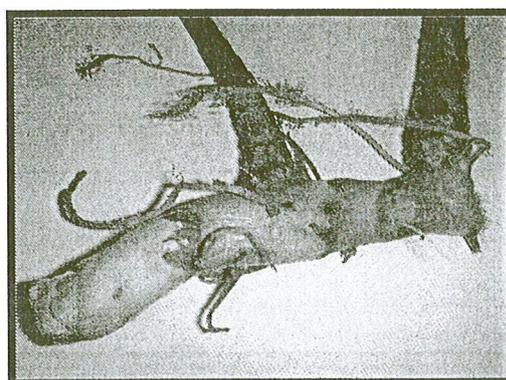
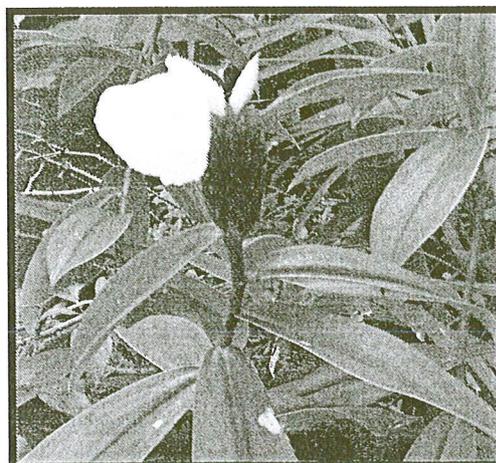
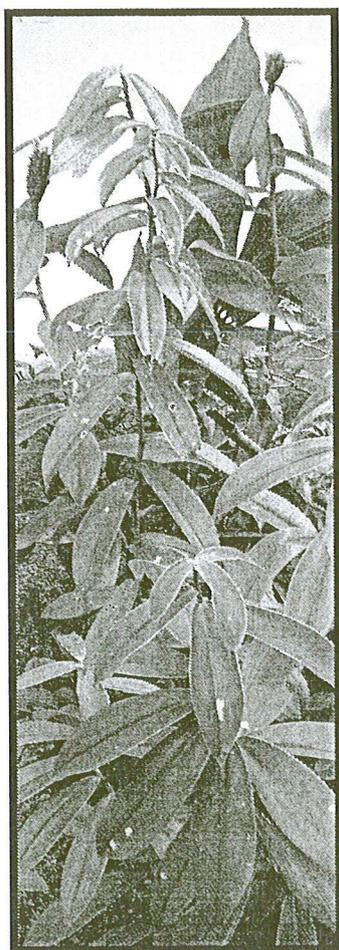


บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดสารจากเอื้องหมายนา

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



ภาพที่ 1 สัณฐานวิทยาของเอื้องหมายนา

ขั้นตอนการสกัดสารจากพืชทำโดย ตัดแยกส่วนลำต้นและเหง้าของต้นเอื้องหมายนา จากนั้น ล้างทำความสะอาดเอาเศษดินออกให้หมด หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอบให้แห้งเพื่อป้องกันการเกิด เชื้อราเมื่อพืชแห้งสนิทแล้วจึงนำมาบ่นบดให้เป็นผง นำผงดังกล่าวไปเข้ากระบวนการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet Extractor โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้ากระบวนการกลั่นแบบ reflux เพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ ออกให้หมดด้วยเครื่อง Rotary Evaporator กระบวนการสุดท้ายคือการทำให้สารสกัดแห้งเพื่อที่จะ

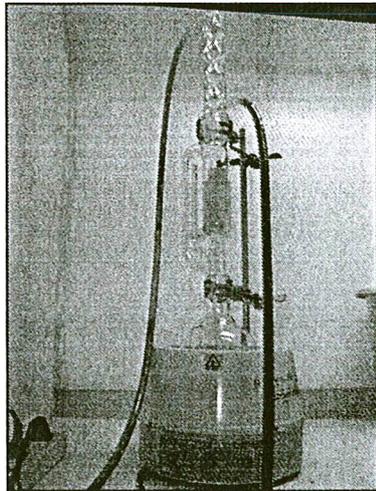
สามารถเก็บรักษาสารสกัดให้นานยิ่งขึ้นและเป็นการเพิ่มความเข้มข้นให้สารสกัดด้วยเครื่อง Lyophilizer สามารถเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นานจนกว่าจะใช้เป็น เวลาอย่างน้อย 1 ปี

สูตรการคำนวณหาค่า % yield ของสารสกัดพืช (Phrompittayarat และคณะ, 2007) เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดที่ได้กับปริมาณสารตั้งต้น เพื่อให้เราทราบต้นทุนการผลิตในแต่ละ ครั้ง

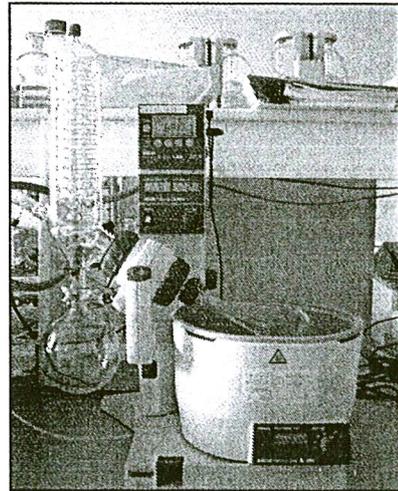
$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดพืช}}{\text{น้ำหนักแห้งของพืชสมุนไพร}} \times 100$$

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

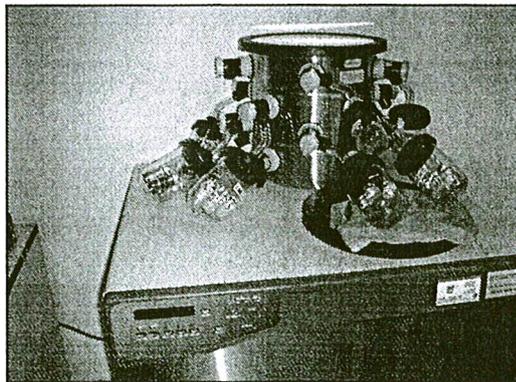
A



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 ทำการเมตาตามตรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ 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 ส่วนอีกด้านหนึ่งผูกเงื่อนตายที่ปลายไหมให้ยาว อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างมดลูก และการแยก longitudinal strips ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกได้

การวัดแรงในการหดตัว

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

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการบันทึกข้อมูลนั้น แรงดึงที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการหดหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อจะส่งผ่าน transducer ซึ่ง transducer จะส่งสัญญาณผ่านต่อไปยัง bridge amplifier และมีการแปลงสัญญาณต่อโดยเครื่อง PowerLab ให้เป็นความสัมพันธ์ระหว่างแรงดึงและเวลาซึ่งจะถูกอ่านและบันทึกโดยโปรแกรม Chart Recorder และแสดงให้เห็นบนจอคอมพิวเตอร์ สำหรับอุปกรณ์ในการทดลองแสดงไว้ในภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

การทดลองที่ 2: ศึกษาผลของสารสกัดในการคุมกำเนิด

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูสีขาวสายพันธุ์ Wistar เพศเมียน้ำหนัก 200-300 กรัม และเพศผู้ น้ำหนัก 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 จากนั้นแบ่งกลุ่มหนูต้องออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 3-4 ตัว ดังนี้

- | | |
|------------|---|
| กลุ่มที่ 1 | ป้อนสารละลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร |
| กลุ่มที่ 2 | ป้อนสารละลาย 17 α -ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร |
| กลุ่มที่ 3 | ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร |
| กลุ่มที่ 4 | ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว 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 จุดบันทึกการเปลี่ยนแปลงของมดลูก น้ำหนัก และจำนวนตำแหน่งที่มีการฝังตัว เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การป้องกันการฝังตัว (Williamson, Okaka และ Evan, 1996)

เปอร์เซ็นต์การป้องกันการฝังตัว =

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

2. ระยะที่ 2 ของการตั้งท้อง (Post-implantation): เริ่มป้อนสารสกัดเอื้องหมายนาให้แก่หนูที่มีอายุการตั้งครรภ์ 8 วัน เป็นระยะเวลา 7 วัน และเก็บผลการทดลองในวันที่ 20 จุดบันทึกการเปลี่ยนแปลงของมดลูก 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 คือหนูที่ผ่า
เปิดหน้าท้องแต่ไม่ได้ตัดแยกรังไข่
ออก) | ป้อนสารละลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
เป็นหนูกลุ่ม positive control , n = 9 |
|--|--|

กลุ่มที่ 2 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นหนูกลุ่ม negative control , n = 10
กลุ่มที่ 3 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลาย 17 α -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

$$\text{น้ำหนักมดลูกเปียกสัมพัทธ์} = \text{น้ำหนักมดลูก} / (\text{น้ำหนักตัว} \times 100)$$

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

คำนวณสำคัญทางสถิติวิเคราะห์โดย one way ANOVA และกำหนดค่าสำคัญที่ $P < 0.05$ จากนั้นแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อน

การทดลองที่ 4: ศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอด

การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลาย 10% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 2 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลาย 17 α -ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 4 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลายสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 5 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 6 หนูตัดรังไข่	ป้อนสารละลายสารสกัดลำต้นเอื้องหมายนาความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ระยะเวลาในการทดลองทั้งหมด 8 สัปดาห์ ทำการสเมียร์ช่องคลอดเพื่อนำเซลล์มาตรวจ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

การวิเคราะห์เซลล์ช่องคลอด

เก็บตัวอย่างเซลล์ช่องคลอดในช่วงเช้าเริ่มตั้งแต่เวลา 8.00-11.00 น. โดยสอดทิป (tip) ที่บรรจุสารละลายซาลีนบัฟเฟอร์ (saline buffer) เข้าไปในช่องคลอดแล้วดูดเข้า-ออก นำของเหลวที่ได้ไปหยดลงบนแผ่นสไลด์และย้อมสีด้วยเมธิลีนบลู (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)