องค์ประกอบทางเคมีของ *Psilocybe cubensis*

นางสาวทัศพร แคล้วอ้อม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Psilocybe cubensis*

Miss Tassaporn Khlaeo-om

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	องค์ประกอบทางเคมีของ *Psilocybe cubensis*
โดย	นางสาวทัศพร แคล้วอ้อม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ กิ๊กผล)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทัศพร แคล้วอ้อม : องค์ประกอบทางเคมีของ *Psilocybe cubensis* (CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Psilocybe cubensis*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.สุรชัย พรภคกุล, 72 หน้า.

การสกัดแยกสารเมแทบอไลต์ของเส้นใยและน้ำเลี้ยงของ *Psilocybe cubensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Malt Extract Broth (MEB) พบสเตียรอยด์และไตรกลีเซอไรด์ในส่วนสกัดเฮกเซนและส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนของเส้นใยเห็ดดังกล่าว และแยกได้สารประกอบ 2 ชนิด คือ 5-hydroxymethyl-2-furan-carbaldehyde (1) และ 5-hydroxymethyl-2-furan-carboxylic acid (2) จากส่วนสกัดเมทานอลในน้ำเลี้ยง อายุ 60 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการพิสูจน์โครสร้างสารทั้ง 2 โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ IR, MS, 1D และ 2D NMR นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการสร้างดอกเห็ดเฉพาะจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 45 วัน และในดอกเห็ดที่เกิดขึ้นมีไซโลไซบิน 0.051 % และไซโลซิน 0.010% (เมื่อเทียบกับน้ำหนักดอกเห็ดแห้ง 51.7 มิลลิกรัม) ส่วนก้านดอกเห็ดพบไซโลไซบิน 0.018 % และไซโลซิน 0.015% (เมื่อเทียบกับน้ำหนักก้านเห็ดแห้ง 55.7 มิลลิกรัม) ส่วนเส้นใยที่เกิดดอกเห็ดตรวจไม่พบไซโลไซบินและไซโลซิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา:..........เทคโนโลยีชีวภาพ.........ลายมือชื่อนิสิต:..

ปีการศึกษา:..........2551....................ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:..............

4872299023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Psilocybe cubensis* / HALLUCINOGENIC MUSHROOM / MAGIC MUSHROOM / SESQUITERPENOID COMPOUND

TASSAPORN KHLAEO-OM : CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Psilocybe cubensis* THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURACHAI PORNPAKAKUL, Ph.D., 72 pp.

Extraction and isolation of metabolites of *Psilocybe cubensis* from mycelia and fermentation broth cultured in Malt Extract Broth (MEB) for 60 days at room temperature obtained steroid and triglyceride from the hexane and dichloromethane extract of mycelia and two known compounds consisting of 5-hydroxymethyl-2-furan-carbaldehyde (1) and 5-hydroxymethyl-2-furan-carboxylic acid (2) from the methanol extract of fermentation broth. The structure of both compounds were established by spectroscopic data (IR, MS, and 1D and 2D NMR). Additionally *Psilocybe cubensis* only produced fruiting body on Potato Dextrose Broth (PDB) cultured at room temperature for about 45 days. Psilocybin and psilocin were found in cap and stalk of *Psilocybe cubensis* cultured on Potato Dextrose Broth (PDB) while both compounds were not found in mycelia. The amount of psilocybin and psilocin in cap were 0.051 % and 0.010% (dry weight 51.7 mg) and psilocybin and psilocin in stalk were 0.018% and 0.015% (dry weight 55.7 mg), respectively.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study:.......Biotechnology......Student's signature:...

Academic year:.........2008.............Thesis Advisor's signature:...

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก สำหรับความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ความช่วยเหลือทุกๆ อย่างที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์และรองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ กรรมการ สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน

ขอบคุณภาควิชาเคมี หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง และเจ้าหน้าที่ของหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ สมาชิกศูนย์วิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี (Research Centre for Bioorganic Chemistry, RCBC) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณสุนิสา สุวรรณเจริญ คุณเบญจพร เทียนสงค์ คุณผกาวัลย์ มูสิกพงศ์ คุณจตุพล เหลี่ยงสกุล คุณปรัชญา วาทะสิทธิ์ คุณสรสุดา เสตะพันธ์ คุณนฤมล ใบพัด คุณวารุณี ตันติธนากรกุลและน้องๆ ท่านอื่น ๆ สำหรับแรงงาน ความช่วยเหลือ ข้อแนะนำ กำลังใจ และทุกๆอย่าง

ขอขอบพระคุณ ภญ. ดวงพร อภิกันต์พันธุ์ ภญ.พูนทรัพย์ โกสินทร์ ภญ.จิดาภา กนกสุนทรรัตน์ ภญ.บงกช พันธ์บูรณานนท์ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวัตถุเสพติด สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่าน สำหรับการสนับสนุน ความช่วยเหลือและส่งเสริมให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายขอบคุณครอบครัว พ่อ แม่ พี่น้อง และเพื่อนๆ สำหรับความเข้าใจและกำลังใจตลอดเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย ง

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ จ

กิตติกรรมประกาศ ฉ

สารบัญ ช

สารบัญตาราง ฎ

สารบัญภาพ ฏ

สารบัญแผนภาพ ฑ

คำอธิบายสัญลักษณ์ ฒ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 เห็ด (mushroom) 4

2.2 เห็ดมีพิษ (Poisonous mushrooms) 5

2.3 เห็ดพิศวง (Magic Mushrooms) 6

2.4 รายงานการวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดสกุล *Psilocybe* 9

2.5 กลไกการสังเคราะห์ไซโลซินและไซโลไซบิน 13

2.6 ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของ *Psilocybe cuben*sis ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด 14

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 17

3.1 ตัวอย่างเส้นใยเห็ด 17

3.2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเส้นใย *Psilocybe cubensis* ที่นำมาใช้ศึกษา 17

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเกตด้วยตาเปล่า 17

3.2.2 การศึกษาลักษณะโครงสร้างเส้นใย *Psilocybe cubensis* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ 17

3.2.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเส้นใย *Psilocybe cubensis* 18

3.3 เครื่องมือ 18

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 19

3.4.1 ตัวทำละลาย 19

3.4.2 สารเคมีชนิดอื่น ๆ 19

หน้า

3.4.2.1 ตัวดูดซับสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 19
3.4.2.2 TLC aluminum sheet ที่มีเฟสคงที่เป็น silica gel 60 F_{254} 19
3.5 การเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis* 19
3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ 20
3.7 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Psilocybe cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 20
3.8 การเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis* และการสกัดสารเมแทบอไลต์ที่สร้างได้จาก *Psilocybe cubensis* 20
3.8.1 การเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe Cubensis* 20
3.8.2 การสกัดสารเมแทบอไลต์ที่ได้จาก *Psilocybe cubensis* 20
3.9 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยง *Psilocybe cubensis* 22
3.9.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากเส้นใย *Psilocybe cubensis* 22
3.9.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis* 22
3.9.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร 23
3.9.3.1 สาร 1 จากลำดับส่วนที่ 78 - 93 23
3.9.3.2 สาร 2 จากลำดับส่วนที่ 151 - 162 24
3.10 การวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทไซโลไซบินและไซโลซินจากเห็ด *P. cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะ (High performance liquid chromatography; HPLC) 26
3.10.1 การเตรียมสารมาตรฐานผสมไซโลไซบิน ไซโลซินและ 4-hydroxyindole สำหรับวิเคราะห์โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะ (HPLC) 26
3.10.2 การเตรียมสกัดตัวอย่างเห็ด *Psilocybe cubensis* 27
3.10.2.1 การทำเห็ดให้แห้ง 27
3.10.2.1 ดอกเห็ด (cap) 27
3.10.2.3 ก้านดอก (stalk) 27
3.10.3 ภาวะที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC 27
3.10.4 การคำนวณปริมาณไซโลไซบินและไซโลซิน 28

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล 30

4.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเส้นใย *Psilocybe cubensis* ที่นำมาใช้ศึกษา 30

4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 30

4.1.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยตาเปล่า 30

4.1.1.2 ผลการศึกษาลักษณโครงสร้างเส้นใย *Psilocybe cubensis* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ 31

4.1.2 ผลการพิสูจน์สายพันธุ์ทางอณูชีววิทยา 31

4.1.3 สัณฐานวิทยาของเห็ด *Psilocybe cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน 32

4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของรา *Psilocybe cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลว MEB 33

4.3 การเลี้ยง *Psilocybe cubensis* และการสกัดสารเมแทบอไลต์ที่สร้างได้จาก *Psilocybe cubensis* 34

4.4 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis* 35

4.4.1 การแยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ 35

4.4.1.1 ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจากเส้นใย 35

4.4.1.2 ส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ 35

4.4.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 36

4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทไซโลไซบิน และไซโลซิน จากเห็ด *Psilocybe cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 วัน โดยเทคนิค HPLC 41

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 44

รายการอ้างอิง 45

ภาคผนวก 49

ภาคผนวก ก 50

ภาคผนวก ข 52

ภาคผนวก ค 63

ภาคผนวก ง 65

ภาคผนวก จ 66

ภาคผนวก ฉ 69

หน้า

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 สารพิษที่พบในเห็ดพิษชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย 5
3.1 การแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis* 23
4.1 ขนาดของโคโลนีและลักษณะทางกายภาพของ *Psilocybe cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง PDA, MEA, CMA และ SDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ 33
4.2 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 1 36
4.3 ข้อมูล ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ HMBC ของสาร 1 (ใน $CDCl_3$) 37
4.4 การเปรียบเทียบ ^{13}C-NMR และ ^{1}H-NMR ของสาร 1 กับ 5-HMF 38
4.5 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 2 39
4.6 ข้อมูล ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ HMBC ของสาร 2 (ใน CD_3OD) 39
4.7 การเปรียบเทียบ^{13}C-NMR และ ^{1}H-NMR ของสาร 2 กับสาร 1 และ 5- Hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid 41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 สิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มอาณาจักรเห็ดรา 4
2.2 ตัวอย่างเห็ดมีพิษ (Poisonous mushrooms)บางชนิดที่พบในประเทศไทย 6
2.3 ตัวอย่างของเห็ดที่ออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท (hallucinogenic mushrooms) ในประเทศไทย 7
2.4 โครงสร้างทางเคมีของไซโลไซบินและไซโลซิน 8
2.5 บริเวณเซอโรโทนิน รีเซพเตอร์ (serotonin receptor site) 9
2.6 โครงสร้างทางเคมีของเซอโรโทนินและแอลเอสดี 9
2.7 โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้จากเห็ดหลอนจิตและประสาท 12
2.8 วิถีของชีวสังเคราะห์ของไซโลไซบินและไซโลซิน 13
2.9 ดอกเห็ด *Psilocybe cubensis* 14
2.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. cubensis* เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ 15
2.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. cubensis* เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 16
3.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 1 24
3.2 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2 25
4.1 ลักษณะทางกายภาพของโคโลนีและเส้นใยของ *P. cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, MEA, CMA และ SDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ 30
4.2 ลักษณะเส้นใยของ *P. cubensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X 31
4.3 ลำดับเบสบริเวณ ITS ร่วมกับไพรเมอร์ ITS1f และ ITS4 ของ *P. cubensis* เมื่อเทียบกับข้อมูลดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank 32
4.4 ดอกเห็ดของ *P. cubensis* ที่เกิดในอาหารลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 45 วัน 33
4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเส้นใย *P. cubensis* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MEB เป็นเวลา 60 วัน 34
4.6 HMBC ของสาร 1 37
4.7 โครงสร้างทางเคมีของสาร 1 38
4.8 HMBC ของสาร 2 40

รูปที่ หน้า

4.9 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2 40
4.10 เห็ด *P. cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDA และดอกเห็ด
อายุประมาณ 45 วัน 42
4.11 โครมาโทแกรมของของ (ก), (ข), (ค) และ (ง) ที่วิเคราะห์ด้วย Inertsil ODS-3 column
(15cmX4.6mmX5□m), mobile phase 10 mM Ammonium formate (pH 3.5) :
Acetonitrile (95:5 v/v), 1.0 ml/min, Inj. Vol. 20 ul ที่ UV 220 nm 43
1ข ^{1}H-NMR สเปคตรัมของสาร 1 52
2ข ^{13}C-NMR สเปคตรัมของสาร 1 53
3ข COSY ของสาร 1 54
4ข HSQC ของสาร 1 55
5ข HMBC ของสาร 1 56
6ข NOESY ของสาร 1 57
7ข TOCSY ของสาร 1 58
8ข ^{1}H-NMR สเปคตรัมของสาร 2 59
9ข ^{13}C-NMR สเปคตรัมของสาร 2 60
10ข HSQC ของสาร 2 61
11ข HMBC ของสาร 2 62
1ค IR สเปกตรัมของสาร 1 63
2ค IR สเปกตรัมของสาร 2 64
1ง แมสสเปกตรัมของสาร 1 65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพ

รูปที่ หน้า

3.1 วิธีการสกัดเส้นใยและน้ำเลี้ยงรา *Psilocybe cubensis* 21
3.2 วิธีการสกัดส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis* 22
3.3 การเตรียมสารมาตรฐานผสมไซโลไซบิน ไซโลซินและ 4-hydroxyindole
ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
μg/mL	microgram per milliliter
CD_3OD	deuterated methanol
$CDCl_3$	deuterated chloroform
^{13}C-NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy
COSY	^{1}H-^{1}H correlation spectroscopy
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
d	doublet (for NMR spectral data)
dd	doublet of doublet (for NMR spectral data)
DMSO	dimethyl sulfoxide
δ	chemical shift
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
^{1}H-NMR	proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IR	infared spectrophotometer
ITS	internal transcribed spacer
J	coupling constant (for NMR spectral data)
MHz	megahertz
MS	mass spectrometry
MW	molecular weight
$[M+H]^+$	protonated molecular ion
[M+Na]+	sodium adducted molecular ion
NMR	nuclear magnetic resonance spectrometry
s	singlet (for NMR spectral data)
TLC	thin layer chromatography
TOF	Time of flight
UV	ultraviolet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เห็ด (mushroom) เป็นกลุ่มของเชื้อราขนาดใหญ่ซึ่งในระยะหนึ่งของวงจรชีวิตจะสร้างโครงสร้างที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า คือ ระยะดอกเห็ด (fruiting body) โดยขนาดของดอกเห็ดแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดได้ เห็ดเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง นอกจากนี้ยังนำสารสกัดจากเห็ดมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น ยาต้านไวรัส (anti-viral agent) ยารักษามะเร็ง (anti-cancer agent) ยาเพิ่มภูมิคุ้มกัน (immunopotentiating agent) ยาบำรุงตับ (hepatoprotective agent) และยาลดปริมาณโคเลสเตอรอลในหลอดเลือด (hypocholesterolaemic agent) เป็นต้น ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้อาจสกัดได้จากเส้นใยเห็ด (mycelium) หรือดอกเห็ดที่มีคุณสมบัติทางยาและโภชนาการ เห็ดหลายชนิดเป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น โรคเน่าของพืชในเขตร้อน และหลายชนิดเป็นเห็ดพิษ (toxic mushroom) บางชนิดมีพิษร้ายแรงถึงแก่ชีวิต เช่น *Amanita verna, Amanita virosa* เป็นต้น (สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, 2545ก) จากการศึกษาและวิจัยเห็ดพิษในประเทศไทยโดยสมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย สามารถจำแนกตามกลุ่มของสารพิษได้หลายกลุ่ม หนึ่งในนั้นคือกลุ่มที่สร้างสารพิษไซโลไซบิน (Psilocybin) และไซโลซิน (Psilocin) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท (Hallucinogenic compound) ทำให้เกิดอาการทางประสาทหลอน มึนเมา สับสน มีความคิดและอารมณ์เปลี่ยนแปลงคล้ายเอลเอสดี (LSD) อาจถึงขั้นวิกลจริต กล่าวกันว่าผู้ที่ได้รับสารพิษแสดงอาการเห็นอะไรเป็นสีเขียวหมด ต่อมาอาการจะหายเป็นปกติ แต่บางรายงานพบว่าอาจมีอันตรายถึงตายได้หากรับประทานในปริมาณมาก (พูนพิไล, 2541) ดังนั้นจึงจัดเห็ดกลุ่มดังกล่าวเป็นยาเสพติด ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น *Copelandia cyanescens (Berk. & Br.) Sing.*, *Psilocybe cubensis (Earle) Sing.* หรือเห็ดขี้ควาย บางแห่งเรียกเห็ดโอสถลวงจิต, *Gymanopilus Aeruginosus (Peck) Sing.* หรือเห็ดขอนสีทองเกล็ดแดง เป็นต้น (Miller, 1980; Lincoff และ Mitchel, 1977; สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, 2545ข)

Psilocybe cubensis พบได้บนมูลวัวมูลควาย มีสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท จึงจัดเป็นเห็ดที่ออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท โดยทั่วไปจะเรียกว่า Magic mushroom ซึ่งเป็นชื่อที่รู้จักกันดีในหมู่นักท่องเที่ยวชาวต่างประเทศ ในประเทศไทยจะเรียกว่า เห็ดขี้ควาย หรือ เห็ดพิศวง

เห็ดเหล่านี้นิยมนำมาใช้ในทางที่ผิดกฎหมาย จึงถูกควบคุมเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2531) เรื่องระบุชื่อและประเภทยาเสพติดให้โทษ (พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522) สำหรับการตรวจพิสูจน์ตัวอย่างเห็ดที่สงสัยว่าเป็นยาเสพติด โดยส่วนใหญ่สถานตรวจพิสูจน์จะได้รับตัวอย่างเห็ดที่เป็นเห็ดแห้งหรือเป็นผง บางครั้งเป็นเห็ดสดที่บอบช้ำหรือมีสภาพใกล้เน่า ทำให้ยากแก่การตรวจลักษณะทางกายภาพเพื่อจำแนกชนิด ดังนั้นจึงต้องใช้การตรวจเอกลักษณ์สารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ด คือ ไซโลซินและไซโลไซบิน โดยใช้วิธีการดูการเกิดสีกับน้ำยาทดสอบ (Color test) และเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น โครมาโทกราฟีแบบบาง (Thin layer chromatography; TLC) เพื่อยืนยันผลการพิสูจน์ จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาโดยส่วนใหญ่จะเน้นศึกษาสารออกฤทธิ์สำคัญ ทั้ง 2 ชนิดจากส่วนดอกเห็ด ซึ่งพบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ในเห็ดแต่ละชนิดจะแตกต่างกันและมักพบไซโลไซบินมากกว่าไซโลซิน (Beug และ Bigwood, 1981; Gross, 2000; Tsujikawa และคณะ, 2003) และในปี 2005 Suwancharoen ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ *Psilocybe samuiensis* ซึ่งเป็นเห็ดหลอนจิตและประสาทสายพันธุ์ใหม่ที่เพิ่งค้นพบในประเทศไทย โดยพบสารประกอบเซสควิเทอร์พีนอยด์ (sesquiterpenoid) ชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ *ent*-2,3-secoaromadendrane-2,10,12-triol แต่ไม่พบการสร้างไซโลไซบิน ไซโลซินและเบโอซิสทิน (baeocystin) จากเส้นใยของเห็ดชนิดนี้ (Pornpakakul และคณะ, 2009) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารประกอบชนิดใหม่นี้อาจเป็นสารเอกลักษณ์เฉพาะของ *Psilocybe samuiensis* จึงเป็นมูลเหตุจูงใจสำคัญในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ *Psilocybe cubensis* เพื่อหาสารเอกลักษณ์เฉพาะ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีในการแยกสกัดสาร ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่ได้ นอกจากนั้นสารเอกลักษณ์เฉพาะที่ได้อาจนำไปพัฒนาเป็นชุดทดสอบเพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของเส้นใยเห็ดสายพันธุ์นี้ ซึ่งเป็นยาเสพติดให้โทษ เพื่อให้สะดวกในการควบคุมและป้องกันการนำไปใช้เป็นยาเสพติดได้ดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. แยกองค์ประกอบทางเคมีจากเห็ดสายพันธุ์ *Psilocybe cubensis*
2. พิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากเห็ด *Psilocybe cubensis*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ และอาจได้สารชนิดใหม่ที่สร้างขึ้นจากเห็ดสายพันธุ์ *P. cubensis* ซึ่งอาจนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ด้านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของยาเสพติดต่อไป

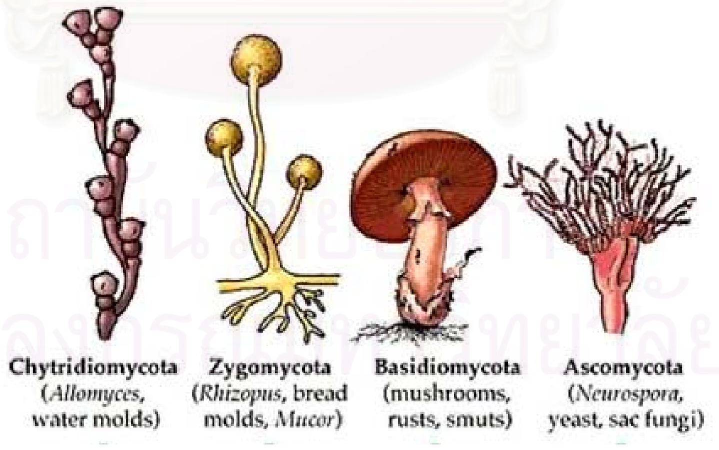
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ด (Mushrooms)

