สารกรายาโนทอกซิน
(Grayanotoxins)

ประไพรัตน์ สีพลไกร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
E-mail: prapairat.s@msu.ac.th

บทคัดย่อ

สารกรายาโนทอกซิน (GTXs) เป็นไดเทอร์พีนอยด์มีพิษพบในพืชหลายสายพันธุ์ของวงศ์อีริคาซีเออี (Ericaceae) โครงสร้างของสารกรายาโนทอกซินเป็นแบบกรายาเนนที่มีระบบวงสี่วง 5/7/6/5 หรือ เอ-*นอร์*-บี-*โฮโม*-*เอน*-คูเรน ชีวสังเคราะห์ของสารกรายาโนทอกซินนี้น่าจะเกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับ*เอ็น*-คูเรนไดเทอร์พีนอยด์โดยทั่วไปที่ได้มาจากพืช แต่อย่างไรก็ดีสารกรายาโนทอกซินนี้ก็ยังสามารถพบได้ในน้ำผึ้งที่ได้จากน้ำหวานของเกสรดอกไม้ของพืชในสกุลโรโดเดนดรอน (Rhododendron) (วงศ์อีริคาซีเออี) ซึ่งเป็นที่รู้จักดีในเหล่าบรรดานักแต่งสวนในชื่อ “อซาเลีย” สายพันธุ์โรโดเดนดรอนเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นพืชมีพิษ ก่อให้เกิดอาการมึนเมาในสัตว์และเป็นพิษต่อมนุษย์โดยการปนเปื้อนในน้ำผึ้ง น้ำผึ้งที่ปนเปื้อนด้วยสารกรายาโนทอกซินนี้มีพิษต่อระบบประสาทและให้ความรู้สึกแสบร้อนอย่างรุนแรงในลำคอ ดังนั้นมันจึงถูกเรียกว่า “น้ำผึ้งบ้า” หรือ “น้ำผึ้งขม” ในจำนวนสารกรายาโนทอกซิน (GTX-I ถึง GTX-XXI) กรายาโนทอกซิน-III มีความเป็นพิษมากที่สุดโดยจะขัดขวางการทำงานของช่องโซเดียมในเยื่อหุ้มเซลล์

คำสำคัญ : กรายาโนทอกซิน โรโดเดนดรอน น้ำผึ้งบ้า น้ำผึ้งขม ช่องโซเดียม

Abstract

Grayanotoxins (GTXs) are toxic diterpenoidps found in several plant species of the family Ericaceae. Their structures are of the grayanane-type which has a tetracyclic 5/7/6/5 ring system or A-*nor*-B-*homo*-*ent*-kaurane. The biosynthesis of grayanotoxins is possibly related to *ent*-kaurane diterpenoids commonly derived from plants. However, grayanotoxins can be found in honey made from nectar of the plants in genus Rhododendron (family Ericaceae), well known to gardeners as “azaleas.” The Rhododendron species are toxic plants, causing intoxication in animals and poisoning in humans by contamination of honey. The contaminated honey by grayanotoxins is neurotoxic and causes a sharp burning sensation in the throat, earning it the name of “mad honey” or “bitter honey.” Among grayanotoxins (GTX-I to GTX-XXI), grayanotoxin-III is the most toxic by the blockage of sodium channels in cell membranes.

Keywords: grayanotoxin, Rhododendron, mad honey, bitter honey, sodium channel

1. บทนำ

สารกรายาโนทอกซิน (grayanotoxins หรือ GTXs) เป็นสารกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ (diterpenoids) ที่โดยส่วนใหญ่แยกได้จากพืชวงศ์อีริคาซีเออี (Ericaceae) ชื่อ "กรายาโนทอกซิน" น่าจะมาจากแหล่งของพืชที่แยกสารกลุ่มนี้ได้เป็นครั้งแรก คือ *Leucothoe grayana* [1] นอกจากชื่อกรายาโนทอกซินแล้วสารกลุ่มนี้ยังเป็นที่รู้จักในชื่ออื่นๆ อีก เช่น GTX-I คือสารตัวเดียวกันกับอะเซธิลแอนโดรมีดอล (acetylandromedol) แอนโดรมีโดทอกซิน (andromedotoxin) และโรโดทอกซิน (rhodotoxin) ส่วน GTX-II คือสารตัวเดียวกันกับแอนโดรมีดีนอล (andromedenol) และ GTX-III คือสารตัวเดียวกันกับแอนโดรมีดอล (andromedol) ทั้งนี้ก็เพราะในช่วงเวลาใกล้เคียงกันนอกจาก *L. grayana* แล้ว สารกรายาโนทอกซินยังแยกได้จากพืชชนิดอื่นๆ อีก เช่น *Pieris japonica* (ในประเทศญี่ปุ่นพืชสายพันธุ์นี้เป็นที่รู้จักกันในชื่อ *Andromeda japonica* และ *Japanese andromeda*) และพืชในสกุลโรโดเดนดรอน (Rhododendron) ในพืชที่ผลิตสารกรายาโนทอกซินพบว่ามีสารกรายาโนทอกซินมากในยอดอ่อน ใบ ละอองเกสรและน้ำหวานของเกสรดอกไม้ พืชผลิตสารชนิดนี้ก็เพื่อป้องกันตัวจากสัตว์กินพืชและแมลงชนิดต่างๆ ดังนั้น น้ำผึ้งที่ได้มาจากละอองเกสรและน้ำหวานของพืชที่ผลิตสารกรายาโนทอกซิน จึงเกิดการปนเปื้อนของสารพิษ กลุ่มนี้ สารกรายาโนทอกซินมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของช่องโซเดียมของเซลล์ประสาท หรือเรียกว่าเป็นตัวบล็อกช่องโซเดียม (sodium channel blocker) ทำให้การเปิดของช่องโซเดียมนี้ยาวนานมากขึ้น มีผลให้เซลล์ประสาทอยู่ในภาวะที่ถูกกระตุ้นได้ง่าย และเป็นระยะเวลาที่ยาวขึ้น (hyperexcitability) ซึ่งระยะดังกล่าวจะมีผลทำให้โซเดียมไอออนจากภายนอกเซลล์ไหลเข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้น จนทำให้ภายในเซลล์มีประจุบวกมากหรือประจุลบน้อย (depolarization) โดยผลที่ตามมาหากเป็นเซลล์ประสาทอาจทำให้เกิดการกระตุกของกล้ามเนื้อได้ จนถึงปัจจุบัน พบว่ามีรายงานการแยกสารกรายาโนทอกซินจำนวนมากถึง 21 ตัว คือ GTX-I ถึง GTX-XXI ทั้งนี้ยังไม่นับรวมสารอนุพันธ์ของสารกรายาโนทอกซิน และสารที่อยู่ในกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ที่มีลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงกัน ในบทความฉบับนี้จะได้กล่าวถึงแหล่งของสารกรายาโนทอกซิน โครงสร้างทางเคมีและชีวสังเคราะห์ของสารกรายาโนทอกซิน การปนเปื้อนและพิษของสารกรายาโนทอกซินในน้ำผึ้ง รวมถึงการสกัดและวิธีการตรวจวิเคราะห์หาสารกรายาโนทอกซิน

