รหัสโครงการ SUT-104-53-24-11

รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดจากเอื้องหมายนาต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูตัดรังไข่ (Effects of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. Extract on Reproductive System in Ovariectomized Rats)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT-104-53-24-11

รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดจากเอื้องหมายนาต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูตัดรังไข่ (Effects of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. Extract on Reproductive System in Ovariectomized Rats)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.สพ.ญ.ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.น.สพ.ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ผลของสารสกัดจากเอื้องหมายนาต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูตัดรังไข่” นี้ มีแนวคิดที่จะวิจัย estrogenic effect ของสารสกัดจากเอื้องหมายนาในหนูทดลองที่ตัดรังไข่ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์อีกชิ้นหนึ่ง ที่จะยืนยันถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของเอื้องหมายนา เมื่อประกอบกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้านอื่นๆ จะทำให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการที่จะผลิตสารสกัดจากเอื้องหมายนาในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ หรือ ยาแผนปัจจุบันได้ต่อไปในอนาคต โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์

พฤศจิกายน 2554

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

เอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Sm. เป็นพืชสมุนไพรพบทั่วไปในแถบเอเชียมีสรรพคุณเป็นยาแผนโบราณใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด เอื้องหมายนาประกอบด้วยไฟโตเอสโตรเจน หลายชนิดรวมทั้งไดออสจีนินและบีตาซิโตสเตอรอล วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้คือศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของสารสกัดจากเหง้าและต้นเอื้องหมายนาในหนูตัดรังไข่โดยศึกษา 1) ผลต่อช่องคลอด 2) ผลต่อระดับเอสตราไดออลและลิพิด โปรไฟล์ 3) ผลต่อการฝังตัวและ 4) ผลต่อการหดตัวของมดลูกและเปรียบเทียบผลกับสารมาตรฐาน พร้อมทั้งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางสรีรวิทยา ผลการศึกษาพบว่าในสารสกัดจากเอื้องหมายนามีไดออสจีนินและบีตาซิโตสเตอรอลเช่นเดียวกับไฟโตเอสโตรเจนอื่นๆ การศึกษาฤทธิ์พบว่าการป้อนสารสกัดจากเอื้องหมายนาทั้งเหง้าและต้นขนาดต่ำและสูง (500 และ 1000 มก. ต่อ กก.นน.) สามารถเพิ่มน้ำหนักมดลูก เพิ่มความหนาของเยื่อบุช่องคลอด สารสกัดจากเอื้องหมายนาไม่เพิ่มระดับเอสตราไดออลแต่ลดระดับคลอเรสเตอรอลและคลอเรสเตอรอลชนิดไม่ดี นั่นคือการมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนของสารสกัดไม่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ผ่านโกนาโดโทรปินพิทูอิตารีย์โอวาเรียนแอกซิส นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเอื้องหมายนาทั้งเหง้าและต้นมีฤทธิ์ต่อต้านการฝังตัวในหนูท้องระยะก่อนการฝังตัว โดยเอื้องหมายนามีผลไปรบกวนสมดุลระหว่างโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนตลอดจนไปเพิ่มการหดตัวของมดลูก เมื่อศึกษาผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกพบว่าสารสกัดจากเหง้าและต้นเอื้องหมายนาสามารถเพิ่มการหดตัวของมดลูกของหนูตัดรังไข่ได้ โดยมีฤทธิ์สูงสุดที่ 10 และ 30 มก. ใน 100 มล. ตามลำดับ โดยกลไกการออกฤทธิ์ไม่ได้เกิดจากการมีฤทธิ์เป็นเอสโตรเจนแต่เกิดจากการเพิ่มการหดตัวซึ่งเกิดจากการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียมผ่านแอลไทป์แคลเซียมชาแนลและการหลั่งแคลเซียมจากซาโคพลาสมิคเรติคูลัม สรุปได้ว่าเอื้องหมายนาทั้งเหง้าและต้นมีฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน การออกฤทธิ์เป็นได้ทั้งแบบที่ไม่ผ่านและผ่านยีน

คำสำคัญ: เอื้องหมายนา, หนูตัดรังไข่, เอสโตรเจน, มดลูก, การหดตัว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Costus speciosus (Koen.) Sm. is a medicinal plant widely distributed in Asia. The plant is traditionally used in the treatment of various ailments. *C. speciosus* contains phytoestrogens including diosgenin and β-sitosterol. The main aim of this study was to study estrogenic activities of *C. speciosus* rhizome and stem extracts in ovariectomized rats by investigating 1) the effects on vagina, 2) the effects on serum estradiol level and lipid profile, 3) the effects on implantation, and 4) the effects on uterine contraction and compared the effects to known compounds. The underlying mechanisms of the extracts were also investigated. The results revealed that *C. speciosus* extracts contained diosgenin and β-sitosterol as well as other phytoestrogens. The data showed that oral administration of the extracts both low and high doses (500 and 1000 mg/kg B.W.) increased relative uterine weight and vaginal epithelium thickness. The extracts did not increase serum estradiol level but decreased total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol. Thus, estrogenic effects of the extracts were not involved with gonadotropin-pituitary-ovarian axis. In addition, the extracts had anti-implantation effects during pre-implantation periods. These could be due to an alteration of progesterone and estrogen balance as well as an increase in uterotonic activity. The investigation of physiological effects of *C. speciosus* extracts on uterine contractility exhibited that *C. speciosus* rhizome and stem extracts were potent stimulators of the uterus in ovariectomized rats as they increased spontaneous contraction with a maximum effect of 10 and 30 mg/100 mL, respectively. The mechanisms of action were due to non-estrogen effects, but increasing contraction via Ca^{2+} entry on L-type calcium channel and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}. In conclusion, the study clearly showed that both *C. speciosus* rhizome and stem have estrogenic activities. They can exert their effects via both non-genomic and genomic pathways.

Key words: *Costus speciosus* (Koen.) Sm., ovariectomized rat, estrogen, uterus, contraction

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
ผลงานวิจัยที่มีมาก่อน	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การสกัดสารจากเอื้องหมายนา	4
การศึกษาผลของสารสกัดเอื้องหมายนาในสัตว์ทดลอง	6
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
สารสกัดเอื้องหมายนา	11
ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก	12
ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการคุมกำเนิด	24
ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักมดลูก	28
ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอด	28
ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับฮอร์โมนและคอเลสเตอรอลในเลือด	32
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	
วิจารณ์ผลการทดลอง	35
สรุปผลการวิจัย	37
ข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	41
ภาคผนวก ข	42
ประวัติผู้วิจัย	43

สารบัญรูป

รูปที่	เรื่อง	หน้า
1	สัณฐานวิทยาของเอื้องหมายนา	4
2	อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดสารสกัดเอื้องหมายนา	5
3	GC chromatogram ของสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาและโครงสร้างเคมีของ diosgenin	11
4	GC chromatogram ของสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาและโครงสร้างเคมีของ β-sitosterol	12
5	การซ้อนทับกันระหว่างการหดตัวแบบธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่และหนูปกติ	13
6	ฤทธิ์ของสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาต่อกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	14
7	ฤทธิ์ของสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาต่อกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	14
8	ฤทธิ์ของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย high K^+	15
9	ฤทธิ์ของสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channels ถูกยับยั้งการทำงาน	16
10	ฤทธิ์ของสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channels ถูกยับยั้งการทำงาน	17
11	ผลของ β-sitosterol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกเปรียบเทียบกับสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา	18
12	ผลของ β-sitosterol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกเปรียบเทียบกับสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา	20
13	ผล β-sitosterol ในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channel ถูกยับยั้งการทำงานด้วย nifedipine	21
14	ผลของ diosgenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกเปรียบเทียบกับสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา	22
15	ผลของ diosgenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกเปรียบเทียบกับสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา	23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	เรื่อง	หน้า
16	ผลของสาร Diosgenin ในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} Channel ถูกยับยั้งการทำงาน	24
17	ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศ์ เซลล์ช่องคลอดหนูตัดรังไข่ถูกย้อมสีด้วย methylene blue (the bar equals 100 μm)	30
18	ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาที่ออกฤทธิ์ผ่านยีน (Genomic pathways) และไม่ผ่านยีน (Non-genomic pathways)	38

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
1	ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อหนูท้องในระยะ Pre-implantation	26
2	ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อหนูท้องในระยะ Post-implantation	27
3	ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักมดลูก	29
4	จำนวนเซลล์เกล็ดปลาที่พบในช่องคลอดหนูตัดรังไข่	31
5	ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดหนูตัดรังไข่	33
6	ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับคอเลสเตอรอลในเลือดหนูตัดรังไข่	34

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับ phytoestrogen เป็นอย่างมาก ในแง่ของการนำมาทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ ซึ่งใช้ในรักษา ป้องกันโรคหรือความผิดปกติ เช่น อาการร้อนวูบวาบ โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคกระดูกพรุน ซึ่งเกิดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนในสตรีวัยทอง

เป็นที่ทราบกันดีว่า phytoestrogen นั้นเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น แต่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเอสโตรเจน พืชที่สามารถสร้าง phytoestrogen ได้นั้น มี 3 ประเภท คือ 1) พืชชนิดที่มีฝัก (legume) เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วลิสง ทองหลาง กระถิน 2) พืชชนิดที่มีเมล็ด (Cereal) เช่น ข้าว เมล็ดของต้น flax และ 3) พืชจำพวกหญ้า (Grasses) นอกจากนี้มีรายงานการพบ phytoestrogen ในพืชชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดรวมทั้งเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Sm.) ซึ่งพบในส่วนของลำต้นและเหง้า

ในประเทศไทย กล่าวได้ว่าคนไทยได้นำ phytoestrogen (ซึ่งพบได้ในพืชพื้นบ้านของไทยหลายชนิด) มาใช้กันอย่างแพร่หลายตั้งแต่อดีตมาแล้ว ในปัจจุบันเนื่องจาก “กระแสสมุนไพร” คนไทยก็ได้ให้ความสนใจมากยิ่งขึ้น ที่จะนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาใช้ประโยชน์เพื่อป้องกันโรค บำรุงสุขภาพ และเสริมความงาม เอื้องหมายนาจัดเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนั้น ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวภาพของเอื้องหมายนายังมีไม่มากพอ สรรพคุณต่างๆ เป็นเพียงการอ้างจากผลของการบริโภคและการใช้ประโยชน์โดยภูมิปัญญาพื้นบ้านเป็นหลัก แม้จะมีรายงานว่าเอื้องหมายนามีสารสำคัญกลุ่ม phytoestrogen (diosgenin) แต่คุณสมบัติทางชีวภาพด้านอื่นๆ เช่น การออกฤทธิ์ รวมทั้งความปลอดภัยในการนำมาบริโภคยังไม่มีหลักฐานยืนยัน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะวิจัย estrogenic effect ของสารสกัดจากเอื้องหมายนาในหนูทดลองที่ตัดรังไข่ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์อีกชิ้นหนึ่ง ที่จะยืนยันถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของเอื้องหมายนา เมื่อประกอบกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้านอื่นๆ จะทำให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการที่จะผลิตสารสกัดจากเอื้องหมายนาในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ หรือ ยาแผนปัจจุบันได้ต่อไปในอนาคต

ผลงานวิจัยที่มีมาก่อน

เอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Sm.) จัดอยู่ในวงศ์ COSTACEAE ชื่อสามัญคือ Crape ginger, Malay ginger, Spiral flag ชื่ออื่นๆ ที่รู้จักกันคือ ชูไลบ้อง ซูเลโบ (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน) เอื้องช้าง (นครศรีธรรมราช) เอื้องต้น เอื้องเพ็ดม้า (ภาคกลาง) เอื้องใหญ่ บันไดสวรรค์ (ภาคใต้) เอื้องหมายนาเป็นพืชล้มลุกมีเหง้าหรือลำต้นใต้ดินมีลักษณะเป็นหัว ลำต้นสีแดง อวบน้ำ

เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 9.1-15.1 มิลลิเมตร สูง 135-190 เซนติเมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับรอบต้น รูปร่างใบกึ่งรูปขอบขนานกึ่งใบรูปหอก (oblong – lanceolate) ปลายใบเรียวแหลม กว้าง 6-8 เซนติเมตร ยาว 20.5-29.6 เซนติเมตร ออกดอกที่ปลายยอด ช่อดอกสีแดงยาว 7.6-11.6 เซนติเมตร มีดอกย่อย 19-42 ดอก กลีบดอกสีขาวแกมสีชมพูหรือเหลือง อับเรณูสีเหลือง ออกดอกช่วงเดือน สิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน ขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อและใช้เมล็ด ชอบขึ้นบริเวณที่ชุ่มชื้นใต้ต้นไม้ใหญ่ ริมน้ำหรือริมหนองบึงเชิงเขาทั่วทุกภาคของประเทศ (จิรายุ, 2008) ประโยชน์ของเอื้องหมายนานั้นหลากหลาย นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ตัดประดับแจกันทั้งต้นที่มีช่อดอก เนื่องจากทั้งต้นและกาบมีความสวยงามแปลกตา นอกจากนั้นยังใช้เป็นอาหารสัตว์ โค กระบือ และสมุนไพรในมนุษย์ ตำรับยาไทยระบุไว้ว่า ลำต้นใต้ดินหรือเหง้าของเอื้องหมายนามีรสขมเมา ใช้ในการขับปัสสาวะ แก้บวมน้ำ แก้ตกขาว แก้โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ แก้แผลหนอง อักเสบ บวม ฆ่าพยาธิ และเป็นยาถ่าย ส่วนเหง้าสดของเอื้องหมายนานั้นมีพิษมาก หากใช้ในปริมาณมากจะทำให้ท้องร่วง อาเจียนอย่างรุนแรง ต้องทำให้สุกก่อน นอกจากนี้ นิยมนำมาใช้เพื่อตำพอกบริเวณสะดือ รักษาโรคท้องมาน ในขณะที่รากของเอื้องหมายนา ซึ่งมีรสขมเมา นิยมนำมาใช้เพื่อขับพยาธิ ขับเสมหะ แก้ไอ แก้โรคผิวหนัง สารที่พบในเอื้องหมายนามีหลายชนิด ที่เกี่ยวข้องกับ phytoestrogen ได้แก่ diosgenin, tigogenin, saponins และ β-sitosterol (Chandel และคณะ, 1996)

เอื้องหมายนามีผลต่อร่างกายหลายประการ ขึ้นกับส่วนของเอื้องหมายนาที่นำมาใช้และวิธีการสกัด พอจะสรุปฤทธิ์ของเอื้องหมายนาได้ดังนี้ คือ มีฤทธิ์ในการเป็น estrogen เป็นผลจาก saponin ซึ่งพบมากในเหง้า โดยจะทำให้น้ำหนักมดลูกเพิ่มขึ้น เพิ่มการสะสมของไกลโคเจน กระตุ้นให้มีการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุมดลูกและช่องคลอด (Singh และคณะ, 1972; Pandey และคณะ, 1972) นอกจากนี้ ยังยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนเมื่อทำการป้อนสารสกัดให้แก่หนูที่ขนาด 5-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลา 15 วัน (Tewari และคณะ, 1973) มีรายงานว่าสารสกัดเอื้องหมายนาจากเหง้าและเมล็ดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ในหนูและสุนัขทดลองได้ตามลำดับ (Moshihuzzaman และคณะ, 1994) มีรายงานว่าสาร alkaloid ที่พบในเอื้องหมายนามีฤทธิ์คล้าย papaverine ซึ่งทำให้มดลูกคลายตัว มีฤทธิ์เป็น antispamodic, cardiotonic, hydrocholeretic, diuretic, central nervous system depressant แต่ไม่มีผลในเชิงเป็น inflammatory, antiarthritis, anticonvulsant, anagesic, antipyretic และ anti-snake venom (Bhattacharya และคณะ, 1973) นอกจากนี้ไม่พบว่าสารสกัดจากเอื้องหมายนาทั้งที่สกัดโดยน้ำและแอลกอฮอล์เป็นพิษต่อตับ แม้จะให้ในขนาดที่สูง (Gogoi และ Sharma, 2001)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเอื้องหมายนาต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูตัดรังไข่

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของการวิจัยกำหนดไว้ดังนี้

1.1 สกัดสารจากเหง้าและลำต้นของเอื้องหมายนาด้วยแอลกอฮอล์

1.2 ศึกษาผลของสารสกัดต่อการหดตัวของมดลูกหนูในหลอดทดลอง

1.3 ศึกษาผลของสารสกัดในการคุมกำเนิดของหนูทดลอง

1.4 ศึกษาผลของสารสกัดต่อน้ำหนักของมดลูกในหนูตัดรังไข่

1.5 ศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอดในหนูตัดรังไข่

1.6 ศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของหนูตัดรังไข่

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.1 ได้ข้อมูลที่เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

1.2 เป็นการคงไว้ซึ่งภูมิปัญญาท้องถิ่น

1.3 เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเอื้องหมายนา

1.4 ลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาหรือฮอร์โมน

1.5 เป็นประโยชน์ต่อ ผู้บริโภค การแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยและสถานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับงานวิจัยสมุนไพรทั้งด้านการแพทย์และการผลิตสัตว์เศรษฐกิจ หน่วยงานเอกชนที่ผลิตและวิจัยเกี่ยวกับเอื้องหมายนาเพื่อการเกษตรและเพื่อการค้า เช่น บริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายยาและผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

1.6 ได้ผลิตบัณฑิตจำนวน 1 คน

1.7 ได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ 1 เรื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดสารจากเอื้องหมายนา

แหล่งที่มาของต้นเอื้องหมายนาที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ มีขอบเขตอยู่ในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งทำการเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนสิงหาคม ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (Herbarium No. BKF161284)

ภาพที่ 1 สัณฐานวิทยาของเอื้องหมายนา

ขั้นตอนการสกัดสารจากพืชทำโดย ตัดแยกส่วนลำต้นและเหง้าของต้นเอื้องหมายนา จากนั้นล้างทำความสะอาดเอาเศษดินออกให้หมด หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอบให้แห้งเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราเมื่อพืชแห้งสนิทแล้วจึงนำมาปั่นบดให้เป็นผง นำผงดังกล่าวไปเข้ากระบวนการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet Extractor โดยใช้เอทธานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้ากระบวนการกลั่นแบบ reflux เพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่อง Rotary Evaporator กระบวนการสุดท้ายคือการทำให้สารสกัดแห้งเพื่อที่จะ

สามารถเก็บรักษาสารสกัดให้นานยิ่งขึ้นและเป็นการเพิ่มความเข้มข้นให้สารสกัดด้วยเครื่อง Lyophilizer สามารถเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นานจนกว่าจะใช้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ปี

สูตรการคำนวณหาค่า % yield ของสารสกัดพืช (Phrompittayarat และคณะ, 2007) เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดที่ได้กับปริมาณสารตั้งต้น เพื่อทำให้เราทราบต้นทุนการผลิตในแต่ละครั้ง

% yield = น้ำหนักของสารสกัดพืช / (น้ำหนักแห้งของพืชสมุนไพร × 100)

เมื่อได้สารสกัดจากลำต้นและเหง้าของเอื้องหมายนามาเรียบร้อยแล้ว ทำการตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญทางเคมีของพืชด้วยวิธีการ Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (Agilent Technologies 6850 gas chromatograph, coupled with an Agilent Technologies 5973 (EI) mass spectrum detector) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Institute of Standard and Technology (NIST) and Wiley libraries

A

B

C

ภาพที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดสารสกัดเอื้องหมายนา (A) เครื่อง Soxhlet Extractor (B) เครื่อง Rotary Evaporator (C) เครื่อง Lyophilizer

การศึกษาผลของสารสกัดเอื้องหมายนาในสัตว์ทดลอง

แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง

การทดลองที่ 1: ศึกษาผลของสารสกัดต่อการหดตัวของมดลูก

การเตรียมสัตว์ทดลองและตัวอย่างเนื้อเยื่อ

หนูสีขาวสายพันธุ์ Wistar เพศเมียน้ำหนัก 200-300 กรัม เลี้ยงหนูในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ให้กินอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตามที่ต้องการ (ad libitum) และเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมือนกันทั้งหมด วิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี การผ่าตัดเพื่อเอารังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง กระทำภายหลังจากการทำให้หนูสลบด้วยยาสลบเพนโทบาร์บิทอล โซเดียม (pentobarbital sodium) หลังการผ่าตัด 14 วัน ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์จะลดลง ทำการเมตตาฆาตรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างมดลูกเพื่อนำไปทำการทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป

เมื่อถึงห้องปฏิบัติการทำการแยก longitudinal strip (แถบกล้ามเนื้อเรียบที่ประกอบด้วยหลายๆ เซลล์ที่เรียงตัวกันคล้าย bundle ของกล้ามเนื้อลายตามแนวยาวของปีกมดลูก) ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกภายใต้กล้อง stereo microscope โดยตัด strip ให้มีขนาด 1 มม. × 5 มม. × 1 มม. ตัวอย่างมดลูก 1 ตัวอย่าง สามารถแยกได้หลาย strips ทำการผูก strip ด้วยไหมเย็บแผลเบอร์ 4 โดยทำห่วงที่ปลายด้านหนึ่ง ส่วนอีกด้านหนึ่งผูกเงื่อนตายทิ้งปลายไหมให้ยาว อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างมดลูก และการแยก longitudinal strips ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกได้

การวัดแรงในการหดตัว

นำ strip ที่เตรียมไว้เกี่ยวบ่วงเข้ากับตะขอที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (fixed hook) ส่วนปลายไหมอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ในขั้นตอนนี้ strip จะแขวนอยู่ภายใน organ bath chamber ที่บรรจุด้วยสารละลาย physiological saline solution ที่ถูกอุ่นให้มีอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส โดยให้มีออกซิเจน (95%) ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ ผ่านเข้าไปในสารละลายตลอดเวลา (สารละลายนี้จะมีองค์ประกอบคล้ายกับ extracellular fluid ที่ล้อมรอบเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูก) หลังจากปล่อยให้ strip แช่อยู่ในสารละลาย physiological solution จนกระทั่งเริ่มหดตัวได้เองโดยธรรมชาติแล้ว จึงทำการทดสอบผลของสารสกัดจากต้นและเหง้าของเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของมดลูก โดยการ superfused สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 30-70 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร และสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 10-50 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย physiological solution ผ่านเนื้อเยื่อมดลูกที่กำลังหดตัวอยู่อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที การทดลองอื่นๆที่ต้องทดสอบเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเอื้องหมายนา ได้แก่ nifedipine, diosgenin และ β-sitosterol

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการบันทึกข้อมูลนั้น แรงตึงที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการหดหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อจะส่งผ่าน transducer ซึ่ง transducer จะส่งสัญญาณผ่านต่อไปยัง bridge amplifier และมีการแปลงสัญญาณต่อโดยเครื่อง PowerLab ให้เป็นความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงและเวลาซึ่งจะถูกอ่านและบันทึกโดยโปรแกรม Chart Recorder และแสดงให้เห็นบนจอคอมพิวเตอร์ สำหรับอุปกรณ์ในการทดลองแสดงไว้ในภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ ความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟการหดตัว จากนั้นแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อน เทียบกับ ของกลุ่มควบคุม) ค่า *n* แสดงถึงจำนวนสัตว์ทดลอง (ไม่ใช่จำนวน strip) ค่านัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์โดย t-tests กำหนดนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

การทดลองที่ 2: ศึกษาผลของสารสกัดในการคุมกำเนิด

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูสีขาวสายพันธุ์ Wistar เพศเมียน้ำหนัก 200-300 กรัม และเพศผู้น้ำหนัก 450-500 กรัม เลี้ยงหนูในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ให้กินอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตามที่ต้องการ (ad libitum) และเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมือนกันทั้งหมด วิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดสอบผลของสารสกัดในการคุมกำเนิด

ตามวิธีการของ Khanna และ Choudhury (1968) โดยทำการสเมียร์ช่องคลอดทุกวันเพื่อหาระยะที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์หนู คือระยะ Proestrus หลังจากปล่อยให้หนูผสมพันธุ์กันเรียบร้อยแล้ว นำหนูเพศเมียมาสเมียร์ช่องคลอดเพื่อตรวจหาเชื้ออสุจิของหนูเพศผู้อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแบ่งกลุ่มหนูท้องออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 3-4 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1	ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 2	ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 3	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 4	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การศึกษาเรื่องการคุมกำเนิดนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

1. ระยะที่ 1 ของการตั้งท้อง (Pre-implantation): เริ่มป้อนสารสกัดเอื้องหมายนาให้แก่หนูตั้งแต่วันที่ 1 ที่เกิดการปฏิสนธิ เป็นระยะเวลา 7 วัน และเก็บผลการทดลองในวันที่ 10 จดบันทึกการเปลี่ยนแปลงของมดลูก น้ำหนัก และจำนวนตำแหน่งที่มีการฝังตัว เพื่อนำมาคำนวนหาเปอร์เซนต์การป้องกันการฝังตัว (Williamson, Okaka และ Evan, 1996)

$$\text{เปอร์เซนต์การป้องกันการฝังตัว} = \frac{(\text{จำนวนการฝังตัวของกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนการฝังตัวของกลุ่มที่ป้อนสารสกัด}) \times 100}{\text{จำนวนการฝังตัวของกลุ่มควบคุม}}$$