เห็ด (mushroom) เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ใน Class Basidiomycota ในอาณาจักรเห็ดรา (Kingdom Fungi) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ซึ่งเป็นอาณาจักรเดียวกันกับ รา และยีสต์ ถือว่าเป็นราชั้นสูงที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ เนื่องจากเห็ดไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงต้องอาศัยอาหารจากการย่อยสลายอินทรียวัตถุจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในการดำรงชีพ อย่างไรก็ตามเห็ดบางชนิดอาจดำรงชีวิตแบบปรสิต หรืออยู่รวมกับสิ่งมีชีวิตอื่นโดยอาศัยประโยชน์ซึ่งกันและกัน เช่น ไลเคนส์ โดยทั่วไปจะมองเห็นได้ชัดเจนในระยะที่เป็นกลุ่มใยรา (mycelium) หรือระยะที่เกิดส่วนสร้างสปอร์ (fruiting body) จำนวนเป็นล้าน ๆ ในครีบดอก (gills) ทำให้เห็ดขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วมาก นักวิชาการคาดว่าจะมีเห็ดราในโลกนี้มากมายถึง 1.5 ล้านชนิด เท่าที่ทราบชื่อแล้วประมาณ 70,000 ชนิด (Arora, 1986)



รูปที่ 2.1 สิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มอาณาจักรเห็ดรา(Arora, 1986)

2.2 **เห็ดมีพิษ** (Poisonous mushrooms)

เห็ดมีพิษที่พบอยู่ทั่วโลกมีประมาณ 100 ชนิด ซึ่งสารพิษจะเป็นสารทางชีวเคมีซึ่งมีความหลากหลาย บางชนิดก็จะพบเฉพาะในบางสายพันธุ์เท่านั้น เห็ดบางชนิดอาจมีสารพิษได้หลายชนิดขณะที่เห็ดหลาย ๆ ชนิดอาจมีสารพิษที่คล้ายคลึงกัน จากการศึกษาเห็ดพิษในประเทศไทย สามารถจำแนกตามสารพิษออกเป็น 7 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และรูปเห็ดพิษบางชนิดที่พบในประเทศไทย ดังแสดงในรูปที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 สารพิษที่พบในเห็ดพิษชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย (สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, 2545ค)

สารพิษ	ชนิดของเห็ดพิษ
Cyclopeptides	เห็ดระโงกหิน (*Amanita verna*, *Amanita virosa*)
Monomethylhydrazine	เห็ดสมองวัว (*Gyromitra esculenta*)
Coprine	เห็ดหิ่งห้อย (*Coprinus atramentaris*)
Muscarine	Amanita สกุล Clitocybe และสกุล Inocybe
Ibotenic acid และ Muscimol	ยังไม่มีรายงาน
Gastrointestinal	เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybdites*)
	เห็ดกรวยเกล็ดทอง (*Gomphus floccosus*)
Psilocybin และ Psilocin	เห็ดขี้ควาย (*Psilocybe cubensis*), *Copelandia cyanescens*
	เห็ดขอนสีทองเกล็ดแดง *Gymanopilus aeruginosus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

รูปที่ 2.2 ตัวอย่างเห็ดมีพิษ (Poisonous mushrooms) บางชนิดที่พบในประเทศไทย

(ก) เห็ดระโงกหิน (*Amanita virosa*) (Noguere, 2005)

(ข) เห็ดสมองวัว (*Gyromitra esculenta*) (Pumarat, 2007)

(ค) เห็ดกรวยเกล็ดทอง (*Gomphus floccosus*) (Kuo, 2006)

(ง) เห็ดขอนสีทองเกล็ดแดง *(Gymanopilus aeruginosus*) (Kinoko, 2007)

2.3 **เห็ดพิศวง** (Magic Mushrooms)

เห็ดพิศวงเป็นเห็ดซึ่งเจริญเติบโตในธรรมชาติ และให้สารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท (Bogusz และคณะ, 1998; Seivewright และ Lagundoye, 2000) Magic mushrooms เป็นพวก Saprophytes สามารถเจริญเติบโตได้ทั่วทุกหนทุกแห่งบนโลก *Panaeolus cyanescens* พบได้ใน ฮาวาย เม็กซิโก ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลียตะวันออกและไทย เป็นต้น (Allen, 1992 และ Stamets,1996) *Psilocybe cubensis* พบได้ในประเทศเม็กซิโก คิวบา อเมริกา ออสเตรเลีย อินเดีย เวียดนาม ญี่ปุ่น และไทย เป็นต้น (Tsujikawa และคณะ, 2003; Allen,1992 และ Stamets,1996)

เห็ดที่ออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท (Hallucinogenic fungi) พบได้ทั่วไปในทุ่งหญ้า มูลสัตว์ ป่า และพื้นที่ที่ผ่านการเผาไหม้ ส่วนใหญ่มีขนาดเล็กและมีสีอึมครึม เห็ดประเภทนี้มีอยู่ในสกุล *Psilocybe*, *Conocybe*, *Gymnopilus*, *Inocybe* และ *Pluteus* โดยสกุลหลักเป็น *Panacolus* และ *Psilocybe* (Stamets, 1996) เห็ดทั้ง 2 สกุลดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวออกสี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟ้า ๆ เมื่อมันบอบช้ำหรือฉีกขาด (bluing reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาความรู้สึกตอบสนองต่อการกระตุ้นของสภาวะการเจริญหรือขณะที่พวกมันถูกสัมผัสเมื่อถูกเก็บ โดยปฏิกิริยานี้ได้รับความสนใจจากนักเคมีและนักเภสัชวิทยา ซึ่งการเกิดสีน้ำเงินเป็นผลจากการย่อยไซโลซินที่ไม่เสถียร (dephosphorylated psilocybin) ได้สารประกอบที่ไม่ทราบโดยเอนไซม์ของเซลล์เห็ดนี้หมายถึงว่า เมื่อ *Psilocybe* หรือ *Panaeolus* เป็นแผลมีสีออกฟ้า ๆ ซึ่งปฏิกิริยาการเกิดสี เป็นตัวบ่งชี้ว่า psilocin เกิดขึ้น (Stamets, 1996 และ Levine, 1967)

เห็ดที่ออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทที่พบบ่อยบนมูลวัวควาย มีชื่อเรียกว่า เห็ดขี้ควาย เป็นเห็ดที่พบในประเทศไทยอยู่ในสกุล *Psilocybe* และ *Panaeolus* รวมถึง *Psilocybe cubensis, Psilocybe subcubensis, Panaeolus* (*Copelandia*) *Cyanescens, Panaeolus antillarum* (Allen, 1992) และ *Psilocybe samuiensis* (Guzman และคณะ, 1993; Gartz และคณะ, 1994) ซึ่งเห็ดส่วนใหญ่จะพบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยเห็ดขี้ควายบางส่วนแสดงในรูป 2.3

(ก)

(ข)

รูปที่ 2.3 ตัวอย่างของเห็ดที่ออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท (hallucinogenic mushrooms) ในประเทศไทย (Allen,1992)

(ก) *Psilocybe cubensis* เติบโตในธรรมชาติ

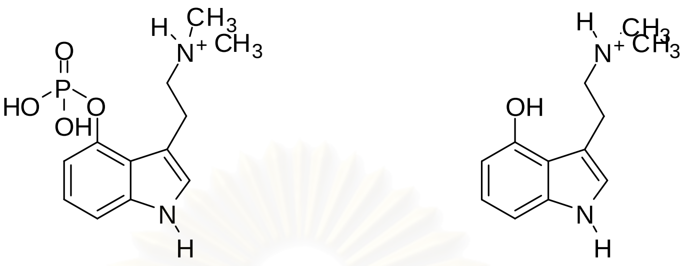
(http://www.erowid.org/library/books_online/magic_mushrooms_aunz/images/psilocybe_cubensis15_sm.jpg)

(ข) *Psilocybe samuiensis* เติบโตในธรรมชาติ

(http://forums.mycotopia.net/attachments/forum-international/73661d1200432441-evolution-sem-psilocybe-samuiensis-thailand-semsam20.jpg)

ผลกระทบของยาหลอนประสาท (psychedelic) ของบางสายพันธุ์จากสกุล *Psilocybe* กล่าวถึงครั้งแรกโดย Wasson ในปี 1957 (Beug และ Bigwood, 1981) Hofmann และคณะ (Stamets, 1996) พบสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ 2 ชนิด ในกลุ่มของ tryptamine จาก *Psilocybe mexicana* คือ ไซโลไซบิน (psilocybin; 4-phosphoryloxy-*N*,*N*-dimethyltryptamine)

และไซโลซิน (psilocin; 4-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine) (Beug และ Bigwood, 1981; Keller และคณะ, 1999) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.4

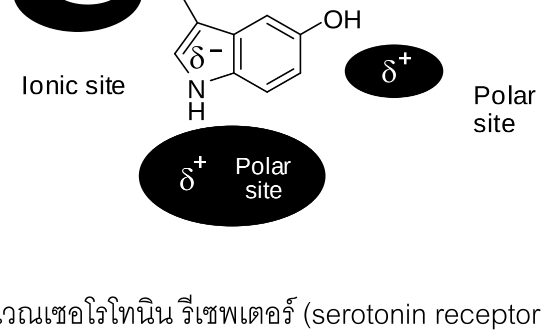


Psilocybin Psilocin

รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของไซโลไซบิน (Psilocybin) และไซโลซิน (Psilocin)

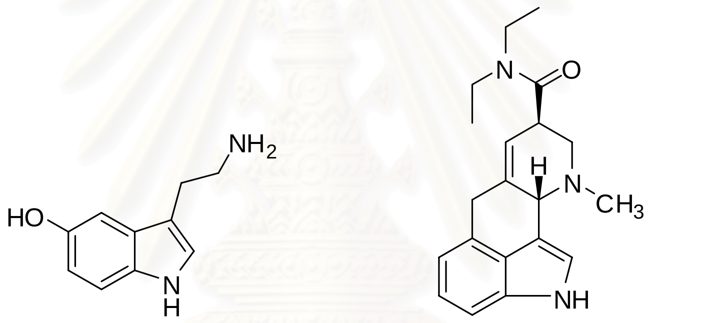
สารไซโลไซบินและไซโลซินสามารถทำปฏิกิริยากับเซอโรโทนิน รีเซพเตอร์ (serotonin receptor) เช่น 5-HT$_{1A}$, 5-HT$_{2A}$ และ 5-HT$_{2C}$ เป็นต้น โดยเซอโรโทนิน รีเซพเตอร์ เป็นสารสื่อประสาทในกลุ่มของ โมโนเอมีน (monoamine) พบในเนื้อเยื่อหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular tissue), เนื้อเยื่อบุโพรง (endothelial tissue) เซลล์เม็ดเลือด และในระบบสมองส่วนกลาง (central nervous system; CNS) มีหน้าที่สำคัญคือควบคุมเกี่ยวกับการแสดงออกทางอารมณ์ ความรู้สึก (Hasler และคณะ, 2004 และ Nichols, 2004) เมื่อโมเลกุลของสารหลอนจิตและประสาทเข้าสู่ตัวรับที่เหมือนกับสารสื่อประสาท และเมื่อมีการกระตุ้นจะทำให้การรับสัญญาณผิดเพี้ยนไป (Ophardt, 2003) ซึ่งบริเวณเซอโรโทนิน รีเซพเตอร์ แสดงไว้ในรูปที่ 2.5 และโครงสร้างของเซอโรโทนิน แสดงในรูปที่ 2.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 บริเวณเซอโรโทนิน รีเซพเตอร์ (serotonin receptor site) (Ophardt, 2003)

สารออกฤทธิ์ที่พบในเห็ดสกุล *Psilocybe* ประกอบด้วยไซโลไซบิน, ไซโลซินและ เบโอซิสทิน (baeocystin) จัดเป็นสารหลอนจิตและประสาท จำพวก alkaloidal indole ซึ่งมีการออกฤทธิ์เหมือนกับเอลเอสดี (LSD ; Lysergic acid diethylamine) ดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 2.6 หลังจากรับเห็ดที่ออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทเข้าสู่ร่างกายจะแสดงอาการภายใน 20-60 นาที ทำให้ขาดหรือสูญเสียลักษณะเฉพาะตัว แสดงอาการเพ้อคลั่ง อาการประสาทหลอน ความรู้สึกดีใจปีติยินดีมากอย่างเกินเหตุผลพอดี ความสุขเคลิบเคลิ้ม และลักษณะอาการเช่น อาการหน้ามืดวิงเวียน จิตกังวล กระวนกระวายใจ ปวดหัว คลื่นไส้ ภาวะที่หัวใจเต้นเร็วผิดปกติ สับสน มีไข้ และน้ำมูกไหล อาการมีไข้และน้ำมูกไหลพบในเด็ก ซึ่งอาการอาจแสดงมากสุดภายใน 2 ชั่วโมง และจะหายไปภายใน 4-6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามอาการต่างๆเหล่านี้อาจจะเกิดขึ้นย้อนกลับมาหลายอาทิตย์หรือหลายเดือน (Persson, 2003)



Serotonin Lysergic acid diethyamide (LSD)

รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของเซอโรโทนินและแอลเอสดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 รายงานการวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดสกุล *Psilocybe*

ปี 1958 Hofmann ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสายพันธุ์ *P. Mexicana* ซึ่งเป็นเห็ดที่ใช้ในพิธีกรรมทางศาสนาของชาวพื้นเมืองแถบประเทศเม็กซิโก พบสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ 2 ชนิด คือ ไซโลไซบิน (psilocybin; 4-phosphoryloxy-*N*,*N*-dimethyltryptamine) และไซโลซิน (psilocin; 4-hydroxy-*N*,*N*-dimethyltryptamine) (Staments, 1996)

ปี 1964 Catalfomo และ Tyler ศึกษาการสร้างสารไซโลซินและไซโลไซบินในเส้นใยของ *P. cubensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ พบเพียงสารไซโลไซบินเท่านั้น (Catalfomo และ Tyler, 1964)

ปี 1968 Leung และ Paul ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจาก *P. baeocystis* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบไซโลซิน, ไซโลไซบิน และสารอนุพันธ์ชนิด 4-phosphoryloxytryptamine อีก 2 ตัว คือ เบโอซิสทินและนอร์เบโอซิสทิน (norbaeocystin) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (Leung และ Paul, 1968)

ปี 1981 Beug และ Bigwood ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ไซโลซินและไซโลไซบินของ *P. baeocystis* (Singer and Smith) โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะ (High performance liquid chromatography, HPLC) และโครมาโทกราฟีแบบบาง (TLC) พบว่าในเห็ด 1 กรัม มีปริมาณไซโลไซบิน 1.5-8.5 มิลลิกรัม และปริมาณไซโลซิน 0.0-5.9 มิลลิกรัม (Beug และ Bigwood, 1981)

ปี 1981 Koike และคณะ พบไซโลไซบิน, เอสโกสเทอรอล (esgosterol), เออร์โกสเทอรอลเปอร์ออกไซด์ (ergosterol peroxide) และอัลฟา, อัลฟา-ทรีฮาลอส (α, α-trehalose) จากส่วนดอกของ *Psilocybe argentipes* ซึ่งเป็นเห็ดสายพันธุ์ใหม่ที่พบในญี่ปุ่น (Koike และคณะ, 1981)

ปี 1994 Gartz และคณะ ศึกษาปริมาณอัลคาลอยด์ (alkaloids) ในเห็ด *P. samuiensis* ที่เพาะขึ้นโดยใช้เทคนิค HPLC พบปริมาณไซโลไซบิน ร้อยละ 0.23-0.90 ในดอก และร้อยละ 0.24-0.32 ในเส้นใย เทียบกับน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังพบไซโลซินและเบโอซิสทินอีกด้วย (Gartz และคณะ, 1994) และในปีเดียวกัน Gartz ได้หาปริมาณ indole derivative alkaloids ของ *P. cubensis*, *P. semilanceata*, *P. bohemica*, *P. cyanescens* โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน พบว่า เมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ได้ไซโลไซบินและเบโอซิสทินปริมาณสูง ส่วนไซโลซินพบในปริมาณสูงเมื่อใช้ aqueous alcohol เป็นตัวทำละลาย (Gartz, 1994)

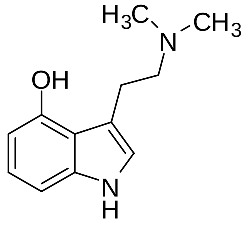
ปี 1999 Keller และคณะ หาปริมาณของไซโลซินและไซโลไซบินในดอกเห็ด (cap) และส่วนก้านดอกเห็ด (stalk) ของ *Psilocybe subcubensis* ซึ่งในส่วนดอกเห็ดมีปริมาณไซโลซินและไซโลไซบิน ร้อยละ 0.86 และ 0.02 ของน้ำหนักเห็ดแห้งตามลำดับ สำหรับส่วนก้านดอกเห็ดพบไซโลไซบิน ร้อยละ 0.8 และไซโลซิน ร้อยละ 0.03 (Keller และคณะ, 1999)

ปี 2000 Gross ศึกษาการสร้างสารไซโลซินและไซโลไซบินของ *P. cyanescens* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบบางและ GC-MS พบว่าสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดไม่พบในระยะเส้นใย (mycelium) แต่จะพบในระยะ mycelium knot ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการเกิด fruiting body ของเห็ด ส่วนระยะที่เกิด pinhead และดอกเห็ดก็พบสารทั้ง 2 ชนิดนี้เช่นกัน (Gross, 2000) นอกจากนี้ในปีเดียวกัน Musshoff และคณะ ศึกษาปริมาณอัลคาลอยด์

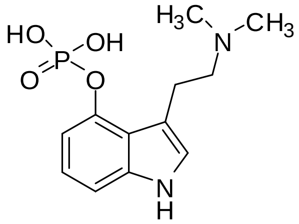
ใน magic mushroom ที่ได้จากของกลางในการจับยึด โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะ (HPLC) พบว่า *P. cubensis* เป็นชนิดที่จับยึดได้มากที่สุด ซึ่งมีปริมาณไซโลไซบินร้อยละ 0.31 และไซโลซิน ร้อยละ 0.23 ของน้ำหนักเห็ดแห้ง นอกจากนี้ยังมีเห็ดชนิดอื่นๆ เช่น *P. semilanceata*, *Panaeolus cyanescens* และ *P. tumpanensis* ซึ่งมีปริมาณไซโลไซบินอยู่ในช่วงน้อยกว่าร้อยละ 0.003-1.15 และไซโลซิน ร้อยละ 0.01-0.90 ของน้ำหนักเห็ดแห้ง และพบว่า *Panaeolus cyanescens* เป็นเห็ดที่มีปริมาณไซโลไซบินและไซโลซินสูงสุด (Musshoff และคณะ, 2000)

ปี 2003 Tsujikawa และคณะ ศึกษาปริมาณไซโลซินและไซโลไซบินของ *P. cubensis* และ *Copelandia sp.* โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะ (HPLC) พบว่า *P. cubensis* มีไซโลไซบินปริมาณมาก (ร้อยละ 0.37-1.30 ของเห็ดทั้งดอก) และ *Copelandia sp.* มีไซโลซินปริมาณมาก (ร้อยละ0.43-0.76 ของเห็ดทั้งดอก) (Tsujikawa และคณะ, 2003)

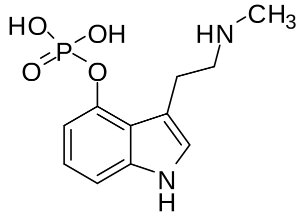
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



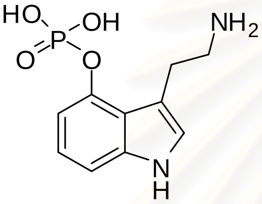
Psilocin



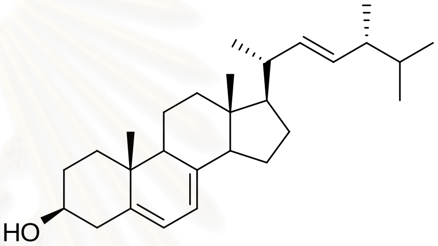
Psilocybin



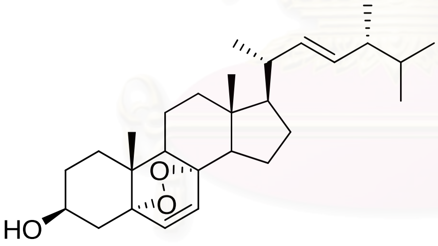
Baeocystin



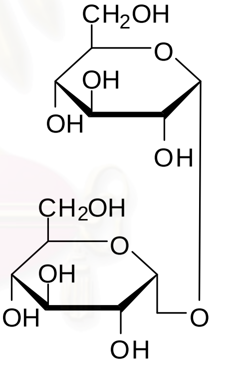
Norbaeocystin



Ergosterol



Ergosterol peroxide



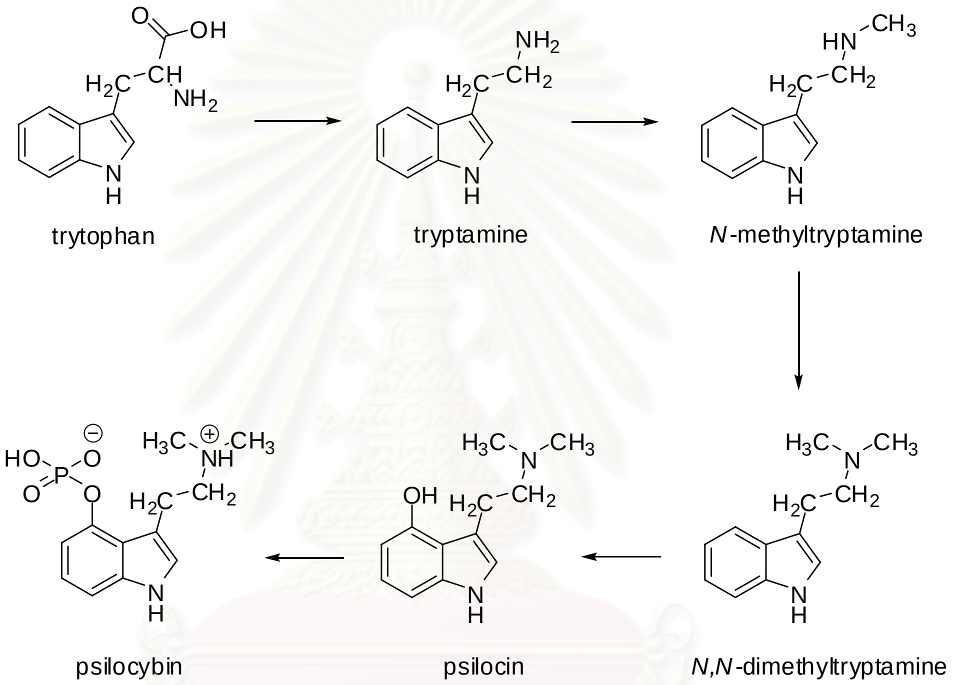
α,α−Trehalose

รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้จากเห็ดหลอนจิตและประสาท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 กลไกการสังเคราะห์ไซโลซินและไซโลไซบิน

ไซโลซินและไซโลไซบินมีความใกล้เคียงกับสารชนิด 4-hydroxylated indoles ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าไซโลไซบิน ได้มาจากทริปโทแฟน (tryptophan) และทริปทามีน (tryptamine) โดยมีความเป็นไปได้ของกลไกการเกิดของไซโลซินและไซโลไซบิน ดังรูปที่ 2.8 (Agurell และ Nilsson, 1968a; Agurell และ Nilsson, 1968b)



รูปที่ 2.8 วิถีของชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis pathway) ของไซโลซินและไซโลไซบิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของ *Psilocybe cubensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

สัณฐานวิทยาของ *P. cubensis* มีส่วนที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า และส่วนที่ดูได้จากกล้องจุลทรรศน์

1) ลักษณะที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ประกอบด้วย

ส่วนดอกเห็ดหรือหมวก (cap) มีลักษณะเป็นรูปกรวย กว้างประมาณ 0.3-2.2 เซนติเมตรยาว 5-8 เซนติเมตร เมื่ออ่อนยอดมีลักษณะแหลม เมื่อบานมีสีน้ำตาลอมเหลืองขอบล่างสีขาว ตัวหมวกสีเหลืองและผิวหน้ามีลักษณะเรียบ ส่วนด้านใต้ของหมวกเห็ด (gill) มีสีดำ

ส่วนก้านดอกเห็ด (stalk) ยาว 40-150 เซนติเมตร หนา 5-15 มิลลิเมตร มีสีเหลืองค่อนข้างซีดขาว ดังแสดงในรูปที่ 2.9

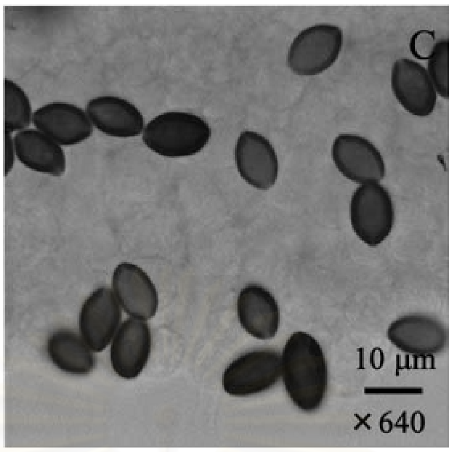
2) ลักษณะที่สังเกตโดยผ่านกล้องจุลทรรศน์

ส่วนของสปอร์ (Spores) มีขนาด 10.2-16.5 ไมโครเมตร x 5.9-10.0 ไมโครเมตร ลักษณะกลมรีเหมือนไข่ มีสีน้ำตาลเข้ม และมีสปอร์ในระยะของการพัฒนา (germ pores) อยู่ปลายสุด ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษเฉพาะตัว ผิวหน้าเรียบ ส่วนของ Basidia มีลักษณะโปร่งใส มี 4 สปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.10 และ 2.11

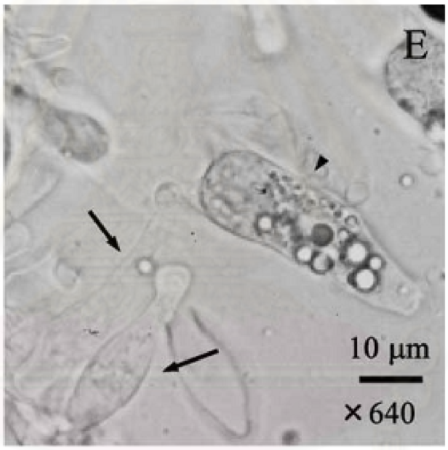
(ก)

(ข)

รูปที่ 2.9 ดอกเห็ด *Psilocybe cubensis* (ก) ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงในแป้งข้าวกล้อง (brown rice flour) (www.health.howstuffworks.com/.../printable) (ข) ดอกเห็ดแห้งที่เกิดในธรรมชาติ (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4e/Dried_Cubensis.jpg)



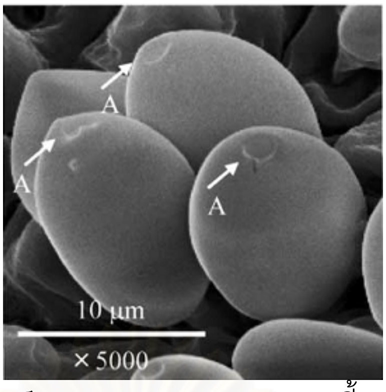
(ก) ลักษณะโครงสร้างสปอร์ *P. cubensis*



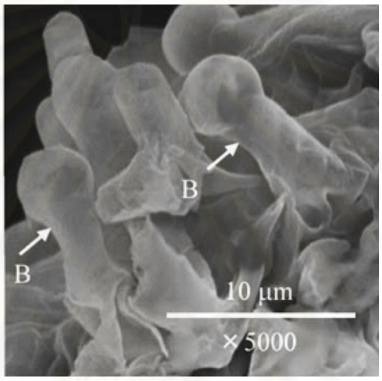
(ข) ลักษณะโครงสร้างของ cystidia (ลูกศร) และ basidia (หัวลูกศร)

รูปที่ 2.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. cubensis* เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Tsujikawa และคณะ, 2003)

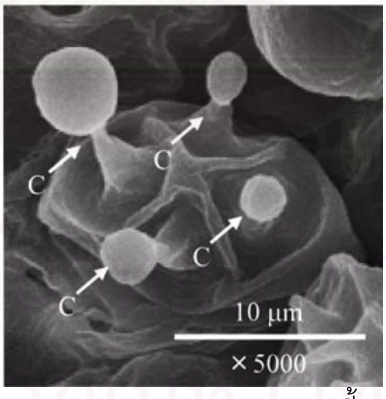
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก) สปอร์ของ *P. cubensis*(A ลูกศรชี้ germ pores)



(ข) cystidia ของ *P. cubensis* (B ลูกศรชี้ cystidia)



(ค) basidia ของ *P. cubensis* (C ลูกศรชี้ sterigmata)

รูปที่ 2.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. cubensis* เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Tsujikawa และคณะ, 2003)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างเส้นใยเห็ด

เส้นใยเห็ด *Psilocybe cubensis* ได้จากการเพาะเนื้อเยื่อตัวอย่างเห็ดที่เก็บจาก อำเภอเกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดย John Allen ซึ่งเส้นใยเก็บไว้ที่คลังเก็บราห้องปฏิบัติการทดสอบของรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเส้นใย *Psilocybe cubensis* ที่นำมาใช้ศึกษา

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเกตด้วยตาเปล่า

ศึกษาลักษณะต่างๆ ของเส้นใยเห็ด เช่น รูปร่างของโคโลนี สีของเส้นใยและสปอร์ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เส้นใยสร้างขึ้น เป็นต้น โดยสังเกตด้วยตาเปล่า

3.2.2 การศึกษาลักษณะโครงสร้างเส้นใย *Psilocybe cubensis* ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทำ slide culture สำหรับส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. นำกระดาษกรองวางลงในจานเพาะเชื้อ แล้ววางทับด้วยแท่งแก้วรูปตัววี จากนั้นวางแผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Cover glass) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที
2. เตรียมอาหารแข็ง PDA จากนั้นใช้ needle ตัดชิ้นอาหารให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ เขี่ยเส้นใย *Psilocybe cubensis* ใส่ลงที่ด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
3. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อพอให้ชุ่มกระดาษกรอง ปิดจานเพาะเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-30°C) จนกว่าเส้นใยจะเจริญเต็มที่
4. ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเส้นใยผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยการหยดสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอลบลู (Lactophenol cotton blue) ลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้

3.2.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเส้นใย *Psilocybe cubensis*

จิโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ของ *P. cubensis* จะถูกสกัดออกมาโดยใช้วิธีซิทิลไตรเมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (Cetyltrimethylammonium bromide: CTAB) และนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ร่วมกับไพรเมอร์ ITS1f (Grades and Bruns, 1993) และ ITS4 (White et al, 1990) โดยตั้งโปรแกรมการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 94˚C นาน 5 นาที ตามด้วย 94˚C นาน 1 นาที, 51˚C นาน 1 นาที, 72˚C นาน 1 นาที จำนวน 38 รอบ และสุดท้าย 72˚C นาน 5 นาที ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้นั้นจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย ชุด NucleoSpin® (Macherey-Nagel Inc., Easton, USA) และหาลำดับเบสของดีเอ็นเอส่วน ITS โดยบริษัท Macrogen (Seoul, Korea)

ลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ *P. Cubensis* ที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank (http://ncbi.nml.nih.gov/BLAST/Blast.cgi.)

3.3 เครื่องมือ

3.3.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) รุ่น Varian Mercury +400 NMR สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ 1D และ 2D NMR ได้แก่ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, COSY, NOESY, HSQC และ HMBC โดยวิเคราะห์สเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ที่ 400 MHz และ ^{13}C-NMR ที่ 100 MHz สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายเมทานอล-ดี (CD_3OD), คลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) โดยวัดค่าเคมิคอลชิพท์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สำหรับค่าเคมิคอลชิพท์ (δ) อ้างอิงกับค่าเคมิคอลชิพท์ของตัวทำละลายที่ตกค้างอยู่ในตัวทำละลายชนิดดิวทีเรเท็ด โดยที่ CD_3OD อ้างอิงที่ δ_H 4.80 ppm และ $CDCl_3$ อ้างอิงที่ δ_H 7.26 ppm สำหรับ ^{1}H nuclei ค่าเคมิคอลชิพท์ (δ) อ้างอิงกับค่าเคมิคอลชิพท์ของตัวทำละลายที่ตกค้างอยู่ในตัวทำละลายชนิดดิวทีเรเท็ด โดยที่ CD_3OD อ้างอิงที่ δ_c 49.0 ppm และ $CDCl_3$ อ้างอิงที่ δ_c 7.26 ppm สำหรับ ^{13}C nuclei

3.3.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Dionex รุ่น UVD-340u ต่ออยู่กับ Inertsil®ODS-3 column (15 ซม. X 4.6 มม. X 5 ไมโครเมตร) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาท Psilocybin และ Psilocin

3.3.3 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet FTIR รุ่น 6700 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร ส่วนสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวเตรียมโดยหยดของเหลวลงบนแผ่นวินโดว์ที่ทำด้วยโพแทสเซียมโบรไมด์ (Potassium bromide;

KBr) และหยดของเหลวลงบนแผ่นวินโดว์ที่ทำด้วยผลึกซิงค์ซีลิไนด์ (zinc selenide; ZnSe) ในการวัด ATR mode

3.3.5 เครื่อง Rotary Vacuum Evaporator (เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน) ของบริษัท Buchi, Switzerland

3.3.6 เครื่อง Mass Spectrometer สำหรับใช้ในการมวลโมเลกุลของสารประกอบ วิเคราะห์ด้วย Atmospheric pressure chemical ionization / time of flight (APCI/TOF) โดยเครื่อง Mass Spectrometer (MS) รุ่น microToF ของ Bruker Daltonics, USA

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1 ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เมทานอล เฮกเซน เอธิลอะซิเตต เป็นตัวทำละลายชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม (Commercial grade) ซึ่งจะนำไปกลั่นให้บริสุทธิ์ก่อนใช้ทุกครั้ง และใช้ตัวทำละลายคุณภาพห้องแลบ (Analytical grade) ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เมทานอล คลอโรฟอร์ม ในการแยกสาร ทดสอบการละลาย และทำเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

3.4.2 สารเคมีชนิดอื่น ๆ

3.4.2.1 ตัวดูดซับสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 Art.1.09385.9025 (230-400 mesh ASTM) ของบริษัท Merck, Germany

3.4.2.2 TLC aluminum sheet ที่มีเฟสคงที่เป็น silica gel 60 F_{254} ของบริษัท Merck, Germany ขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร สำหรับเทคนิค TLC

การตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ใช้การส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือนำแผ่น TLC ใส่ลงในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของไอโอดีน หรือพ่นด้วย vanillin/H_2SO_4 (ให้สารซึมเข้าแผ่น TLC จนทั่ว แล้วนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจนปรากฏจุดของสารบนแผ่น TLC (สารละลาย vanillin/H_2SO_4 ประกอบด้วยเอธานอล 95 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4.5 มิลลิลิตร)

3.5 การเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis*

นำส่วนของเส้นใย *P. cubensis* มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-30°C) และสังเกตการเจริญของเส้นใย เมื่อพบว่ามีเส้นใยเจริญออกมา จึงเขี่ยส่วนปลายเส้นใยของเชื้อราออกไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Potato Dextose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA) และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) อาหารดังกล่าวใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *Psilocybe cubensis* เพื่อเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกใช้ในการศึกษาการสร้างสารเมแทบอไลต์ คือ Malt Extract Broth (MEB) ดูรายละเอียดของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาคผนวก ก (ภาคผนวก ก)

3.7 การศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใย *Psilocybe cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของ *P. cubensis* เจริญอยู่เต็มอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ flamed cork border ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้แก่ Potato Dextose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA) และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองทุกวัน เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใย โดยการสังเกตขนาดของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

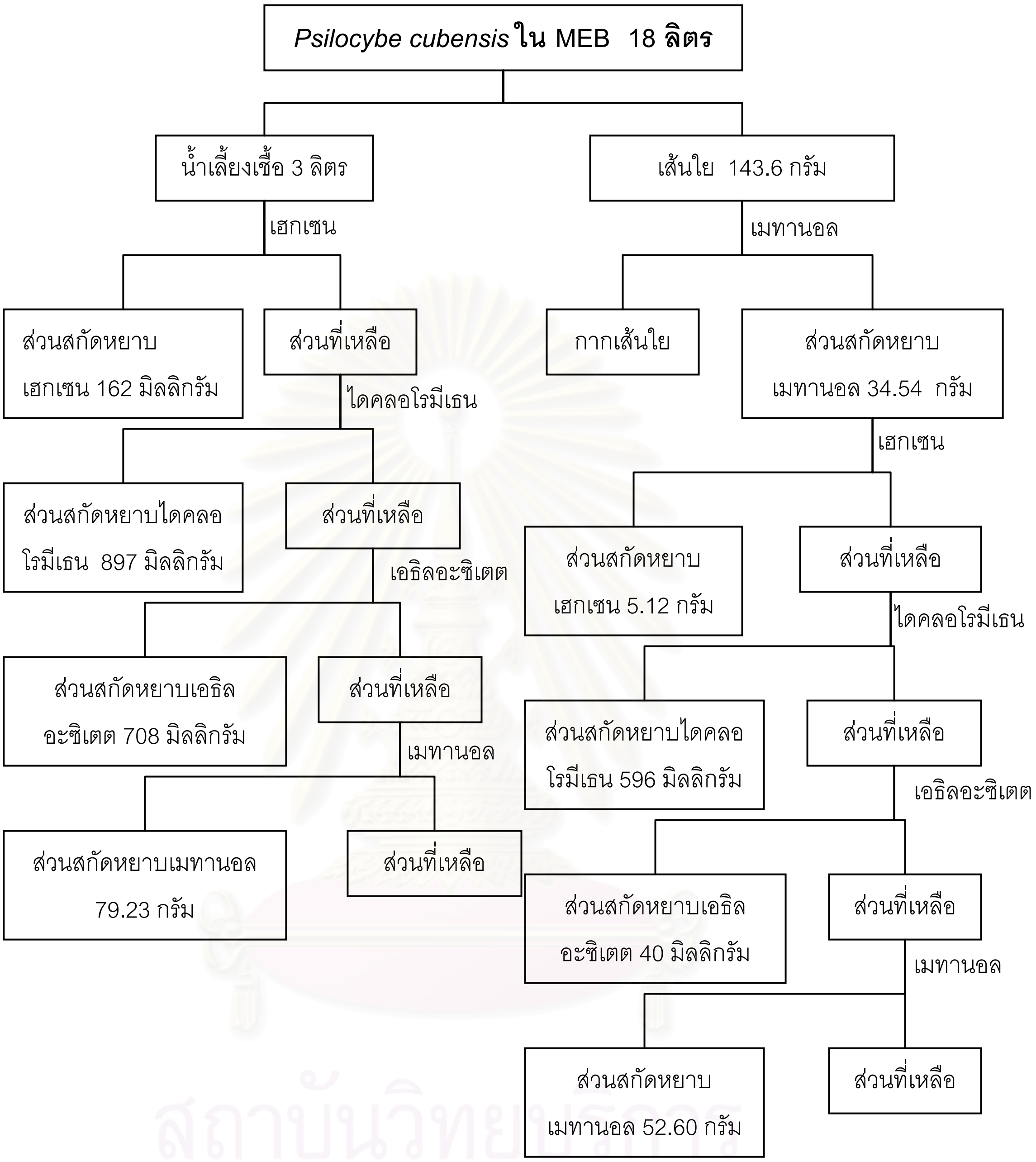
3.8 การเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis* และการสกัดสารเมแทบอไลต์ที่สร้างขึ้นจาก *Psilocybe cubensis*

3.8.1 การเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe Cubensis*

นำเส้นใยของ *P. cubensis* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MEA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์นั้นจะถูกเจาะเอาชิ้นวุ้นให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ด้วย flamed cork hole borer จำนวน 5 ชิ้น ถ่ายใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเหลว MEB 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน

3.8.2 การสกัดสารเมแทบอไลต์ที่ได้จาก *Psilocybin Cubensis*

นำเส้นใยของ *P. cubensis* ที่ได้จากข้อ 3.8.1 มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whattman เบอร์ 93 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้นี้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอธิลอะซิเตต และเมทานอล ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 1



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 1 วิธีการสกัดเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis*

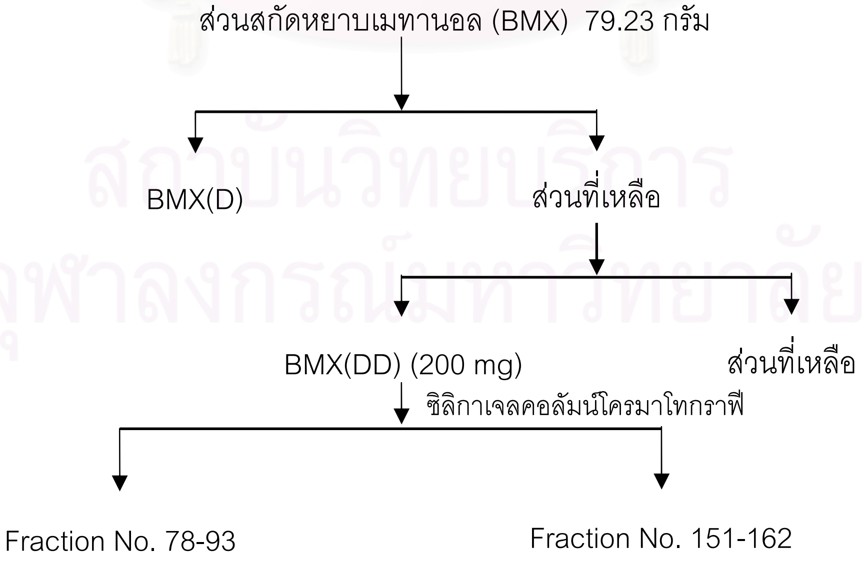
3.9 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis*

3.9.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากเส้นใย *Psilocybe cubensis*

นำส่วนสกัดหยาบเฮกเซน น้ำหนัก 5.12 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เริ่มต้นเป็นเฮกเซน แล้วค่อยๆเพิ่มสภาพขั้วจนเป็นเอธิลอะซิเตตและเพิ่มสภาพขั้วจนเป็นเมทานอล แล้วเก็บสารที่ชะออกมาเป็นลำดับส่วน นำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบบางและ ^{1}H NMR สำหรับส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน น้ำหนัก 59.6 มิลลิกรัม นำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบบางและ ^{1}H NMR

3.9.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis*

นำส่วนสกัดหยาบเมทานอลที่ได้จากน้ำเลี้ยงเส้นใย *P. cubensis* น้ำหนัก 79.23 กรัม สกัดแยกน้ำตาลด้วยไดคลอโรมีเทน โดยการเติมไดคลอโรมีเทนในส่วนที่ละลายด้วยเมทานอลจนได้ตะกอนขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ดูดเอาส่วนใสออกมาระเหยแห้ง จะได้ส่วนสกัดเมทานอลในไดคลอโรมีเทนของส่วนสกัดเมทานอลจากน้ำเลี้ยง หนัก 200 มิลลิกรัม ดังแสดงในแผนภาพที่ 2 จากนั้นนำมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ วัฏภาคเคลื่อนที่เริ่มต้นเป็นคลอโรฟอร์มและเพิ่มสภาพขั้วด้วยเมทานอล แล้วเก็บสารที่ชะออกมาเป็นลำดับส่วน ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1



แผนภาพที่ 2 วิธีการสกัดส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 การแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis*

ลำดับส่วนที่	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะปรากฏ
1 - 8	100% คลอโรฟอร์ม	1.6	ของเหลวใส ไม่มีสี
11 – 20	1% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	1.3	ของเหลวใส
21 – 28	2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	1.5	ของเหลวใส
29 – 35	3% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	2.8	ของเหลวสีเหลือง
36 – 41	4% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	2.4	ของเหลวสีเหลือง
42 – 47	5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	3.1	ของเหลวสีเหลือง
48 – 54	6% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	5.2	ของเหลวสีเหลือง
55 – 64	7% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	4.5	ของเหลวสีเหลือง
65 - 70	8% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	3.2	ของเหลวสีเหลือง
71 - 77	9% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	6.1	ของเหลวสีเหลือง
78 – 93	10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	8.0	ของหนืดสีเหลือง คล้ายน้ำมัน
94 – 113	15% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	4.7	ของเหลวสีเหลือง
114 – 124	20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	5.8	ของเหลวสีเหลือง
125 - 136	25% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	7.4	ของเหลวสีเหลือง
137 - 150	30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	5.3	ของเหลวสีเหลือง
151 - 162	35% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	4.0	ตะกอนสีขาวขุ่น
163 - 167	50% เมทานอลนคลอโรฟอร์ม	12.0	ของเหลวสีเหลือง

จากผลการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR ของลำดับส่วนที่ 78 - 93 และลำดับส่วนที่ 151 - 162 พบว่าน่าจะมีสารที่น่าสนใจ จึงนำมาแยกองค์ประกอบต่อโดยใช้ preparative TLC โดยลำดับส่วนที่ 78 - 93 ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม และลำดับส่วนที่ 151 - 162 ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ตามลำดับ

3.9.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร

3.9.3.1 สาร 1 จากลำดับส่วนที่ 78 - 93

นำส่วนที่ได้จากลำดับส่วนที่ 78-93 แยกด้วย preparative TLC โดย

ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม แยกได้ทั้งหมด 2 แถบ ดังนี้

แถบ 1 ค่า R_f = 0.61

แถบ 2 ค่า R_f = 0.75

แถบที่ 1 ได้เป็นสาร **1** เป็นของหนืดสีเหลือง น้ำหนัก 8 มิลลิกรัม ซึ่งมีสมบัติทางเคมีดังนี้

IR สเปกตรัม ทำการวัดโดยหยดสารลงบนแผ่นวินโดว์ที่ทำด้วยผลึกโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr)

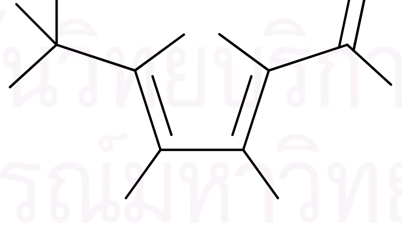
การดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3334 (O-H stretching), 2953 (C-H stretching), 1674 (C=O stretching), 1521 (C=C stretching aromatic ring) และ 1019 (C-O bending alcohol) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.2

δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz): 9.57 (1H, s, CHO), 7.21 (1H, d, *J* =3.5 Hz , H-3), 6.51 (1H, d, *J* =3.5 Hz, H-4), 4.70 (2H, s, CH_2OH), ppm (รูปที่ 1ข ภาคผนวก ข)

δ_C ($CDCl_3$,100 MHz): 177.72 (d, CHO), 160.71 (s, C-5), 152.3 (s, C-2), 123.03 (d, C-3), 110.01 (d, C-4), 57.56 (t, C-6) ppm (รูปที่ 2ข ภาคผนวก ข)

สเปกตรัมของ HSQC และ HMBC แสดงไว้ในรูปที่ 4ข และ 5ข ภาคผนวก ข

MS (API/MS) สเปกตรัม *m/z* 148.984 $[M+Na]^+$ (รูปที่ 1ค ภาคผนวก ค)



รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 1

3.9.3.2 **สาร 2 จากลำดับส่วนที่ 151 - 162**

นำส่วนที่ได้จากลำดับส่วนที่ 151 – 162 แยกด้วย preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม แยกได้ทั้งหมด 5 แถบ ดังนี้

แถบ 1 ค่า R_f = 0.20

แถบ 2 ค่า R_f = 0.25

แถบ 3 ค่า R_f = 0.50

แถบ 4 ค่า R_f = 0.71

แถบ 5 ค่า R_f = 0.79

แถบที่ 2 ได้เป็นสาร 2 เป็นตะกอนสีขาวขุ่น น้ำหนัก 4 มิลลิกรัม ซึ่งมีสมบัติทางเคมีดังนี้

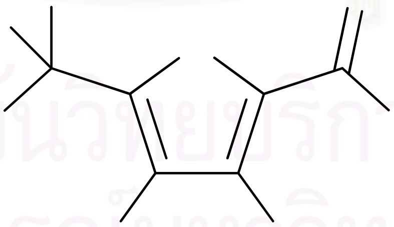
IR สเปกตรัม ทำการวัดโดยหยดของเหลวลงบนแผ่นวินโดว์ที่ทำด้วยผลึกซิงค์ซิลิไนด์ (ZnSe) ทำการวัดด้วย ATR mode

การดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3357 broad (O-H stretching), 2924 (C-H stretching), 1743 (C=O stretching), 1643 (C=C stretching), 1102 และ 1023 (C-O stretching) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.5

δ_H (CD_3OD, 400 MHz.): 6.87 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-3), 6.2 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-4), 4.51 (2H, s, H-6) ppm (รูปที่ 8ข ภาคผนวก ข)

δ_C (CD_3OD, 100 MHz.): 150 (d, C-2), 114 (s,C-3), 109 (s, C-4), 156 (C-5), 56.2 (t, C-6) ppm (รูปที่ 9ข ภาคผนวก ข)

สเปกตรัมของ HSQC และ HMBC แสดงไว้ในรูปที่ 10ข และ 11ข ภาคผนวก ข



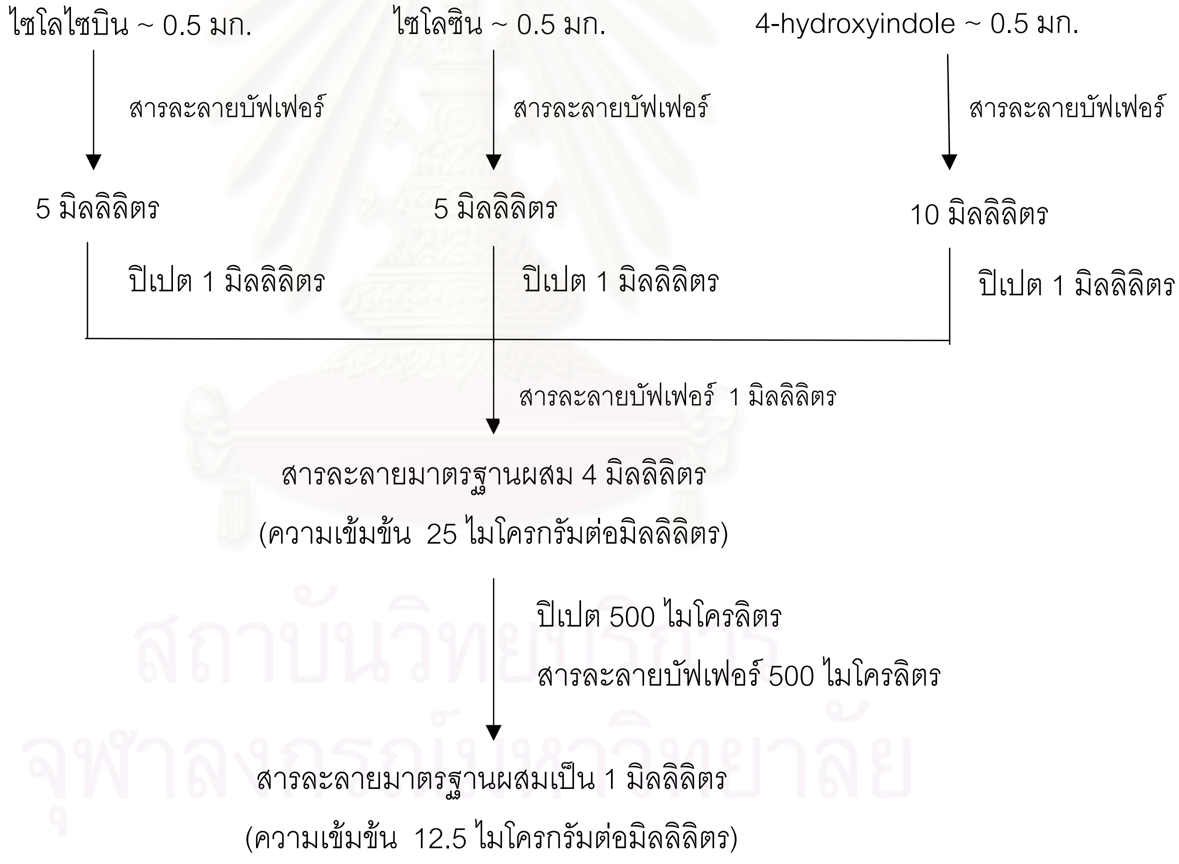
รูปที่ 3.2 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 การวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทไซโลไซบินและไซโลซินจากเห็ด *Psilocybe cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะ (High performance liquid chromatography; HPLC)

3.10.1 การเตรียมสารมาตรฐานผสมไซโลไซบิน ไซโลซินและ 4-hydroxyindole สำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะ (HPLC)

การเตรียมสารมาตรฐานผสมให้ได้ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีการของ Tsujikawa และคณะ (2003) พบว่า ความเข้มข้นของสารมาตรฐานดังกล่าวสูงกว่าตัวอย่างที่สกัดได้ จึงเจือจางสารมาตรฐานผสมให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับตัวอย่าง คือ ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.3



แผนภาพที่ 3.3 การเตรียมสารมาตรฐานผสมไซโลไซบิน ไซโลซินและ 4-hydroxyindole ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10.2 การเตรียมสกัดตัวอย่างเห็ด *Psilocybe cubensis*

ตัวอย่างดอกเห็ดมาจากการเพาะเลี้ยงเส้นใย *P. cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDB ในห้องปฏิบัติการทดลอง เป็นระยะเวลาประมาณ 45 วัน

3.10.2.1 การทำเห็ดให้แห้ง

นำเห็ดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกส่วนดอกเห็ดและก้านดอกเห็ดออกจากกัน

3.10.2.2 ดอกเห็ด (cap)

นำส่วนดอกเห็ดที่แห้งมาบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างมา 51.7 มิลลิกรัม สกัดด้วยเมทานอล ครั้งละ 2 มิลลิลิตร ทำการสั่นด้วยอ่างคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนออกมาใส่หลอดทดลอง จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง นำส่วนใสที่ได้มาระเหยแห้งภายใต้กระแสไนโตรเจน (Nitrogen stream) ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี Internal Standard 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ จำนวน 500 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้นของ internal standard เป็น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมากรองผ่าน PTFE microfilter ขนาดรูพรุน 0.45 μm ใส่ขวดแก้ว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.10.2.3 ก้านดอกเห็ด (stalk)

นำส่วนก้านดอกเห็ดที่แห้งมาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก 55.7 มิลลิกรัม ทำการสกัดเช่นเดียวกับตัวอย่างดอกเห็ด ข้อ 3.10.2.2

3.10.3 ภาวะที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

ทำการวิเคราะห์ส่วนสกัดดอกเห็ดและก้านดอกเห็ด โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะ (HPLC) ตามภาวะที่ใช้วิเคราะห์ของ Tsujikawa และคณะ (2003) ดังนี้

Column	: Inertsil ODS-3 , 150 x 4.6 mm, 5 μm with guard column
Mobile phase	: 10 mM Ammonium formate (pH 3.5) : Acetonitrile (95:5 v/v)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Inj. Vol.	: 20 μL
Detection	: UV 220 nm

พบว่า ไซโลไซบิน ไซโลซินและ 4-hydroxyindole ให้ค่า retention time (RT) ที่ต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.13

3.10.4 การคำนวณปริมาณไซโลไซบินและไซโลซิน

จากการใช้วิธีวิเคราะห์โดยใช้สารละลายของมาตรฐานเพียงความเข้มข้นเดียว จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นที่เท่ากับหรือใกล้เคียงกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายของสารตัวอย่าง เนื่องจากเป็นการวัดค่าแอบซอร์แบนซ์เพียงค่าเดียวเท่านั้น และการหาความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายของสารตัวอย่างเป็นการคำนวณโดยเทียบบัญญัติไตรยางค์ ซึ่งจะได้

$$C_u = A_u \times C_s / A_s$$

เมื่อ C_u เป็นความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายของสารตัวอย่าง

C_s เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายของสารมาตรฐาน

A_u เป็นค่าแอบซอร์แบนซ์ที่วัดได้จากสารละลายของสารตัวอย่าง

A_s เป็นค่าแอบซอร์แบนซ์ที่วัดได้จากสารละลายของสารมาตรฐาน

ซึ่งค่าแอบซอร์แบซ์ที่วัดได้โดยเทคนิค HPLC จะแปรค่าเป็นพื้นที่ใต้พีค สำหรับวิธีนี้มีข้อจำกัด คือ การดูดกลืนรังสีโดยสารที่ต้องการวิเคราะห์นั้นต้องเป็นไปตามกฎของ Beer และสามารถหาสารมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูงพอ เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมากใน British pharmacopoeia และ United States pharmacopoeia (นวลศรี, 2536) และมีการใช้ internal standard ในการวิเคราะห์จึงใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานหรือตัวอย่างกับพื้นที่ใต้พีคของ internal standard มาใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารดังกล่าว

จากสูตรการคำนวณข้างต้น เมื่อนำมาแทนค่าในการหาปริมาณสารจะได้เป็น

C_u = ปริมาณสารที่ต้องการทราบค่า x Dilution factor of sample x น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (mg)

= ปริมาณสารที่ต้องการทราบ x 1 ml x น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (mg)

C_s = ปริมาณสารของสารมาตรฐาน x Dilution factor of standard x น้ำหนักของสารมาตรฐาน (mg)

= (% standard potency / 100) x [(1/5 ml) x (1 ml / 4 ml) x (0.5 ml / 1 ml)] x น้ำหนักของสารมาตรฐาน (mg)

A_u = อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้พีคของ internal standard

= Sample ratio

A_s = อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานต่อพื้นที่ใต้พีคของ internal standard

= Standard ratio

ฉะนั้น จะได้สูตรในการคำนวณเป็น

ปริมาณสารที่ต้องการทราบค่า

= [A_u / A_s] x C_s x [1/1 ml x 1/น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง(mg)]

เมื่อแทนค่า จะได้เป็น

ปริมาณสารที่ต้องการทราบค่า

= [(Sample ratio/standard ratio) x (% standard potency/100) x (1/5 ml) x (1 ml/4 ml) x (0.5 ml/1 ml) x standard weight (mg) x (1/1 ml) x (1/sample weight (mg))]

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ทำการฉีดสารมาตรฐานผสม 2 ครั้ง สลับกับการฉีดตัวอย่าง 2 ครั้ง นั่นคือ จะได้ลำดับการฉีดเป็น สารมาตรฐานผสม 2 ครั้ง, ตัวอย่าง 2 ครั้ง, สารมาตรฐานผสม 2 ครั้ง, ตัวอย่าง 2 ครั้ง ดังนั้น จะได้ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานผสม 4 ค่า นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานแต่ละชนิดมาคิดเทียบอัตราส่วนกับ internal standard ในแต่ละครั้งที่ฉีดสารมาตรฐานผสม แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณต่อไป ในทำนองเดียวกัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างที่ฉีดมาคิดอัตราส่วนแล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นจึงนำไปแทนค่าลงในสูตรการคำนวณเพื่อหาปริมาณสารไซโลไซบินและไซโลซิน ดังแสดงในตาราง 1จ และ 2จ (ภาคผนวก จ)

บทที่ 4

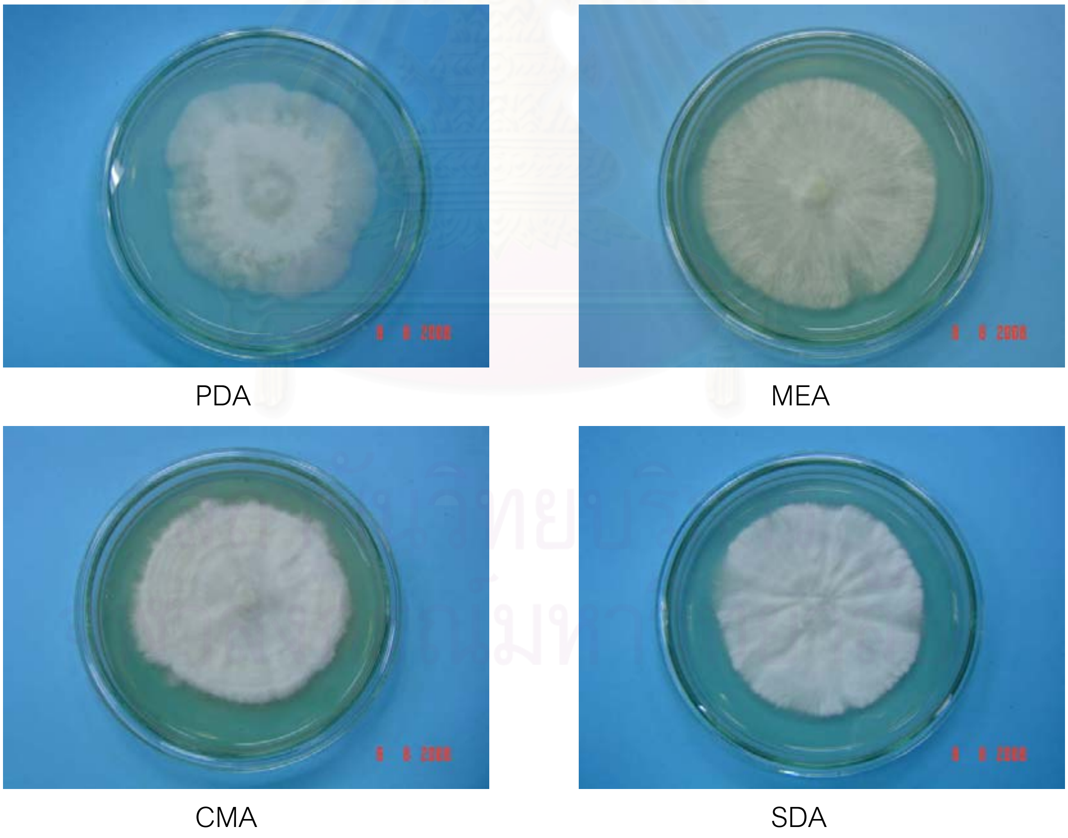
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเส้นใย *Psilocybe cubensis* ที่นำมาใช้ศึกษา

4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.1.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยตาเปล่า

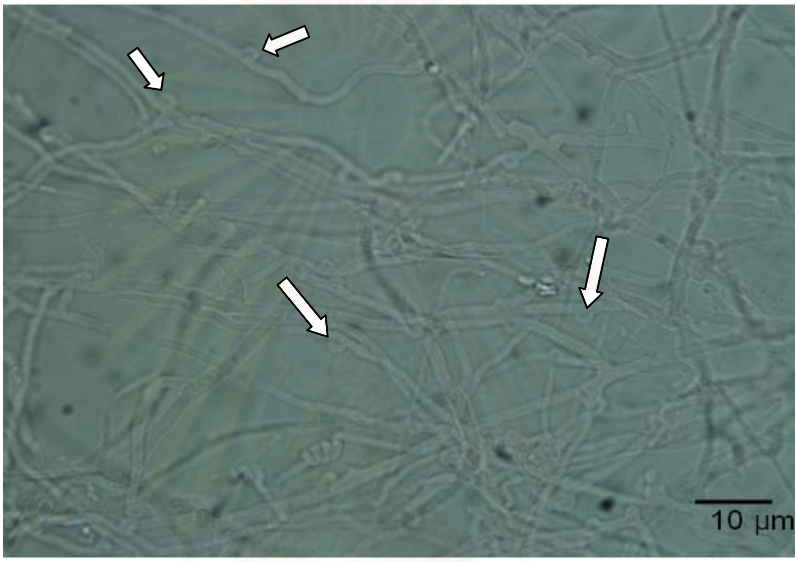
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. cubensis* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA) และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าลักษณะโคโลนีประกอบด้วยเส้นใยสีขาว และไม่พบมีการสร้างสปอร์ ดังแสดงในรูป 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของโคโลนีและเส้นใยของ *P. cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, MEA, CMA และ SDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

4.1.1.2 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างเส้นใย *Psilocybe cubensis* ด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากการทำ slide culture ของเส้นใย *P. cubensis* และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มี clamp connection ซึ่งเป็นลักษณะโครงสร้างเฉพาะของเส้นใยราในไฟลัม Basidiomycete ซึ่งเห็ดสกุล *Psilocybe* จัดอยู่ในไฟลัมนี้ ดังแสดงในรูป 4.2 จึงเป็นการพิสูจน์ว่าเส้นใยที่แยกได้น่าจะมาจากการแยกเนื้อเยื่อดอกเห็ด *P. cubensis*



