปกติใช้รักษาความสะอาดสระว่ายน้ำ ในระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด คือ มีค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ถึง 82.22% ดังนั้นจึงได้เลือกสาร CuSO_4 สำหรับจะใช้ผสมกับผลิตภัณฑ์ (EM-1) ต่อไป แต่จำเป็นต้องตรวจสอบพิษที่อาจเกิดขึ้นกับผิวผลมะม่วงเสียก่อน ดังนี้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการคัดเลือกผลมะม่วงที่จมน้ำ มาล้างให้สะอาดและทำการผึ่งให้แห้ง แล้วจุ่มใน CuSO_4 ระดับความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 10,000 ส่วนต่อล้าน โดยปรับอุณหภูมิสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส จุ่มนาน 5 นาที จากนั้นนำผลมะม่วงมาผึ่งให้แห้ง และเก็บไว้ในสภาพกล่องบรรจุผลมะม่วงเพื่อส่งจำหน่าย เพื่อศึกษาผลกระทบต่อลักษณะผิวภายนอกของผลมะม่วง นาน 10 วัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังจากจุ่มผลมะม่วงในสารละลาย CuSO_4 เพื่อดูลักษณะผิวภายนอกของผลมะม่วงที่ความเข้มข้นระดับ 250, 500, 1,000 และ 10,000 ส่วนต่อล้าน ไม่พบอาการผิดปกติของผิวผลมะม่วงแต่อย่างใด ถึงแม้จะใช้ในระดับความเข้มข้น 10,000 ส่วนต่อล้าน หรือ 1% โดยปกติ CuSO_4 หรือจุนสีเป็นสารที่เกษตรกรใช้ในการฉีดพ่นป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้างในพืชผักอยู่แล้ว ในอัตราความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน (1 กรัม/น้ำ 1 ลิตร) โดยไม่มีพิษต่อใบพืชแต่อย่างใด (มาตรฐานเกษตรอินทรีย์, 2544) ดังนั้นการที่จะใช้ CuSO_4 ในการชุบผลมะม่วงจึงมีความเป็นไปได้ ในด้านความปลอดภัยต่อผิวผลมะม่วงและต่อผู้บริโภค และอาจช่วยเสริมฤทธิ์ให้กับ EM-1 ก็ได้

7.3 การทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ (EM-1) กับ CuSO_4 ในระดับงานอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังจากที่ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ CuSO_4 กับผิวผลมะม่วง พบว่า แม้ในระดับความเข้มข้นถึง 10,000 ส่วนต่อล้าน ก็ไม่เกิดอาการเป็นพิษแต่อย่างใดแล้ว คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษา CuSO_4 ต่อ ในด้านฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่าในมะม่วง โดยได้นำ CuSO_4 มาผสมกับผลิตภัณฑ์ EM-1 แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อราในระดับงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้ได้กำหนดศึกษาที่ความเข้มข้นต่ำ เพื่อไม่ให้เกินระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากข่า เพื่อคงคุณลักษณะว่าเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เตรียมความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ (EM-1) กับ CuSO_4 ดังนี้

- EM-1 200 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 200 ส่วนต่อล้าน
- EM-1 200 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน
- EM-1 250 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 200 ส่วนต่อล้าน
- EM-1 250 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน

แล้วนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) ที่ง้วนอาหารแข็งตัว จากนั้นเจาะเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาวางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มจานอาหารเปรียบเทียบกับ (Control) จึงทำการวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อรา คำนวณหาร้อยละการยับยั้ง ตามสูตรของ ธรรมศักดิ์ (2538)

