

องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบหึงเม่นและผลต่อมดลูกและ
ไขมันในซีรัมของหนูตัดรังไข่**

Phytochemical Constituents of *Crotalaria pallida* Ait. Leaf Extract and
Effects on Uterus and Serum Lipid Profiles of Ovariectomized Rats**

วิลาวณีย์ พร้อมพรหม* และ วรณชัย ชาแท่น
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Wilawan Promprom* & Wannachai Chatan
Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบหึงเม่นที่สกัดด้วยเอทานอลโดยเทคนิค GC-MS ศึกษาผลของสารสกัดต่อน้ำหนักและเนื้อเยื่อมดลูกและผลต่อไขมันในซีรัมของหนูตัดรังไข่ โดยใช้หนูขาวสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกตัดรังไข่ โดยให้รับสารสกัดจากใบหึงเม่นที่ปริมาณแตกต่างกันคือ 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบหึงเม่น มีสารประกอบทั้งหมด 14 ชนิด โดยมีสารที่พบในปริมาณมากและระบุชื่อได้ คือ 9,12,15-Octadecatrienoic Acid ($C_{20}H_{34}O_2$) ส่วนสารสกัดจากใบหึงเม่นทั้งสองปริมาณไม่สามารถเพิ่มน้ำหนักของมดลูกเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับ 17 α -Ethyl Estradiol ได้ ด้านการศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อมดลูก พบว่าหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหึงเม่นทั้งสองปริมาณ ไม่มีการเพิ่มการแบ่งเซลล์เยื่อผิวของชั้น Endometrium อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากใบหึงเม่นที่ปริมาณ 500 มก./กก. น้ำหนักตัวสามารถทำให้ระดับ Low-Density Lipoprotein ลดลงจากกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบหึงเม่นมีผลลดระดับไขมัน Low-Density Lipoprotein ของหนูตัดรังไข่ได้

คำสำคัญ: องค์ประกอบทางพฤกษเคมี หึงเม่น เนื้อเยื่อมดลูก ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: wipromprom@gmail.com

องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบหึงเม่นและผลต่อมดลูกและ
ไขมันในซีรัมของหนูตัดรังไข่

**งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

Abstract

The aim of this study was to investigate active components of an ethanolic leaf extract of *Crotalaria pallida* by GC-MS and to study the effects of leaf extracts on uterine weight, uterine tissues and serum lipid levels. Ovariectomized Sprague Dawley rats were administrated with *C. pallida* leaf extracts at different doses (250 and 500 mg/kg body weight). These rats were treated for 14 days. Fourteen phytochemical constituents were identified, and the major chemical constituent that could be identified was 9,12,15-octadecatrienoate ($C_{20}H_{34}O_2$). *C. pallida* leaf extracts at both doses could not increase uterine weight when compared with normal rats and ovariectomized rats treated with 17 α -ethyl estradiol. In the histological study of uteri, the two doses of plant extracts could not increase endometrial epithelium cells of ovariectomized rats. However, the leaf extracts at the dose of 500 mg/kg body weight decreased low-density lipoprotein when compared with the OVX group ($P<0.05$). These results indicate that the leaf extract from *C. pallida* could decrease low-density lipoproteins of ovariectomized rats.

Keyword: Phytochemical Constituents, *Crotalaria pallida* Ait., Uterus Tissue, Low-Density Lipoprotein

บทนำ

ภาวะหมดประจำเดือน (Menopause) หมายถึง จุดช่วงชีวิตที่ไม่มีประจำเดือนเป็นระยะเวลาหนึ่งปีเต็ม อันเป็นผลจากการที่รังไข่หยุดทำงานถาวร โดยปกติภาวะหมดประจำเดือนจะเริ่มเกิดขึ้นช่วงอายุเฉลี่ยระหว่าง 45 ถึง 55 ปี (Sidhu et al., 2005) ทำให้การสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงและเกิดความไม่สมดุลของฮอร์โมนเอสโตรเจนขึ้น ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดอาการความผิดปกติหลังหมดประจำเดือน ซึ่งมีผลต่อขบวนการเมแทบอลิซึมของไขมันไม่สมดุล และทำให้มีไขมันในเลือดสูงเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และโรคหลอดเลือดหัวใจ นำไปสู่ความผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือด (Swarnalatha & Ebrahim, 2012) หรือมีอาการร้อนวูบวาบ รวมทั้งความผิดปกติเกี่ยวกับอวัยวะเพศ (มดลูก ช่องคลอด) และอวัยวะทางเดินปัสสาวะฝ่อและแห้งด้วย (Thurston & Joffe, 2011) แนวทางในการรักษาภาวะความผิดปกตินี้อาจมีการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (Hormone Replacement Therapy (HRT) and Estrogen Replacement Therapy (ERT) แต่จากการศึกษาวิจัยในปัจจุบันพบว่า การรักษาด้วยฮอร์โมนเป็นระยะเวลานานติดต่อกันประมาณ 5 - 10 ปีขึ้นไปจะส่งผลทำให้มีอัตราเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านม มะเร็งมดลูก และมะเร็งรังไข่ (Wuttke et al., 2003; Wagner & Anthony, 2001)

ด้วยเหตุนี้ ในปี ค.ศ. 2002 ทางองค์กร Women's Health Initiative (WHI) ในสหรัฐอเมริกา จึงได้ประกาศยกเลิกการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ทดแทนให้กับผู้ป่วยเป็นระยะเวลานาน (Wuttke et al., 2008) ดังนั้น ในปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์จึงสนใจศึกษาไฟโตรเอสโตรเจน (Phytoestrogens) เพื่อใช้ในการทดแทนฮอร์โมนที่ผิดปกติของผู้หญิงในภาวะหมดประจำเดือน เนื่องจากไฟโตรเอสโตรเจนเป็น สารที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน และไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงหรือมีผลข้างเคียงน้อย ไฟโตรเอสโตรเจน ซึ่งได้จากพืช พบได้ทั้งในผักและผลไม้ แต่ส่วนใหญ่มักเป็นพืชวงศ์ถั่ว (Bou et al., 2003) ในระหว่าง การศึกษาวิจัยความหลากหลายของพรรณไม้ในอุทยานแห่งชาติภูแลงคา ได้พบพรรณไม้ในวงศ์ถั่วที่มีความหลากหลาย (Promprom & Chatan, 2015; Saisaard et al., 2015) จึงเป็นพืชในกลุ่มที่น่าสนใจ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้พืชหังเม่น (*Crotalaria pallida* Aiton) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) พืชชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบสารพฤกษเคมี ของทั้งต้นหังเม่น ที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แอลกอฮอล์ เอทิลอะซิเตท และน้ำ คือแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน ฟีนอล สเตอรอยด์ และแทนนิน โดยตัวทำละลายที่แสดงสารพฤกษเคมี มากที่สุดคือ แอลกอฮอล์ (Govindappa et al., 2011) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับใบหังเม่นในการหาค่าประกอบทางพฤกษเคมีที่สกัดด้วย เอทานอลที่ใช้เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) และความสัมพัทธ์กับระบบ สืบพันธุ์ หรือการเป็นพืชในกลุ่มที่มีไฟโตรเอสโตรเจน หรือการใช้พืชหังเม่นในการรักษาอาการหลังหมด ประจำเดือน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าประกอบทางพฤกษเคมีจากสารสกัดใบหังเม่น ศึกษาสารสกัดจากใบหังเม่นต่อน้ำหนักมดลูก ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อมดลูก รวมทั้งศึกษา ระดับไขมันในซีรัมของหนูขาววัยเจริญพันธุ์ที่ถูกตัดรังไข่ ซึ่งเป็นสัตว์ตัวแบบของผู้หญิงในวัยหมดประจำเดือน และข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะได้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมทางวิทยาศาสตร์ในการยืนยันถึงประสิทธิภาพในการใช้ สมุนไพรในการรักษาต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาค่าประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบหังเม่นด้วยเทคนิค GC-MS
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบหังเม่นต่อน้ำหนักและเนื้อเยื่อมดลูกของหนูตัดรังไข่
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบหังเม่นต่อระดับไขมันในซีรัมของหนูตัดรังไข่

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัด

ตัวอย่างพรรณไม้หึ่งเม่นในการวิจัยครั้งนี้ เก็บจากอุทยานแห่งชาติภูแล้งคา จังหวัดนครพนม ในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2554 ทำการระบุชนิดพืชและเปรียบเทียบตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง คือ W. Chatan 1094 เก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ขั้นตอนการสกัดสารจากพืชทำโดยนำใบหึ่งเม่นล้างทำความสะอาดเอาเศษดินออกให้หมด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสให้แห้งเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อรา เมื่อแห้งสนิทแล้วจึงนำมาบดให้บดเป็นผง นำผงดังกล่าวไปหมักในเอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย อัตราส่วน 1:4 (น้ำหนัก:ปริมาตร) หมักเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นลดความดัน (Rotary Evaporator) กระบวนการสุดท้ายคือ การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer ได้สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวข้น เก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และได้ค่า % yield ของสารสกัดจากใบหึ่งเม่นมีค่าเท่ากับ 23.70%

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบหึ่งเม่นด้วยเทคนิค GC-MS

สารสกัดจากใบของหึ่งเม่นนำมาวิเคราะห์เพื่อหาสารสำคัญทางเคมีด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) สภาวะของเครื่อง GC (ยี่ห้อ Agilent Technology, รุ่น GC 7890A, USA) ใช้การฉีดที่ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ในส่วนของคอลัมน์ที่ใช้คือ HP-5MS 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m Film Thickness ตั้งอัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเข้าคอลัมน์เป็น 1.0 มิลลิเมตรต่อนาที ส่วนอุณหภูมิคอลัมน์จะตั้งโปรแกรมโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 50 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลาวิเคราะห์นาน 40 นาที ส่วน MS (ยี่ห้อ Agilent Technology, รุ่น MSD 5975C, USA) เป็น MS Quadrupole ที่ต่อกับ GC โดยตรง ซึ่งผ่านส่วนเชื่อมต่อ (Transfer Line) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของ Ion Source เป็น 230 องศาเซลเซียสในระบบ Electron Impact Ionization (EI) และในระบบ Scan Mode ในช่วง Mass 30 ถึง 500 AMU (Atomic Mass Unit) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Institute of Standard and Technology (NIST) and Wiley Libraries

3. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200 - 250 กรัม จำนวน 30 ตัว ได้มาจากสำนักสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำหนูมาพักก่อนทำการทดลอง 1 สัปดาห์ ในห้องที่มีอุณหภูมิห้องประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียสความชื้นสัมพัทธ์ 45% - 50% เลี้ยงหนูในกรงที่ปลอดเชื้อ มีความมืด/สว่าง 12/12 ชั่วโมง ให้กินอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตามที่ต้องการ (Ad Libitum) ตลอดระยะเวลาของการทดลอง วิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เลขที่รับรอง 0004 / 2555

หลังจากนั้นทำการตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง โดยกระทำภายหลังจากการทำให้หนูสลบด้วยยาเพนโทบาร์บิทอล โซเดียม (Pentobarbital Sodium) ทำการผ่าเปิดลำตัวด้านข้างทั้งสองข้างและใช้ปากคีบคีบรังไข่ออกมา พร้อมทั้งทำการตัดรังไข่ออกหลังจากนั้นทำการเย็บแผลให้สนิท ให้พักสัตว์ทดลอง 14 วันหลังทำการผ่าตัด แล้วนำมาป้อนสารสกัดจากใบหิรัญเม่น

4. การดำเนินการทดลอง

4.1 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบหิรัญเม่นต่อน้ำหนักมดลูกหนูโดยวิธี Uterotrophic Assay และลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อมดลูก

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม จำนวน (n=6) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูปกติที่ได้รับ 1 % Tween 80 วันละ 1 มิลลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 2 หนูผ่าตัดรังไข่ (Ovariectomized control; OVX) ที่ได้รับ 1% Tween 80 วันละ 1 มิลลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 3 หนูผ่าตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมน 17α -Ethinyl Estradiol ปริมาณ 0.1 มก./กก.น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 4 หนูผ่าตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหิรัญเม่นปริมาณ 250 มก./ กก.น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 5 หนูผ่าตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหิรัญเม่นปริมาณ 500 มก./ กก.น้ำหนักตัว

โดยหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม นี้ถูกให้สารละลายหรือฮอร์โมนหรือสารสกัดทุกวันติดต่อกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน บันทึกน้ำหนักตัวก่อนและเสร็จสิ้นการทดลอง ทำการสับหนูแล้วทำการผ่าตัด เพื่อแยกมดลูกมาชั่งน้ำหนักทันที สำหรับการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมดลูกมาศึกษาลักษณะทาง จุลกายวิภาค แล้วนำมาคงสภาพในน้ำยา Neutral Buffered Formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา ผ่านขั้นตอนทางพยาธิเทคนิค แล้วตัดชิ้นเนื้อหนาประมาณ 6 ไมครอน และนำมาย้อมสี Hematoxylin and Eosin นำสไลด์ที่ได้มาศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Rimoldi, 2007)

4.2 การตรวจวิเคราะห์ไขมันในซีรัม

เก็บเลือดจากหัวใจของสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม นำเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกเม็ดเลือดแดง และซีรัมออกจากกัน และเก็บซีรัมไว้ที่ อุณหภูมิ 2 - 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวัดระดับไขมัน โดยทำการตรวจวัดระดับ Total Cholesterol, High Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein และ Triglyceride ด้วยเครื่อง Advia Centaur Cp (BAYER)

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) และ ความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (Standard Error Of Means, SEM) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองวิเคราะห์โดย One Way ANOVA ตามด้วย Post-hoc Duncan Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบหิ๋งเม่น ด้วยเทคนิค GC-MS

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบหิ๋งเม่น ด้วยวิธีการ Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่าสารสกัดจากใบหิ๋งเม่นที่สกัดด้วยเอทานอล ประกอบด้วยสารประกอบทั้งหมดพบว่ามีสารทั้งหมด 14 ชนิดแต่สามารถระบุชื่อได้ 8 ชนิด โดยมีสารที่พบในปริมาณมากและระบุชื่อได้คือ คือ 9,12,15-Octadecatrienoate (14.52 %) จัดอยู่ในกลุ่มไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารประกอบเคมีจากสารสกัดใบหิ๋งเม่นด้วยเทคนิค GC-MS