2. แหล่งของสารกรายาโนทอกซิน

สารกรายาโนทอกซินแยกได้จากพืชวงศ์อีริคาซีเออีและส่วนใหญ่พบในพืชสกุลมีพิษ เช่น พืชในสกุลคาลไม (Kalmai) ลูโคโธ (Leucothoe) เพียริส (Pieris) และโรโดเดนดรอน โดยสารนี้จะพบมากในพืชสายพันธุ์ *L. grayana* นอกจากนี้ยังแยกได้จากพืชสายพันธุ์อื่นๆ เหล่านี้ คือ *K. latifolia K. angustifolia P. japonica R. decorum R. luteum R. ponticum* และ *R. molle* [1]-[7]

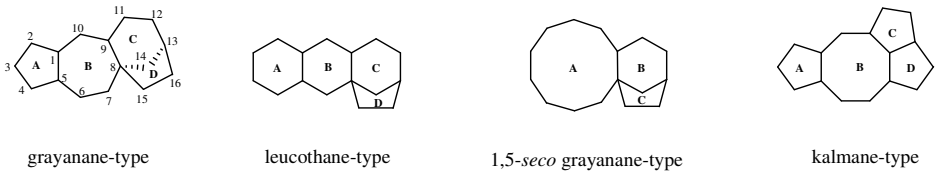
พืชสกุลโรโดเดนดรอน ก็เป็นหนึ่งในแหล่งของพืชที่สำคัญที่ผลิตสารกรายาโนทอกซิน พืชสุกลนี้เป็นไม้พุ่มและไม้ยืนต้นขนาดเล็ก โดยส่วนมากเป็นพืชดอกที่มีสีสันสวยงาม จึงได้รับความนิยมนำมาปลูกเพื่อตกแต่งสวน จึงเป็นที่รู้จักกันดีในเหล่าบรรดานักตกแต่งสวนในชื่อ "อซาเลีย" (azalea) โรโดเดนดรอนพบได้ทั่วไปในทวีปยุโรป ออสเตรเลีย อเมริกา เอเชียและแอฟริกา สายพันธุ์ *R. molle* เป็นหนึ่งในพืชสกุลโรโดเดนดรอนที่มีความเป็นพิษสูง พบมากในแถบทางตอนใต้ของประเทศจีน [8] ชื่อที่เป็นที่รู้จักในท้องถิ่นคือไชนีสอซาเลีย (*Chinese azalea*) ดอกมีสีเหลือง พืชชนิดนี้ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน ที่มีพิษและใช้เป็นยาฆ่าแมลงในประเทศจีนมาเป็นเวลานาน [8]-[10] สารกรายาโนทอกซินที่แยกได้จาก *R. molle* คือ GTX-II และ GTX-III [11] นอกจาก *R. molle* แล้ว พืชสายพันธุ์ *R. ponticum* ในประเทศตุรกีก็พบว่ามีสารกรายาโนทอกซินอยู่ในปริมาณสูง [12] และเป็นหนึ่งในสายพันธุ์พืชพบการปนเปื้อนของสารกรายาโนทอกซินในน้ำผึ้ง [13] (**ตารางที่ 1**)

ตารางที่ 1 น้ำผึ้งที่มีพิษจากแหล่งพืชชนิดต่างๆ

สายพันธุ์พืช	วงศ์	สายพันธุ์พืช	วงศ์
Agauria spp.	Ericaceae	*Rhododendron luteum*	Ericaceae
Andromeda spp.	Ericaceae	*Rhododendron ponticum*	Ericaceae
Kalmia spp.	Ericaceae	*Paullinia australis*	Sapindanceae
Kalmia litifolia	Ericaceae	*Azalea pontica*	Ericaceae