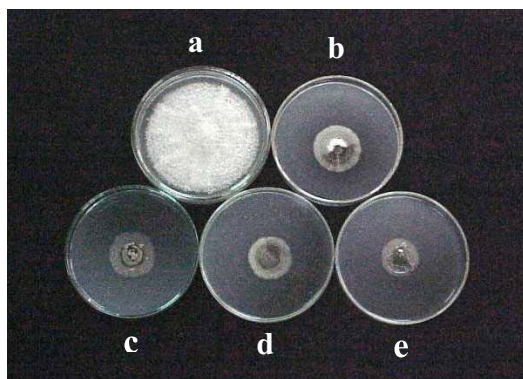
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลอง พบว่า ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ (EM-1) กับ CuSO_4 ที่ระดับความเข้มข้น EM-1 250 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด คือ 72.22% ส่วนสูตรผสมอื่นยับยั้งได้ 62.44 – 64.77% (ตารางที่ 7.6) การที่สูตรผสมสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด 72.22% ยังถือว่าไม่เพียงพอในการนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่าบนผลมะม่วงในแปลงปลูกจริง เนื่องจากในการใช้กับผลมะม่วงนั้นผลิตภัณฑ์จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้น้อยกว่าในระดับงานอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากในระดับงานอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นผลิตภัณฑ์สัมผัสกับเชื้อราโดยตรง ส่งผลให้เชื้อราหยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเพิ่มระดับความเข้มข้นของส่วนผสมผลิตภัณฑ์ (EM-1) ในการทดสอบกับเชื้อราในระดับงานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

ตารางที่ 7.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของ ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ (EM-1) กับ CuSO_4

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
ชุดควบคุม (Control)	0b ^{1/}
EM-1 200 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 200 ส่วนต่อล้าน	62.44a
EM-1 200 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน	64.22a
EM-1 250 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 200 ส่วนต่อล้าน	64.77a
EM-1 250 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน	72.22a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามหลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



หมายเหตุ

a = ชุดควบคุม (Control)

b = EM-1 200 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 200 ส่วนต่อล้าน

c = EM-1 200 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน

d = EM-1 250 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 200 ส่วนต่อล้าน

e = EM-1 250 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน

ภาพที่ 7.7 ประสิทธิภาพของสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ EM-1 ผสมกับ CuSO_4 ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

7.3.1 การทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ (EM-1) กับ CuSO_4 ในระดับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบสูตรผสมและสูตรเดี่ยวของ EM-1 และ CuSO_4 ดังนี้

- EM-1 500 ส่วนต่อล้าน
- CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน
- CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน
- EM-1 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 250 ส่วนต่อล้าน
- EM-1 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน

จากนั้นนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) รอให้อาหารแข็งแล้วนำเส้นใยเชื้อรามาวางไว้บนอาหาร รอจนกระทั่งเส้นใยเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเปรียบเทียบ จึงทำการวัดขนาดของโคโลนีและคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ตามสูตรคำนวณของธรรมศักดิ์ (2538)

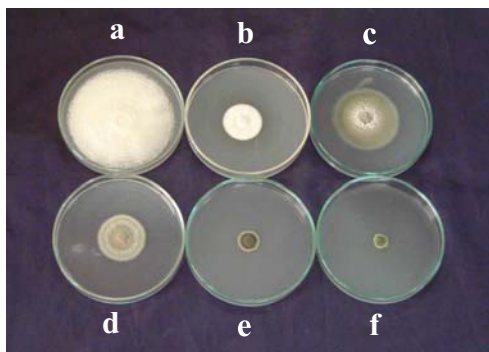
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 7.7 และภาพที่ 7.8 จะเห็นได้ว่า เมื่อใช้ EM-1 500 ส่วนต่อล้าน เพียงอย่างเดียวจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 69.44% ส่วน CuSO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 ส่วนต่อล้าน จะยับยั้งได้เพียง 43.11 และ 58.67% ตามลำดับ แต่เมื่อนำสารทั้ง 2 ชนิดมาผสมกันแล้ว พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้มากขึ้นถึง 93.56% ในกรณีที่เป็น EM-1 500 ส่วนต่อล้าน ผสมกับ CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน แสดงว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถผสมกันได้ดี และมีประสิทธิภาพมากพอที่จะใช้ในการควบคุมเชื้อราบนผลมะม่วงได้ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ตัดสินใจเลือกสาร CuSO_4 ในการผสมกับผลิตภัณฑ์ EM-1 ในระดับความเข้มข้น 500+500 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ควบคุมการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวบนผลมะม่วงในระดับแปลงเกษตรกรต่อไป