รูปที่ 4.2 ลักษณะเส้นใยของ *P. cubensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X ตำแหน่งลูกศรชี้ คือ clamp connection

4.1.2 ผลการพิสูจน์สายพันธุ์ทางอณูชีววิทยา

จากการพิสูจน์ทางอณูชีววิทยาเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณ ITS ร่วมกับไพรเมอร์ ITS1f และ ITS4 ของ *P. cubensis* ที่ได้กับข้อมูลดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่า มีความเหมือนกับ *P. cubensis* 100% (Accession No. AY129342, score = 618 bit) และเหมือนกับ *P. cyanescens* 94% (Accession No. DQ494691, score = 644 bits) ดังนั้นจึงจัดได้ว่าเป็นรา *P. cubensis* ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ alignment data แสดงในภาคผนวก ฉ

TCCTCCGCTT	ATTGATATGC	TTAAGTTCAG	CGGGTAGTCC
TACCTGATTT	GAGGTCAAAT	TGTCATTAAT	TGTCTGAGTA
AACAGACGGT	TTGAAGCAGC	TTCAACCCAT	TCATAGTAGA
CATCCACGGC	GTAGATAATT	ATCACACCAA	TAGACGGTCC
ACAGCGGGCA	GCCGGCTAAT	GCATTTAAGG	GGAGCTGACT
TGGTAAGAAG	CCGGCAAAAT	AAACCCCCAA	GTCCAAGCCA
TTACACAAGC	TAACAAAAGC	TGGTAAGGTT	GAGAATTTAA
TGACACTCAA	ACAGGCATGC	TCCTCGGAAT	ACCAAGGAGC
GCAAGGTGCG	TTCAAAGATT	CGATGATTCA	CTGAATTCTG
CAATTCACAT	TACTTATCGC	ATTTCGCTGC	GTTCTTCATC
GATGCGAGAG	CCAAGAGATC	CGTTGCTGAA	AGTTGTATAT
TGTTTTATAG	GCACAAGGCC	ATATAGATAC	ATTCTGTTAC
ATTCATTGGA	GTATATGAAA	ACGTAGACCA	TCATTGAGAA
AGCCTTCAAT	TCATCAGAGA	GTAATCTCTG	ACTTCAATCC
AGCTTCCAAA	AACAATGATC	TACAAAAAGT	GCACAGGTGG
AAATATAAAG	ATGACGGGCG	AGCACATGCC	CCCGAGAGGG
CCAGCTACAA	CCACGCCAAA	GTTATTCAAT	AATGATCCTT
CCGCAGGTTC	ACCTACGGAA	ACCTTGTTAC	GACTTTTACT
TCCTCTAAAT	GACCAAG (787 bp)		

รูปที่ 4.3 ลำดับเบสบริเวณ ITS ร่วมกับไพรเมอร์ ITS1f และ ITS4 ของ *Psilocybe cubensis* เมื่อเทียบกับข้อมูลดีเอ็นเอในฐานข้อมูล GenBank

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 สัณฐานวิทยาของเห็ด *Psilocybe cubensis* ในอาหารเลี้ยง PDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน

จากการเพาะเลี้ยง *P. cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เมื่ออายุประมาณ 45 วัน มีดอกเห็ดเกิดขึ้น ลักษณะของดอกเห็ดที่เกิดขึ้นมีโครงสร้างคล้ายเห็ดสายพันธุ์นี้ กล่าวคือ ดอกเห็ดเมื่ออ่อนมีลักษณะแหลม เมื่อบานมีสีน้ำตาล ด้านใต้หมวกเห็ดมีสีดำ ดังแสดงในรูปที่ 4.4

รูปที่ 4.4 ดอกเห็ดของ *P. cubensis* ที่เกิดในอาหารลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 45 วัน

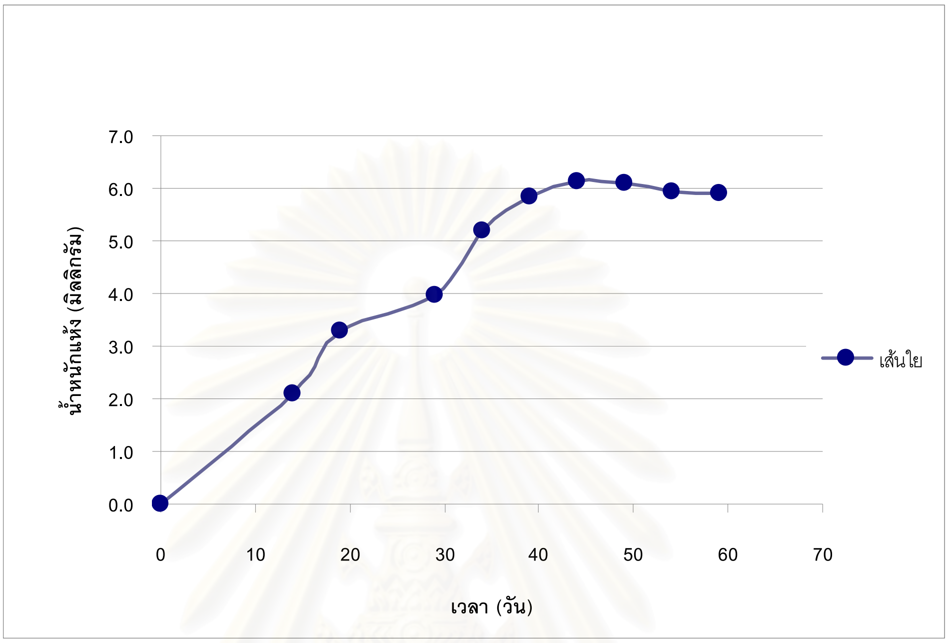
4.2 **ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของรา *Psilocybe cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลว MEB**

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. cubensis* เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ PDA, MEA, CMA และ SDA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อดูขนาดของโคโลนีและลักษณะเส้นใยดังแสดงในรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *P. cubensis* คือ MEA จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในการวัดการเจริญเติบโต เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดอื่น และเพื่อศึกษาเปรียบเทียบการสร้างสารเอกลักษณ์เฉพาะของ *P. samuiensis* จากงานวิจัยของ Suwancharoen, 2005 ที่ผ่านมากับ *P. cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

ตารางที่ 4.1 ขนาดของโคโลนีและลักษณะทางกายภาพของ *P. cubensis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง PDA, MEA, CMA และ SDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ชนิดของอาหาร	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ลักษณะทางกายภาพของโคโลนี
PDA	7.2	เส้นใยหนาบางไม่สม่ำเสมอ ขอบไม่เรียบ
MEA	7.4	เส้นใยหนาปานกลาง ขอบเป็นวงเรียบ
CMA	7.0	เส้นใยหนา สีขาว ขอบไม่เรียบ
SDA	6.8	เส้นใยหนา สีขาว ขอบไม่เรียบ

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MEB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 เดือน โดยการชั่งน้ำหนักเส้นใยที่อบแห้ง เขียนกราฟเส้นระหว่างน้ำหนักแห้งกับวันที่ ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเส้นใย *Psilocybe cubensis* เมื่อทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MEB เป็นเวลา 60 วัน

พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย *P. cubensis* สูงสุดที่ 45 วัน จากนั้นการเจริญจะค่อยๆลดลงมาจนถึงจุดที่เริ่มคงที่ในวันที่ 55 และคงที่เมื่ออายุ 60 วัน นั่นแสดงว่าราเข้าสู่ระยะ Stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่รามีการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเส้นใย *P. cubensis* เป็น 60 วัน

4.3 **การเลี้ยง** *Psilocybe cubensis* **และการสกัดสารเมแทบอไลต์ที่สร้างได้จาก** *Psilocybe cubensis*

เลี้ยงเส้นใยรา *P. cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MEB ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สกัดเส้นใยที่กรองได้ด้วยเมทานอลก่อนที่จะนำไปสกัดลำดับส่วนด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอธิลอะซิเตต

และเมทานอล นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองได้มาสกัดด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอธิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.1

4.4 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psilocybe cubensis*

4.4.1 การแยกส่วนสกัดหยาบให้บริสุทธิ์

4.4.1.1 ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและไดคลอโรมีเธนจากเส้นใย

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบทั้งสองชนิด พบว่าสารที่ได้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม (โดยประมาณ) นำมาวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบบาง และ ^{1}H NMR พบว่าประกอบด้วยสเตียรอยด์ (Steroid) และ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งเป็นสารที่พบทั่วไปในส่วนสกัดเหล่านี้ สำหรับส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใย พบว่ามีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ

4.4.1.2 ส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (ดังแสดงในแผนภาพที่ 2)

โดยส่วนใหญ่ส่วนสกัดหยาบเมทานอลจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ จึงนำมาสกัดแยกน้ำตาลด้วยไดคลอโรมีเทนก่อนจะทำการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้เป็นคลอโรฟอร์ม แล้วเพิ่มสภาพขั้วโดยการเติมเมทานอล พบว่าที่ 10% ของเมทานอลในคลอโรฟอร์ม ได้<u>สาร 1</u> มีสีเหลือง ลักษณะหนืดคล้ายน้ำมัน และที่ 35% ของเมทานอลในคลอโรฟอร์ม ได้<u>สาร 2</u> ลักษณะเป็นตะกอนสีขาวขุ่น (คราบสีขาวติดที่ขวดก้นกลม)

สาร 1 เป็นของหนืดสีเหลือง แยกได้จากลำดับส่วนที่ 78-93 ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตัวชะเป็น 10% ของเมทานอลในคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำมาแยกต่อด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 5:95 ได้แถบที่ 1 น้ำหนัก 8 มิลลิกรัม เป็นสารสีเหลือง ลักษณะหนืดคล้ายน้ำมัน

สาร 2 เป็นตะกอนสีขาวขุ่น แยกได้จากลำดับส่วนที่ 151-162 ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตัวชะเป็น 35% ของเมทานอลในคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำมาแยกต่อด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 30:70 ได้แถบที่ 2 น้ำหนัก 4 มิลลิกรัม เป็นตะกอนสีขาวขุ่น

สำหรับส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อในตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เช่น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอธิลอะซิเตต เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีและนำมาวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่ามีสารที่น่าสนใจเช่นกัน แต่เนื่องจากตัวอย่างของสารที่แยกได้มีปริมาณน้อย (ประมาณ 1-2 มิลลิกรัม) จึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ต่อไปได้

4.4.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

<u>สาร 1</u> สามารถละลายได้ในเอธิลอะซิเตต และคลอโรฟอร์ม

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังรูปที่ 1ค (ภาคผนวก ค) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3334 (O-H stretching), 2953 (C-H stretching), 1674 (C=O stretching), 1521 (C=C stretching aromatic ring) และ 1019 (C-O bending alcohol) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 1

เลขคลื่น (cm^{-1})	**ลักษณะ**
3334	O-H stretching
2953	C-H stretching
1674	C=O stretching
1521	C=C stretching aromatic ring
1019	C-O bending alcohol

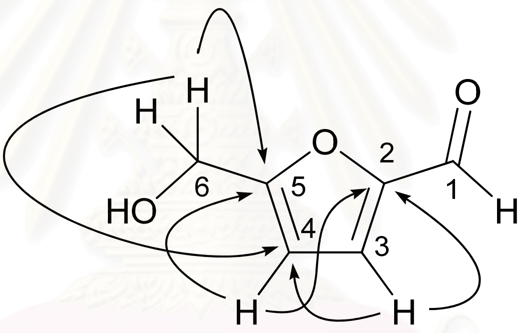
จากข้อมูล ^{1}H-NMR ของสาร **1** ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1ข ภาคผนวก ข ปรากฏสัญญาณของโปรตอนดังนี้ โปรตอนของอัลดีไฮด์ที่ δ_H 9.57 ppm โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 δ_H 7.21 ppm โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 δ_H 6.51 ppm และเมทิลลีนโปรตอนที่อยู่ติดกับออกซิเจนที่ δ_H 4.70 ppm

จากข้อมูล ^{13}C-NMR และ HSQC ของสาร **1** ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2ข ภาคผนวก ข ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนดังนี้ คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 δ_C 177.72 ppm คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 δ_C 160.71 ppm คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 δ_C 152.30 ppm คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 δ_C 123.03 ppm คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ที่ δ_C 110.01 ppm และคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 δ_C 57.56 ppm

ตารางที่ 4.3 ข้อมูล ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ HMBC ของสาร 1 (ใน $CDCl_3$)

ตำแหน่ง	^{13}C-NMR (δ_C)	^{1}H-NMR(δ_H)	gHMBC (H to C)
1	177.72	9.57 (CH, S)	-
2	152.30	-	-
3	123.03	7.21 (1H, d, *J* = 4 Hz)	C-2, C-4, C-5
4	110.01	6.51 (1H, d, *J*= 3.2 Hz)	C-2, C-5
6	57.56	4.70 (2H, s)	C-5

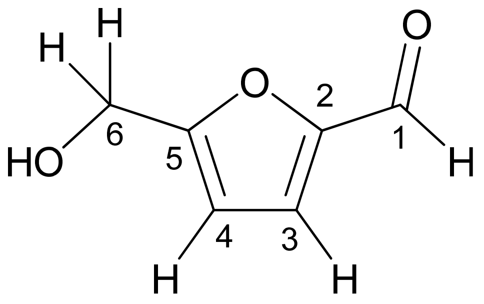
จากข้อมูลความสัมพันธ์ของ HMBC สามารถหาการเชื่อมต่อของอะตอมในโมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 HMBC ของสาร 1

จากข้อมูล HMBC สาร 1 มีความสัมพันธ์ของโปรตอน H-3 กับคาร์บอน C-2, C-4 และ C-5 โปรตอน H-4 กับ C-2 และ C-6 และโปรตอน H-6 กับ C-5

จากข้อมูลแมสเปกตรัม (APCI/TOF MS spectrum) ของสาร **1** พบว่าสารมีมวลโมเลกุล *m/z*: 148.984 $[M+Na]^+$ สูตรโมเลกุลของสาร **1** คือ $C_6H_6O_3$ และมีมวลโมเลกุลจากการคำนวณ 149.1017



รูปที่ 4.7 โครงสร้างทางเคมีของสาร 1

จากโครงสร้างที่วิเคราะห์ได้ ทำให้ทราบว่าสาร 1 มีโครงสร้างเหมือนกับ 5-Hydroxymethyl-furan-2-carbaldehyde (5-HMF) (ดังแสดงในตารางที่ 4.4) ซึ่งเคยมีรายงานการค้นพบในปี 1990 โดย William และ Julie แยกได้จากเมแทบอไลต์ของ *Talaromyces flavus* ในส่วนสกัดจากสารอินทรีย์ (organic extract) โดยเชื้อดังกล่าวสามารถควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อ *Verticillium dahliae* Kleb ที่ทำให้เกิดการเหี่ยวของมะเขือ (Ayer และ Racok, 1990)

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบ ^{13}C-NMR และ ^{1}H-NMR ของสาร 1 กับ 5-HMF

	^{13}C-NMR (δ_C)		^{1}H -NMR (δ_H)	
	สาร 1	5-HMF	**สาร 1**	5-HMF
1	177.72	178.1	9.57 (CH, s)	9.58 (1H,s,CHO)
2	152.30	153.7	-	-
3	123.03	123.3	7.21 (1H, d, J = 4 Hz)	7.19 (1H, d, J=3.5 Hz, H-3)
4	110.01	110.2	6.51 (1H, d, J= 3.2 Hz)	6.50 (1H, d, J=3.5 Hz, H-4)
5	160.71	163.0	-	-
6	57.56	57.6	4.70 (2H, s)	4.70 (2H, s, CH_2OH)

<u>สาร 2</u> สามารถละลายได้ในเมทานอล

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังรูปที่ 2ค (ภาคผนวก ค) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3357 broad (O-H stretching), 2924 (C-H stretching), 1743 (C=O stretching), 1643 (C=C stretching), 1102 และ 1023 (C-O stretching) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 2

เลขคลื่น (cm^{-1})	ลักษณะ
3357 broad	O-H stretching
2924	C-H stretching
1743	C=O stretching
1643	C=C stretching
1102 และ 1023	C-O stretching

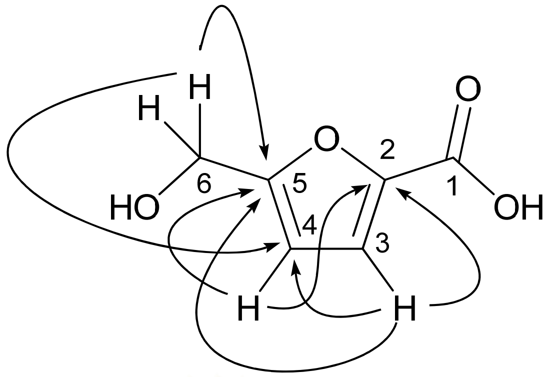
จากข้อมูล ^{1}H-NMR ของสาร 2 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 8ข ภาคผนวก ข ปรากฏสัญญาณของโปรตอนดังนี้ โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 δ_H 7.21 ppm โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 δ_H 6.51 ppm และโปรตอนที่ต่ออยู่กับเมทอกซิ (CH_2OH) ที่ δ_H 4.70 ppm

จากข้อมูล ^{13}C-NMR ของสาร 2 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 9ข ภาคผนวก ข ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนดังนี้ คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ที่ δ_C 156 ppm คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 δ_C 150 ppm คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ที่ δ_C 114 ppm คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ที่ δ_C 109 ppm และเมทอกซิคาร์บอนที่ δ_C 56.2 ppm

ตารางที่ 4.6 ข้อมูล ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ HMBC ของสาร 2 (ใน CD_3OD)

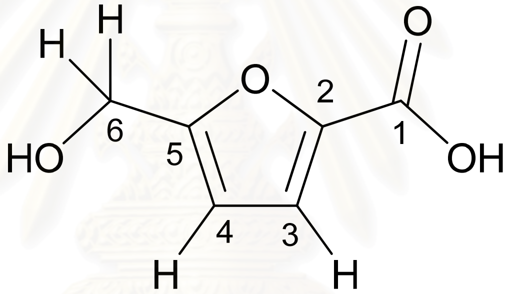
ตำแหน่ง	^{13}C-NMR (δ_C)	^{1}H-NMR(δ_H)	gHMBC (H to C)
2	150	-	-
3	114	6.8 (1H, *J*= 2.8 Hz)	C-2, C-4, C-5
4	109	6.2 (1H, *J* = 2.8 Hz)	C-1, C-5
5	156	-	-
6	56.2	4.5 (2H, s)	C-4, C-5

จากข้อมูลความสัมพันธ์ของ HMBC สามารถหาการเชื่อมต่อของอะตอมในโมเลกุลดังแสดงในรูป 4.8



รูปที่ 4.8 HMBC ของสาร 2

จากข้อมูล HMBC สาร 1 มีความสัมพันธ์ของโปรตอน H-3 กับคาร์บอน C-2, C-4 และ C-5 โปรตอน H-4 กับ C-2 และ C-6 และโปรตอน H-6 กับ C-5



รูปที่ 4.9 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2

จากโครงสร้างที่วิเคราะห์ได้ทำให้ทราบว่า สาร 2 มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสาร 1 เนื่องจาก IR พบว่า โครงสร้างของสาร 2 มีหมู่คาร์บอนิล ดังนั้น สาร 2 น่าจะเป็น 5-Hydroxy methyl-furan-2-carboxylic acid เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร 2 กับสาร 1 และ 5-Hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ทำให้ยืนยันได้ว่า สาร 2 คือ 5-Hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid ซึ่งเคยมีรายงานการค้นพบในปี 2001 โดย Jadulco และคณะ พบอนุพันธุ์ชนิดใหม่ของ furan carboxylic acid จากฟองน้ำทะเล ซึ่งได้มาจาก *Cladosporium herbarum* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtillis* และ *Staphylococcus aureus* (Jadulco และคณะ, 2001) และสาร 2 เป็นอนุพันธุ์กับสาร 1

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบ ^{13}C-NMR และ ^{1}H-NMR ของสาร 2 กับสาร 1 และ 5- Hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid

	^{13}C-NMR (δ_C)			^{1}H -NMR (δ_H)		
	สาร 2	**สาร 1**	5-Hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid	**สาร 2**	**สาร 1**	5- Hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid
1	-	177.72	162.5	-	9.57 (CH, s)	-
2	150	152.30	160.6	-	-	-
3	114	123.03	110.2	6.8 (1H, d, *J* = 4 Hz)	7.21 (1H, d, J = 4 Hz)	6.44 (1H, d, *J*=3.5 Hz)
4	109	110.01	119.5	6.2 (1H, d, *J*= 3.2 Hz)	6.51 (1H, d, J= 3.2 Hz)	7.12 (1H, d, *J*=3.5 Hz)
5	156	160.71	145.9	-	-	-
6	56.2	57.56	57.8	4.5 (2H, s)	4.70 (2H, s)	4.52 (2H, s)

4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทไซโลไซบินและไซโลซินจากเห็ด *Psilocybe cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะ (HPLC)