2. ระยะที่ 2 ของการตั้งท้อง (Post-implantation): เริ่มป้อนสารสกัดเอื้องหมายนาให้แก่หนูที่มีอายุการตั้งครรภ์ 8 วัน เป็นระยะเวลา 7 วัน และเก็บผลการทดลองในวันที่ 20 จดบันทึกการเปลี่ยนแปลงของมดลูก น้ำหนัก จำนวนตำแหน่งที่มีการฝังตัว และรูปร่างภายนอกของทารกที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (Steele และ Copping, 1990)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่านัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์โดย one way ANOVA และกำหนดค่านัยสำคัญที่ $P < 0.05$ จากนั้นแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อน

การทดลองที่ 3: ศึกษาผลของสารสกัดต่อน้ำหนักของมดลูก

การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 7 กลุ่มๆละ 8-10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนู sham-operated (หนู sham-operated คือหนูที่ผ่าเปิดหน้าท้องแต่ไม่ได้ตัดแยกรังไข่ออก)	ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นหนูกลุ่ม positive control , n = 9

กลุ่มที่ 2 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นหนูกลุ่ม negative control , n = 10

กลุ่มที่ 3 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร n = 10

กลุ่มที่ 4 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, n = 8

กลุ่มที่ 5 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, n = 9

กลุ่มที่ 6 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, n = 9

กลุ่มที่ 7 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, n = 9

การชั่งน้ำหนักตัวและน้ำหนักมดลูก

ชั่งน้ำหนักตัว 2 ครั้ง โดยครั้งแรกทำก่อนการให้สารสกัด 1 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 ทำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำมดลูกออกมาตัดเนื้อเยื่อที่ไม่เกี่ยวข้องออกและทำความสะอาดก่อนชั่งน้ำหนักเปียก เพื่อวัดความแตกต่างระหว่างน้ำหนักเปียกของมดลูกกับน้ำหนักตัว โดยใช้สมการต่อไปนี้

น้ำหนักมดลูกเปียกสัมพัทธ์ = น้ำหนักมดลูก/ (น้ำหนักตัว × 100)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค่านัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์โดย one way ANOVA และกำหนดค่านัยสำคัญที่ $P < 0.05$ จากนั้นแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อน

การทดลองที่ 4: ศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอด

การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 6 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ระยะเวลาในการทดลองทั้งหมด 8 สัปดาห์ ทำการสเมียร์ช่องคลอดเพื่อนำเซลล์มาตรวจสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

การวิเคราะห์เซลล์ช่องคลอด

เก็บตัวอย่างเซลล์ช่องคลอดในช่วงเช้าเริ่มตั้งแต่เวลา 8.00-11.00 น. โดยสอดทิป (tip) ที่บรรจุสารละลายซาลีนบัฟเฟอร์ (saline buffer) เข้าไปในช่องคลอดแล้วดูดเข้า-ออก นำของเหลวที่ได้ไปหยดลงบนแผ่นสไลด์และย้อมสีด้วยเมธีลีนบลู (methylene blue) (Rhodes, Balestreire, Czambel และ Rubin, 2002) นำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อแยกประเภทของเซลล์ (Malaivijitnond และคณะ, 2006) ในการทดลองนี้ใช้เซลล์เกล็ดปลา (cornified cells) เป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน (estrogenic activity)

การทดลองที่ 5: ศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

สำหรับการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างเลือดจากการทดลองที่ 3 ทั้งนี้ เพื่อเป็นการลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง (Reduction) ตามหลัก 3R

การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมน

ตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยกระบวนการ Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) (Roche Diagnostics, USA)

การตรวจวิเคราะห์คอเลสเตอรอลในเลือด

ตรวจวิเคราะห์ total-cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol และ triglycerides (TG) ด้วย Enzymatic color test and assayed by OLYMPUS analyzer (Olympus Life and Material Science, Germany)

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

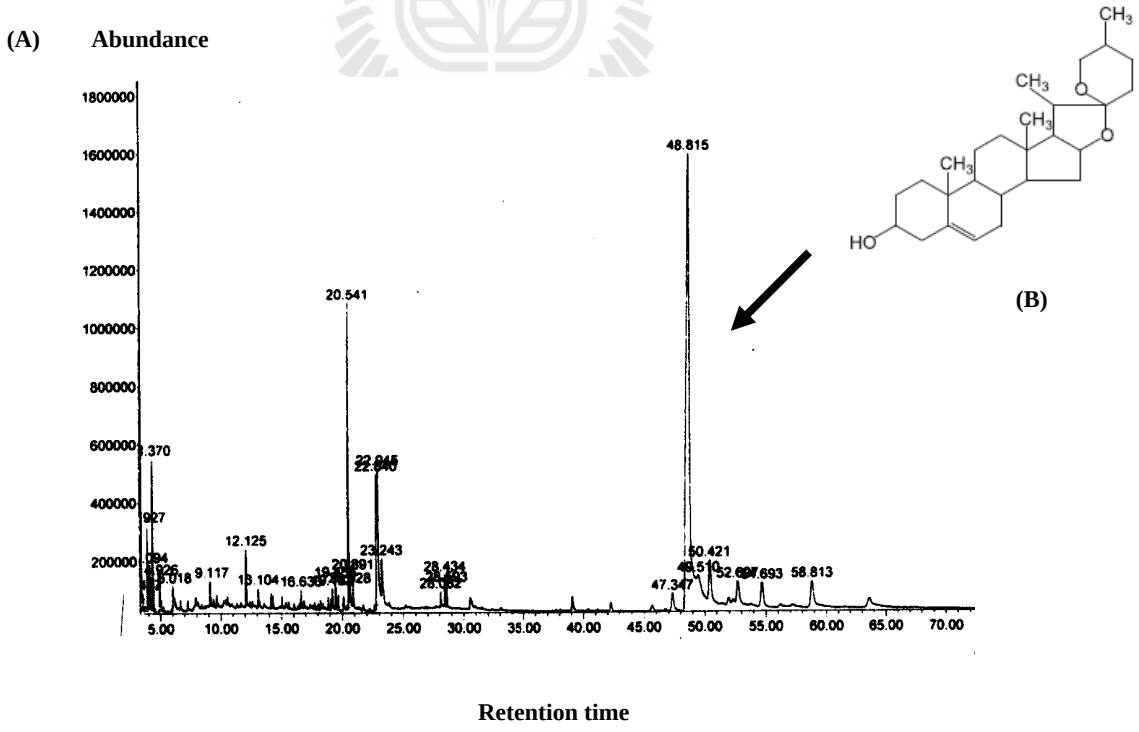
สารสกัดเอื้องหมายนา

ค่า % Yield ที่ได้จากการสกัดสาร

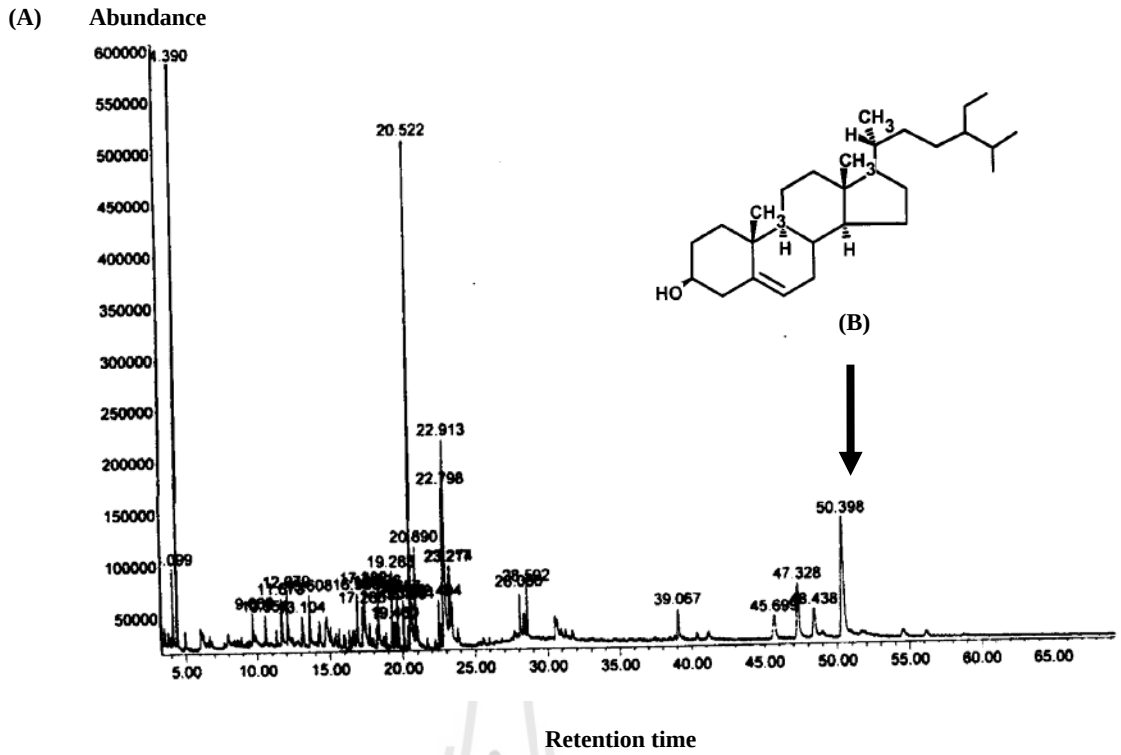
สารสกัดที่ได้จากเหง้ามีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล และสารสกัดที่ได้จากลำต้นมีลักษณะเหนียวข้นจับตัวเป็นก้อนสีเขียว ค่า % yield ของสารสกัดเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนามีค่าเท่ากับ 7.21 และ 8.68 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดเอื้องหมายนา

การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดเอื้องหมายนาด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า ในสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาประกอบด้วยสารประกอบทั้งหมด 28 ชนิด (ภาพที่ 3) แบ่งเป็นสารประกอบที่ระบุชื่อได้จำนวน 20 ชนิด และสารประกอบที่ไม่สามารถระบุชื่อได้จำนวน 8 ชนิด ในสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาประกอบด้วยสารประกอบทั้งหมด 31 ชนิด (ภาพที่ 4) แบ่งเป็นสารประกอบที่ระบุชื่อได้จำนวน 26 ชนิด และสารประกอบที่ระบุชื่อไม่ได้จำนวน 5 ชนิด สารส่วนใหญ่ที่พบทั้งในเหง้าและลำต้นคือ กรดคอเลสเตอรอล สารสำคัญที่มีลักษณะเป็นไฟโตเอสโตรเจนที่พบมากทั้งในส่วนเหง้าและลำต้นคือ diosgenin และ β-sitosterol ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสารไฟโตสเตอรอลอื่นๆอีกเช่น stigmasterol และ ergosterol เป็นต้น



ภาพที่ 3 (A) GC chromatogram ของสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา (B) โครงสร้างเคมีของ diosgenin (Au และคณะ, 2004)

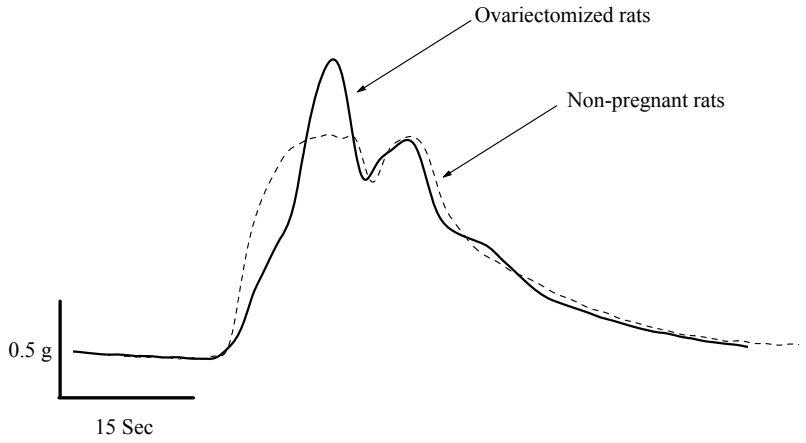


ภาพที่ 4 (A) GC chromatogram ของสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา (B) โครงสร้างเคมีของ β-sitosterol (Turnbull, Frankos, Leeman และ Jonker, 1999)

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

ลักษณะการหดตัวตามธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกในหนูตัดรังไข่

ภายใต้สภาวะที่ถูกควบคุมอย่างเหมาะสม กล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูตัดรังไข่สามารถหดตัวได้เองตามธรรมชาติ (n = 6) จากการศึกษาเปรียบเทียบกันระหว่างการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกในหนูตัดรังไข่และหนูปกติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ในหนูตัดรังไข่ค่าเฉลี่ยความแรงของการหดตัวเท่ากับ 11.17 ± 1.86 นิวตัน และค่าเฉลี่ยความถี่ของการหดตัวเท่ากับ 1.00 ± 0.00 ต่อนาที ในหนูปกติค่าเฉลี่ยความแรงของการหดตัวเท่ากับ 9.89 ± 1.47 นิวตัน และค่าเฉลี่ยความถี่ของการหดตัวเท่ากับ 1.00 ± 0.00 ต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 5

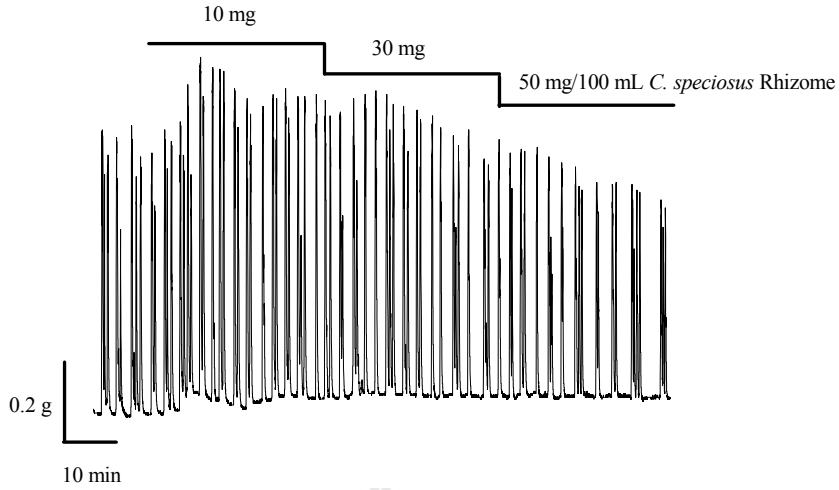


ภาพที่ 5 การซ้อนทับกันระหว่างการหดตัวแบบธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่และหนูปกติ

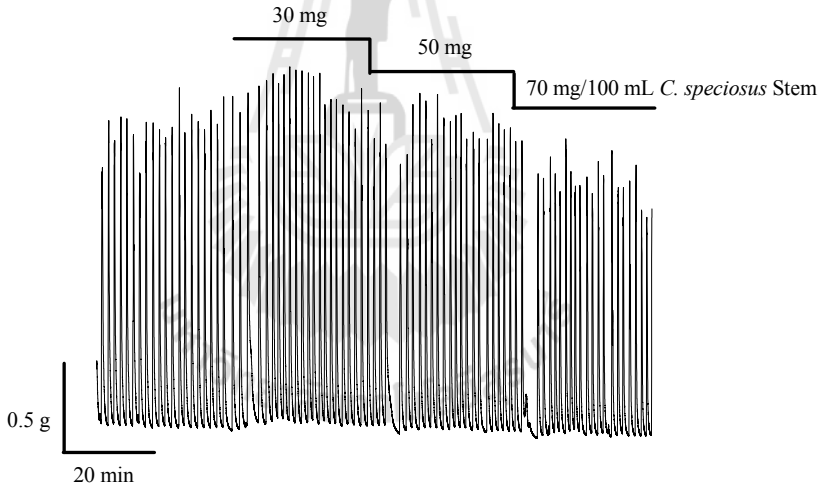
ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่

ไล่ระดับความเข้มข้นสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาบนกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ เริ่มจากความเข้มข้นน้อยไปหามากคือ 10, 30 และ 50 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร ตามลำดับอย่างต่อเนื่อง (n = 3) โดยกล้ามเนื้อเรียบมดลูกจะแช่อยู่ในสารสกัดแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร มีฤทธิ์ไปเพิ่มความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟของการหดตัว (ภาพที่ 6) คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ดังนี้ 140.82 ± 8.82, 103.03 ± 3.03 และ 200.84 ± 35.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสูงสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนามีฤทธิ์ไปลดความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟของการหดตัว

ไล่ระดับความเข้มข้นสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาบนกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ เริ่มจากความเข้มข้นน้อยไปหามากคือ 30, 50 และ 70 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร ตามลำดับอย่างต่อเนื่อง (n = 3) โดยกล้ามเนื้อเรียบมดลูกจะแช่อยู่ในสารสกัดความเข้มข้นละ 30 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร มีฤทธิ์ไปเพิ่มความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟของการหดตัว (ภาพที่ 7) คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ดังนี้ 109.91 ± 4.22, 106.70 ± 3.88, และ 122.71 ± 4.61 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสูงสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนามีฤทธิ์ไปลดความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟของการหดตัว



ภาพที่ 6 ฤทธิ์ของสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาต่อกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

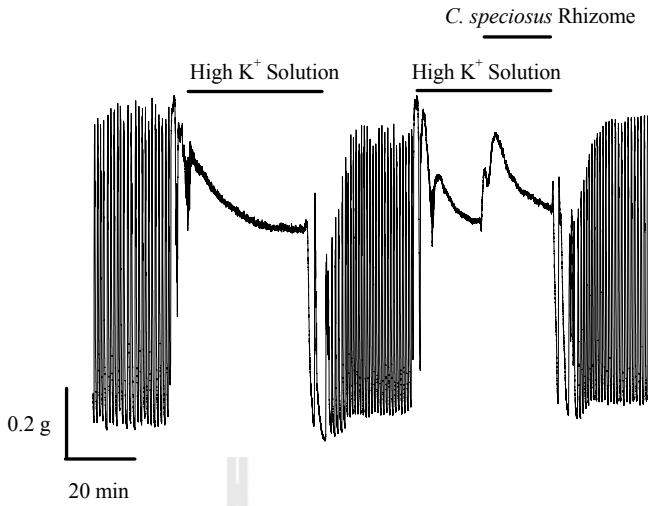


ภาพที่ 7 ฤทธิ์ของสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาต่อกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

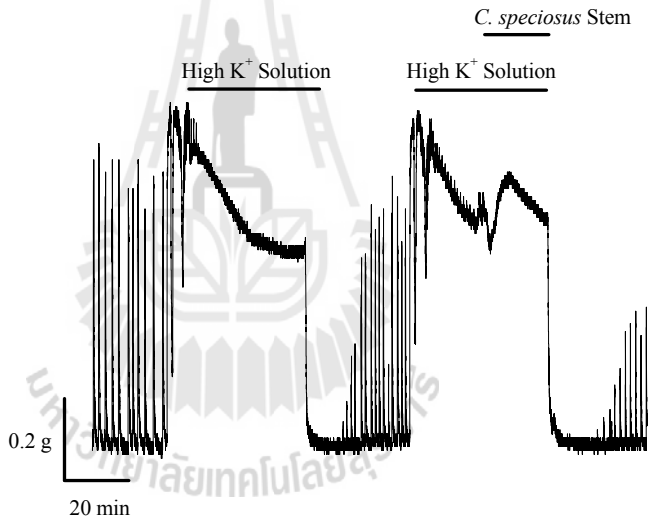
ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย High K^+

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ในสภาวะที่แคลเซียมภายในเซลล์ถูกกักเก็บไว้ไม่สามารถเคลื่อนที่ออกมาภายนอกเซลล์ได้ เนื่องจากระดับความเข้มข้นของสารละลาย high K^+ ภายนอกเซลล์สูง (ภาพที่ 8)

A



B



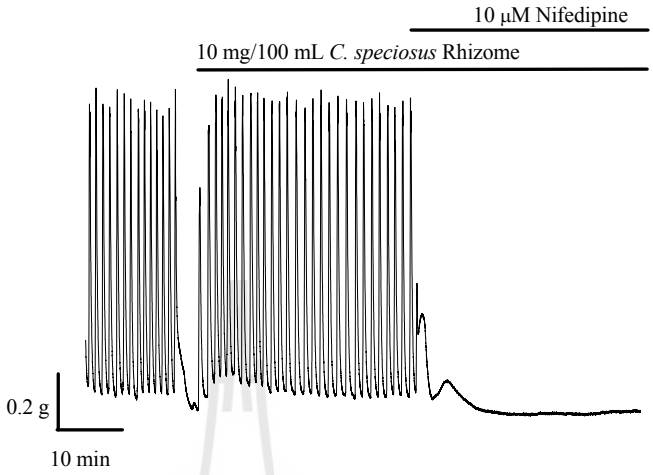
ภาพที่ 8 ฤทธิ์ของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย high K^+ เมื่อ (A) สารกัดเหง้าเอื้องหมายนา และ (B) สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่เมื่อ L-type Ca^{2+} Channel ถูกยับยั้งการทำงาน

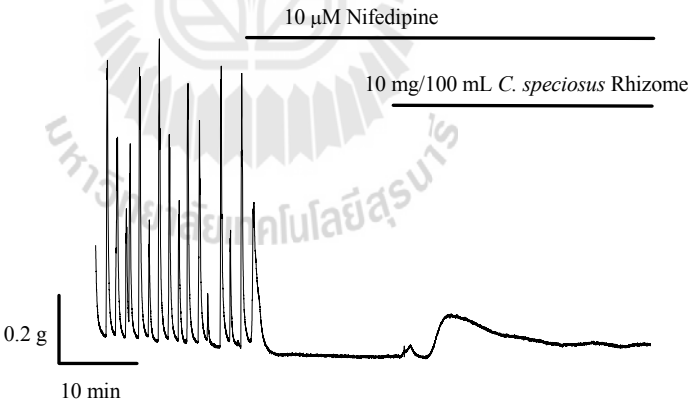
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอื้องหมายนาในการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channels ถูกยับยั้งการทำงานด้วย nifedipine โดยกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ด้วยสารสกัดเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนา (10 มิลลิกรัมใน

100 มิลลิลิตร และ 30 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ) จากนั้นเติมสารสกัดเอื้องหมายนาที่มี 10 μM nifedipine เจือจางอยู่ด้วยลงไปอย่างต่อเนื่อง พบว่า 10 μM nifedipine มีฤทธิ์ไปยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (n = 3) ดังแสดงในภาพที่ 9A และ 10A

A

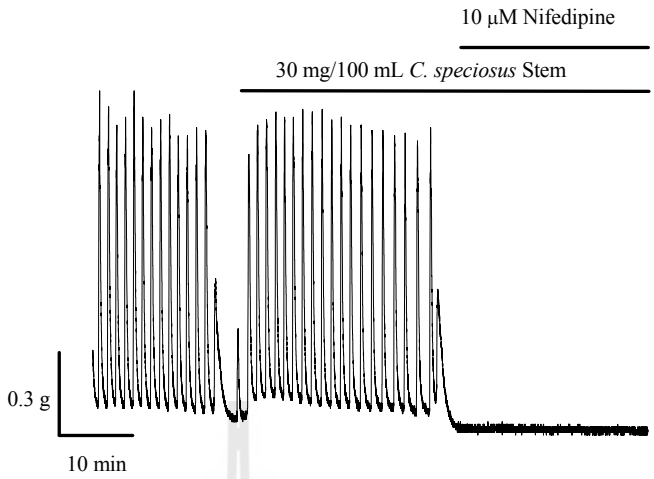


B

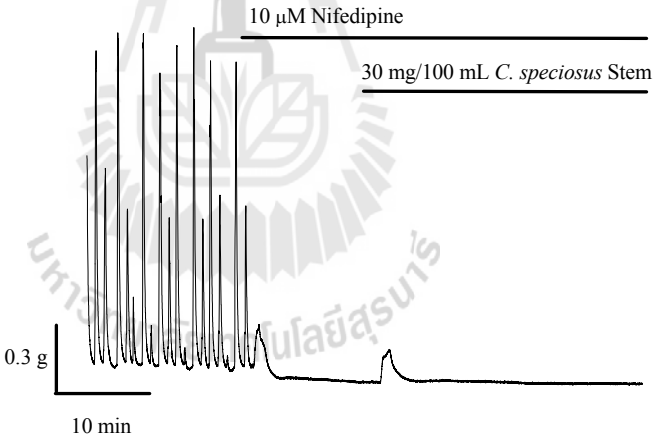


ภาพที่ 9 ฤทธิ์ของสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channels ถูกยับยั้งการทำงาน (A) ให้สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาก่อน และ (B) ให้สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาหลังจากที่ L-type Ca^{2+} channels ถูกยับยั้งการทำงาน

A



B



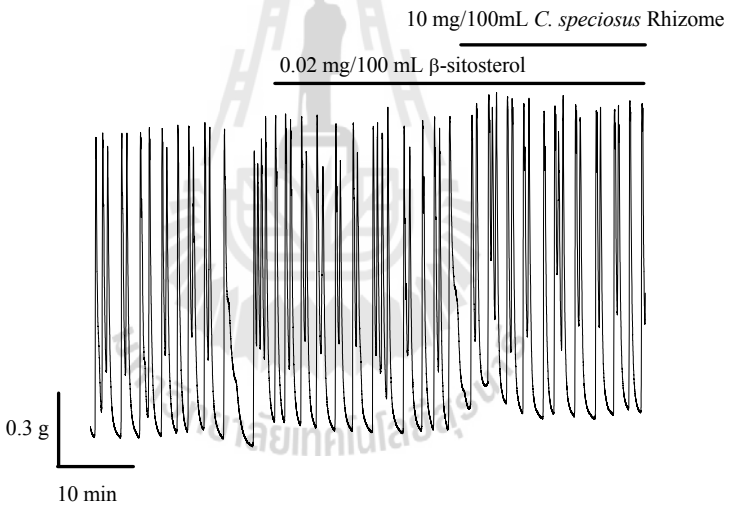
ภาพที่ 10 ฤทธิ์ของสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channels ถูกยับยั้งการทำงาน(A) ให้สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาก่อน และ (B) ให้สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาหลังจากที่ L-type Ca^{2+} channels ถูกยับยั้งการทำงาน

จากภาพที่ 9B และ 10B เมื่อเติมสารสกัดเอื้องหมายนาภายหลังจากที่เติม 10 μM nifedipine พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ทำให้เกิดแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

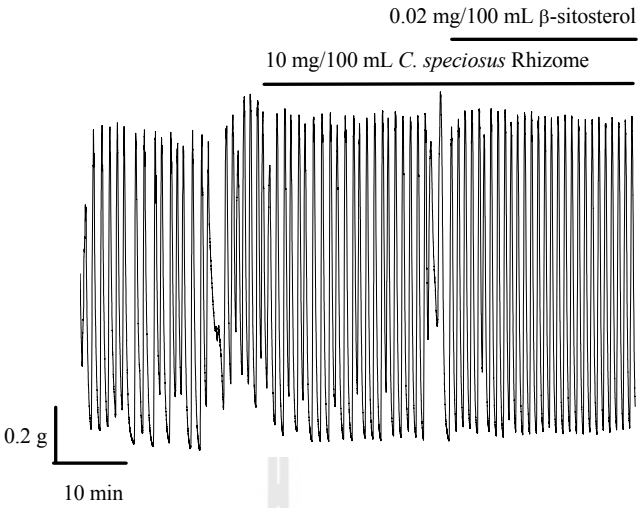
ผลของ β-sitosterol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่

เมื่อให้ β-sitosterol (0.02 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) แก่กล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ (n = 3) พบว่าค่าเฉลี่ยความแรง, ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟของการหดตัวเพิ่มขึ้น 103.44 ± 4.50, 112.50 ± 12.50 และ 112.93 ± 28.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อตามธรรมชาติ (100 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นทดสอบใส่สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาลงไปอย่างต่อเนื่องกันพบว่า สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนามีฤทธิ์เพิ่มความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้เท่ากับ 109.86 ± 6.18, 108.34 ± 8.34 และ 130.66 ± 19.44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาที่ให้ β-sitosterol เพียงอย่างเดียว (100 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบโดยให้ β-sitosterol หลังจากให้สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาแล้วพบว่ามันไปมีผลลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบดังแสดงในภาพที่ 11

A



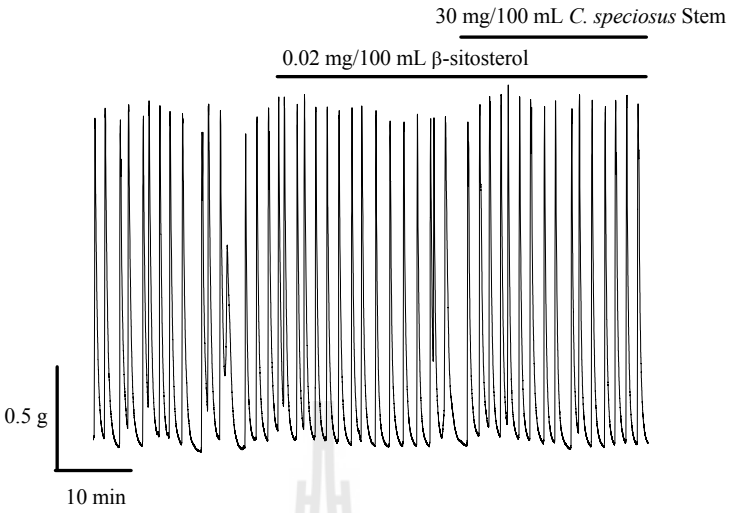
B



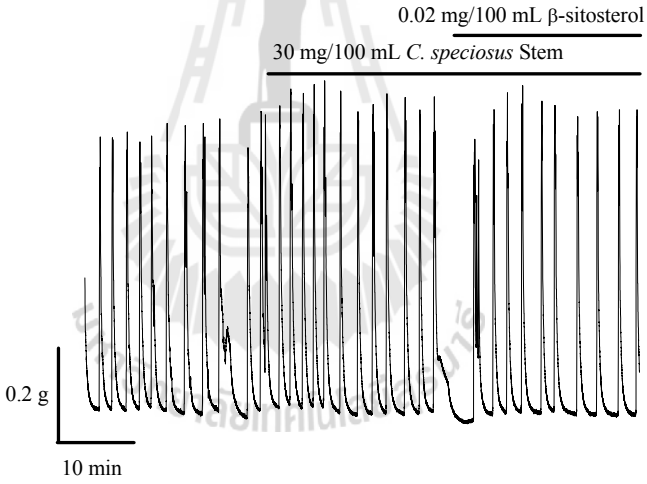
ภาพที่ 11 ผลของ β-sitosterol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (A) ให้ β-sitosterol ก่อนสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา (B) ให้ β-sitosterol หลังสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา

เมื่อให้ β-sitosterol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร แก่กล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ พบว่าสารดังกล่าวมีผลไปเพิ่มความแรงในการหดตัวของมดลูกเป็น 104.34 ± 2.71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับความแรงในการหดตัวแบบธรรมชาติ (100 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อเติมสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาเข้าไปอย่างต่อเนื่องกัน พบว่าสารสกัดนี้ไปมีผลทำให้ความถี่เพิ่มขึ้นเป็น 120.00± 11.55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกที่ได้รับเฉพาะ β-sitosterol เพียงอย่างเดียว (100 เปอร์เซ็นต์) ในทางกลับกันเมื่อทดลองให้ β-sitosterol ภายหลังจากให้สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาแล้วพบว่าความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟการหดตัวลดลงคิดเป็นเปอร์เซนต์ได้เท่ากับ 101.98 ± 6.27, 70.84 ± 4.17 และ 76.79 ± 4.62 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 12

A



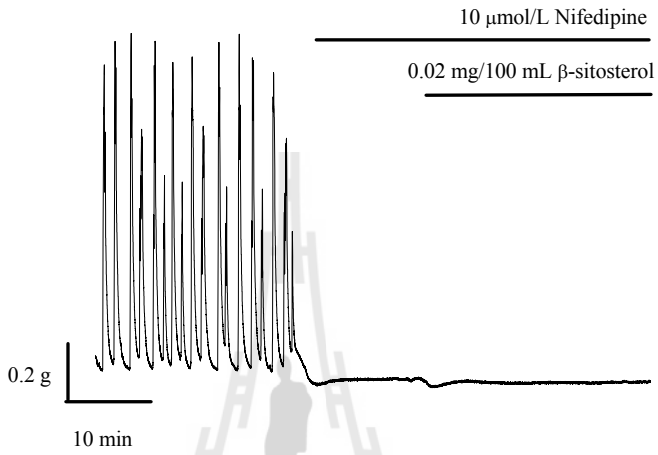
B



ภาพที่ 12 ผลของ β-sitosterol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (A) ให้ β-sitosterol ก่อนสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา (B) ให้ β-sitosterol หลังสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา

ผลของ β-sitosterol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} Channel ถูกยับยั้งการทำงาน

การทดลองนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ของ β-sitosterol (0.02 mg/100 mL) ต่อสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channel ถูกยับยั้งด้วย nifedipine ผลที่ได้คือ β-sitosterol ไม่สามารถไปกระตุ้นให้ L-type Ca^{2+} channel กลับมาทำงานได้

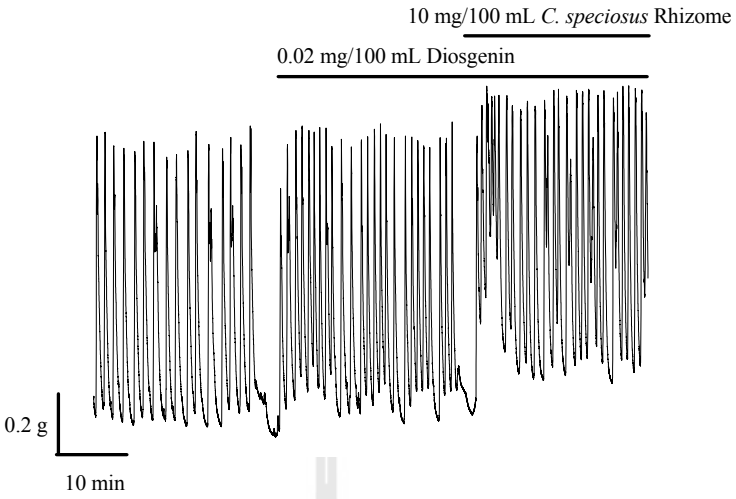


ภาพที่ 13 ผล β-sitosterol ในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} channel ถูกยับยั้งการทำงานด้วย nifedipine

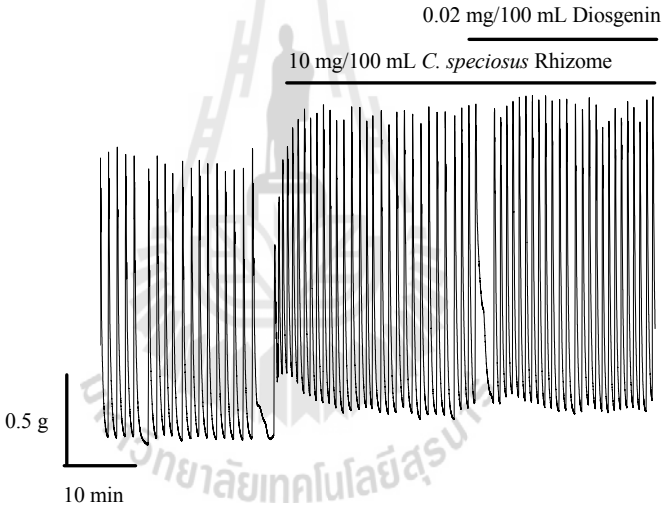
ผลของ Diosgenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่

เมื่อทดลองให้สาร diosgenin ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตรแก่กล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่พบว่า สารดังกล่าวมีฤทธิ์ไปลดความแรงการหัดตัวของกล้ามเนื้อเรียบคิดเป็นเปอร์เซนต์ได้เท่ากับ 87.71 ± 10.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการหดตัวแบบธรรมชาติ (100 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นทดลองให้สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาอย่างต่อเนื่องกัน สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ไปเพิ่มความแรงและพื้นที่ใต้กราฟการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้เท่ากับ 119.69 ± 0.94 และ 165.34 ± 24.11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อได้รับสาร diosgenin เพียงอย่างเดียว (100 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อทดลองให้สาร diosgenin ภายหลังจากให้สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาแล้ว พบว่าความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลดลง คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้เท่ากับ101.97 ± 0.29, 87.50 ± 12.50 และ92.15 ± 0.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 14

A



B

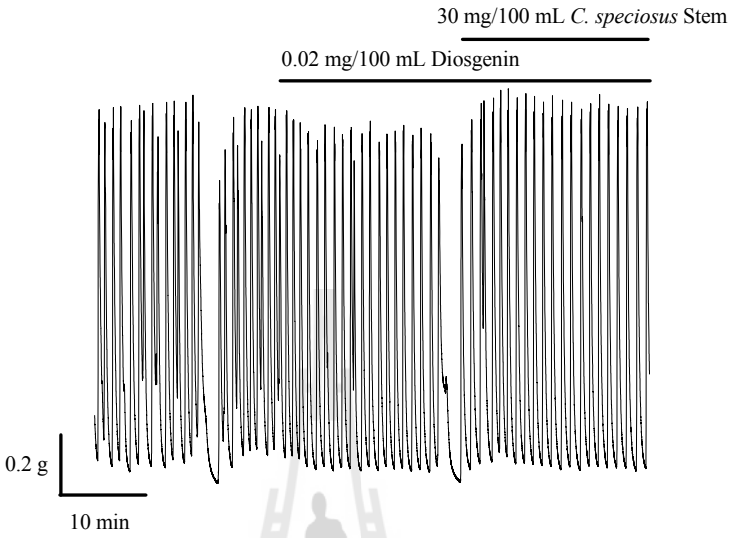


ภาพที่ 14 ผลของ diosgenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (A) ให้ diosgenin ก่อนสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา (B) ให้ diosgenin หลังสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา

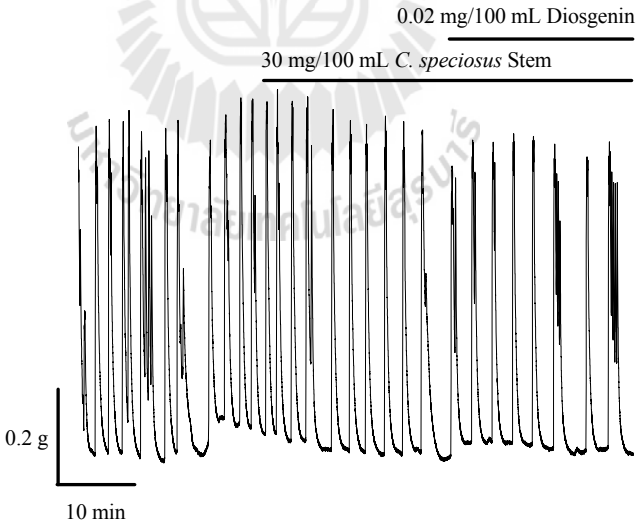
diosgenin มีผลไปลดความแรงและพื้นที่ใต้กราฟการหดตัว คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้กับ 87.75 ± 6.74 และ 67.89 ± 11.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อทดลองให้สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาอย่างต่อเนื่องภายหลังให้สาร diosgenin พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีผลเพิ่มความแรงและพื้นที่การหดตัวกล้ามเนื้อเรียบมดลูก คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้เท่ากับ 112.02 ± 2.02 และ 127.34 ± 7.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการหดตัวตามธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (100 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในภาพที่ 15(A) จากนั้นทดลองให้สาร diosgenin ภายหลังจากให้สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาแล้ว พบว่าความแรง ความถี่ และพื้นที่ใต้กราฟการหดตัวลดลง คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้

เท่ากับ 90.25 ± 6.25, 91.67 ± 8.34 และ 62.02 ± 17.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาที่ให้สาร diosgenin เพียงอย่างเดียว (100 เปอร์เซ็นต์) แสดงในภาพที่ 15(B)

A



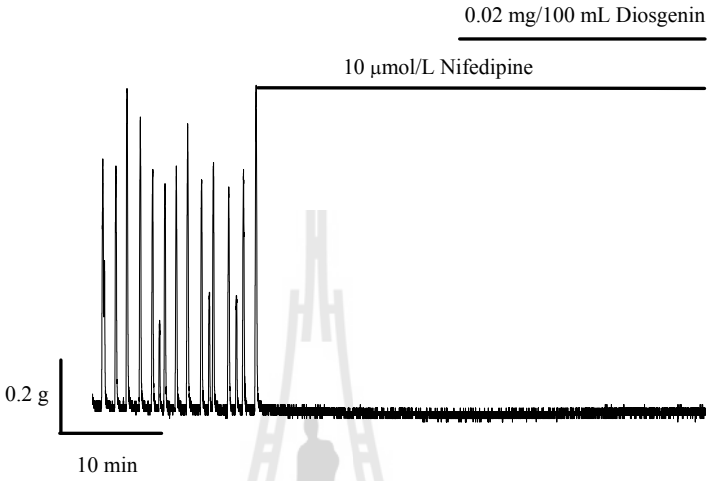
B



ภาพที่ 15 ผลของ diosgenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (A) ให้ diosgenin ก่อนสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา (B) ให้ diosgenin หลังสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา

ผลของสาร Diosgenin ในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} Channel ถูกยับยั้งการทำงาน

เมื่อทดลองให้สาร diosgenin ปริมาณ 0.02 มิลลิกรัมใน 100 มิลลิลิตร ภายหลังจากที่ให้สาร nifedipine ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ แก่กล้ามเนื้อเรียบมดลูก (n = 3) พบว่า สาร nifedipine ไปมีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบอย่างฉับพลัน เมื่อให้สาร diosgenin เข้าไปอย่างต่อเนื่องกัน ไม่เกิดผลใดๆต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ



ภาพที่ 16 ผลของสาร Diosgenin ในสภาวะที่ L-type Ca^{2+} Channel ถูกยับยั้งการทำงาน

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการคุมกำเนิด

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อ Pre-Implantation ในหนูท้อง

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 จากการป้อนสารสกัดเอื้องหมายนาให้แก่หนูท้องพบว่าหนูท้องในกลุ่มที่ป้อนสารสกัดจากเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนาปริมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว การฝังตัวของตัวอ่อนและค่าเฉลี่ยน้ำหนักมดลูกลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนในช่วงก่อนการฝังตัว (pre-implantation) ได้ 19.52 และ 28.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

หนูท้องในกลุ่มที่ป้อนสารสกัดจากเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนาในปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว การฝังตัวของตัวอ่อนและค่าเฉลี่ยน้ำหนักมดลูกลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนในช่วงก่อนการฝังตัว (pre-implantation) ได้ 17.24 และ 24.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

หนูท้องกลุ่มที่ป้อน 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักมดลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คิดเป็นเปอร์เซนต์การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนได้ 26.41 เปอร์เซ็นต์ การป้อนสารดังกล่าวไม่มีผลข้างเคียงกับหนู

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อ Post-Implantation ในหนูท้อง

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ไปลดจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อน ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของตัวอ่อนลดลงในหนูท้องกลุ่มที่ป้อนสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เปอร์เซนต์การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนในระยะ post-implantation ในหนูท้องกลุ่มที่ป้อนสารสกัดเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนาที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่าเท่ากับ 6.93 และ 10.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในหนูท้องกลุ่มที่ป้อน 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าการฝังตัวของตัวอ่อนและค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของตัวอ่อนลดลง คิดเป็นเปอร์เซนต์การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนได้เท่ากับ 10.34 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สารดังกล่าวไม่มีผลข้างเคียงกับตัวอ่อนและไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของหนูในภาวะที่ตั้งท้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อหนูท้องในระยะ Pre-implantation

กลุ่ม	การทดลอง	จำนวนตำแหน่งการฝังตัว	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักมดลูก (มิลลิกรัม)	การยับยั้งการฝังตัว (เปอร์เซ็นต์)
1	ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	14.50 ± 1.50[b]	513.41 ± 42.53[b]	0
2	ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	10.67 ± 0.88[ab]	370.82 ± 19.64[a]	26.41
3	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	12.00 ± 0.00[ab]	435.02 ± 22.47[ab]	17.24
4	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	11.67 ± 0.67[ab]	365.15 ± 12.81[a]	19.52
5	ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	11.00 ± 1.68[ab]	434.25 ± 45.33[ab]	24.14
6	ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	10.33 ± 0.33[a]	353.45 ± 22.41[a]	28.76

[a, b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในคอลัมน์ ค่าเฉลี่ย ± S.E.M.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อหนูท้องในระยะ Post-implantation

กลุ่ม	การทดลอง	จำนวนการฝังตัว	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวอ่อน (กรัม)	การยับยั้งการฝังตัว (เปอร์เซ็นต์)
1	ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	9.67 ± 1.33	14.68 ± 1.46	0
2	ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	8.67 ± 1.45	13.80 ± 1.53	10.34
3	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	10.67 ± 0.88	14.64 ± 0.00	6.93
4	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	6.67 ± 3.53	15.85 ± 0.00	0
5	ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	8.67 ± 1.86	13.96 ± 2.38	10.34
6	ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	9.67 ± 0.33	16.27 ± 0.00	0

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในคอลัมน์ ค่าเฉลี่ย ± S.E.M.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักมดลูก

หนูตัดรังไข่มีน้ำหนักตัวมากกว่าหนูกลุ่มควบคุม (Sham-operated rats) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารมาตรฐาน และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดเอื้องหมายนาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3

น้ำหนักมดลูกหนูตัดรังไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อนำไปเปรียบทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (Sham-operated rats) ($P < 0.05$) ส่วนน้ำหนักมดลูกหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสาร 17α-ethynylestradiol และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวนั้น มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ ($P < 0.05$)

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอด

เมื่อทำการสเมียร์ช่องคลอดหนูตัดรังไข่จะพบเพียงเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) เท่านั้น ส่วนในหนูตัดรังไข่กลุ่มที่ได้รับยามาตรฐานสามารถตรวจพบเซลล์เกล็ดปลา (cornified cells) ได้ตั้งแต่วันที่ 4 ของการให้ยาจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง และหนูตัดรังไข่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเอื้องหมายนาในระดับความเข้มข้นต่างๆสามารถพบเซลล์เอพิธีเลียมที่มีนิวเคลียสและเซลล์เกล็ดปลาได้ ดังแสดงในภาพที่ 17

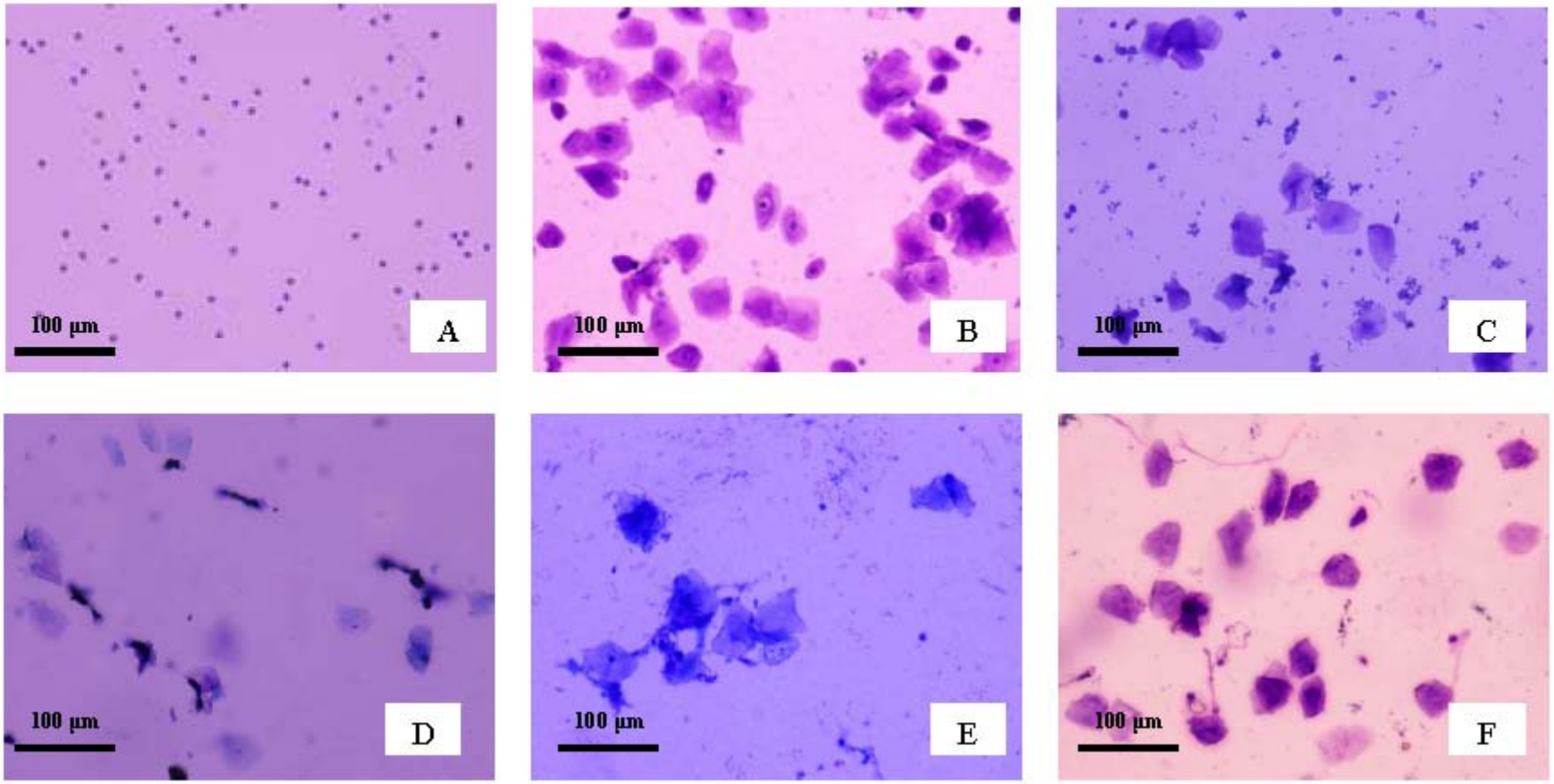
เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่พบในช่องคลอดของหนูตัดรังไข่กลุ่มต่างๆ โดยกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 0% และกลุ่มที่ได้รับยามาตรฐานมีค่าเท่ากับ 100% ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และ สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีเปอร์เซนต์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักมดลูก

กลุ่ม	การทดลอง	น้ำหนักตัว (g)	น้ำหนักมดลูกสัมพัทธ์ (mg/100 g B.W.)	n
1	หนู sham-operated ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	278.89 ± 6.96[a]	152.49 ± 7.40[d]	7
2	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	330.00 ± 2.98[d]	38.09 ± 2.41[a]	7
3	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	275.00 ± 2.69[a]	128.94 ± 10.33[c]	7
4	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	288.57 ± 3.40[ab]	56.13 ± 2.78[b]	7
5	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	275.71 ± 6.49[a]	52.49 ± 3.60[ab]	7
6	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	307.14 ± 5.22[c]	51.47 ± 3.36[ab]	7
7	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	298.57 ± 7.05[bc]	52.70 ± 2.57[ab]	7

[a, b, c, d] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในคอลัมน์ ค่าเฉลี่ย ± S.E.M. โดยให้ n คือจำนวนสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 17 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศ์ เซลล์ช่องคลอดหนูตัดรังไข่ถูกย้อมสีด้วย methylene blue (the bar equals 100 µm) (A) กลุ่มควบคุม (B) ได้รับ 17α-ethinylestradiol (0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) (C) สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา (500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) (D)สารสกัดเหง้าเอื้องหมายนา (1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) (E) สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) (F) สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนา (1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)

ตารางที่ 4 จำนวนเซลล์เกล็ดปลา (Cornified Cell) ที่พบในช่องคลอดหนูตัดรังไข่

การทดลอง	n	เซลล์เกล็ดปลาที่พบในช่องคลอด (เปอร์เซ็นต์)							
		สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8
ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	6	0	0	0	0	0	0	0	0
ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	6	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	6	16.67	16.67	16.67	50.00	33.33	33.33	50.00	33.33
ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	6	16.67	33.33	50.00	33.33	66.67	50.00	50.00	66.67
ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	6	16.67	50.00	33.33	50.00	50.00	66.67	66.67	83.33
ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	6	0	50.00	16.67	66.67	66.67	33.33	66.67	16.67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับฮอร์โมนและคอเลสเตอรอลในเลือด

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด

ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูกลุ่มควบคุม (sham-operated rats) มีค่าเท่ากับ 22.00 ± 0.96 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร (n = 5) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับยามาตรฐานมีระดับฮอร์โมนเท่ากับ 20.47 ± 0.96 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร (n = 5) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ (10.57 ± 0.08 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร, n = 5) พบว่าไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเอื้องหมายนา

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมด (Total cholesterol) ในหนูตัดรังไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (sham-operated rats) ส่วนหนูตัดรังไข่ที่ได้รับ17α-ethynylestradiol (0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบว่าปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมและหนูตัดรังไข่ นอกจากนี้พบว่าหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น (500, 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น (500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่

ระดับไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับยามาตรฐาน (stand drug) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในหนูกลุ่มควบคุม หนูตัดรังไข่ และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดเอื้องหมายนา ระดับคอเลสเตอรอลดี (HDL-cholesterol) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ 17β- ethynylestradiol ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หนูตัดรังไข่ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีระดับคอเลสเตอรอลดีลดลงเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ ระดับไขมันไม่ดี (LDL-cholesterol) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในหนูที่ได้รับยามาตรฐานเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ ส่วนหนูตัดรังไข่ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนาทั้ง 2 ความเข้มข้นนั้น ระดับคอเลสเตอรอลไม่ดีมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดหนูตัดรังไข่

กลุ่ม	การทดลอง	ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด (พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	n
1	หนู sham-operated ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	22.00 ± 0.96^{c}	5
2	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	10.57 ± 0.08^{a}	5
3	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	20.47 ± 0.96^{c}	5
4	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	12.43 ± 0.13^{ab}	5
5	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	13.43 ± 1.55^{b}	5
6	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	10.63 ± 0.65^{a}	5
7	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	10.57 ± 0.52^{a}	5

[a, b, c] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในคอลัมน์ ค่าเฉลี่ย ± S.E.M. โดยให้ n คือจำนวนสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับคอเลสเตอรอลในเลือดหนูตัดรังไข่

กลุ่ม	การทดลอง	คอเลสเตอรอลทั้งหมด (mg/DL)	ไตรกลีเซอไรด์ (mg/DL)	คอเลสเตอรอลไม่ดี (mg/DL)	คอเลสเตอรอลดี (mg/DL)	n
1	หนู sham-operated ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	68.67 ± 6.50^{b}	84.33 ± 8.61^{b}	44.83 ± 4.33^{b}	7.00 ± 2.00^{ab}	5
2	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสะลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	93.17 ± 6.69^{cd}	67.33 ± 4.60^{ab}	60.20 ± 2.98^{cd}	19.83 ± 3.78^{c}	5
3	หนูตัดรังไข่received ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	45.83 ± 4.70^{a}	138.75 ± 8.63^{c}	22.33 ± 3.49^{a}	4.17 ± 0.60^{a}	5
4	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	92.67 ± 5.84^{cd}	58.33 ± 4.18^{a}	58.67 ± 3.33^{cd}	19.33 ± 3.38^{c}	5
5	หนูตัดรังไข่ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	79.00 ± 3.21^{bc}	71.33 ± 4.63^{ab}	48.33 ± 2.67^{bc}	13.67 ± 0.33^{bc}	5
6	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	83.33 ± 4.91^{bc}	62.00 ± 8.50^{ab}	51.33 ± 2.96^{bc}	15.67 ± 5.33^{bc}	5
7	หนูตัดรังไข่ ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	106.67 ± 1.20^{d}	77.67 ± 2.40^{ab}	66.00 ± 1.15^{d}	18.33 ± 2.03^{c}	5

$^{a, b, c, d}$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในคอลัมน์ ค่าเฉลี่ย ± S.E.M. โดยให้ n คือจำนวนสัตว์ทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเอื้องหมายนา 1) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ 2) การคุมกำเนิด 3) น้ำหนักของมดลูก 4) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอด 5) ระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ผลสรุปมีรายละเอียดเป็นดังนี้

สารสำคัญในสารสกัดเอื้องหมายนา

จากผลการสกัดเอื้องหมายนาด้วยเอทานอลและวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS ทำให้ทราบว่าสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาประกอบด้วยสารประกอบทั้งหมด 28 ชนิด สารประกอบหลักที่พบมากที่สุดคือ diosgenin ส่วนสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาประกอบด้วยสารประกอบทั้งหมด 31 ชนิด สารประกอบหลักที่พบมากที่สุดคือ β-sitosterol นอกจากนี้ยังพบสารประกอบในกลุ่มไฟโตเอสโตรเจนอื่นที่น่าสนใจ ได้แก่ ergosterols ซึ่งพบได้ทั้งในสารสกัดเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนา

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่

ในสภาวะที่ขาดฮอร์โมนจากรังไข่ กล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่ยังคงสามารถหัดตัวได้ตามธรรมชาติเช่นเดียวกับหนูปกติ นอกจากนี้สารสกัดจากเอื้องหมายนายังสามารถกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูตัดรังไข่หดตัวเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับในหนูปกติ จากการทดลองเหล่านี้จึงยืนยันว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกไม่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนจากรังไข่ ผลการทดลองที่ชัดเจนนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอื้องหมายนามีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

สารประกอบที่พบมากที่สุดในสารสกัดเอื้องหมายนาคือ β-sitosterol และ diosgenin เป็นที่น่าสนใจว่าสารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้จะไปมีผลอย่างไรต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า β-sitosterol มีฤทธิ์ไปเพิ่มการหดตัว และ diosgenin มีฤทธิ์ไปลดการหดตัว ถึงแม้ว่า β-sitosterol จะเป็นสารหลักที่พบในสารสกัด แต่เราก็ยังตรวจพบสารไฟโตเอสโตรเจนอื่นๆด้วย ดังนั้นสารเหล่านี้อาจมีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกเช่นกัน

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อการคุมกำเนิด

ผลการทดลองในระยะ pre-implantation แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอื้องหมายนาทั้งในส่วนเหง้าและลำต้นที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของมดลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม การฝังตัวของตัวอ่อนและค่าเฉลี่ยน้ำหนักของตัวอ่อนในระยะ post-implantation ไม่มีความแตกต่างกัน ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าสาร estrogenic เช่น β-sitosterol อาจมีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน โดยไปรบกวนสมดุลการทำงานระหว่างเอสโตรเจน

และโปรเจสเตอโรน โดยไปเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก ซึ่งอาจส่งผลในการป้องกันการฝังตัว

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักมดลูกในหนูตัดรังไข่

วัยหมดประจำเดือนอาจนำไปสู่ความผิดปกติของการทำงานในระบบสืบพันธุ์ และการเผาผลาญคอเลสเตอรอลอันเนื่องมาจากความบกพร่องของฮอร์โมนเอสโตรเจน หนูตัดรังไข่ถูกนำมาใช้แทนสภาวะวัยหมดประจำเดือน (Speroff, Rowan, Symons, Genant และ Wilbron, 1996) เมื่อทดลองให้สารสกัดเอื้องหมายนาที่มี β-sitosterol และ diosgenin เป็นสารประกอบ ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ส่งผลให้น้ำหนักมดลูกเพิ่มขึ้น

ผลของสารสัดต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอดหนูตัดรังไข่

เอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการรักษาให้เนื้อเยื่อช่องคลอดมีสุขภาพดี ถ้าระดับเอสโตรเจนลดลงจะส่งผลให้เนื้อเยื่อช่องคลอดบาง แห้งและเหี่ยว (Branco, Cancelo, Villero, Nohales และ Julia, 2005) เมื่อเราให้สารสกัดเอื้องหมายนาที่มีสารในกลุ่มไฟโตเอสโตรเจนแก่หนูตัดรังไข่ด้วยวิธีการป้อนทางปาก โดยสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาทั้งความเข้มข้น 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถกระตุ้นเพิ่มจำนวนเซลล์เกล็ดปลาในช่องคลอดหนูได้ หลังจากที่หนูถูกตัดรังไข่ทิ้งแล้ว 14 วัน เช่นเดียวกับสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ทั้งนี้สารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถกระตุ้นให้เกิดเซลล์เกล็ดปลาได้หลังผ่าตัดรังไข่แล้ว 21 วัน จากผลการทดลองทั้งหมดตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเอื้องหมายนามีผลต่อ estrogenic ในหนูตัดรังไข่ โดยช่วยให้สุขภาพช่องคลอดดีขึ้น

ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

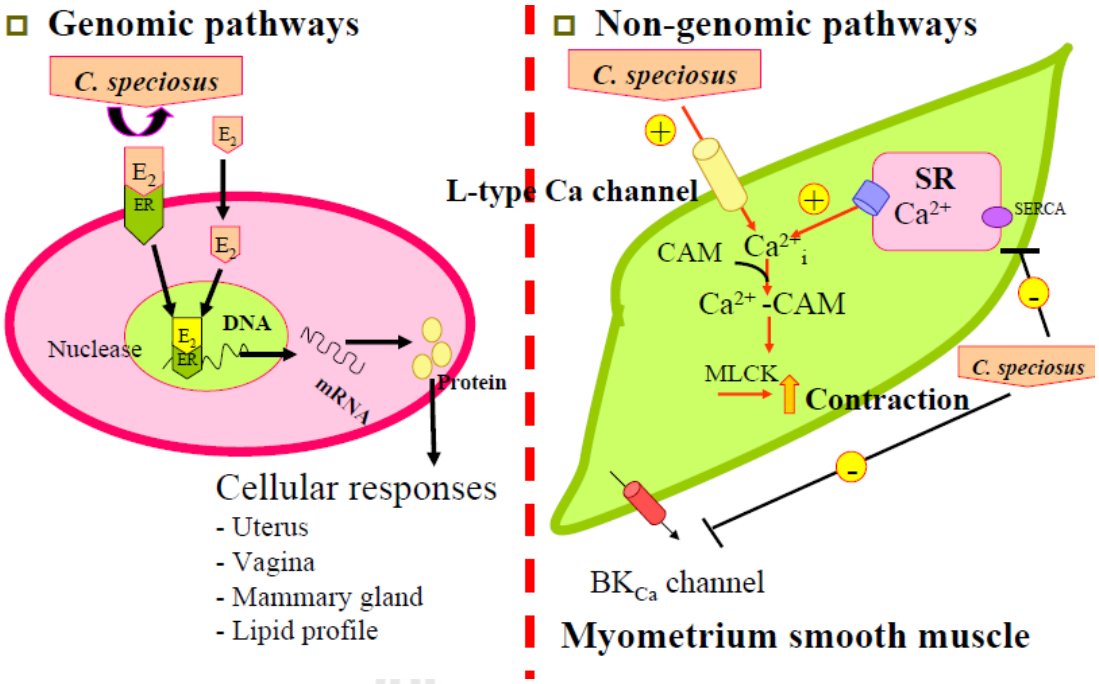
สารสกัดเอื้องหมายนามีผลในเชิงบวกกับการเผาผลาญคอเลสเตอรอล โดยช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol) และคอเลสเตอรอลไม่ดี (LDL-cholesterol) อย่างไรก็ตามสารสกัดเอื้องหมายนาไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมนในเลือดหนูตัดรังไข่ ดังนั้นการกินสารสกัดเหง้าและลำต้นเอื้องหมายนาจะช่วยลดผลกระทบต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์และเปลี่ยนแปลงการเผาผลาญคอเลสเตอรอลในภาวะที่ขาดเอสโตรเจน แม้ว่าผลการทดลองดังกล่าวยังไม่ชัดเจน แต่การที่ระดับฮอร์โมนในเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงให้เห็นว่า ผลดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับ hypothalamic-pituitary-ovarian axis