ตารางที่ 7.7 ประสิทธิภาพของส่วนผสมผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเจริญของเส้นใยเชื้อรา
ชุดควบคุม (Control)	0f ^{1/}
EM-1 500 ส่วนต่อล้าน	69.44c
CuSO ₄ 250 ส่วนต่อล้าน	43.11e
CuSO ₄ 500 ส่วนต่อล้าน	58.67d
EM-1 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO ₄ 250 ส่วนต่อล้าน	82.78b
EM-1 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO ₄ 500 ส่วนต่อล้าน	93.56a

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามหลังด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



หมายเหตุ

a = ชุดควบคุม (Control)

b = EM-1 500 ส่วนต่อล้าน

c = CuSO₄ 250 ส่วนต่อล้าน

d = CuSO₄ 500 ส่วนต่อล้าน

e = EM-1 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO₄ 250 ส่วนต่อล้าน

f = EM-1 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO₄ 500 ส่วนต่อล้าน

ภาพที่ 7.8 ประสิทธิภาพของสูตรผสมผลิตภัณฑ์ EM-1 กับ CuSO₄ ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราในระดับจานอาหารเลี้ยงเชื้อของส่วนผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ กับ CuSO₄ พบว่า ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ EM-1 กับ CuSO₄ ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน + 500 ส่วนต่อล้าน สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ดีที่สุดถึง ร้อยละ 93.56

7.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวผลมะม่วงของสารละลาย EM-1 ผสมกับ CuSO_4

จากการทดลองในระดับงานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข้อ 7.3) ได้สูตรผสมที่พร้อมจะนำไปใช้ในการชุบผลมะม่วง คือ EM-1 500 ส่วนต่อล้าน + CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน แต่ในการทดสอบกับผลมะม่วงเบื้องต้น ซึ่งได้เคย รายงานไว้บ้างแล้ว พบว่า ในการชุบผลด้วยผลิตภัณฑ์ EM-1 ที่ความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน ผลมะม่วงยังแสดงอาการ Toxic (คราบเปื้อน) บริเวณผิวผลอยู่บ้าง ทำให้ผิวมะม่วงไม่สวยจนอาจมีผลต่อการจำหน่ายมะม่วงสุกได้ โดยสาเหตุสำคัญเชื่อว่า เกิดจากความเป็นพิษของกรดที่ได้จากการสลายตัวของ 1'-ACA หรืออาจเกิดจากการ Browning เนื่องจาก Enzyme บางชนิดบริเวณผิวผลที่ถูกกระตุ้นเนื่องจากอุณหภูมิของสารละลายที่ใช้ชุบผลที่สูงถึง 50 องศาเซลเซียส และจากสาร 1'-ACA ซึ่งจากอาการเบื้องต้นคาดว่าจะเป็นเพราะค่าความเป็นกรดของสารละลายที่ใช้ชุบเปลือกผล ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองแนวทางแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการปรับ pH ของสารละลายด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยมี 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 1 ผล)

เตรียม EM-1 ให้มีระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) แล้วปรับค่า pH ของ EM-1 ให้เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 หลังจากนั้นเปรียบเทียบกับผลของการนำไปผสมกับ Ascorbic acid (Vitamin C) หรือ CuSO_4 ดังนี้

- 1) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 ณ อุณหภูมิห้องปกติ
- 2) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 และปรับอุณหภูมิเป็น 45 – 50 องศาเซลเซียส
- 3) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 และปรับอุณหภูมิเป็น 45 – 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปใส่ในตู้เย็น 3 วัน จึงนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องปกติ
- 4) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 + Ascorbic acid ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 ณ อุณหภูมิห้องปกติ
- 5) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 + Ascorbic acid ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 และปรับอุณหภูมิเป็น 45 – 50 องศาเซลเซียส
- 6) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 + Ascorbic acid ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 และปรับอุณหภูมิเป็น 45 – 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปใส่ในตู้เย็น 3 วัน จึงนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องปกติ
- 7) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 + CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน + 500 ส่วนต่อล้าน ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 อุณหภูมิห้องปกติ

- 8) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 + CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน + 500 ส่วนต่อล้าน ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 และปรับอุณหภูมิเป็น 45 – 50 องศาเซลเซียส
- 9) จุ่มผลมะม่วงใน EM-1 + CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน + 500 ส่วนต่อล้าน ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 และปรับอุณหภูมิเป็น 45 – 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปใส่ในตู้เย็น 3 วัน จึงนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องปกติ