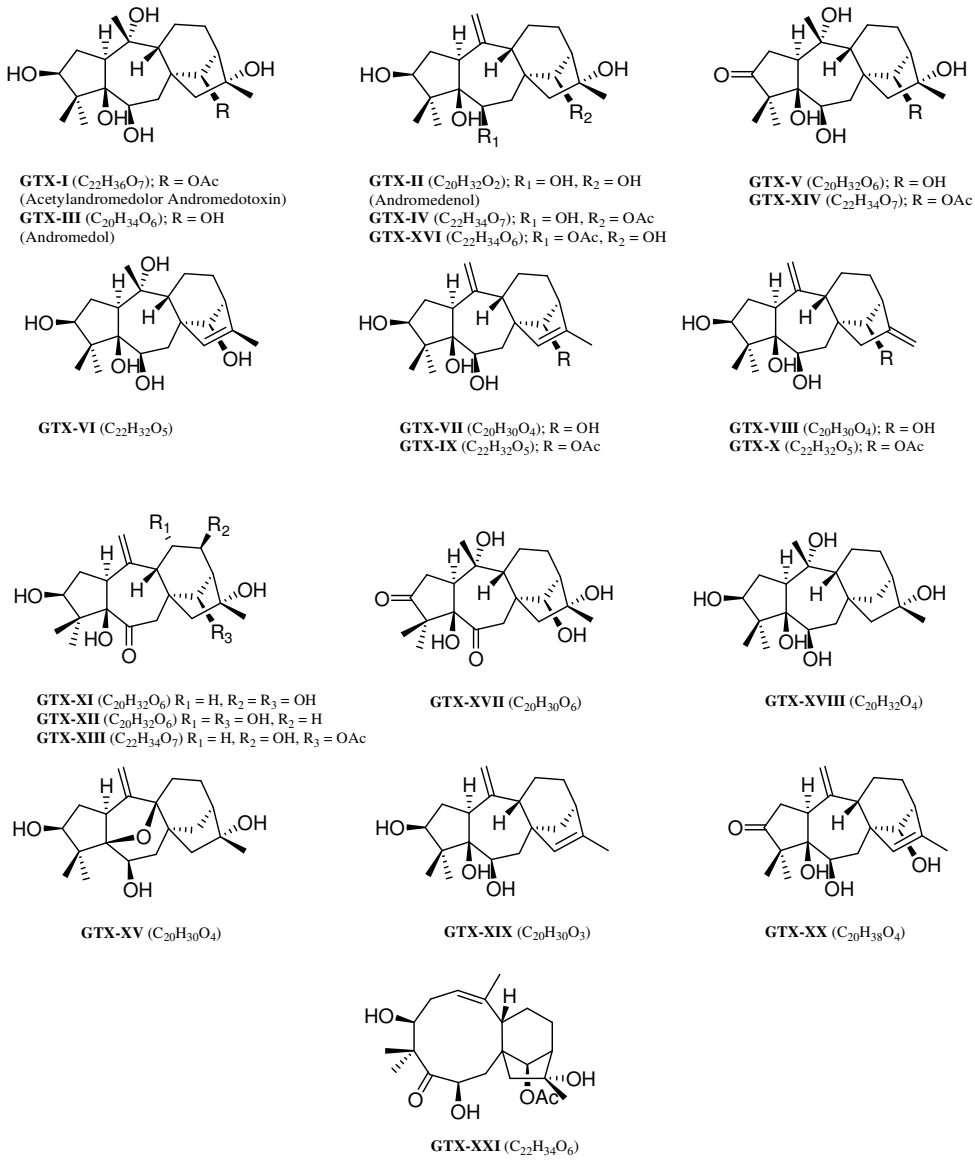
3. โครงสร้างทางเคมีของสารกรายาโนทอกซิน

สารกรายาโนทอกซิน เป็นไดเทอร์พีนอยด์ที่มีโครงสร้างแบบกรายาเนน (grayanane-type) หรือกรายาโนทอกเซน คือ เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่จัดเรียงตัวเป็นวงสี่วง คือวง เอ บี ซี และดี (A/B/C/D) ที่มีขนาดของวงเท่ากับ 5 7 6 และ 5 (5/7/6/5) เหลี่ยมตามลำดับมาเชื่อมต่อกัน หรืออาจเรียกโครงสร้างแบบนี้ว่า เอ-*นอร์*-บี-*โฮโม*-*เอน*-คูเรน (A-*nor*-B-*homo*-*ent*-kaurane) โดยการเชื่อมต่อระหว่างวง เอ/บี/ซี/ดี เป็นแบบ *ทรานส์*/*ซีส*/*ซีส* (*trans*/*cis*/*cis*) และในโครงสร้างของสารกรายาโนทอกซิน ยังพบว่ามีหมู่ไฮดรอกซี (hydroxyl group; -OH) หลายหมู่เกาะอยู่ในตำแหน่งต่างๆ บนวงทั้งสี่อีกด้วย นอกจากโครงสร้างหลักแบบกรายาเนนนี้แล้ว ยังมีไดเทอร์พีนอยด์อื่นๆ ที่แยกได้จากพืชมีพิษวงศ์อีริคาซีเออี ที่มีโครงสร้างหลักใกล้เคียงกันกับสารกรายาโนทอกซิน คือ มีโครงสร้างแบบลูโคเธน (leucothane-type) วง เอ/บี/ซี/ดี ที่มีขนาดวง 6/6/6/5 เหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน แบบ 1,5-*เซโค* กรายาเนน (1,5-*seco* grayanane type) วง เอ/บี/ซี/ดี ที่มีขนาดวง 10/6/5 เหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน และแบบคาลเมน (kalmane-type) วง เอ/บี/ซี/ดี ที่มีขนาดวง 5/8/5/5 เหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน [14] (**รูปที่ 1**)



รูปที่ 1 โครงสร้างหลักแบบต่างๆ ของไดเทอร์พีนอยด์ที่แยกได้จากพืชวงศ์อีริคาซีเออี

กรายาโนทอกซิน-I (GTX-I) ถึง GTX-XX มีโครงสร้างหลักแบบเดียวกัน คือ แบบกรายาเนน มีเพียงเฉพาะ GTX-XXI เท่านั้นที่โครงสร้างหลักเป็นแบบ 1,5-*เซโค* กรายาเนน [6] ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการเปิดวงที่ตำแหน่งคาร์บอน 1 (C-1) และ C-5 ของวงเอและบีของโครงสร้างหลักแบบกรายาเนน ที่ตำแหน่ง C-4 ของ GTX-I ถึง GTX-XX (**รูปที่ 2**) จะมีหมู่เกาะเมธิล (methyl; $-CH_3$) สองหมู่ ในขณะที่ตำแหน่ง C-1 และ C-5 ซึ่งเป็นตำแหน่งเชื่อมต่อของวงเอและบี จะมีไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่ตามลำดับ ในลักษณะที่เป็น *ทรานส์*กัน ยกเว้นในโครงสร้างของ GTX-XV ที่ตำแหน่ง C-5 และ C-9 จะเชื่อมต่อกันด้วยออกซิเจนอะตอม [15]

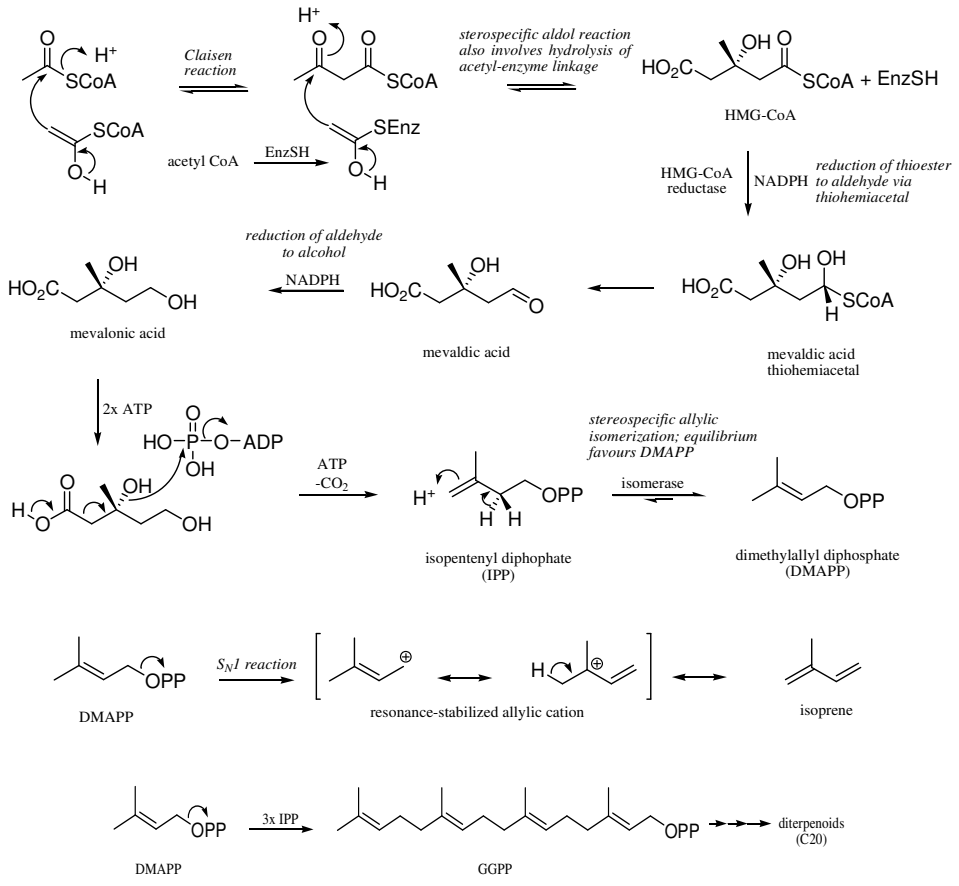


รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ GTX-I ถึง GTX-XXI

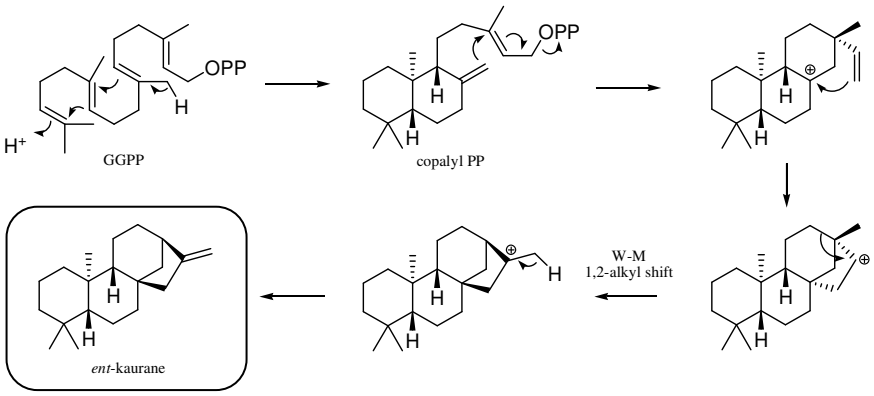
4. ชีวสังเคราะห์ของสารกรายาโนทอกซิน

สารกรายาโนทอกซิน เป็นไดเทอร์พีนที่มีหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) จำนวน 4 หน่วย โดยในหนึ่งหน่วยไอโซพรีนมีคาร์บอนจำนวน 5 อะตอม ดังนั้นในโครงสร้างหลักของสารกรายาโนทอกซิน จึงประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 20 อะตอม ชีวสังเคราะห์ของสารกรายาโนทอกซินนี้ คาดว่าน่าจะมาจากชีวสังเคราะห์ของสารไดเทอร์พีนอยด์ [16] กลุ่ม*เอน*-คูเรนทั่วไป คือใช้อะเซตทิลโค-เอนไซม์เอ (acetyl coenzyme A) หรือ อะเซตทิลโคเอ (acetyl CoA) เป็นสารตั้งต้นกระบวนการชีวสังเคราะห์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) โดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นกรดเมวาโลนิกที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับหมู่ฟอสเฟตของ อะดีโนซิน ไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate; ATP) เกิดเป็น ไอโซเพนทีนิลไดฟอสเฟตหรือไอพีพี (isopentenyl diphosphate; IPP) ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นสารไอโซเมอร์ คือ ไดเมธิลแอลลิล ไดฟอสเฟตหรือดีเอ็มเอพีพี(dimethylallyl diphosphate; DMAPP) โดยกระบวนการทำงานของเอนไซม์ การหลุดหมู่ไดฟอสเฟตของดีเอ็มเอพีพี จะ

นำไปสู่การสร้างหน่วยไอโซพรีนที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่นำไปสู่ไดเทอร์พีนอยด์ ดีเอ็มเอพีพีที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ 3 โมเลกุลของไอพีพีเกิดเป็นเจอรานิล เจอรานิลไดฟอสเฟตหรือจีจีพีพี (geranyl geranyl diphophate; GGPP) ก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็นสารไดเทอร์-พีนอยด์ (**รูปที่ 3**) เส้นทางชีวสังเคราะห์แบบนี้เรียกว่า เส้นทางเมวาโลเนต (mevalonate pathway) หลังจากนั้น จีจีพีพีที่เกิดขึ้นจะเกิดการปิดวง นำไปสู่การสังเคราะห์สารกลุ่ม*เอน*-คูเรน (**รูปที่ 4**) [17] ต่อไป ส่วนชีวสังเคราะห์จาก*เอน*-คูเรนไปเป็นสารกรายาโนทอกซินนั้น ยังไม่มีกลุ่มนักวิจัยใดทำการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ สารกรายาโนทอกซินซึ่งเป็นสารกลุ่มเอ-*นอร์*-บี-*โฮโม*-*เอน*-คูเรน กับสารกลุ่ม*เอน*-คูเรนทั่วไปจะพบว่า ขนาดของวงเอมีจำนวนคาร์บอนลดลงหนึ่งอะตอม จึงกำกับด้วยคำนำหน้า (prefix) *"นอร์* (*nor*)" ที่แสดงถึงการลดลงของจำนวนคาร์บอนอะตอมในโครงสร้างคาร์บอน ส่วนคำนำหน้า "*โฮโม (homo)*"บอกถึงการมีคอนฟิกูเรชัน (configuration) ตรงตำแหน่งการเชื่อมต่อของวง (ในที่นี้คือวงเอและบี) ที่มีลักษณะเป็น*ทรานส์*กัน



รูปที่ 3 ชีวสังเคราะห์ของจีจีพีพีจากอะเซตทิล โค-เอนไซม์เอ



รูปที่ 4 ชีวสังเคราะห์ของ*เอน*-คูเรนจากจีจีพีพี

5. การปนเปื้อนของสารกรายาโนทอกซินในน้ำผึ้ง

น้ำผึ้งที่ได้มาจากละอองเกสร และน้ำหวานของพืชสกุลโรโดเดนดรอน โดยเฉพาะ *R. ponticum* และ *R. luteum* เป็นที่รู้จักในวงกว้างว่ามีการปนเปื้อนของสาร กรายาโนทอกซิน [12] น้ำผึ้งที่ปนเปื้อนนี้ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค และเป็นที่รู้จักกันดีตั้งแต่ยุคโบราณโดยมีการกล่าวถึงในทวีปยุโรปตั้งแต่เมื่อ 100 ปีที่แล้ว [18] นอกจากนี้ น้ำผึ้งจากแถบทะเลดำของประเทศตุรกีก็พบว่าเกิดการปนเปื้อนของสารกรายาโนทอกซิน อยู่บ่อยครั้ง [19]-[21] น้ำผึ้งนี้ถูกเรียกว่า “น้ำผึ้งบ้า (mad honey)” หรือ “น้ำผึ้งขม (bitter honey)” [22], [23] ซึ่งเมื่อบริโภคแล้วจะรู้สึกถึงอาการแสบร้อนในลำคอเป็นอย่างมาก แต่ในขณะเดียวกัน ชาวพื้นเมืองในแถบทะเลดำก็ยังคงมีการนำน้ำผึ้งชนิดนี้มาใช้เพื่อเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน ในการรักษาอาการของโรคต่างๆ รวมถึงมีความเชื่อว่าสามารถช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ [22] จากการจากการนำมาใช้ประโยชน์ดังที่กล่าวมารวมถึงความเชื่อที่มี ทำให้ยังคงมีการใช้น้ำผึ้งชนิดนี้อยู่ โดยไม่ตระหนักถึงอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้น

6. พิษของสารกรายาโนทอกซินในน้ำผึ้ง

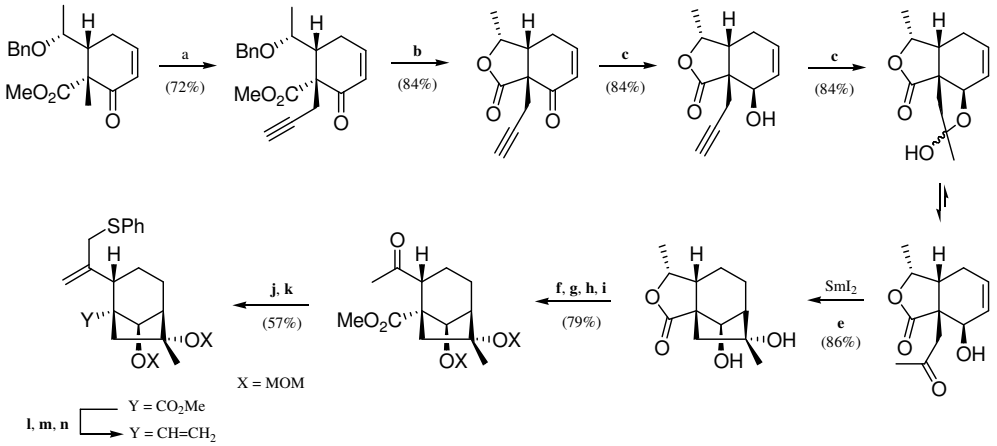
สารกรายาโนทอกซินเป็นพิษต่อประสาท โดยจะขัดขวางการทำงานของช่องโซเดียมในเยื่อหุ้มเซลล์ [24] ทำให้การเปิดของช่องโซเดียมยาวนานมากขึ้น มีผลให้เซลล์ประสาทชนิดกระตุ้น โดยเฉพาะเซลล์ประสาทและเซลล์กล้ามเนื้ออยู่ในภาวะที่ถูกกระตุ้นได้ง่ายและเป็นระยะเวลาที่ยาวขึ้น (hyperexcitability) ซึ่งระยะดังกล่าวมีผลทำให้โซเดียมไอออนจากภายนอกเซลล์ไหลเข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้นจนทำให้ภายในเซลล์มีประจุบวกมากหรือประจุลบน้อย เราเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “ดีโพลาไรเซชัน (depolarization)” ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ระบบประสาทและระบบประสาทส่วนกลาง [19] อาการที่ไม่รุนแรงของผู้ที่ได้รับพิษ อาจมีทั้งวิงเวียนศีรษะ อ่อนล้า มีเหงื่อและน้ำลายมากกว่าปกติ คลื่นไส้ อาเจียน หน้ามืด เป็นลม หมดสติ เกิดอาการหนาวสั่น ในกรณีที่มีอาการรุนแรง พิษนี้ อาจส่งผลต่อระบบการทำงานของหัวใจ โดยไปหยุดการทำงานของระบบควบคุมการเต้นของหัวใจ ความดันเลือดต่ำหรือเกิดอาการช้อค อาการได้รับพิษดังกล่าว จะแสดงภายหลังจากที่บริโภคน้ำผึ้งหรือหลังจากนั้นสองถึงสามชั่วโมง [19] ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารกรายาโนทอกซินที่ได้รับเข้าไปจากรายงานของยิลเมซ (Yilmaz) และคณะพบว่าหากบริโภคน้ำผึ้งที่มีการปนเปื้อนสารกรายาโนทอกซินในปริมาณ 5-30 กรัม ก็อาจส่งผลให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ [21] สารกรายาโนทอกซินจะมีผลต่อร่างกายไม่เกิน 24 ชั่วโมง หลังจากบริโภค แต่จะถูกย่อยและถูกขับออกจากร่างกายได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้ผู้ที่ได้รับพิษมีอาการดีขึ้นภายในหนึ่งชั่วโมง อัตราการเต้นของหัวใจและความดันเลือดจะกลับเข้าสู่สภาวะปกติภายใน 2 ถึง 9 ชั่วโมง [19]

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า ในจำนวนสารกรายาโนทอกซินทั้งหมดมีเพียงเฉพาะ GTX-I GTX-II และ GTX-III ที่เป็นพิษ โดย GTX-III มีความเป็นพิษสูงที่สุดและ GTX-II มีความเป็นพิษต่ำที่สุด ในพืชสกุลโรโด-เดนดรอนพบว่ามี GTX-III เป็นสารพิษหลัก ในขณะที่ GTX-I และ GTX-II พบในปริมาณต่ำ [24], [25] จากการรายงานพบว่าสาร GTX-I GTX-II และ GTX-III มีค่า LD_{50} ในช่วง 0.87 ถึง 1.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในหนูทดลอง (ค่า

LD_{50} คือค่าที่บอกถึงความเป็นพิษที่ทำให้ประชากรของหนูทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง) [25] ความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีระหว่าง GTX-II และ GTX-III คือหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่ตำแหน่ง C-10 ของวงบี

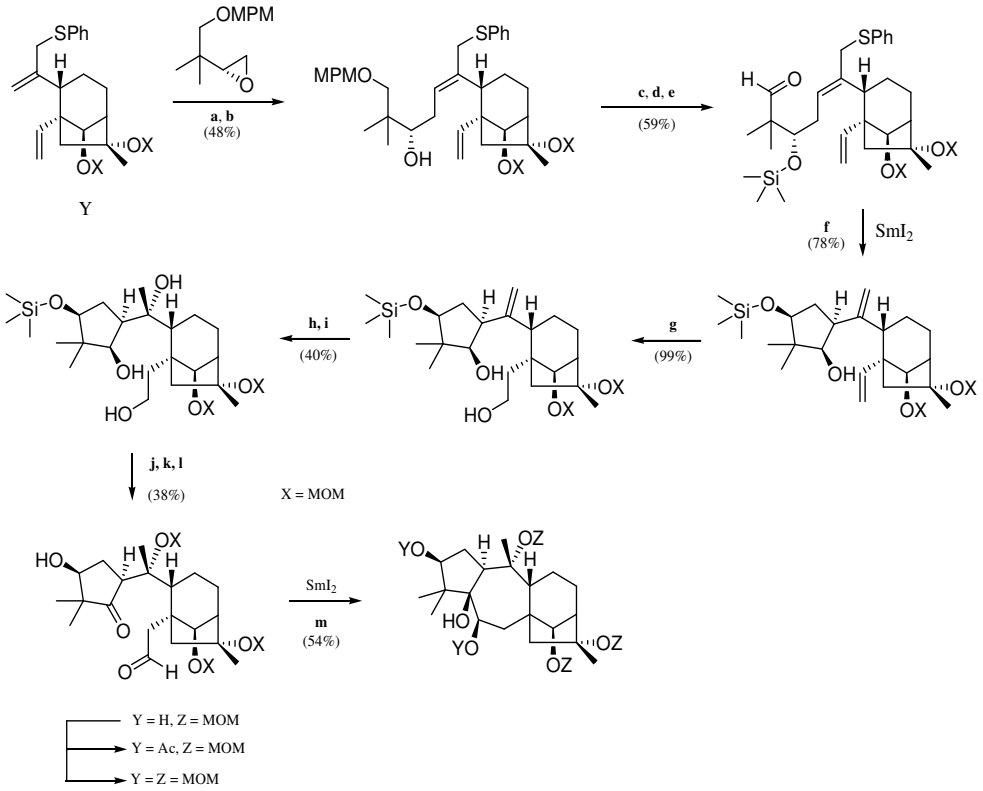
การรักษาในกรณีที่ได้รับพิษ จากการได้รับสารกรายาโนทอกซินที่ปนเปื้อนในน้ำผึ้งคือการให้ยาอะโทรพิน (atropine) ร่วมกับการให้น้ำเกลือ [19]-[21],[27] เช่นเดียวกับอาการได้รับสารพิษ กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ที่พบมากในยาฆ่าแมลงและกลุ่มคาร์-บาเมต (carbamete) โดยจะมีอาการหลอดลมอัมพาต รูม่านตาเล็ก น้ำลายฟูมปากและมีเสียงที่ช่องท้อง เรียกอาการได้รับพิษเหล่านี้ว่า “คลอลิเนอร์จิคทอกซิโดรม (cholinergic toxidrome)” สารพิษที่ได้รับเข้าไปนี้จะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะทิลคลอลีนเอสเทอร์เรส (acetyl cholinesterase) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการทำลายสารสื่อประสาทอะเซตทิลคลอลีน (acetylcholine) อะโทรพินที่ให้เข้าไป จะมีผลทำให้การหลั่งอะเซตทิลคลอลินจากปลายประสาทลดลง สารอะโทรพินนี้เป็นสารกลุ่มโทรเพนอัลคาลอยด์ (tropane alkaloids) ซึ่งในทางธรรมชาติสกัดได้จากพืชในวงศ์โซโลเนซีเออี (Solonaceae) สายพันธุ์ *Atropa belladonna Datura stramonium* และ *Mandragora officinarum*

เนื่องจากสารกรายาโนทอกซินมีผลต่อการทำงานช่องโซเดียมในเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้น ในปี ค. ศ. 1994 เคน (Kan) และคณะจึงได้มีความสนใจศึกษาวิธีการสังเคราะห์ GTX-III ซึ่งมีพิษสูงสุดในกลุ่มสารกรายาโนทอกซินโดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางเภสัชวิทยาสำหรับตรวจสอบการทำงานของช่องโซเดียม [28] (**รูปที่ 5** และ **6**)



(**a**) *1)* NaOH, DMF, 0 C, *2)* $CH{=}CHCH_2Br$, 0 C; (**b**) $FeCl_3$, CH_2Cl_2, rt; (**c**) $NaBH_4$, $CeCl_3.7H_2O$, MeOH, -78 C to rt; (**d**) $NaAuCl_4.H_2O$, H_2O-THF, 60 C; (**d**) SmI_2, HMPA-THF, -78 to 0 C; (**f**) MOMCl, $^iPr_2NEt$, CH_2Cl_2, rt; (**g**) 1 N KOH, MeOH, 80 C, then 1 N HCl; (**h**) CH_2N_2, ether, rt; (**i**) Jones reagent, acetone, 0 C; (**j**) *1)* $LiN(SiMe_3)_2$, THF, -78 C, 2) Tf_2NPh, -78 C; (**k**) $Li_2CuCN(CH_2SPh)_2$, THF, -20 C; (**l**) DIBAL, CH_2Cl_2, -78 C; (**m**) Dess-Martin reagent, CH_2Cl_2, rt; (**n**) $Ph_3P{=}CH_2$, THF, rt

รูปที่ 5 การเตรียมสารตั้งต้นสำคัญสำหรับการสังเคราะห์ GTX-III



(**a**) *n*BuLi, TMEAD, HMPA, THF, -78 to 0 C; (**b**) $(PhS)_2$, xylene, 160 C; (**c**) ^{t}BuMe$_2$SiOTf, ^{i}Pr$_2$NEt, CH_2Cl_2, 0 C; (**d**) DDQ, H_2O-CH_2Cl_2, rt; (**e**) Dess-Martin reagent, CH_2Cl_2, rt; (**f**) SmI_2, HMPA-THF, -78 C; (**g**) *1)* 9-BBN, THF, rt, then H_2O, *2)* 30% H_2O, 2 N NaOH, rt; (**h**) mCPBA, CH_2Cl_2; (**i**) DIBAL, CH_2Cl_2, 0 C; (**j**) Dess-Martin reagent, CH_2Cl_2, 0 C; (**k**) MOMCl, ^{i}Pr$_2$NEt, CH_2CL_2, rt; (**l**) *n*Bu$_4$NF, 0 C; (**m**) SmI_2, HMPA-THF, -78 to 0 C; (**n**) Ac_2O, DMAP, Py, rt; (**o**) $RuCl_3$ nH_2O, $NaIO_4$, H_2O-MeCN-CCl_4, rt; (**p**) 1 N KOH, MeOH, 80 C

รูปที่ 6 การสังเคราะห์ GTX-III

จากความพยายาม ในการสังเคราะห์กรายาโนทอกซิน-III ของเคนและคณะจะเห็นได้ว่ายังมีขั้นการสังเคราะห์หลายขั้นตอนและเปอร์เซ็นต์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่ำ แต่จนถึงปัจจุบันก็ยังไม่มีกลุ่มวิจัยใดที่พัฒนาปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์สารกรายาโนทอกซิน ต่อเนื่องจากที่มีการรายงานดังกล่าว

7. การสกัดและการตรวจหาสารกรายาโนทอกซิน

การสกัดสารกรายาโนทอกซิน ทำได้โดยใช้เมธานอลหรือคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย แต่ทั้งเมธานอลและคลอโรฟอร์ม ก็เป็นตัวทำละลายที่ดีกับสารอินทรีย์หลากหลายกลุ่ม ดังนั้นในการวิเคราะห์หาสารกรายาโนทอกซินจึงควรนำสารสกัด มาผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทางโครมาโตกราฟี (chromatography) บางส่วนเสียก่อนหลังจากนั้นจึงนำมาทำการตรวจวิเคราะห์

เนื่องจากสารกรายาโนทอกซิน เป็นไดเทอร์พีนอยด์ที่ประกอบขึ้นจากไอโซพรีน 4 หน่วย มีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอม จึงระเหยเป็นแก๊สได้ยากกว่าเซสควิเทอร์พีนอยด์ (sesquiterpenoids) ที่มีคาร์บอนจำนวน 15 อะตอม จึงสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟีบางอย่าง ที่เหมาะสมเท่านั้น หลังจากทำการแยกบริสุทธิ์สารบางขั้นตอนมาแล้ว เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีหรือทีแอลซี (Thin Layer Chromatography; TLC) ก็สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารกรายาโนทอกซินทั้งในพืช และในน้ำผึ้งได้ [22], [29], [30] โดยเฉพาะวิธีทีแอลซี 2 มิติ (2 dimension TLC) นั้นถูกนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์หาสารกรายาโนทอกซินในอาหาร และอุจจาระสัตว์ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดถึง 0.2 ไมโครกรัม/กรัม [31] ก็ถึงอย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นการตรวจหาเชิงคุณภาพวิเคราะห์เท่านั้น และจากสีที่มองเห็นด้วยวิธีการนี้ ก็ไม่สามารถระบุชนิดของสารกรายา-

โนทอกซินได้ เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีหรือจีซี (Gas Chromatography; GC) และเทคนิคที่คล้ายคลึงกัน คือ แก๊สลิควิดโครมาโตรกราฟีหรือจีแอลซี (Gas Liguid Chromatography; GLC) ก็เป็นอีกวิธีการที่ถูกนำมาใช้กันบ่อยๆ ในการตรวจวิเคราะห์แต่เนื่องจากสารกรายาโนทอกซินนี้ไม่เสถียร เพราะจะถูกออกซิไดส์และสลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนความร้อนอีกทั้งยังระเหยเป็นไอได้ยาก ดังนั้นก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีซีและจีแอลซี จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนสารกรายาโนทอกซินให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของไตรเมธิลไซเลน (trimethylsilane;-$SiMe_3$) [24], [32] ส่วนเทคนิค ลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปรคโตรเมทรี/แมสสเปรคโตรเมทรีหรือแอลซี-เอ็มเอส/เอ็มเอส (Liquid Chromatography-Mass Specrometry/Mass Specrometry) ที่รายงานโดยโฮลสเทก (Holstege) และคณะ [33] ในการพัฒนาวิธีที่รวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์หา GTX-I GTX-II และ GTX-III โดยเฉพาะ ในอาหารที่อยู่ในกระเพาะพัก อุจจาระและปัสสาวะของสัตว์ โดยตัวอย่างจะถูกนำมาสกัดด้วยเอธานอล โดยใช้การสกัดโซลิดเฟส (solid extraction) จากนั้นตัวอย่างที่ได้จะถูกแยกบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคไฮเปอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี หรือเฮชพีแอลซี (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ส่วนบริสุทธิ์ที่ได้จากการวิเคราะห์จะผ่านเข้าสู่แมสสเปรคโตรเมทรี เพื่อตรวจสอบค่ามวลต่อประจุ (*m/z*) ที่เกิดจากการแตกของโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ วิธีการนี้พบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สาร GTX-I GTX-II และ GTX-II ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/กรัม ในอาหารที่อยู่ในกระเพาะพักและอุจจาระ และ 0.05 ไมโครกรัม/กรัม ในปัสสาวะ

โดยสรุป จะเห็นได้ว่าสารกรายาโนทอกซินนอกจากจะมีโครงสร้างทางเคมีที่น่าสนใจแล้ว ยังมีฤทธิ์ทางชีววิทยาที่อาจส่งผลกระทบต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจากความรู้เรื่องสารกรายาโนทอกซินในพืช และที่ปนเปื้อนในน้ำผึ้ง จึงทำให้สามารถลดความเสี่ยงหรือเป็นอันตรายจากการได้รับพิษจากสารกลุ่มนี้ พืชสกุลโรโดเดนดรอนนี้สามารถพบได้ในประเทศไทย ที่เราเรียกว่ากุหลาบแดง กุหลาบขาว หรือกุหลาบพันปี สำหรับในเมืองไทยนั้นประมาณกันว่าพบไม้ในสกุลโรโดเดดรอน 8 ชนิด (ปัจจุบันอาจพบชนิดใหม่ๆ เพิ่มขึ้นอีก) โรโดเดนดรอนเป็นพืชในเขตหนาวเย็นชุ่มชื้นที่พบบนเทือกเขาสูง ประมาณ 1,600-2,500 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล พบได้ในป่าดิบเขาทางภาคเหนือ เช่น อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ และอุทยานแห่งชาติขุนแจ จังหวัดเชียงราย เป็นต้น และจากการสืบค้นวารสารทางวิชาการพบว่า ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาทางอนุกรมวิธาน รวมถึงสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของพืชสกุลโรโดเดนดรอนนี้เลย จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาวิจัยถึงความหลากหลายทางชีวภาพ ฤทธิ์ทางชีววิทยาต่างๆ และสารออกฤทธิ์ในพืชสกุลดังกล่าวที่พบในประเทศไทย

บรรณานุกรม

[1] Tallent, W.H., Riethof, M.L. and Horning, E.C. 1957. “Studies on the occurrence and structure of acetylandromedol (andromedotoxin)”. **Journal of the American Chemical Society** 79:4548-4554.

[2] Burke, J.W. and Doskotch, R.W. 1990. “High field ^{1}H-and ^{13}C-NMR assignments of grayanotoxins I, IV, and XIV isolated from *Kalmia angustifolia”*. **Journal of Natural Products** 53:131-137.

[3] Elnaggar, S.F. and Doskotch, R.W. 1980. “Antifeedant diterpenes for the gypsy moth larvae from *Kalmia latifolia:* Isolation and charaterization of ten grayanoids”. **Journal of Natural Products** 43:617-631.

[4] Mancini, S.D. and Edwards, J.M. 1979. “Cytotoxic principles from the sap of *Kalmia latifolia*”. **Journal of Natural Products** 42:483-488.

[5] Wood, H.B. and et al. 1954. Andromedotoxin. “A potent hypotensive agent from *Rhododendron maximum*”. **Journal of the American Chemical Society** 76:5689-5692.

[6] Zhang, H.P. and et al. 2005. “A new 1,5-seco grayanotoxin from *Rhododendron decorum”*. **Journal of Asian Natural Products Research** 7:87-90.

[7] Zymakowsky, F., Pachaly, P. and Keller, S. 1968. “Die Bestimmung von acetylandromedol (grayanotoxin I) in extrakten von *Rhododendron ponticum*“. **Planta Medica** 17:8-13.

[8] Chen, J.S. and Zheng, S. 1987. **Chiness Poisonous Plants.** Beijing: Science Press.

[9] Bao, G.H. and et al. 2003. "Diterpenoid and phenolic glycosides from the roots of *Rhododendron molle"*. **Journal of Natural Products** 69:434-439.

[10] Li, C.J. and et al. 2000. "Diterpenoids from the fruits of *Rhododendron molle*". **Journal of Natural Products** 63:1214-1217.

[11] Chen, S.N. and et al. 2004. "Diterpenoids from the flowers of *Rhododendron molle*". **Journal of Natural Products** 67:1903-1906.

[12] Jordan, J. 2006. "Research in highlights from the literature". **Clinical and Autonomic Research** 16:198-201.

[13] Alder, L.S. 2000. "The ecological significance of toxic nectar". **Oikos** 91:409-420.

[14] Beuke, J.W. and et al. 1989. "Kalmanol, a pharmacologically active diterpenoid with a new ring skeleton from *Kalmia angustifolia* L.*"* **Journal of the American Chemical Society** 111:5831-5833.

[15] Connolly, J.D. and Hill, R. A. 1991. **Dictionary of terpenoids.** London: Chapman & Hall.

[16] Masutani, T. and et al. 1981. "Biosynthesis of grayanotoxins in *Leucothoe grayana* Max. incorporation of mevalonic acid and (-)-kaurene into grayanotoxin-III". **Agricultural and Biological Chemistry** 45:1281-1282.

[17] Dewick, P.M. 1997. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. England: John Wiley & Sons.

[18] Kebler, L.F. 1896. "Poisonous honey". **Journal of the American Pharmaceutical Association** 44:167-174.

[19] Gunduz, A. and et al. 2006. "Mad honey poisoning". **American Journal of Emergency Medicin** 24:595-598.

[20] Yavus, H and et al. 1991. "Honey poisoning in Turkey". **The Lancet** 337:789-790.

[21] Yilmaz, O. and et al. 2006. "Hypotension, bradycardia and syncope caused by honey poisoning". **Resuscitation** 68:405-408.

[22] Sutlupinar, N., Mat, A. and Satganoglu, Y. 1993 "Poisoning by toxic honey in Turkey". **Archive of Toxicology** 67:148-150.

[23] Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 2002. **Plant; Grayanotoxin.** (p. 1171). New York : McGraw-Hill.

[24] Wong, J. and et al. 2002. **Report of the Rhododendron feasibility study.** United Kingdom: Bangor Bangor Gwynedd LL57 2UW.

[25] Hikino, H. and et al. 1976. "Structure activity relationship of Ericaceous toxins on acute toxicity in mice". **Toxicology and Applied Pharmacology** 35:303-310.

[26] Koca, I. and Koca, A.F. 2007. "Poisoning by mad honey: A brief review". **Food and Chemical Toxicology** 45:1315-1318.

[27] Gunduz, A. and et al. 2007. "Mad honey poisonous-related asystole". **Emergency Medicine Journal** 24: 592-593.

[28] Kan, T. and et al. 1994. "Total synthesis of (-)-grayanotoxin III"**. Journal of Organic Chemistry** 59:5532-5534.

[29] Scott, P.M., Coldwell, B.B. and Wiberg, G.S. 1971. *"Grayanotoxins.* Occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice". **Food and Cosmetics Toxicology** 9:179-184.

[30] Kinghorn, A.D., Jawad, F.H. and Doorenbos, N.J. 1978. "Thin-layer chromatographic and spectroscopic determination of some diterpenoids of the grayanotoxin type". **Journal of Chromatography** 147:229-308.

[31] Holstege, D.M. and et al. 2000. “Multiresidue screen for cardiotoxins by two-demensional thin-layer chromatography”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48:60-64.

[32] Tasdemir, D. and et al. 2003. “Analysis of the volatile components of five Turkish Rhododendron species by headspace solid-phase microextraction and GC-MS (HS-SPME-GC-MS)”. **Zeitschrift fur naturforschung C** 58:797-803.

[33] Holstege, D.M., Puschner, B. and Le, T. 2001. “Determination of grayanotoxins in biological samples by LC-MS/MS”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49:1648-16.