ลำดับ	สารประกอบเคมี	Retention Time	Peak Area	%Peak Area
1.	Unidentified	5.00	6533576	2.145
2.	Unidentified	9.28	3847956	1.263
3.	Unidentified	11.46	84024313	27.58
4.	Nitrocyclopentane Formula: $C_5H_9NO_2$; MW: 115	13.27	6213988	2.040
5.	Methanone Formula: $C_{13}H_{10}O_3$; MW: 214	18.80	22011841	7.22
6.	Unidentified	19.50	26717506	8.77
7.	Unidentified	19.19	9266296	3.04
8.	Unidentified	19.34	27418684	9.00
9.	Palmitic Acid Formula: $C_{16}H_{32}O_2$; MW: 256	22.46	11560724	3.79
10.	Ethyl Palmiate Formula: $C_{18}H_{36}O_2$; MW: 284	22.85	28869148	9.48
11.	3,7,11,15-Tetramethyl-2-Hexadecen-1-ol Formula: $C_{20}H_{40}O$; MW: 292	24.45	17746262	5.83
12.	9,12-Octadecadienoic Acid Formula: $C_{18}H_{32}O_2$; MW: 280	25.11	10808895	3.55
13.	9,12,15-Octadecatrienoic Acid Formula: $C_{20}H_{34}O_2$; MW: 306	25.21	44218121	14.52
14.	Ethyl Octadecanoate Formula: $C_{20}H_{40}O_2$; MW: 312	25.53	5363496	1.76

2. ผลของสารสกัดใบหิ่้งเเมนต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักมดลูก และลักษณะเนื้อเยื่อของมดลูก

2.1 ผลของสารสกัดใบหิ่้งเเมนต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักมดลูก

น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูตัวต้งไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหิ่้งเเมนปริมาณ 250 และ 500 มก./กก.น้ำหนักตัว พบว่าน้ำหนักตัวเท่ากับ 245.00 ± 5.62 กรัมและ 250.00 ± 3.65 กรัม แตกต่างจากหนูปกติ และหนูตัวต้งไข่ที่ได้รับ 17 α -Ethinyl Estradiol ปริมาณ 0.1 มก./กก. น้ำหนักตัว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ผลของสารสกัดจากใบหิ่้งเเมนไม่สามารถลดน้ำหนักตัวของหนูตัวต้งไข่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อให้สารสกัดจากใบหิ่้งเเมนปริมาณ 250 และ 500 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน พบว่าน้ำหนักของมดลูกเท่ากับ 0.062 ± 0.09 กรัมและ 0.049 ± 0.00 กรัม ไม่แตกต่างจากหนูตัวต้งไข่ ดังแสดงในตารางที่ 2

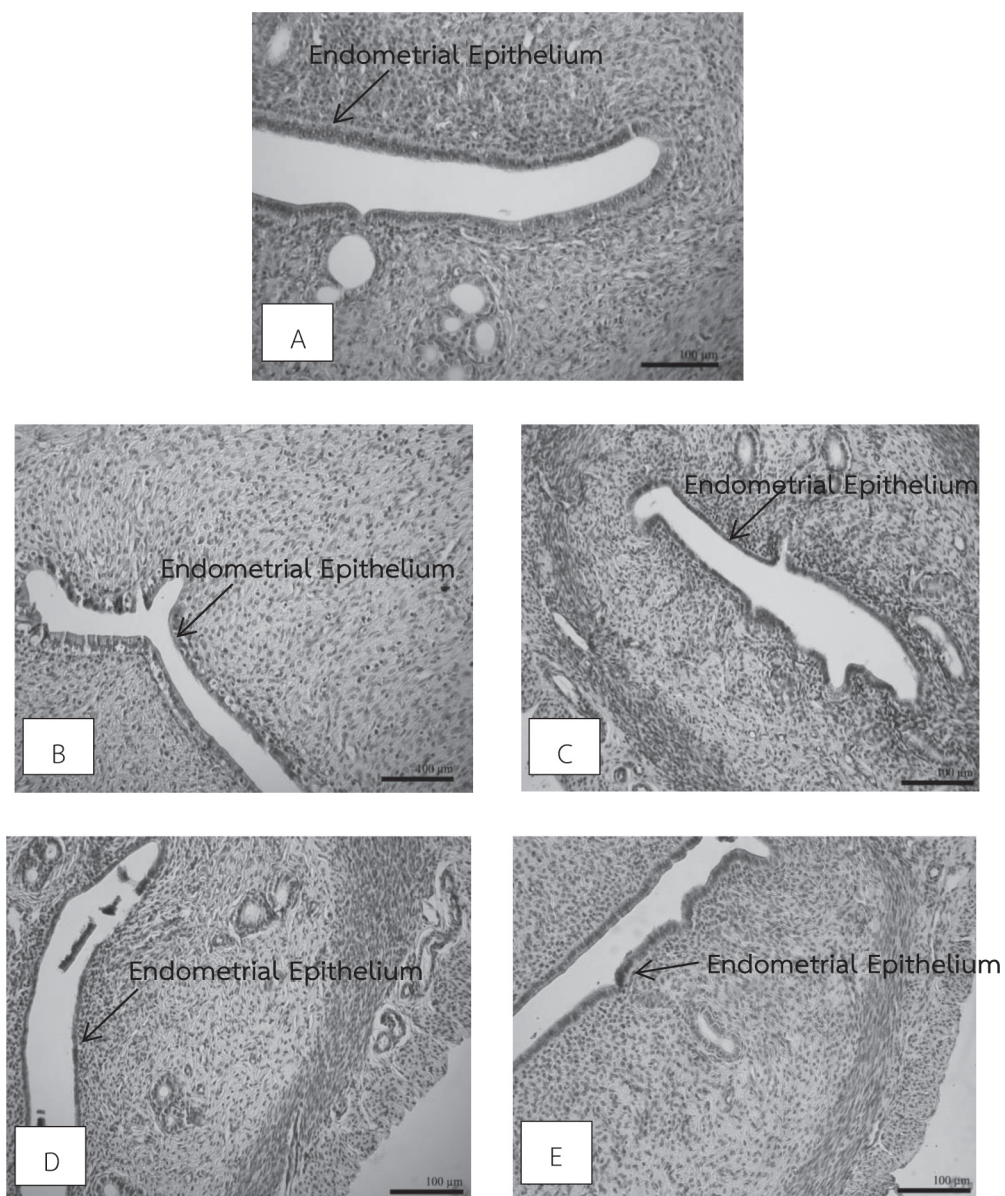
ตารางที่ 2 น้ำหนักตัวและน้ำหนักสัมพันธ์ของมดลูกที่ได้รับสารสกัดจากใบหิ่้งเเมน

กลุ่ม (มก./กก. น้ำหนักตัว)	น้ำหนักตัว (กรัม)		น้ำหนัก สัมพันธ์ (กรัม)
	น้ำหนักตัวเริ่มต้น	น้ำหนักตัวสุดท้าย	มดลูก
- หนูปกติ	203.33 $\pm$ 2.10	228.33 $\pm$ 4.77 ^a	0.287 $\pm$ 0.41 ^a
- หนูตัวต้งไข่ (OVX)	200.00 $\pm$ 0.00	257.50 $\pm$ 3.59 ^c	0.037 $\pm$ 0.00 ^c
- 17 α -Ethinyl Estradiol 0.1 มก.	200.00 $\pm$ 0.00	198.33 $\pm$ 6.14 ^b	0.168 $\pm$ 0.11 ^b
- หนูตัวต้งไข่ที่ได้รับ			
-C. pallida 250 มก.	201.67 $\pm$ 1.05	245.00 $\pm$ 5.62 ^c	0.062 $\pm$ 0.09 ^c
-C. pallida 500 มก.	202.50 $\pm$ 1.11	250.00 $\pm$ 3.65 ^c	0.049 $\pm$ 0.00 ^c

หมายเหตุ : a,b,c แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในกลุ่ม Mean $\pm$ SD

2.2 ผลของสารสกัดใบหิ่้งเเมนต่อเนื้อเยื่อมดลูก

จากภาพที่ 1 ซึ่งเป็นภาพถ่ายจากไ้กล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของมดลูก จากตัวแทนของหนูทดลองแต่ละกลุ่มการทดลอง ภาพที่ 1 (A) แสดงลักษณะเนื้อเยื่อมดลูกของหนูปกติ ภาพที่ 1 (B) แสดงลักษณะเนื้อเยื่อมดลูกหนูตัวต้งไข่ที่ได้รับ 17 α -Ethinyl Estradiol ปริมาณ 0.1 มก./กก. น้ำหนักตัว ที่มีการขยายตัว (Hypertrophic) ของเนื้อเยื่อบุผิวชั้นในและมีการเจริญของเนื้อเยื่อเกินปกติ (Hyperplastic) ภาพที่ 1 (C) แสดงลักษณะเนื้อเยื่อมดลูกหนูตัวต้งไข่ที่ได้รับ 1% Tween 80 ซึ่งเนื้อเยื่อบุผิวชั้นใน (Endometrium) ของเนื้อเยื่อมดลูกเกิดภาวะฝ่อลีบ ยิ่งไปกว่านั้นไม่พบมีการแบ่งเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวชั้นใน ภาพที่ 1 (D และ E) แสดงลักษณะเนื้อเยื่อมดลูกหนูตัวต้งไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหิ่้งเเมนปริมาณ 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งเนื้อเยื่อบุผิวชั้นในของมดลูกมีภาวะฝ่อลีบ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบหิ่้งเเมนไม่สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อบุผิวเกิดการเพิ่มหรือขยายตัวได้



ภาพที่ 1 ภาพตัดกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะทางจุลกายวิภาคของมดลูกหนูตัดรังไข่ย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin (The Bar Equals 100 μ m) (A) = หนูปกติ; (B) = หนูตัดรังไข่ที่ได้รับ 17α -Ethinyl Estradiol (0.1 มก./กก. น้ำหนักตัว); (C) = หนูตัดรังไข่ (OVX); (D) = หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหิંગเม่น (250 มก./กก. น้ำหนักตัว); (E) = หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหิંગเม่น (500 มก./กก. น้ำหนักตัว)

3. ผลของสารสกัดใบหิ้งเม่นต่อกลุ่มไขมันในซีรัม

หนูตัวเต็มวัยที่ได้รับสารสกัดจากใบหิ้งเม่นปริมาณ 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัวพบว่า มีระดับคอเลสเตอรอลไม่แตกต่างกันจากหนูทดลองทุกกลุ่ม หนูตัวเต็มวัยที่ได้รับ 17α -Ethinyl Estradiol ปริมาณ 0.1 มก./กก น้ำหนักตัว มีระดับไตรกลีเซอไรด์ (149.50 ± 5.78 มก./ดล.) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากในทุกกลุ่ม ระดับไขมัน High Density Lipoprotein ทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน และระดับไขมัน Low Density Lipoprotein ของหนูตัวเต็มวัยที่ได้รับสารสกัดจากใบหิ้งเม่นที่ขนาด 500 มก./กก. น้ำหนักตัว มีระดับ Low Density Lipoprotein (43.83 ± 2.78 มก./ดล.) ลดลงแตกต่างจากทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 ระดับไขมันของหนูตัวเต็มวัยที่ได้รับสารสกัดจากใบหิ้งเม่น

กลุ่ม	กลุ่มไขมัน (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)			
	Total Cholesterol	Triglyceride	HDL-Cholesterol	LDL-Cholesterol
- หนูปกติ	120.50 $\pm$ 5.9	131.83 $\pm$ 2.4	42.67 $\pm$ 3.43	51.83 $\pm$ 5.22
- หนูตัวเต็มวัย (OVX)	119.50 $\pm$ 3.7	128.50 $\pm$ 6.16	43.83 $\pm$ 1.83	53.67 $\pm$ 4.49
- 17α -ethinyl estradiol 0.1 มก.	121.83 $\pm$ 2.8	149.50 $\pm$ 5.78 ^a	41.83 $\pm$ 5.89	50.67 $\pm$ 6.36
- หนูตัวเต็มวัยที่ได้รับ				
-C. pallida 250 มก.	123.33 $\pm$ 3.43	133.33 $\pm$ 4.03	37.67 $\pm$ 4.04	59.33 $\pm$ 4.49
-C. pallida 500 มก.	114.16 $\pm$ 2.2	126.00 $\pm$ 2.54	42.50 $\pm$ 2.04	43.83 $\pm$ 2.78 ^a

หมายเหตุ : a, b, c แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในกลุ่ม Mean $\pm$ SD

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษานี้ประกอบทางพิษวิทยาของสารสกัดใบหิ้งเม่นด้วยเทคนิค GC-MS พบสาร 14 ชนิด แต่สามารถระบุชื่อได้ 8 ชนิดคือ Nitrocyclopentane, Methanone, Palmitic Acid, Ethyl Palmiate, 3,7,11,15-Tetramethyl-2-Hexadecen-1-ol, 9,12-Octadecadienoic Acid, 9,12,15-Octadecatrienoate และ Octadecanoic Acid ซึ่งจำนวนชนิดสารที่พบน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษานี้กับรายงานองค์ประกอบทางพิษวิทยาในใบหิ้งเม่นที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (Ukil et al., 2016) ซึ่งพบสารทั้งหมด 28 ชนิด แต่ผลการศึกษานี้ได้พบสารแตกต่างเพิ่มเติมอีก 6 ชนิดคือ Nitrocyclopentane, Methanone, 3,7,11,15-Tetramethyl-2-Hexadecen-1-ol, 9,12-Octadecadienoic Acid, 9,12,15-Octadecatrienoate และ Octadecanoic Acid ซึ่งสารทั้ง

6 ชนิดเป็นรายงานพบครั้งแรกในใบหึงเม่นที่สกัดด้วยเอทานอลด้วยเทคนิค GC-MS สาเหตุที่ชนิดของสารต่างกันอาจจะเนื่องมาจากการวิจัยในครั้งนี้ใช้พืชคนละท้องถิ่น และใช้ตัวทำละลายในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการหาสารสกัดในพืชบางชนิดในสกุล *Crotalaria* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Leguminosae คือเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของโครงสร้างที่อยู่เหนือดินของพืช (รวมทั้งใบด้วย) ใน *C. longipes* (Paulpriya et al., 2014) ซึ่งพบสารทั้งหมด 25 ชนิดแต่ไม่พบสารชนิดเดียวกันกับที่พบในการศึกษาครั้งนี้เลย เมื่อเปรียบเทียบผลการหาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีในเมล็ดของ *C. juncea* (Al-Snafi, 2016) พบว่ามี Palmitic Acid เหมือนกันแต่มีความเข้มข้นของสารนี้ในเมล็ดมากกว่าใบ (16.0-18.09 % : 3.79 %) และเปรียบเทียบชนิดสารองค์ประกอบทางพฤกษเคมีในเมล็ด *C. retusa* (Aremu et al., 2012) พบว่ามี Palmitic Acid เท่ากันที่เหมือนกัน โดยในเมล็ดของ *C. retusa* พบ 7.25 % และในใบ *C. pallida* พบ 3.79 %

เมื่อตัดรังไข่ของหนูกอกทั้งสองข้างจะส่งผลทำให้วงจรการเป็นสัดเกิดการเปลี่ยนแปลง คือไม่เกิดการตกไข่ เนื้อเยื่อมดลูกและช่องคลอดบางแห้ง และเหี่ยวซึ่งเป็นอิทธิพลมาจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการรักษาให้เนื้อเยื่อมดลูกและช่องคลอดมีสุขภาพดี (Rimoldi et al., 2007; Branco et al., 2005) การศึกษาผลของสารสกัดจากใบหึงเม่นต่อน้ำหนักของมดลูกในหนูตัดรังไข่ ซึ่งเป็นสัตว์ตัวแบบของภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน เป็นการใช้ศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนต่อน้ำหนักมดลูก (Laws et al., 2000) การวัดน้ำหนักมดลูกโดยวิธี Uterotrophic Assay ในหนูขาวเพศเมีย เป็นวิธีการดูผลจากการกระตุ้นให้มดลูกของหนูตัดรังไข่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขนาดขึ้น ซึ่งน้ำหนักมดลูกที่เพิ่มขึ้นเป็นดัชนีชี้วัดฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของพืชได้ (Sonnenchein & Soto, 1998) โดยในการทดลองนี้ มดลูกหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหึงเม่นทั้งสองปริมาณมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูกเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างจากหนูตัดรังไข่ แสดงให้ว่าสารสกัดจากใบหึงเม่นอาจไม่มีฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน และในขณะเดียวกันปริมาณสารสกัดที่ให้คือ 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว ทำให้มีน้ำหนักมดลูกต่ำกว่าหนูตัดรังไข่ที่ได้รับ 17α -Ethinyl Estradiol ปริมาณ 0.1 มก./กก. น้ำหนักตัว มาก เมื่อเปรียบได้กับงานวิจัยของ Cordial et al. (2006) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของสารสกัดจากพืชวงศ์ถั่วคือ ถั่วเสียนป่า (*Pueraria phaseoloides*) ที่ทดสอบในหนูตัดรังไข่โดยวิธี Uterotrophic Assay พบว่าสารสกัดจากลำต้นและใบของถั่วเสียนป่าในปริมาณ 525 มก./กก. น้ำหนักตัว มีผลทำให้น้ำหนักมดลูกเพิ่มขึ้น ไม่แตกต่างจากหนูตัดรังไข่และน้ำหนักมดลูกต่ำกว่าหนูตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมนแสดงให้เห็นว่าถั่วเสียนป่าในปริมาณ 525 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่มีฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน

ในขณะเดียวกันวัยหมดประจำเดือนอาจนำไปสู่ความผิดปกติของการเผาผลาญคอเลสเตอรอล อันเนื่องมาจากฮอร์โมนเอสโตรเจนมีปริมาณลดลง (Mili et al., 2004) หนูตัดรังไข่ถูกนำมาใช้แทนสภาวะวัยหมดประจำเดือน จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบหึงเม่นต่อซีรัมไขมันในหนูตัดรังไข่ โดยการป้อนสารสกัดขนาด 500 มก./กก. น้ำหนักตัว พบว่าสารสกัดจากใบหึงเม่นสามารถลดระดับ Low Density Lipoprotein ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในสารสกัดจากใบหึงเม่นพบกรดไขมันคือ 9,12,15-

Octadecatrienoic Acid (Linolenic Acid Ethyl Ester) และ 9,12-Octadecadienoic (Linoleic Acid) โดยที่กรดไขมัน 2 ชนิดนี้มีรายงานการศึกษาว่ามีฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดด้วย (Sudha et al., 2013) จึงอาจทำให้สามารถเผาผลาญไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ ในสภาวะที่ขาดเอสโตรเจนในหนูตัวเมียได้ ผลการทดลองในครั้งนี้เมื่อเทียบกับผลการศึกษาของ Kumar et al. (2014) ที่ให้สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล จากพืชในสกุลเดียวกันคือ *C. juncea* ที่มีกรดไขมัน Linoleic ด้วยสามารถทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ คอลเลสเตอรอล และ Low-Density Lipoprotein ลดลงได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สารสกัดจาก *C. juncea* มีฤทธิ์คล้ายกันกับ *C. pallida* จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบหึงเม่นสามารถ ลดระดับ Low-Density Lipoprotein ในเลือดได้ ซึ่งความเป็นพิษและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจาก ใบหึงเม่นควรมีการศึกษาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางเภสัชวิทยาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบหึงเม่น ด้วยเทคนิค GC-MS ควรมีการศึกษาโดยใช้เทคนิค LC-MS ควบคู่กันด้วยเพื่อสามารถระบุสารเคมีได้ครบถ้วน
2. สารสกัดจากใบหึงเม่นพบสาร Linoleic Acid ในเปอร์เซ็นต์ที่ไม่มากโดยที่สารนี้ส่งผลต่อการลด ไขมัน Low Density Lipoprotein ในเลือดด้วยนั้น อาจพบในพืชชนิดอื่นได้ด้วย ควรศึกษาสารสกัดจากพืช ในสกุลนี้หรือวิธีการสกัดแบบอื่นเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นยาในการลดระดับไขมันของผู้หญิงหมดประจำเดือน ต่อไป

References

- Aremu, O. M., Bamidele, O. T. & Amokaha, A. J. (2012). Compositional Studies of Rattle Box (*Crotalaria retusa* L.) Seeds Found in Nasarawa State, Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(10), 978-983.
- Al-Snafi, E. A. (2016). The contents and pharmacology of *Crotalaria juncea* -A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(6), 77-86.
- Bou, S. M., Wiese, T., Nehls, S., Burow, M. E., Elliott, S., Carter-Wientjes, C. H., Shih, B. Y., Mclachlan, J. A. & Cleveland, T. E. (2003). Evaluation of the Estrogenic Effects of Legume Extracts Containing Phytoestrogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2193-2199.
- Branco, C. C., Cancelo, M. J., Villero, J., Nohales, F. & Julia, M. D. (2005). Management of post-menopausal vaginal atrophy an atrophic vaginitis. *Maturitas*, 52, 46-52.

- Cordial, R. R., Baxa-Daguplo, M. B., Fermanes, M. S. P., Garcia, A. S., Clavel, M. M. R., Herradura, O. M., Javier, J. C. & Santos, R. R. (2006). Estrogenic Activity of *Pueraria phaseoloides* Roxb. Benth Evaluated in Ovariectomized Rats. *Philippine Journal of Science*, 135(1), 38-48.
- Govindappa, M., Bharath, N., Shruthi, H. B., Sadannanda, T. S. & Sharanappa. (2011). Antimicrobial, antioxidant and in Vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of *Crotalaria pallida* Aiton. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(21), 2359-2371.
- Kumar, D. D., David, B., Harani, A. & Vijay, B. (2014). Role of an ethanolic extract of *Crotalaria juncea* L. on high-fat diet-induced hypercholesterolemia. *Scientia Pharmaceutica*, 82(2), 256-262.
- Law, S. C., Carey, S. A., Ferrell, J. M., Bodman, G. J. & Cooper, R. L. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicology Science*, 54, 154-167.
- Mili, R., Pacillio, M., Raso, G. M., Esposito., Coppola, A. & Nasti, A. (2004). Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology*, 145, 3115-3121.
- Paulpriya, K., Tresina, P. S. & Mohan, V. R. (2014). Assessment of Bioactive Constituents by GC-MS of *Crotalaria longipes* Wight & Arn. : An Endemic Plant. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 1043-1048.
- Promptom, W. & Chatan, W. (2015). Diversity and Folk Medicinal Uses of Shrub, Subshrub and Woody Climber in the Family Leguminosae in Phu Langka National Park, Nakhon Phanom Province. *Journal of Science and Tecnology Mahasarakham University*, 34(5), 431-444.
- Rimoldi, G., Christoffel, J., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H. & Wuttke, W. (2007). Effect of Chronic Genistein Treatment in Mammary gland Uterus and Vagina. *Environmental Health Perspective*, 115, 61-68.
- Saisaard, P., Chatan, W. & Maneechai, S. (2015). Diversity of the Genus *Bauhinia* L. in the North-East of Thailand. *SUD research Journal of Sciences and Technology*, 8(2), 87-115.

- Sidhu, S., Kaur, A. & Sidhu M. (2005). Age at Menopause in Educated Women of Amritsar (Punjab). *Journal of Human Ecology*, 18(1), 49-51.
- Sonnenschein, C. & Soto A. M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65, 143-150.
- Sudha, T., Chidambarampillai, S. & Mohan, V. R. (2013). GC-MS Analysis of bioactive components of aerial parts of *Kirganelia reticulata* Poir (Euphorbiaceae). *Journal of Current Chemical & Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 113-122.
- Swarnalatha, P. K. & Ebrahim, N. K. C. (2012). A Correlative Study of Estrogen and Lipid Profile in Premenopausal and Postmenopausal women. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 3(11), 818-822.
- Thurston, C. R. & Joffe, H. (2011). Vasomotor Symptoms and Menopause : Findings From the Study of Women's Health Across The Nation. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 38(3), 489-501.
- Ukil, S., Laskar, S. & Roy, N. R. (2016). Physicochemical characterization and antibacterial activity of the leaf oil of *Crotalaria pallida* Aiton. *Journal of Taibah University for Science*, 10, 490-496.
- Wagner, J. D. & Anthony M. S. (2001). Soy phytoestrogen: research on benefits and risks. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 44, 843-852.
- Wuttke, W., Jarry, H., Westphalen, S., Christoffel, V. & Seidlova-Wuttke, D. (2003). Phytoestrogen for hormone replacement therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 133-147.
- Wuttke, W., Jarry, H., Becker, T., Schultens, A., Christoffel, V., Gorkow, C. & Seidlova-Wuttke, D. (2008). Phytoestrogen: endocrine or replacement for hormone replacement therapy. *Maturitas*, 61(1-2), 159-170.

Translated Thai References

วิลาวณีย์ พร้อมพรม และ วรรณชัย ชาแท่น. (2558). ความหลากหลายของไม้พุ่ม ไม้กึ่งพุ่ม และไม้เถา เนื้อแข็งในวงศ์ถั่วและการใช้สมุนไพรพื้นบ้าน ในอุทยานแห่งชาติภูถ้ำกา จังหวัดนครพนม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, 34(5), 431-444.

พีระพล ไสสะอาด วรรณชัย ชาแท่น และ สุธิรา มณีฉาย. (2558). ความหลากหลายของพืชขงโค (*Bauhinia* L.) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. *วารสารวิจัย มสค สาขา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 8(2), 87-115.

คณะผู้เขียน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิลาวณีย์ พร้อมพรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

e-mail: wipromprom@gmail.com

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณชัย ชาแท่น

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

e-mail: wannachaichatan@gmail.com