กรณีของการเก็บผลไว้ที่อุณหภูมิต่ำหลังจากชุบผลมะม่วง เป็นกรรมวิธีศึกษาเลียนแบบสภาพจริงในการขนส่งผลมะม่วงจากประเทศไทยไปจำหน่ายยังประเทศข้างเคียงของไทย ซึ่งผลมะม่วงจะถูกเก็บในห้องเย็นจนถึงปลายทาง ก่อนทำการบ่มและจำหน่ายต่อไป

นำผลมะม่วงที่ทำความสะอาดและคัดเลือกไว้แล้ว มาจุ่มในผลิตภัณฑ์ที่เตรียมไว้ข้างต้นนาน 5 นาที พึ่งให้แห้ง แล้วเก็บใส่ตะกร้า วางไว้ในห้องที่มีอากาศถ่ายเท สังเกตลักษณะภายนอกของผิวผลมะม่วง

ผลการทดลองและวิจารณ์

ดังแสดงในภาพที่ 7.9 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเปลือกผลมะม่วงที่แช่ในสารละลายต่างๆ เปรียบเทียบกับที่แช่ในสาร benomyl และที่แช่ในน้ำเปล่า (Control) จะเห็นได้ว่า ในกรณีที่ใช้น้ำเปล่า (Control) จะเห็นได้ว่า ในกรณีที่ใช้น้ำเปล่า เติมน้ำ การปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่าเป็นด่างเพิ่มขึ้น (pH 6,7,8) จะช่วยลดความเป็นพิษของสารละลาย EM-1 ได้บ้าง (ภาพ ก ; ผลมะม่วงแถวกลาง) โดยผลมะม่วงในระยะผลสุกไม่แสดงอาการเกิดคราบเปื้อนบนผลให้เห็น การเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายเป็น 50 องศาเซลเซียส (B) จะทำให้เกิดคราบเปื้อนบนผลเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจนแม้จะปรับค่า pH เป็นถึง 6 หรือ 7 ส่วนที่ระดับ pH 8 จะมีปัญหาคราบเปื้อนน้อยลงจนแทบจะมองไม่เห็น แต่ในทางกลับกันถ้าเก็บผลมะม่วงไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ 3 วัน ก่อนนำออกมาปล่อยให้สุกตามปกติที่อุณหภูมิห้อง (BC) ปัญหาคราบเปื้อนเนื่องจากกรด (pH ต่ำถึง 4) มีแนวโน้มลดลง ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นชัดเจนถึงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความเป็นพิษของสารละลาย EM-1 ซึ่งได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายหลังจากผสมน้ำและใช้ชุบผลมะม่วง ซึ่งค่าความเป็นด่าง 6-8 จะลดปัญหาความเป็นพิษได้ นอกจากนี้อุณหภูมิของสารละลายก็มีผลเช่นกัน โดยการเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายถึง 50 องศาเซลเซียส จะทำให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้น

ในกรณีของการใช้ Ascorbic acid (Vitamin C) หรือ CuSO_4 ผสมกับ EM-1 (ภาพที่ 7.9 , ภาพ ข และ ค) โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่า สารเคมีทั้ง 2 ชนิดช่วยลดความเป็นพิษของ EM-1 ได้จนถึงระดับค่า pH 5 ส่วนที่ระดับ pH 6-8 ล้วนใช้ได้ผลดีเช่นกับที่ได้รายงานเฉพาะส่วน EM-1 ใดๆก็ตามเมื่อพิจารณาถึงผลบวกต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ EM-1 สารเคมี CuSO_4 จะมีประสิทธิภาพดีกว่า Vitamin C เพราะมีผลช่วยเสริมฤทธิ์ของ EM-1 ได้ด้วย ดังนั้นสารเคมีที่จะเลือกใช้ผสมกับ EM-1 คือ CuSO_4 นั่นหมายถึงว่า ผลิตภัณฑ์สารสกัดจากชาเพื่อควบคุมโรคผลเน่าในผลมะม่วงจะเป็นสารผสม EM-1 500 ส่วนต่อล้าน ผสมกับ CuSO_4 500 ส่วนต่อล้าน