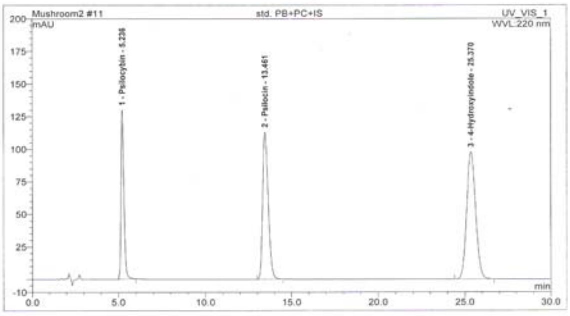
จากเห็ด *P. cubensis* ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ดังแสดงในรูปที่ 4.10 เมื่อนำมาสกัดตามวิธีการทดลองในข้อ 3.10.3.2 และ 3.10.3.3 ได้ส่วนสกัดตัวอย่างดอกเห็ดและก้านดอกเห็ดนำมาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ให้ได้ความเข้มข้นของ internal standard เป็น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรสารที่ใช้วิเคราะห์ (injection volumn) เท่ากับ 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะ (HPLC) ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.10.3 พบว่า ทั้งส่วนดอกเห็ดและก้านดอกเห็ดมีสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทไซโลไซบินและไซโลซิน ซึ่งให้ค่า retention time (RT) ที่ต่างกัน คือ ค่า retention time (RT) ที่ 5.25 และ 13.54 นาที ตามลำดับ ส่วน Internal Standard ค่า RT อยู่ที่ 25.43 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.11 คำนวณหาปริมาณสารออกฤทธิ์ได้จากการเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารแต่ละชนิดกับ Internal Standard พบว่าดอกเห็ดมีไซโลไซบิน 0.051 % และไซโลซิน 0.010% (เมื่อเทียบกับน้ำหนักดอกเห็ดแห้ง 51.7 มิลลิกรัม) ส่วนก้านดอกเห็ดพบไซโลไซบิน 0.018 % และไซโลซิน 0.015% (เมื่อเทียบกับน้ำหนัก

ก้านเห็ดแห้ง 55.7 มิลลิกรัม)ตามลำดับ วิธีการคำนวณ ดังแสดงในตาราง 1จ และ 2จ พร้อมด้วยตัวอย่างการคำนวณดังแสดงใน ภาคผนวก จ

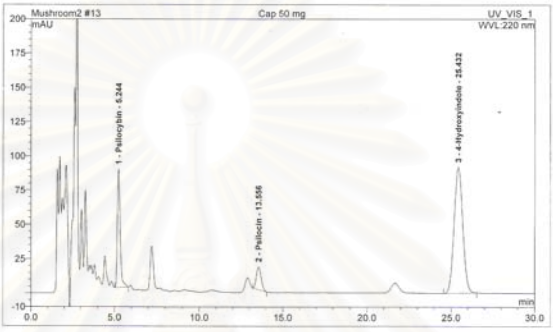
สำหรับเส้นใยของ *P. cubensis* ที่เกิดดอกเห็ดได้ทำการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทั้งสองชนิดโดยใช้วิธีการสกัดและภาวะของเครื่องมือเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ในส่วนดอกเห็ดและก้านดอกเห็ด ปรากฏว่าไม่พบสารทั้งสองในเส้นใยที่เกิดดอกเห็ด *P. cubensis* ดังแสดงในรูปที่ 4.11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

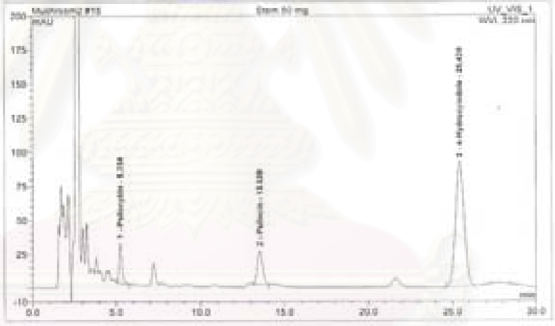
รูปที่ 4.10 เห็ด *P. cubensis* ที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDB และดอกเห็ดอายุประมาณ 45 วัน



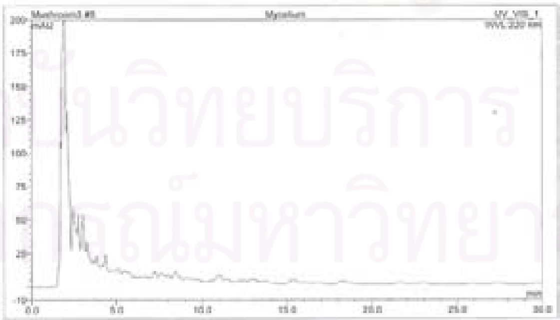
(ก) สารมาตรฐานผสมไซโลไซบิน ไซโลซินและ 4-hydroxyindole
ที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(ข) ส่วนสกัดดอกเห็ด *P. cubensis* หนัก 24.6 มิลลิกรัม



(ค) ส่วนสกัดก้านดอกเห็ด *P. cubensis* หนัก 20.9 มิลลิกรัม



(ง) ส่วนสกัดเส้นใย *P. cubensis* ที่เกิดดอกเห็ดในอาหารชนิด PDB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมของ (ก), (ข), (ค) และ (ง) ที่วิเคราะห์ด้วย Inertsil ODS-3 column (15cmX4.6mmX5μm), mobile phase 10 mM Ammonium formate (pH 3.5) : Acetonitrile (95:5 v/v), 1.0 ml/min, Inj. Vol. 20 ul ที่ UV 220 nm

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Psilocybe cubensis* เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ PDA, MEA, CMA และ SDA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *P. cubensis* คือ PDA และ MEA สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MEA ในการวัดการเจริญเติบโต เนื่องจากเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง MEA เส้นใยของเชื้อรามีการเจริญเร็วกว่าเลี้ยงในอาหารแข็งชนิดอื่นๆ และเป็นการศึกษาเปรียบเทียบการสร้างสารเอกลักษณ์เฉพาะของ *P. samuiensis* จากงานวิจัยของ Suwancharoen, 2005 ที่ผ่านมากับ *P. cubensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ MEB ที่สกัดด้วยเมทานอลถูกเลือกนำมาศึกษา เมื่อนำมาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟฟี ได้แก่ คอลัมน์โครมาโทกราฟี และ preparative TLC ได้สาร 2 ชนิด คือ 5-hydroxymethyl-furan-2-carbaldehyde และ 5-hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid ซึ่งสารทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นสารที่สามารถสกัดได้จากเชื้อราในธรรมชาติ เช่น *Talaromyces flavus* เป็นต้น

ดอกเห็ด *P. cubensis* ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDB เป็นเวลาประมาณ 45 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์หลอนจิตและประสาทไซโลไซบินและไซโลซิน พบว่าในดอกเห็ดมีไซโลไซบิน 0.051 % และไซโลซิน 0.010% (เมื่อเทียบกับน้ำหนักดอกเห็ดแห้ง 51.7 มิลลิกรัม) ส่วนก้านดอกเห็ดพบไซโลไซบิน 0.018 % และไซโลซิน 0.015% (เมื่อเทียบกับน้ำหนักก้านดอกเห็ดแห้ง 55.7 มิลลิกรัม) ส่วนเส้นใยที่เกิดดอกเห็ดไม่พบไซโลไซบินและไซโลซิน

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้น หากต้องการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบลักษณะสำคัญทางชีวภาพ (Biomarker) เพื่อใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ น่าจะใช้เทคนิคอื่นในการทำวิจัยเพิ่มเติมด้วย เช่น เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาในการตรวจสอบหาสารเสพติดในเลือด จึงจะได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำยิ่งขึ้น เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2547. รวมกฎหมายยาเสพติดให้โทษออกตามความในพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม.

นวลศรี นิวัติศัยวงศ์, 2536. อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, 2541. ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย 2545. หนังสือเห็ดไทย. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์พงษ์สาส์น

สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย 2543. เห็ดพิษ. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์พงษ์สาส์น

ภาษาอังกฤษ

Agurell, S. and Nilsson, J. L. G. 1968. A biosynthetic sequence from tryptophan to psilocybin. Tetrahedron Letters. 1968a, 9, 1063-1064.

Agurell, S. and Nilsson, J. L. G. 1968. Biosynthesis of psilocybin part II. Incorporation of labeled tryptamine derivatives. Acta Chemica Scandinavica. 1968b, 22, 1210-1218.

Allen. J. 1992. [online] Available from: http://www.erowid.org/library/books_online /magic_mushrooms_aunz/images/psilocybe_cubensis15_sm.jpg[2009, May 7]

Allen. J. 1992. [online] Available from: http://forums.mycotopia.net/attachments/forum-international/73661d1200432441-evolution-sem-psilocybe-samuiensis-thailand-semsam20.jpg[2009, May 7]

Allen, J. W. and Merlin, M. D. 1992. Psychoactive mushroom use in Koh Samui and Koh Pha-Ngan, Thailand. J. Ethnopharm. 35: 205-228.

Allen, J. and Gartz, J. 1997. Magic mushroom in some third world countries. Psilly Publications and Raverbooks., Seattle, Washington, pp. 22-32.

Allen, J. 1997. Magic mushrooms of the Pacific Northwest by Mushroom John. Psilly Publications., Seattle, Washington, pp. 9-12.

Arora, D. 1986. Mushrooms Demystified. 2nd ed. California: Ten Speed Press. pp.153-154.

Ayer, W. A. and Racok, J. S. 1990. The metabolites of *Talaromyces flavus*: part 1 metabolites of the organic extracts. Can J Chem. 68: 2085-2094.

Beug, M. W. and Bigwood, J. 1981. Quantitative analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe baeocystis* (Singer and Smith) by High-Performance Liquid Chromatography and by Thin-Layer Chromatography. J. Chromatogr. 207: 379-385.

Bogusz, M. J., Maier, R. D.,Schäfer, A. Th. and Erkens, M.1998. Honey with Psilocybe mushrooms a revival of a very old preparation on the dung market. Int J Legal Med. 111: 147-150.

Catalfomo, P. and Tyler, Jr. V. E. 1964. The Production of Psilocybin in Submerged Culture by *Psilocybe cubensis*. Lloydia. 27: 53-63.

Gartz, J., Allen, J. W. and Merlin, M. D. 1994. The Ethnomycology, Biochemistry and Cultivation of *Psilocybe samuiensis* Guzman, Bandala and Allen, A New Psychoactive Fungus from Koh Samui, Thailand. J. Ethnopharm. 43: 73-80.

Gartz, J. 1994. Extraction and analysis of indole derivatives from fungal biomass. J. Basic Microbiol. 34(1):17-22.

Gross, S. T. 2000. Detecting psychoactive drugs in the developmental stages of mushrooms. J. Forensic. Sci. 45(3): 527-537.

Grades, M. and Bruns, T. D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular ecology. 2(2):113-8.

Guzmán, G., Bandala, V. M. and Allen, J. W. 1993. A new bluing psilocybe from Thailand. Mycotaxon. 46: 155-166.

Hasler, F., Grimberg, U., Benz, M. A., Huber, T. and Vollenweider, F. X. 2004. Acute psychological and physiological effects of psilocybin in healthy humans: a double-blind, placebo-controlled dose-effect study. Psychopharmacol. 172: 145-156.

Jadulco, R., Proksch, P., Wray, V., Sudarsono., Berg, A. And Gräfe, U. 2001. New macrolides and furan carboylic acid derivative from the spong-derived fungus Cladosporium herbarum. J Nat Prod. 64: 527-530.

Keller, T., Schneider, A., Regenscheit, P., Dirnhofer, R., Rücker, T., Jaspers, J. and Kisser, W.1999. Analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe subcubensis* GUZMAN by

ion mobility spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. Forensic Sci Int. 796: 421-427.

Kinoko . 2007. เห็ดพิษ: *Gymanopilus aeruginosus* [online]. Available from: www.sudipan.net/phpBB2/viewtopic.php?p=32415. sited from http://inflab.nagaokaut.ac.jp/kinoko/kinoko.html /kinoko2/252-4.jpg..[2009, May 7]

Koike, Y., Wada, K., Kusano, G. And Nozoe, S. 1981. Isolation of Psilocybin from Psilocybe agentipes and its determination in specimens of some mushrooms. J Nat Prod. 44: 362-365.

Kuo. M., 2006. *Gomphus floccosus*. [online]. Available from: http://www.mushroomexpert.com/gomphus_floccosus.html[2009, May 7]

Leung, A. Y. and Paul, A. G. 1968. Baeocystin and norbaeocystion: new analogs of psilocybin from *Psilocybe baeocystis*. J Pharm Sci. 57: 1667-1671.

Levine, W. G. 1967. Formation of blue oxidation product from psilocybin. Nature. 215: 128-129.

Lincoff, G. and Mitchel, D. H. 1977. Toxic and hallucinogenic mushroom poisoning ; a handbook for physicians and mushroom hunters. New York: Van Nostrand Reinhold.

Miller, M 1980. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis and other clinical conditions. J. Periodontol. 72: 1790-8000.

Musshoff, F., Madea, B. and Beike, J. 2000. Hallucinogenic mushrooms on the German market-simple instructions for examination and identification. J. Forensic. Sci. 113: 389-395.

Nichols, D. E. 2004. Hallucinogens. Phamacol Ther. 101: 131-181.

Noguere H. 2005. Mycologie en catalogue nord : Photos *Amanita virosa*. [online]. Available From: http://mycologie.catalogne.free.fr/ImagePagePhoto/Amanita_virosa.jpg[2009, May 7]

Ophardt, E. C. 2003. Drug-CNS hallucinogen [online]. Elmhurst college Available from: http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/672hallucin.html[2009, March 22]

Persson, H. 2003. Mushrooms. The Medicine Publishing Company Ltd.

Pornpakakul, S., Suwancharoen, S., Petsom, A., Roengsumran S., Muangsin N., Chaichit, N., Piapukiew J., Sihanonth, P. and Allen J. W. 2009. A new sesquiterpenoid

metabolite from *Psilocybe samuiensis*. J. Asian Natural Products Research. 11:12-17.

Pumarat. S., 2007. Mycologie en catalogue nord : Photos *Gyromitra esculenta*. [online]. Available from: http://mycologie. catalogne.free. fr/ ImagePagePhoto/ Gyromitra_esculenta.jpg [2009, May 7]

Seivewright, N. and Lagundoye, O. 2000. What the clinician needs to know about magic mushrooms. Adv. Psychiatr. Treat. 6: 344-347.

Stamets, P. 1996. Psilocybin mushrooms of the world. Ten Speed Press, Califonia.

Tsujikawa, K., Kanamori, T., Iwata, Y., Ohmae, Y., Sugita, R., Inoue, H. and Kishi, T. 2003. Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan. J. Forensic. Sci. 138: 85-90.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. In PCR Protocols: A Guide to Methode and Applications. In Innes, M. A., Gelfand, J., Sninky, J., White, T. J. (eds.). San Diego: Academic Press, pp. 315-322.

www.health.howstuffworks.com/.../printable[2009, May 7]

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/ commons/4/4e/Dried_Cubensis.jpg[2009, May 7]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

อาหาร Corn Meal Agar (CMA) เตรียมตามสูตร

Corn Meal	20	กรัม
Peptone	20	กรัม
Glucose	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

อาหาร Malt Extract Agar (MEA) เตรียมตามสูตร

Malt extract	20	กรัม
Peptone	1	กรัม
Glucose	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เตรียมตามสูตร

มันฝรั่ง	200	กรัม
Glucose	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

หั่นมันฝรั่งให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก แล้วนำไปต้มจนมันฝรั่งสุก กรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำต้มมันฝรั่งส่วนที่กรองได้มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำส่วนประกอบต่างๆมาผสมเข้าด้วยกัน

อาหาร Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) เตรียมตามสูตร

Glucose	40	กรัม
Peptone	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อผสมส่วนต่างๆจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำไปทำการฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

อาหาร Corn Meal Broth (CMB) เตรียมตามสูตร

Corn Meal	20	กรัม
Peptone	20	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

อาหาร Malt Extract Broth (MEB) เตรียมตามสูตร

Malt extract	20	กรัม
Peptone	1	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

อาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) เตรียมตามสูตร

มันฝรั่ง	200	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

หั่นมันฝรั่งให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก แล้วนำไปต้มจนมันฝรั่งสุก กรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำต้มมันฝรั่งส่วนที่กรองได้มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำส่วนประกอบต่างๆมาผสมเข้าด้วยกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหาร Sabouraud's Dextrose Broth (SDB) เตรียมตามสูตร

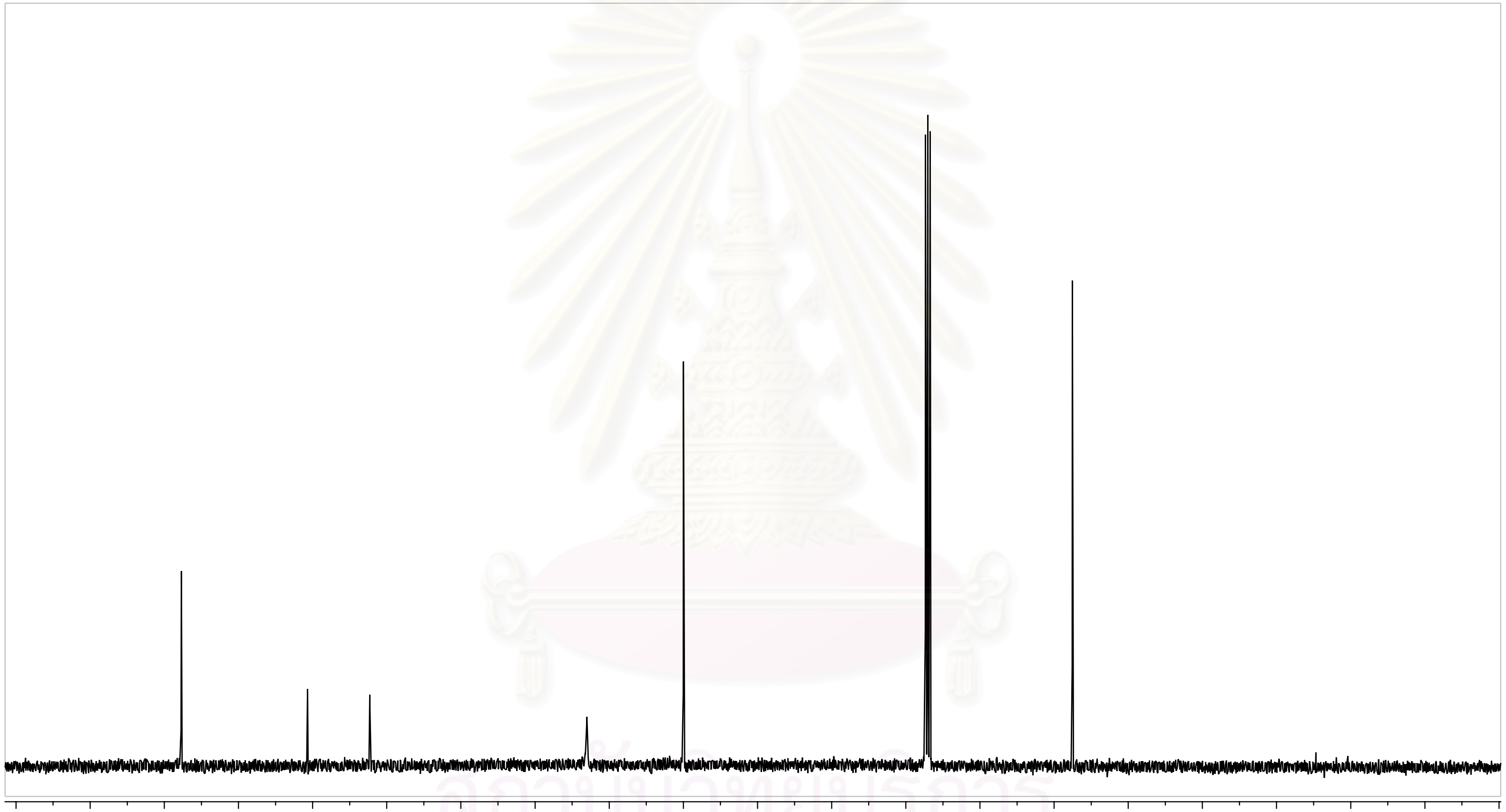
Glucose	40	กรัม
Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เมื่อผสมส่วนประกอบต่างๆจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำไปทำการฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

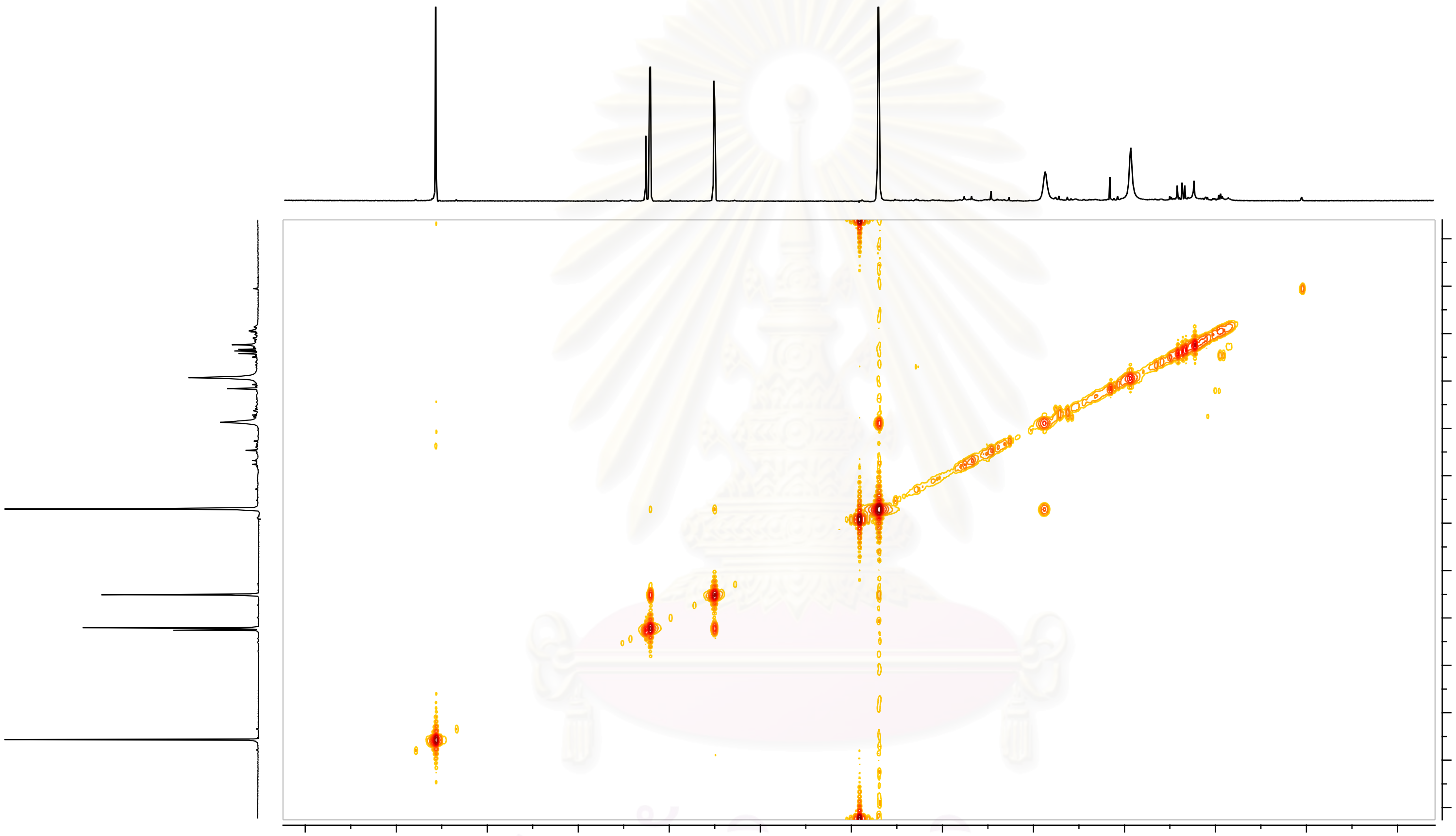
รูปที่ 1ข ^{1}H-NMR สเปคตรัมของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



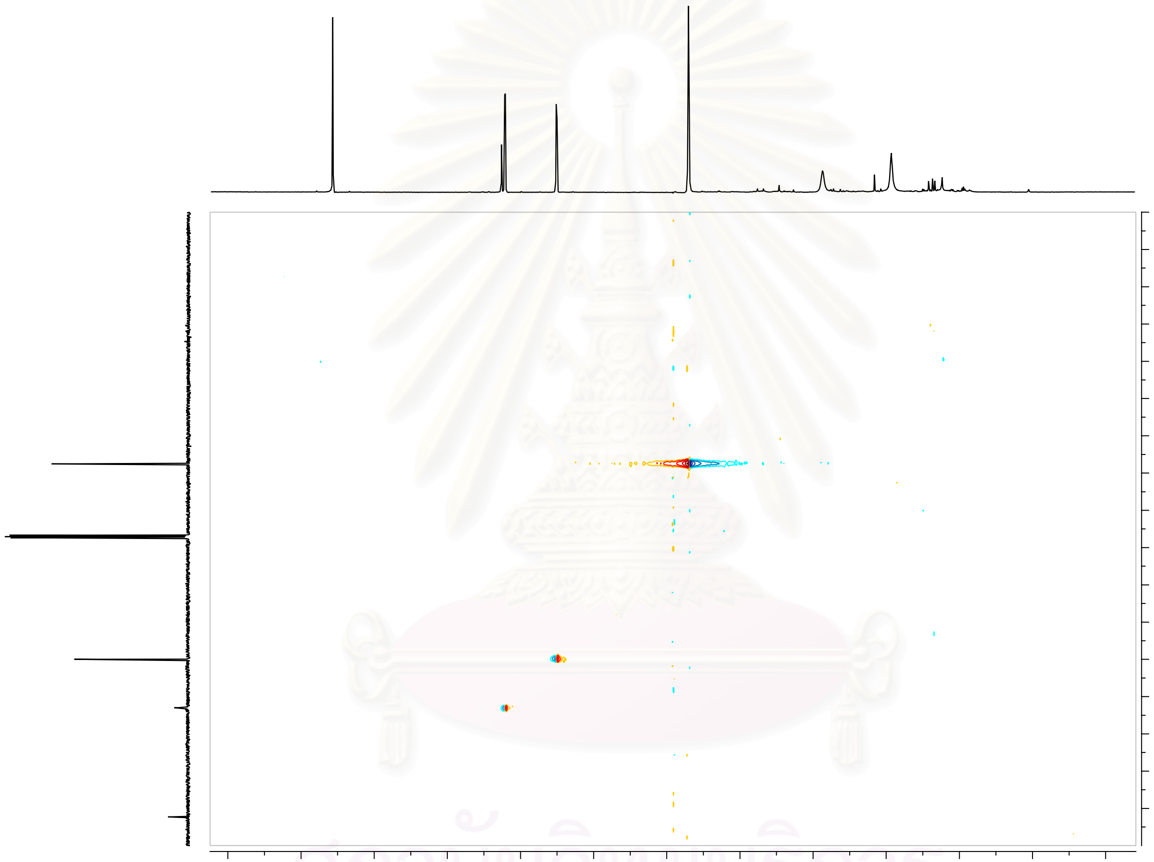
รูปที่ 2ข ^{13}C-NMR สเปคตรัมของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



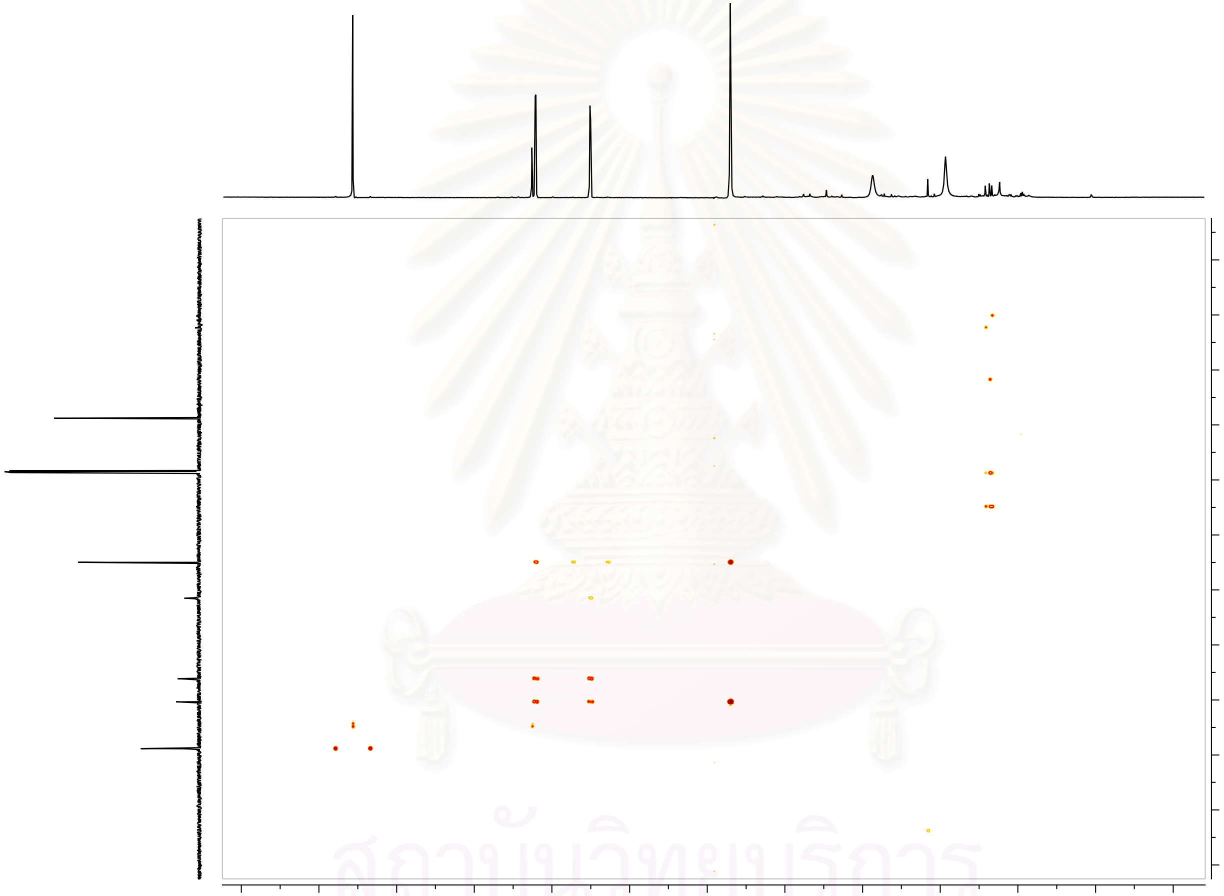
รูปที่ 3ข COSY ของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



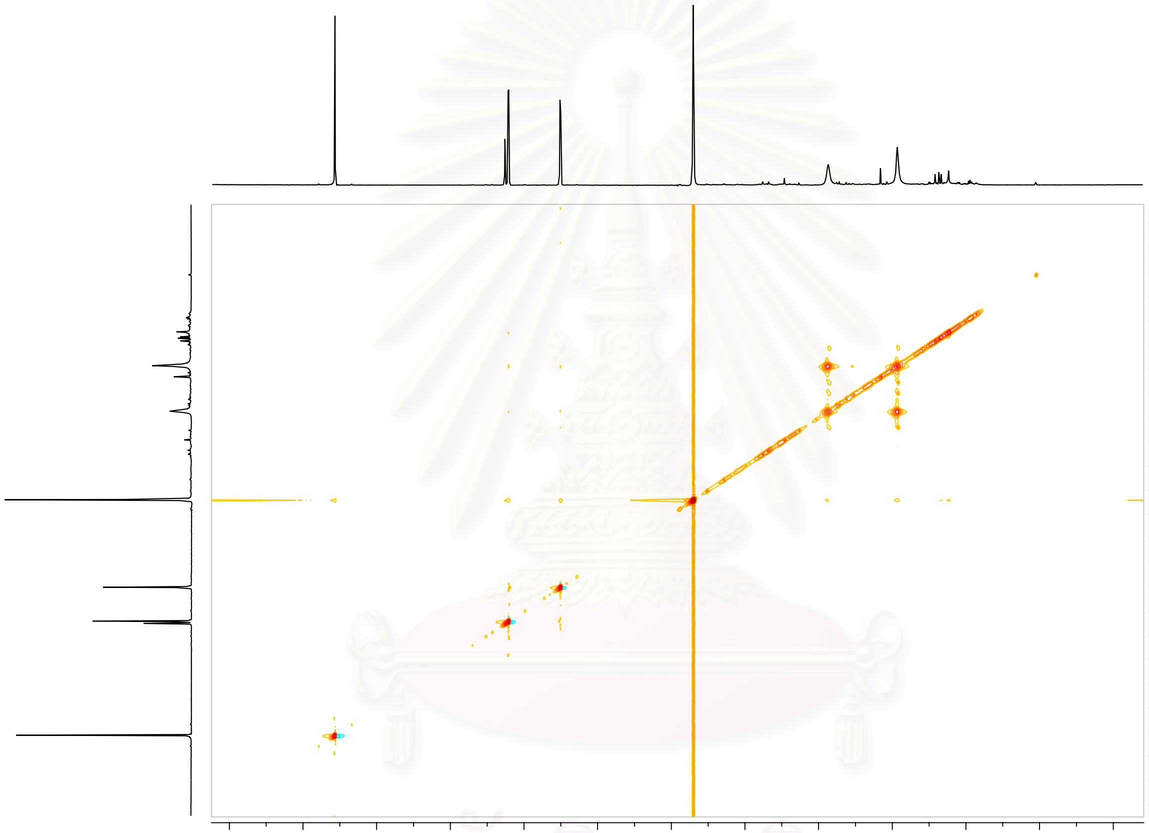
รูปที่ 4ข HSQC ของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5ข HMBC ของสาร 1

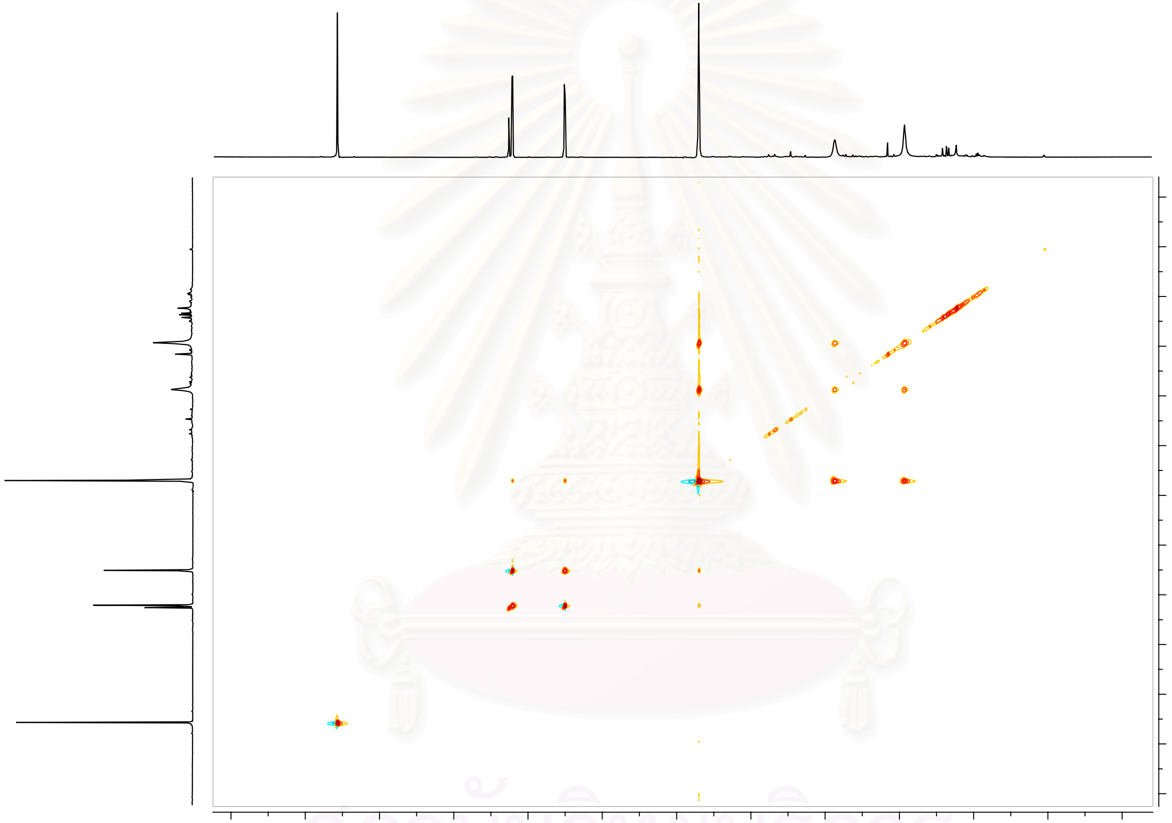
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



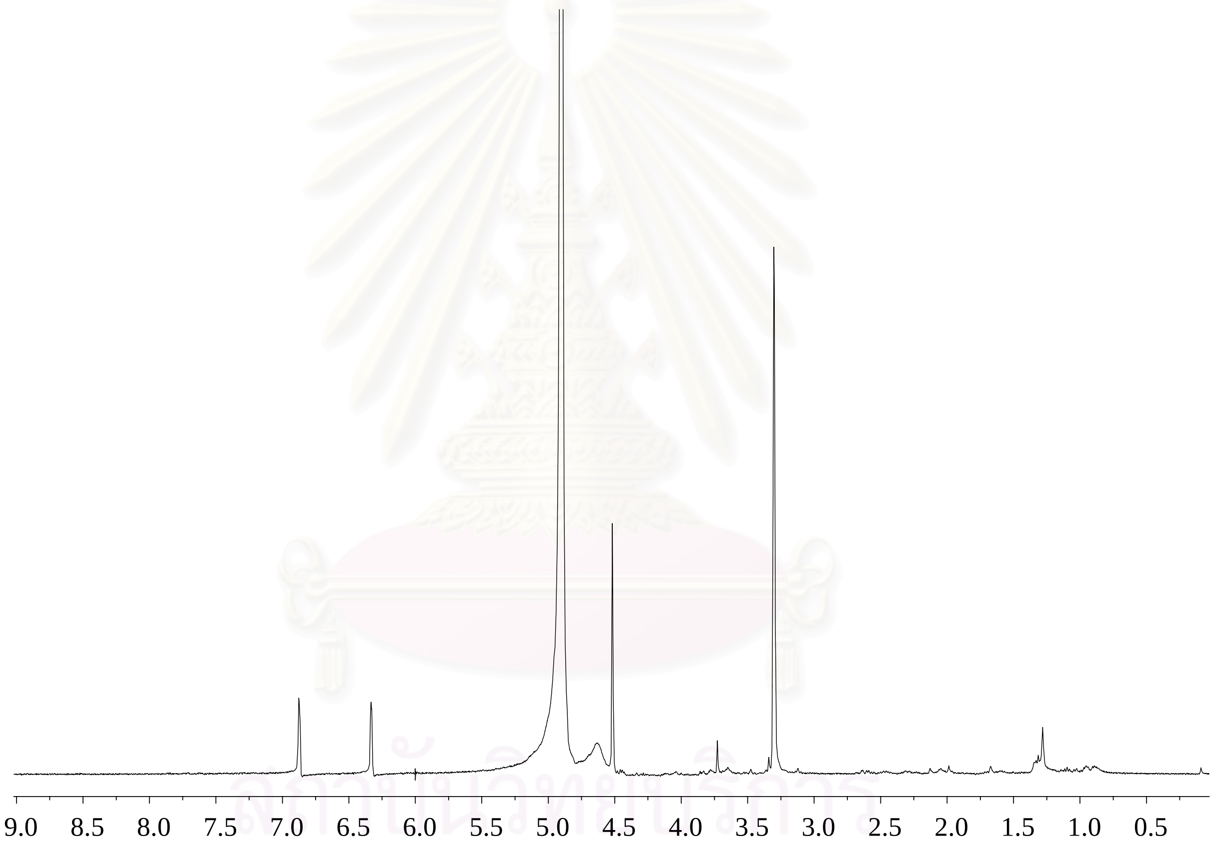
รูปที่ 6ข NOESY ของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

57



รูปที่ 7ข TOCSY ของสาร 1



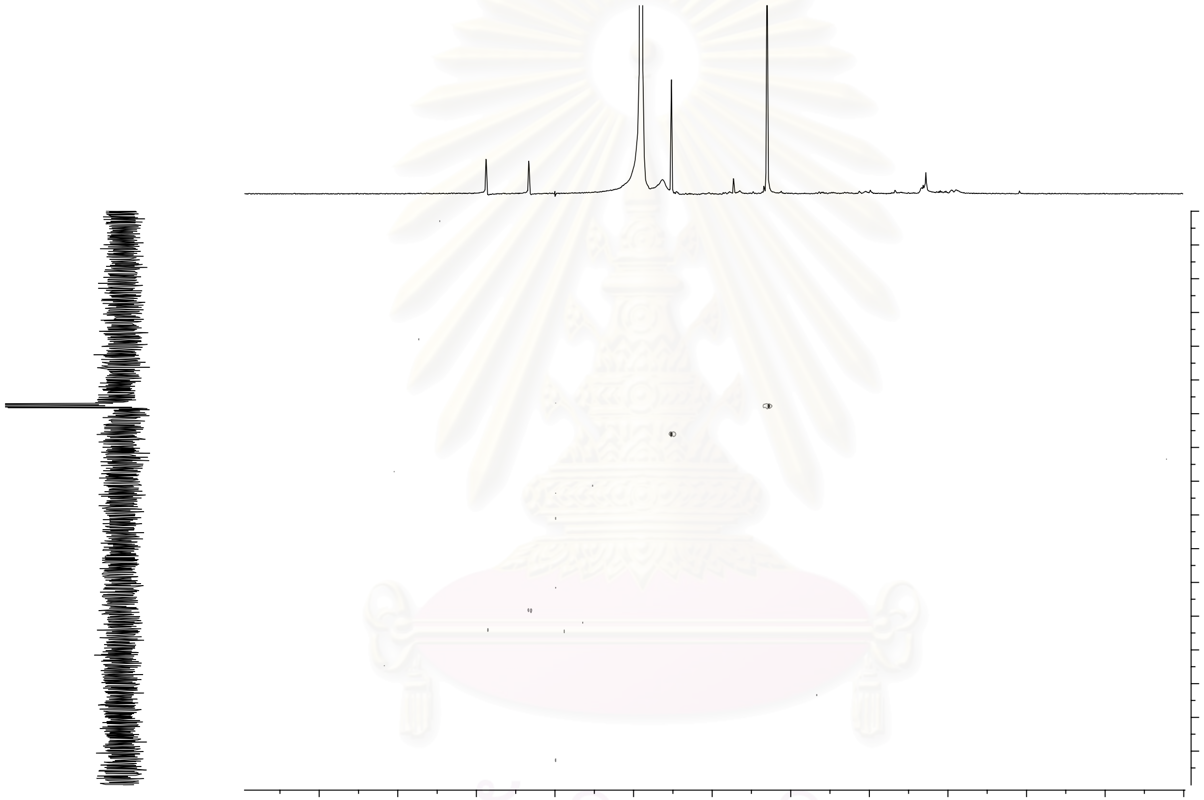
รูปที่ 8ข ^{1}H-NMR สเปคตรัมของสาร 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

59

รูปที่ 9ข ^{13}C-NMR สเปคตรัมของสาร 2

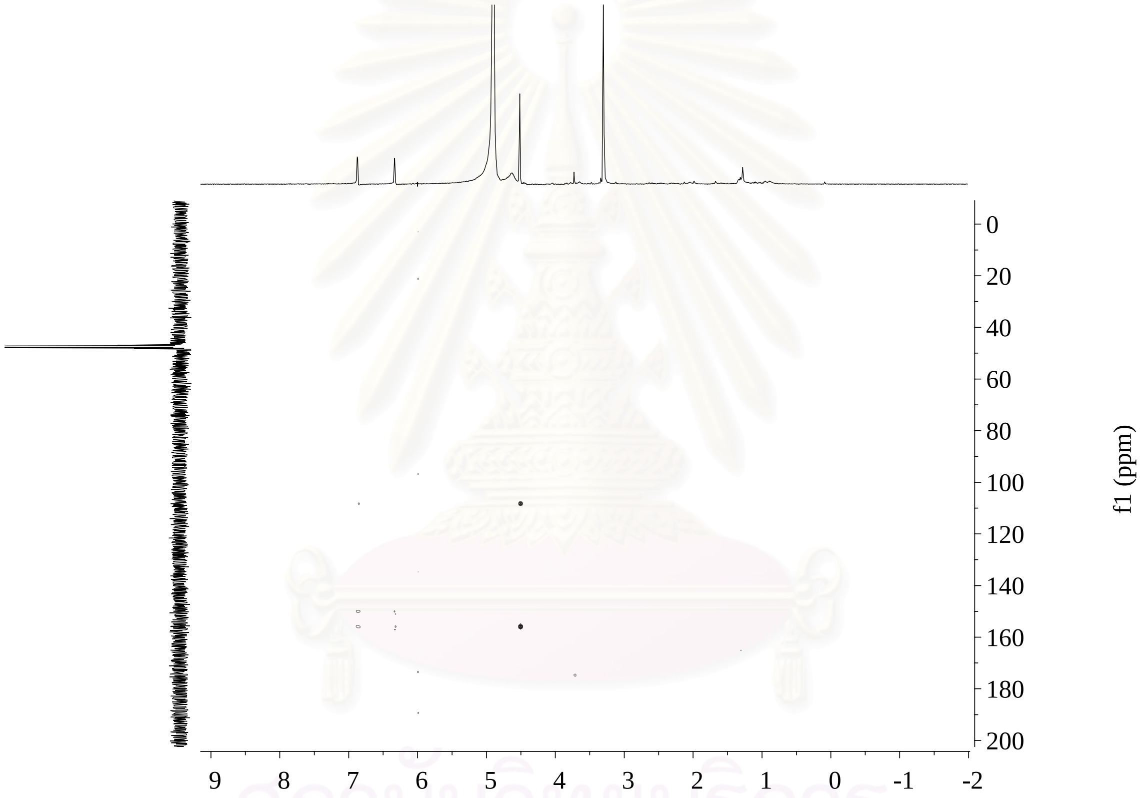
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10ข HSQC ของสาร 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

61

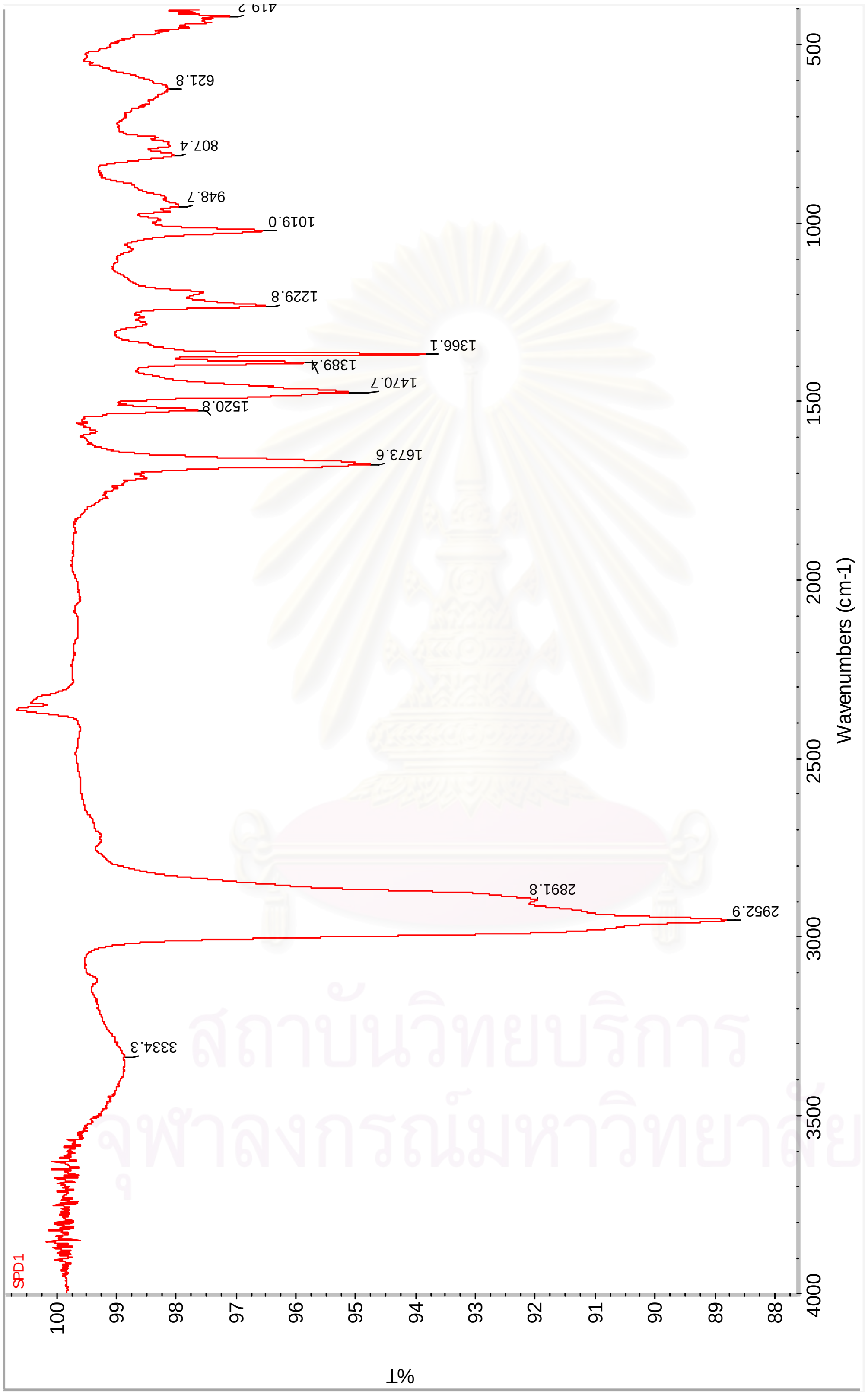


สถาบันวิทยบริการ

รูปที่ 11ข HMBC ของสาร 2

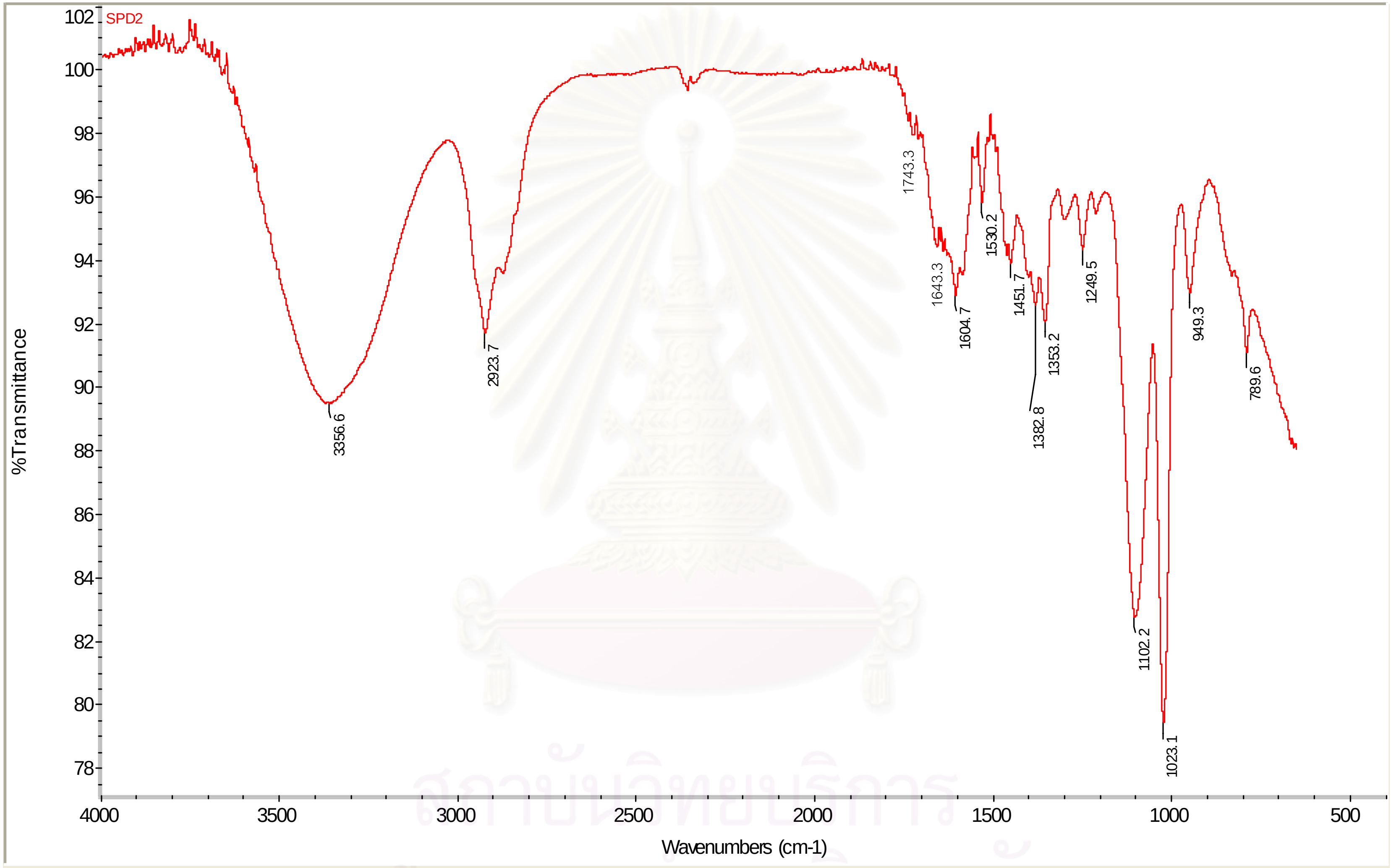
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค



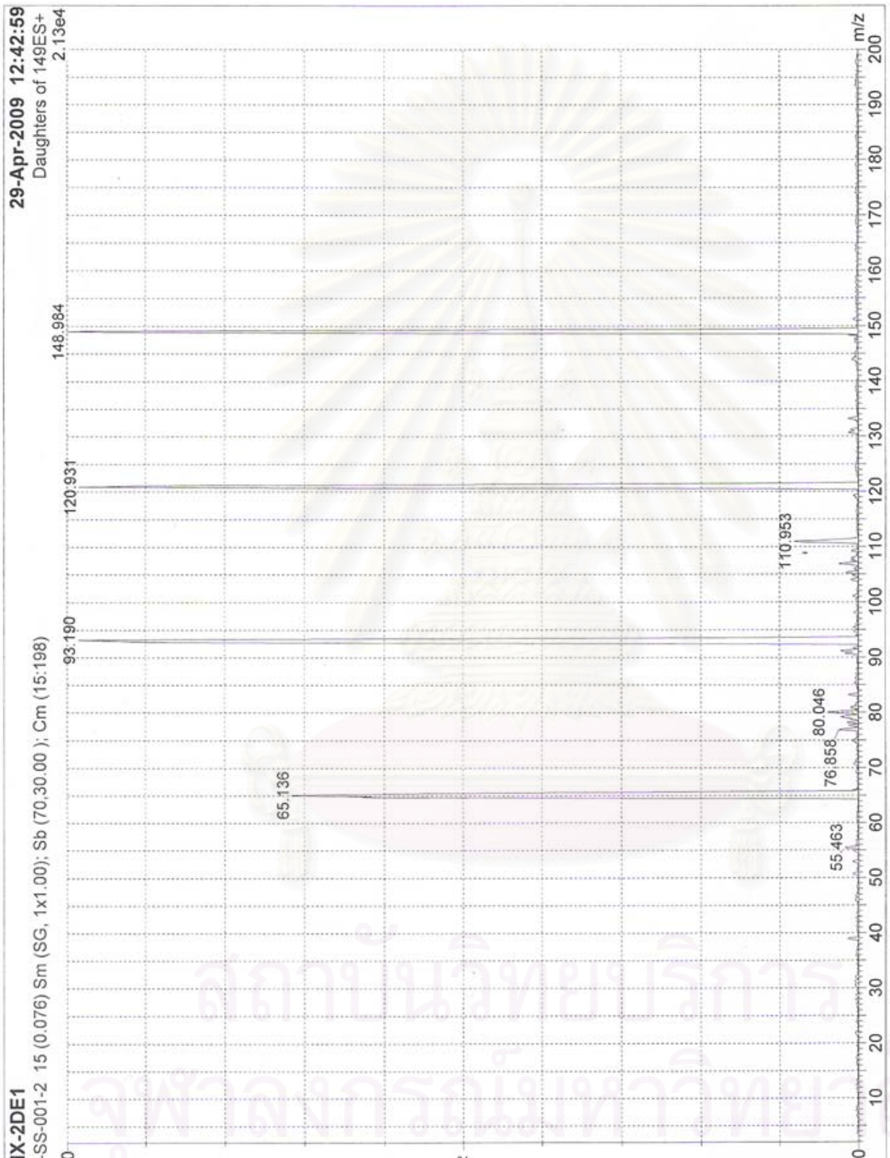
รูปที่ 1ค IR สเปกตรัมของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2ค IR สเปกตรัมของสาร 2

ภาคผนวก ง



รูปที่ 1ง แมสสเปกตรัมของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

วิธีการคำนวณหาปริมาณสารออกฤทธิ์ไซโลไซบินและไซโลซิน

ปริมาณสารที่ต้องการทราบค่า

= [(Sample ratio/standard ratio) x (% standard potency/100) x (1/5 ml) x (1 ml/4 ml) x (0.5 ml/1 ml) x standard weight (mg) x (1/1 ml) x (1/sample weight (mg))]

เมื่อ Sample ratio = อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้พีคของ internal Standard (ค่าเฉลี่ย)

Standard ratio = อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานต่อพื้นที่ใต้พีคของ internal Standard (ค่าเฉลี่ย)

% Std. potency= ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (%)

Dilution factor standard

= การเจือจางสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

= (1/5 ml) x (1 ml/4ml) x (0.5 ml/1ml)

Dilution factor Sample

= การเจือจางส่วนสกัดตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วย mobile phase (มิลลิลิตร)

= (1 / 1 ml)

Sample weight = น้ำหนักตัวอย่างที่อบแห้ง (มิลลิกรัม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1จ การหาปริมาณไซโลไซบินจากส่วนสกัดดอกเห็ด (cap) และก้านดอกเห็ด (stalk) ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะ (HPLC)

	Peak area of Psilocybin	Peak area of 4-hydroxyindole	Peak ratio	Average ratio	psilocybin (%w/w)
Standard	1491465.16	3559067.51	0.41906	0.42189	-
	1496399.02	3557353.94	0.42065		
	1496500.01	3530140.40	0.42392		
	1501151.40	3540971.73	0.42394		
Cap	1009908.99	3331917.14	0.30310	0.30261	0.051
	1011813.13	3349029.47	0.30212		
Stalk	371852.67	3308322.02	0.11240	0.11254	0.018
	373404.18	3313931.71	0.11268		

ตารางที่ 2จ การหาปริมาณไซโลซินจากส่วนสกัดดอกเห็ด (cap) และก้านดอกเห็ด (stalk) ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะ (HPLC)

	Peak area of Psilocin	Peak area of 4-hydroxyindole	Peak ratio	Average ratio	psilocin (%w/w)
Standard	2551361.95	3559067.51	0.71686	0.71969	-
	2557383.45	3557353.94	0.71890		
	2548196.08	3530140.40	0.72184		
	2557108.53	3540971.73	0.72215		
Cap	336926.24	3331917.14	0.10112	0.09914	0.010
	325413.46	3349029.47	0.09717		
Stalk	516014.97	3308322.02	0.15597	0.15783	0.015
	529244.83	3313931.71	0.15971		

ตัวอย่างการคำนวณ

การคำนวณหาปริมาณไซโลไซบินในส่วนสกัดดอกเห็ด

= [(0.30269/ 0.42189) x (0.489/5) x (100/100) x (1/4) x (0.5/1) x (1/51.7) x 100] (x 3*)

= 0.051 % w/w

หมายเหตุ 3* คือ จำนวนขวดที่ใส่ส่วนสกัดดอกเห็ดที่แบ่งมาเป่าแห้งด้วยกระแสไนโตรเจนในปริมาณที่เท่ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

Alignments Data

```
>gi|95107045|gb|DQ494691.1|  Psilocybe cyanescens isolate AFTOL-ID
819 internal transcribed
spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed
spacer 2, complete sequence
Length=597

 Score =  644 bits (325),  Expect = 0.0
 Identities = 408/431 (94%), Gaps = 6/431 (1%)
 Strand=Plus/Minus

Query  59
TAAACAGACGGTTTGAAGCAGCTTCAACCCATTCATAGTAGACATCCACGGCGTAGATAA  118
            ||||| ||||||| ||||||||||||||||||| | || ||||
||||||||||||||||
Sbjct  574
TAAACGGACGGTTAGAAGCAGCTTCAACCCATTGAGAGCAGACGTCCACGGCGTAGATAA  515

Query  119
TTATCACACCAATAGACGGTCCACAGCGGGCAGCCGGCTAATGCATTTAAGGGGAGCTGA  178
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
|||||||||||||||||
Sbjct  514
TTATCACACCAATAGACGGTCCACAGCGGGCAGCCGGCTAATACATTTAAGGGGAGCTGA  455

Query  179  CTTG--
GTAAGAAGCCGGCAAAATAAACCCCCAAGTCCAAGCCATTACACAAGCTAACAA  236
            | |   |  |||||||||||||| |
|||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  454  CATCTCGAGAGAAGCCGGCAAAAGA--
CCCCCAAGTCCAAGCCATTACACAAGCTAACAA  397

Query  237
AAGCTGGTAAGGTTGAGAATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAG  296

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396
AAGCTGGTAAGGTTGAGAATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAG  337

Query  297
GAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA  356

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336
GAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA  277

Query  357
TCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGT  416

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276
TCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGT  217
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
Query  417
ATATTGTTTTATAGGCACAAGGCCATATAGATACATTCTGTTACATTCATTGGAGTATAT  476
            |||| | |||||||||| || |||||| |||||||||||||||||||| ||||
||||||
Sbjct  216  ATATAG-TTTATAGGCATAAAGCCATA-
AGATACATTCTGTTACATTCTTTGGGGTATAT  159

Query  477  GAAAACGTAGA  487
            |||||||||||
Sbjct  158  GAAAACGTAGA  148


 Score =  157 bits (79),  Expect = 7e-35
 Identities = 88/91 (96%), Gaps = 0/91 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  559
TCTACAAAAAGTGCACAGGTGGAAATATAAAGATGACGGGCGAGCACATGCCCCCGAGAG  618
            ||||||||| |||||||||||||
||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  91
TCTACAAAAGGTGCACAGGTGGAGATATAAAGATGACGGGCGAGCACATGCCCCCGAGAG  32

Query  619  GGCCAGCTACAACCACGCCAAAGTTATTCAA  649
            | |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  31   GACCAGCTACAACCACGCCAAAGTTATTCAA  1


>gi|27461740|gb|AY129342.1|  Psilocybe cubensis 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal
RNA gene, partial sequence
Length=312

 Score =  618 bits (312),  Expect = 6e-174
 Identities = 312/312 (100%), Gaps = 0/312 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  379
TCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATATTGTTTTATAGGCACAAGG  438

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  312
TCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATATTGTTTTATAGGCACAAGG  253

Query  439
CCATATAGATACATTCTGTTACATTCATTGGAGTATATGAAAACGTAGACCATCATTGAG  498

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  252
CCATATAGATACATTCTGTTACATTCATTGGAGTATATGAAAACGTAGACCATCATTGAG  193

Query  499
AAAGCCTTCAATTCATCAGAGAGTAATCTCTGACTTCAATCCAGCTTCCAAAAACAATGA  558

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  192
AAAGCCTTCAATTCATCAGAGAGTAATCTCTGACTTCAATCCAGCTTCCAAAAACAATGA  133

Query  559
TCTACAAAAAGTGCACAGGTGGAAATATAAAGATGACGGGCGAGCACATGCCCCCGAGAG  618
```

```
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  132
TCTACAAAAAGTGCACAGGTGGAAATATAAAGATGACGGGCGAGCACATGCCCCCGAGAG  73

Query  619
GGCCAGCTACAACCACGCCAAAGTTATTCAATAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGG  678

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  72
GGCCAGCTACAACCACGCCAAAGTTATTCAATAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGG  13

Query  679  AAACCTTGTTAC  690
            ||||||||||||
Sbjct  12   AAACCTTGTTAC  1
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทัศพร แคล้วอ้อม เกิดเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม พ.ศ. 2518 ณ จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา เมื่อปี พ.ศ. 2540 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย