

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายของชนิดของเห็ดอะมานิทาที่มีพิษ และไม่มีพิษ
2. วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะมานิทิน และฟัลลอยด์ดินที่มีในเห็ดสกุลอะมานิทาที่เป็นสาเหตุทำให้คนไทยเสียชีวิต
3. พัฒนาวิธีการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการทางการที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยาก และเหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจสอบสารพิษอย่างรวดเร็วเบื้องต้น
4. สร้างฐานข้อมูลเห็ดสกุลอะมานิทาที่เป็นพิษ

วิธิตดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาความหลากหลายชนิดของเห็ดอะมานิทาที่มีพิษ และไม่มีพิษ ในป่าชุมชนจังหวัดน่าน เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน

1. เก็บตัวอย่าง ในช่วงเดือน เมษายน - พฤศจิกายน 2552 โดยเก็บทุกระยะการเจริญเติบโตของดอกเห็ดกินได้ และเห็ดพิษที่มีรูปร่างเหมือนหรือใกล้เคียงกัน บันทึกลักษณะสัณฐาน และลักษณะอื่น ๆ ของดอกเห็ด ที่สังเกตได้ด้วยประสาทสัมผัส เช่น ลักษณะของดอกเห็ด ผิวสัมผัส สี ก้าน(ถ้ามี) ขนาด เนื้อ กลิ่น และรสชาติ (ในเห็ดกินได้) บันทึกข้อมูลสิ่งแวดล้อมบางอย่าง เช่น สถานที่เก็บ ระบบนิเวศ ความสัมพันธ์กับ แหล่งอาศัย ชนิดดิน pH ของดิน การดำรงชีพ พิษอาศัย ฯลฯ
2. ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของดอกเห็ดกินได้ และเห็ดพิษที่มีรูปร่างเหมือนกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ และสเตอริโอ พร้อมกับบันทึกภาพ
3. จัดจำพวก และ ระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดทั้งหมดที่เก็บรวบรวมมาโดยอาศัยการเปรียบเทียบกับรูปวิธานในหนังสือของ Bresinsky and Besl (1990) นำมาสร้างหนังสือรูปวิธานเห็ดพิษ และเห็ดกินได้ที่มีรูปร่างลักษณะเหมือนกัน และพัฒนาเป็นละมุนภัณฑ์(software) ในการจัดจำแนกเห็ดกินได้ และเห็ดพิษที่พบในภาคเหนือสร้างฐานข้อมูล และคู่มือในการเปรียบเทียบเห็ดพิษ / เห็ดกินได้ เผยแพร่ผ่านสื่อทุกรูปแบบป้องกันไม่ให้คนกินเห็ดพิษ

ตอนที่ 2 ปริมาณสารพิษอะมานิทิน และฟัลลอยด์ดินที่มีในเห็ดสกุลอะมานิทากินได้ และมีพิษ

การเตรียมตัวอย่าง นำดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละพื้นที่ แบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ หมวกเห็ด ก้าน และฐานดอกเห็ด นำไปอบที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นบดให้เป็นผงในเครื่องบดตัวอย่าง โดยการสกัดสารอะมานิทิน และสารฟัลลอยด์ดิน – นำผงเห็ดตัวอย่างไปขจัดไขมัน ในปิโตรเลียมอีเทอร์ 30 มิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง ในเครื่องสกัดแยก ส่วนที่ไม่ละลายนำไปอบต่อ และสกัดในเมทานอลที่ต้มเดือด นาน 3 ชั่วโมง ในเครื่องสกัดแยก ทำให้แห้งโดยใช้เครื่องสกัดแยกแบบ rotary evaporator ในตัวอย่างที่แห้งนำไปละลายด้วยเมทานอล บัน 30 นาที นำส่วนใสไปใช้การทดสอบเชิงคุณภาพว่ามีหรือไม่มีสารอะมานิทิน หรือฟัลลอยด์ดิน สารละลายที่เหลือนำไป วิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหา ปริมาณสารอะมานิทิน และสารฟัลลอยด์ดิน โดยใช้เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) ดัดแปลงตามวิธีการของ Enjalbert *et al.* (1992)

1. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพหาสารพิษ amanitin และ phalloitoxins ดัดแปลงจากวิธีการของ Block *et al.* (1955) Wieland (1968) and Yocum and Simons (1977) สารมาตรฐานแอลฟาอะมานิทิน (α -Amanitin) เตรียมโดยละลายสาร α -amanitin(Sigma, Singapore) 0.1 % ในเมทานอล และ

สารละลายมาตรฐาน phalloidin(Sigma, Singapore) 0.1 % ในเมทานอล ประมาณ 30 μm ของตัวอย่างน้ำสกัดเห็ดไซท์ทานที่มีพิษ ไม่มีพิษ นำไปหยดลงบนกระดาษ Whatman No.1 chromatographic paper หรือบนแผ่นซิลิกาเจลสำเร็จ หลังจากนั้นนำไปแช่ในแทงค์แก้วสี่เหลี่ยมที่บรรจุด้วย สารละลายของ butanone-acetone-water (30:3:5 v/v)สำหรับใช้เป็นเฟสในการเคลื่อนที่สาร ใช้เวลาประมาณ 40 นาที หลังจากนั้นนำมาพ่นด้วยสารละลาย 1 % solution of *trans*-cinnamaldehyde in methanol และนำไปใส่แทงค์ที่มีไอของกรดไฮโดร คลอริกเข้มข้นทันที (สีม่วง ซึ่งให้เห็นว่ามีส่วน α -amanitin, สีฟ้า แสดงว่าเป็นสาร Phalloidin ; สีส้ม เหลือง น้ำตาล หรือสีอื่น ๆ ไม่ใช่สารดังกล่าว)

2. การวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหา ปริมาณสารอะมานิติน และสารฟัลลอยด์ติน โดยใช้เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) ดัดแปลงตามวิธีการของ Enjalbert *et al.* (1992) การวิเคราะห์ HPLC กระทำโดยผสมสารละลายแบบ gradient elution เครื่องมือประกอบด้วยส่วนสำคัญดังนี้

- ชุดป้อนสารละลายอัตโนมัติ ยี่ห้อ Waters Automated Gradient Controller รุ่น 680
- บั๊มสำหรับ HPLC ยี่ห้อ Waters รุ่น 510, วาล์วนัดตัวอย่าง ขนาดของ loop ความจุ 10 μm
- หัววัด UV แบบหลายความยาวคลื่น ที่สามารถกำหนดหรือตั้งโปรแกรมได้ ยี่ห้อ Waters รุ่น a Model 490 (all from Waters) หัววัดดังกล่าวอนุญาตให้มีการติดตามของสารละลายที่ใช้ ที่ 2 ความยาวคลื่นอย่างต่อเนื่อง และการบันทึกของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาที่กำหนด (จาก 1 สเปกตรัม ต่อ 2 วินาที ถึง 16 สเปกตรัม) ในการศึกษาครั้งน้ระบบที่ใช้ได้กำหนดที่ 1 สเปกตรัมต่อวินาที การบันทึกของกราฟ (chromatograms) บันทึกแบบต่อเนื่องด้วยระบบ Chromatography Station for Windows (Waters) การแยกกระทำที่อุณหภูมิห้องโดยใช้คอลัมน์แบบ reversed-phase 5- μm ultrasphere ODS – 80TS column (150 x 4.6 mm I.D.)(TOSOH / TSK-GEL).

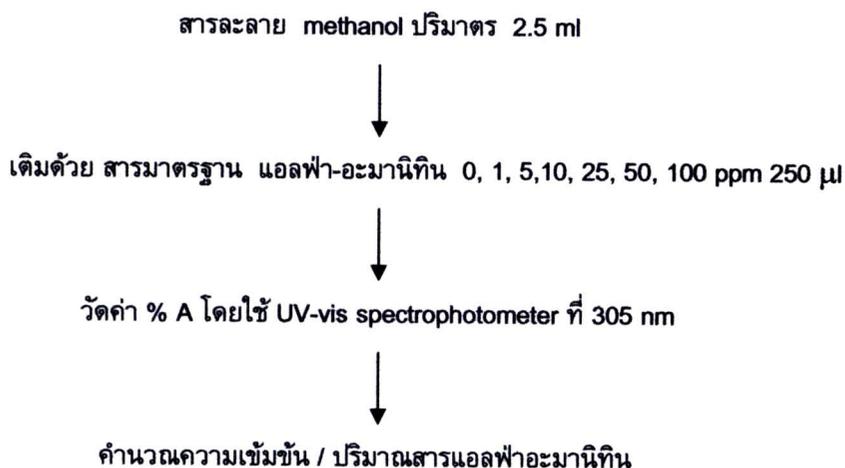
2.1 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่าง: สารละลาย A ความเข้มข้น 0.02 M aqueous ammonium acetate-acetonitrile (90:10, v/v) และ สารละลาย B มีความเข้มข้น 0.02 M aqueous ammonium acetate-acetonitrile (76:24, v/v) ค่า pH ของส่วนผสม A และ B ปรับให้ได้ 5 โดยใช้ กรดวาชเซียสอะซิติกที่ผ่านการกรองแล้ว (glacial acetic acid) โดยสัดส่วนของแกรเดียนส์ที่ผสมเริ่มต้นจาก : 100 % A นาน 4 นาที, 57 % B เป็นเวลา 16 นาที , 100 % B เป็นเวลา 10 นาที และสุดท้ายเป็น 100 % A. ปรับวัฏภาคเคลื่อน(mobile phase) ให้มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร / นาที ค่าการดูดกลืนแสง UV-vis ที่ใช้ อยู่ในช่วง 207 – 305 นาโนเมตร

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับสารมาตรฐาน α -amanitin และ phalloidin มีความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50 และ 100 ng/ μm . ข้อจำกัดในการตรวจสอบกำหนดโดยใช้ความเข้มข้นของสาร α -amanitin (และ phalloidin) ความแม่นยำของวิธีการในการศึกษา ความเข้มข้นของสาร α -amanitin (และ phalloidin) หกระดับความเข้มข้น (1, 5, 10, 25, 50 and 100 ng/ μm) เปรียบเทียบกับปริมาณของ α -amanitin (และ phalloidin) ที่เติมซึ่งทราบความเข้มข้น

2.3 การเตรียมตัวอย่างเห็ดอะมานิตินแห้ง หนัก 1 กรัม บดละเอียดในโกร้งบดที่แช่เย็น บด 1 – 2 นาทีนำไปสกัดด้วยสารละลาย เมทานอล-น้ำ-0.01 M กรดไฮโอโรคลอริก (มิลลิลิตร) [(5:4:1, v/v/v)]. ประมาณ 30 มิลลิลิตร ส่วนผสมดังกล่าวนำไปบ่มที่ 4 °C ทั้งคืน นำไปปั่นที่ 6000 g เป็นเวลา 10 นาที ในชั้นตอนนี้อาจทำซ้ำเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นมากขึ้น นำส่วนที่ใสที่ปั่นได้ 10 μm ไปฉีดใน HPLC เพื่อวิเคราะห์หาสาร amanitin และ phalloidin

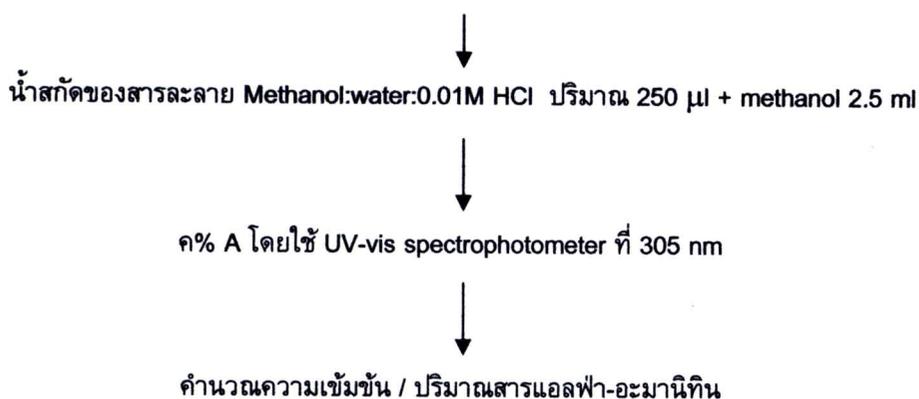
ตอนที่ 3 การพัฒนาการตรวจสอบสารพิษ amanitin และ phalloidin โดยใช้เครื่องวัด UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 305 และ 285 nm

1. หาช่วงการดูดกลืนแสง UV-vis ที่เหมาะสมของสารมาตรฐานอะมานิทิน และฟัลลอยด์ตินที่ละลายในสารละลายเมทานอล
2. นำสารมาตรฐานอะมานิทิน และฟัลลอยด์ติน เจือจางในเมทานอลทำการเจือจางสารมาตรฐานดังนี้
 - สารมาตรฐานอะมานิทิน เตรียมให้มีความเข้มข้น 0 1 10 25 50 และ 100 ppm
 - สารมาตรฐานฟัลลอยด์ติน เตรียมให้มีความเข้มข้น 0 3 7 15 และ 30 ppm
 นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน
3. หาประสิทธิภาพการสกัดสารมาตรฐานอะมานิทิน และฟัลลอยด์ตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในข้อ 2 ในสารละลายเมทานอล เปรียบเทียบกับสารละลาย Methanol:water:0.01M HCl (5:4:1)

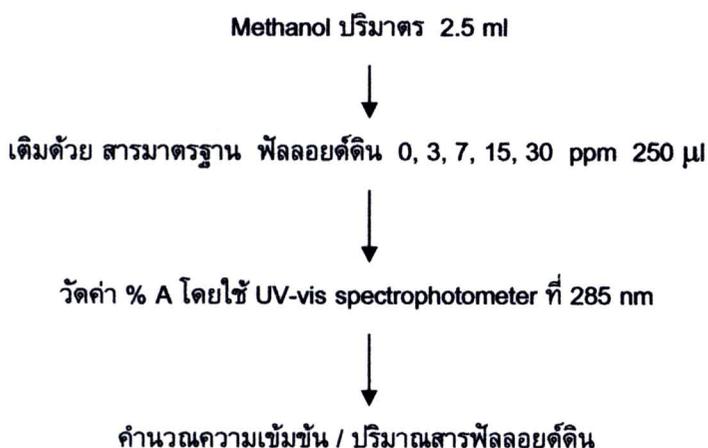


แผนภาพ 1 กราฟมาตรฐานสารมาตรฐานแอลฟา-อะมานิทิน 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ppm

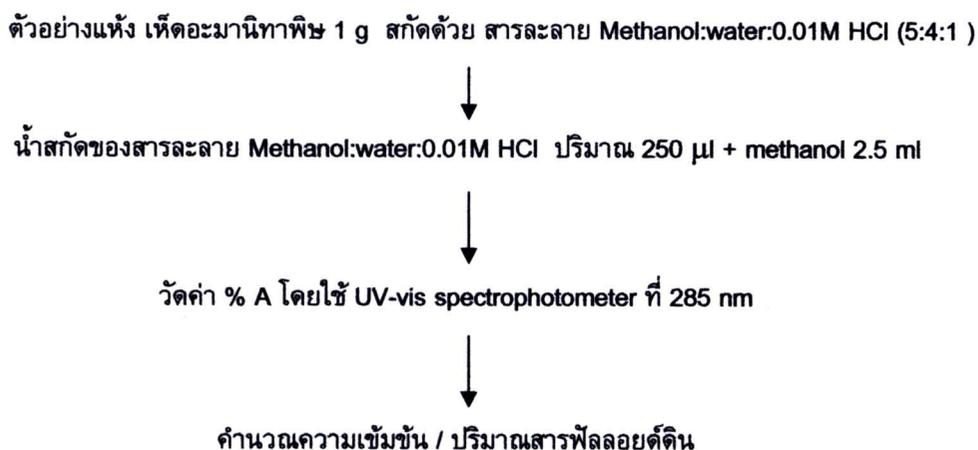
ตัวอย่างแห้ง เห็ดอะมานิทาพิษ 1 g สกัดด้วย สารละลาย Methanol:water:0.01M HCl (5:4:1)



แผนภาพ 2 ลำดับการสกัดสารแอลฟา-อะมานิทินในตัวอย่างแห้งเห็ดอะมานิทา



แผนภาพ 3 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฟัลลอยด์ดิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 285 nm



แผนภาพ 4 ลำดับการสกัดสารฟัลลอยด์ดินในตัวอย่างแห้งเห็ดอะมานิตาพิซ

สำหรับข้อจำกัดของการวิเคราะห์ ต้องรู้ลักษณะรูปร่างของเห็ดและ สามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นเห็ดสกุลอะมานิตา