สรุปผลการทดลอง

รูปแบบกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ของเอื้องหมายนาทั้งส่วนลำต้นและเหง้า จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ 2 รูปแบบ คือ 1) การออกฤทธิ์แบบผ่านยีน (genomic pathway) และ 2) การออกฤทธิ์แบบไม่ผ่านยีน (non-genomic pathway)

การออกฤทธิ์แบบผ่านยีน (genomic pathway) หมายถึง การให้สารชนิดใดชนิดหนึ่งเข้าไปในสิ่งมีชีวิตแล้ว ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถแสดงกลไกการตอบสนองได้ในระดับยีน โดยส่วนใหญ่การออกฤทธิ์ในระดับนี้ร่างกายจะใช้เวลานานในการตอบสนอง สำหรับตัวชี้วัดของการออกฤทธิ์แบบผ่านยีนคือ ระดับของโปรตีน ซึ่งร่างกายจะตอบสนองต่อโปรตีนเหล่านี้ในลักษณะหรือรูปแบบที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนนั้นๆ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากเอื้องหมายนาแสดงการออกฤทธิ์แบบผ่านยีนมีดังนี้: 1) การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูกทั้งในการศึกษาจากภาคตัดขวาง (uterine cross section) 2) การเพิ่มขึ้นของเซลล์เกล็ดปลาในช่องคลอด (vaginal cornification) 3) การพัฒนาที่เพิ่มขึ้นของกระเปาะน้ำนม (alveolar) และท่อนำน้ำนม (tubule) ในเต้านม (mammary gland) 4) ระดับของคลอเลสตอรอลทั้งหมด (total cholesterol) และคลอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (LDL cholesterol) ที่ลดลง และ 5) การต้านการฝังตัวของตัวอ่อน (anti- blastocyst implantation)

การออกฤทธิ์แบบไม่ผ่านยีน (non-genomic pathway) หมายถึง การให้สารชนิดใดชนิดหนึ่งเข้าไปในสิ่งมีชีวิตแล้ว สามารถส่งผลให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถแสดงกลไกการตอบสนองสารดังกล่าวได้โดยที่ไม่ผ่านการแสดงออกในระดับยีน ซึ่งร่างกายของสิ่งมีชีวิตสามารถตอบสนองได้โดยทันทีหรือในเวลาอันสั้น การศึกษาถึงผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเอื้องหมายนาแบบไม่ผ่านยีนได้ทำศึกษาถึงผลของสารสกัดต่อการหดตัวของมดลูกหนูที่แยกออกจากกาย (*in vitro*) โดยการหดตัวโดยธรรมชาติ (spontaneous contraction) เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่าการหดตัวของมดลูก (uterine contraction) นั้นพบว่าขึ้นกับปริมาณของแคลเซียมภายนอกเซลล์ (external calcium) แต่ไม่ขึ้นกับอิทธิพลของฮอร์โมนและระบบประสาท (hormonal and neuronal influences) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเอื้องหมายนามีผลในการเพิ่มการหดตัวทั้งในมดลูกหนูปกติและหนูที่ตัดรังไข่ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดมีดังนี้: 1) สารสกัดจากเอื้องหมายนาสามารถกระตุ้นการทำงานของ L-type Ca^{2+} channel ทำให้ปริมาณของแคลเซียมในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น 2) สารสกัดจากเอื้องหมายนาสามารถกระตุ้นการหลั่งของแคลเซียมจากซาร์โคพลาสมิค เรติคูลัม (SR) 3) สารสกัดจากเอื้องหมายนามีผลในการยับยั้งการทำงานของทั้ง SERCA pump และ BK_{Ca} channel



ภาพที่ 18 ผลของสารสกัดเอื้องหมายนาที่ออกฤทธิ์ผ่านยีน (Genomic pathways) และไม่ผ่านยีน (Non-genomic pathways)

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากเอื้องหมายนามีผลการออกฤทธิ์ที่คล้ายกับเอสโตรเจนและไม่มีผลข้างเคียง จึงเป็นไปได้ว่าพืชสมุนไพรชนิดนี้จะเป็นพืชที่มีคุณประโยชน์ต่อสตรีวัยหมดระดูหรือสตรีที่มีปัญหาเรื่องความผิดปกติของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนได้

ข้อเสนอแนะ

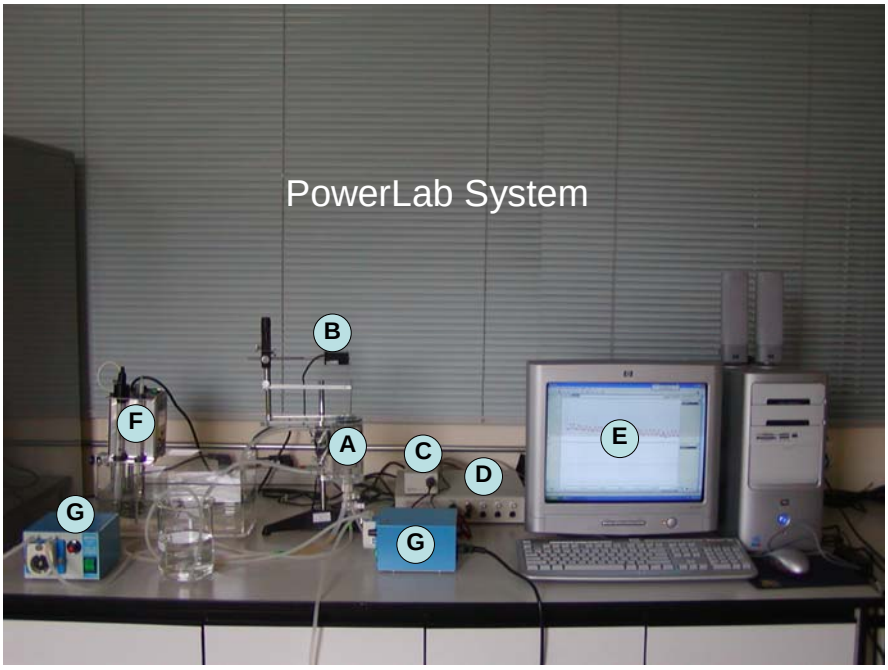
การทดลองนี้เป็นเพียงโมเดลการทดลองในสัตว์ทดลองเท่านั้น หากมีการพัฒนานำไปทดสอบกับมนุษย์จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อสตรีวัยทอง

บรรณานุกรม

1. จิรายุ จันทรประยงค์ (2551) กรมส่งเสริมการเกษตร http://web.ku.ac.th/agri/spiral/index.html
2. Au, A. L. S., Kwok, C. H., Lee, A. T. C., Kwan, Y. W., Lee, M. M. S., Zhang, R. Z., Lee, S. M. Y., He, G. W. and Fung, K. P. (2004). Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca^{2+}-activated K^{+} chanels of porcrine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. European Journal of Pharmacology. 502: 123-133.
3. Bhattachaya SK, Parikh AK, Debnath PK, Pandey VB, Neogy NC. 1973. Pharmacological studies with the alkaloids of *Costus speciosu*s. J Indian Med 8(1), 10-19
4. Branco, C. C., Cancelo, M. J., Villero, J., Nohales, F. and Julia, M. D. (2005). Management of post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. Maturitas. 46-52.
5. Chandel KPS, Shukla G, Sharma N. 1996. Biodiversity in medicinal and aromatic plants in India. ICR: New Delhi.
6. Gogoi JC, Sharma DK. 2001. Prevention of carbon-tetrachloride and acetaminophen induced hepatitic damage by an extract from *Costus speciosus*. International Congress and 49th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Sep 2-6, 2001, Erlangen, Germany
7. Khanna, U. and Chaudhum, R. R. (1968). Antifertility screening of plants, Part I. Investigation of *Butea monoperma* (Lam) Kutze. Indian Journal of Medical Research. 56: 1575-1579.
8. Malaivijitnond, S., Chansri, K., Kijkuokul, P., Urasopon, N. and Cherdshewasart, W. (2006). Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. Journal of Ethnopharmacology. 107: 354-360.
9. Mosihuzzaman M, Nahar N, Ali L, Rokeya B, Khan AK, Nur-E-Alam M, Nandi RP. 1994. Hypoglycemia effects of three plants from eastern Himalayan belt. Diabetes Res 26(3), 127-38
10. Pandey VB, Desgupta B, Bhattachaya SK, Debnath PK, Singh S, Sanyal AK. 1972. Chemical and pharmacological investigation of saponins of *Costus speciosu*s. J Indian Med 34(5), 116-19

11. Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Jetiyanon, K., Wittaya-areekul, S. and Ingkaninan, K. (2007). Comparison of various extraction methods of *Bacupa monnieri*. Naresuan University Journal. 15(1): 29-34.
12. Rhodes, M. E., Balestreire, E. M., Czambel, R. K. and Rubin, R. T. (2002). Estrous cycle influences on sexual dimerism of HPA axis responses to cholinergic stimulation in rats. Brain Research Bulletin. 59(3): 217-225.
13. Singh S, Sanyal AK, Bhattacharya SK, Pandey VB. 1972. Estrogenic activity of saponins from *Costus speciosus* (Koen) Sm. Indian J Med Res 60(2), 287-90
14. Speroff, L., Rowan, J., symmons, J., genant, H. and Wilborn, W. (1996). The comparative effect on bone density, endometrium, and lipid of continuous hormones as replacement therapy (CHART study). A randomized controlled trial. The Journal of The American Medical Association. 276: 1397-1403.
15. Steele, C. E. and Copping, G. P. (1990). Teratogen testing In: Coop, A. J. and Cockroft, D. L. (eds.). Postimplantation Mammalian Embryoes. Oxford: IRL Press. pp 221-234.
16. Tewari PV, Chaturvedi C, Pandev VB. 1973. Antifertility activity of *Costus speciosus*. Indian J Pharm 35(4), 114-15
17. Turnbull D, Frankos VH, Leeman WR, and Jonker D. 1999. Short-term tests of estrogenic potential of plant stanols and plant stanol esters. Regulatory Toxicology and Pharmacology 29:211-215.
18. Williamson, E. M., Okako, D. T. and Evan, F. G. (1996). Selection preparation and pharmacological evaluation of plant material. Phamacological Methods in Phytotherapy Reshearch. 1: 191-212.

ภาคผนวก ก



เครื่องมือที่ใช้วัดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

A, Organ bath chamber

B, Transducer

C, Bridge Amp

D, PowerLab

E, Computer Set

F, Water bath chamber with temperature controller

G, Peristaltic pumps

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย Physiological Saline Solution

	ความเข้มข้น (mM)	**หน่วย g/L**
NaCl	154	9
KCl	5.6	0.42
$Mg.SO_4.7H_2O$	0.12	0.29
HEPES	10.9	2.6
Glucose	8	1.44
$CaCl_2$	2	2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

นางศจีรา คุปพิทยานันท์ ตำแหน่งอาจารย์ เกิดวันเสาร์ที่ 7 มีนาคม พุทธศักราช 2513 ที่อำเภอบัวใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม จากมหาวิทยาลัยขอนแก่นในปีพุทธศักราช 2537 จากนั้นได้รับทุนจากบริติสเคาน์ซิลและรัฐบาลไทยให้ไปศึกษาต่อระดับมหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิตในสาขาสรีรวิทยา ที่มหาวิทยาลัยลิเวอร์พูล ประเทศอังกฤษ สำเร็จการศึกษาในปีพุทธศักราช 2546 ขณะกำลังศึกษา ณ สถานศึกษาดังกล่าวได้รับทุนนักสรีรวิทยารุ่นเยาว์ (Young Physiologist) จากมหาวิทยาลัยฯ เพื่อนำเสนอผลงานวิจัย ปีละ 1,000 ปอนด์ตลอดระยะเวลาการศึกษา ปัจจุบันปฏิบัติงานที่ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30000 มีประสบการณ์ในการวิจัยและผลงานทางวิชาการทางด้านสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ที่ได้รับการตีพิมพ์ในช่วงปี 2543-2554 ผลงานฉบับเต็มในวารสารนานาชาติจำนวน 16 เรื่อง วารสารไทยจำนวน 3 เรื่อง และบทคัดย่อในวารสารระดับชาติ 5 เรื่องและวารสารระดับนานาชาติจำนวน 14 เรื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี