

การใช้แนวทางเมทาโบลอมิกส์เพื่อศึกษาศักยภาพในการรักษาของยาสมุนไพรไทย: ผลของว่านชักมดลูกในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูแรท

Metabolomics approaches for evaluating therapeutic potential of Thai traditional medicine: Effect of *Curcuma comosa* in estrogen-deficient rats



รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง การใช้แนวทางเมทาโบลอมิกส์เพื่อศึกษาศักยภาพในการรักษาของยาสมุนไพรไทย:
ผลของว่านชักมดลูกในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูแรท

โดย นางสาวณิชาบูล ชายหาค และ นางสาวรัชณี ปานรักษ์
ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ



..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิษฐา พุดหอม)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี
วันที่ 21 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ	การใช้แนวทางเมทาโบลิมิกส์เพื่อศึกษาศักยภาพในการรักษาของยาสมุนไพรไทย: ผลของว่านชักมดลูกภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูแรท	
ชื่อนิสิตในโครงการ	1. นางสาวณิชาบูล ชัยหาดี	เลขประจำตัว 543 30913 23
	2. นางสาวรัชณี ปานรักษ์	เลขประจำตัว 543 31347 23
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน	
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557		

บทคัดย่อ

โรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่พบมากในหญิงวัยหมดประจำเดือนเนื่องจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ลดลงของหญิงในวัยนี้ เนื่องด้วยการเกิดโรคต่างๆ มักส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมทาโบลิตในร่างกายเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารเมทาโบลิตกับการเกิดโรคกระดูกพรุนโดยใช้วิธีการเมทาโบลิมิกส์ โดยศึกษาระดับของเมทาโบลิตในหนูที่มีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (OVX) เปรียบเทียบกับหนูในสภาวะปกติ (sham) และศึกษาประสิทธิภาพการรักษาหนูกลุ่ม OVX โดยใช้สารสกัดว่านชักมดลูกเปรียบเทียบกับ การรักษาด้วยสารโคเออร์ลิเซปทานอยด์บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักในว่านชักมดลูก ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลเมทาโบลิมิกส์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (untargeted metabolomics) และแบบจำเพาะเจาะจง (targeted metabolomics) โดยวิเคราะห์ปริมาณของไขมันชนิดต่างๆ ที่พบมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบการเปลี่ยนแปลงระดับของเมทาโบลิตจำนวน 202 และ 10 ไอออน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบหนูกลุ่ม OVX กับหนูกลุ่ม sham ส่วนประสิทธิภาพการรักษาหนูกลุ่ม OVX ด้วยสารสกัดที่ได้จากว่านชักมดลูกเทียบกับสารโคเออร์ลิเซปทานอยด์ พบว่า การรักษาด้วยสารสกัดที่ได้จากว่านชักมดลูกส่งผลให้ระดับเมทาโบลิตในหนูกลุ่ม OVX มีค่าใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม sham มากกว่าการรักษาหนูดังกล่าวด้วยสารโคเออร์ลิเซปทานอยด์บริสุทธิ์ แสดงถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารสกัดว่านชักมดลูกให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคกระดูกพรุนยิ่งขึ้นต่อไป

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำสำคัญ: เมทาโบลิมิกส์, เมทาโบลิต, ว่านชักมดลูก, โรคกระดูกพรุน

Title Metabolomics approaches for evaluating therapeutic potential of Thai traditional medicine: Effect of *Curcuma comosa* in estrogen-deficient rats

Student names 1. Miss Nichaboon Chaihad ID 543 30913 23
2. Miss Ratchanee Panrak ID 543 31347 23

Advisor Dr. Nawaporn Vinayavekhin

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2014

Abstract

Osteoporosis is a bone disease found frequently in postmenopausal women, which result from low level of estrogen in the body. Because changes in the levels of metabolites in the body has been shown to link to many diseases, this research was aimed to study the relationship between levels of metabolites and osteopenia disease using metabolomics approaches. In this work, untargeted and targeted metabolomics analyses discovered changes in levels of 202 and 10 metabolite ions in normal (sham) rats compared with those of the ovariectomized (OVX) rats, respectively. In addition, when metabolomics was applied to study the therapeutic effect of *Curcuma comosa* extracts on the OVX rats compared to that of the pure active compound in *C. comosa*, diarylheptanoid, it was found that levels of metabolites in the OVX rats under the treatment of the extracts were closer to those of the sham controls than those given diarylheptanoid. The results suggested the possibilities of developing the *C. comosa* extracts to have better therapeutic potentials in the future.



Keywords: Metabolomics, metabolites, *Curcuma comosa*, osteopenia

กิตติกรรมประกาศ

ในโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษา และความรู้ต่างๆตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญฟ้า อุ่่นอบ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้เกียรติเป็นกรรมการในโครงการวิจัยครั้งนี้

ยิ่งไปกว่านั้นขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ และนายเจตจำนงค์ เสือใจ เจ้าของเอกสารอ้างอิงที่สำคัญและอนุเคราะห์ตัวอย่างเซรุ่มหนูที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีจากครอบครัวและเพื่อนๆในภาควิชาเคมี ผู้วิจัยขอระลึกในความกรุณาช่วยเหลือและห่วงใยเสมอมาของท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ที่นี่



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตารางประกอบ	ช
สารบัญรูปภาพประกอบ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1) เมทาโบโลมิกส์	3
2.2) ว่านชักมดลูก <i>Curcuma comasa</i> Roxb. (<i>C. comasa</i>)	3
2.3) ไขมัน (lipid)	4
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	9
1. วัตถุประสงค์	9
2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	9
2.1) วัสดุพื้นฐานภายใน	9
2.2) เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	10
3. สารเคมี	10
4. ขั้นตอนการทำงานทดลอง	10
4.1) การสกัดเซรุ่มหนูทดลองเพื่อวิเคราะห์ด้วย liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS)	10
4.2) การวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS	11
4.3) การวิเคราะห์ข้อมูลจาก LC-MS ด้วยวิธีการเมทาโบโลมิกส์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (untargeted metabolomics)	11
4.4) การวิเคราะห์ข้อมูลจาก LC-MS ด้วยวิธีการเมทาโบโลมิกส์แบบจำเพาะเจาะจง (targeted metabolomics)	12
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองเมทาโบโลมิกส์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (Untargeted metabolomics)	13

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองเมทาโบลอมิกส์แบบจำเพาะเจาะจง (Targeted metabolomics)	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	66
เอกสารอ้างอิง	67
ประวัติผู้ทำการวิจัย	69



สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1.1	4
3.1	16
3.2	17
3.3	18
3.4	19
3.5	21
3.6	24
3.7	25

- p-value จาก student's t-test และปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (ion intensity)
- 3.8 ไอออนในขั้วลบ (negative mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับหนู 26
 ในกลุ่ม sham หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z,
 retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ต่างกันระหว่าง OVX และ sham (fold change),
 p-value จาก student's t-test และปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (ion intensity)
- 3.9 ไอออนของ OVX+E2 ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ mass ion intensity ใกล้เคียงกับ sham 32
 หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt),
 และไอออนที่ตรวจพบ (mass ion intensity)
- 3.10 ไอออนของ OVX+EXT, OVX+P1000 และ OVX+P2000 ที่มีการเปลี่ยนแปลง 40
 mass ion intensity ใกล้เคียงกับ sham หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์
 โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), และไอออนที่ตรวจพบ (mass ion intensity)
- 3.11 ไอออนของ OVX+DPHD ที่มีการเปลี่ยนแปลง mass ion intensity ใกล้เคียงกับ sham 46
 หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt),
 และไอออนที่ตรวจพบ (mass ion intensity)
- 4.1 ไอออนในขั้วบวกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม OVX 50
 หลังให้สารต่างๆเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย ประเภทของไขมัน, Acyl chain Ion,
 m/z(exact), m/z(XCMS), retentiontime (rt), ttest (OVX vs. sham),
 OVX/sham, sham/OVX
- 4.2 ไอออนในขั้วลบที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม OVX 59
 หลังให้สารต่างๆเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย ประเภทของไขมัน,
 Acyl chain Ion, m/z(exact), m/z(XCMS), retentiontime (rt),
 ttest (OVX vs. sham), OVX/sham, sham/OVX

สารบัญแผนภาพประกอบ

แผนภาพที่		หน้า
1.1	(ก.) ดอกและ (ข.) เหน้ง้าของว่านชักมดลูก	3
1.2	โครงสร้างอนุพันธ์ของสารไดเอริลเฮปทานอยด์, (3 <i>R</i>)-1,7-diphenyl-(4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD)	4



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ปัจจุบันการรักษาโรคต่างๆ ในทางการแพทย์ มักจะใช้ยาแผนปัจจุบันหรือยาแผนตะวันตก ยาแผนตะวันตกนี้จะผ่านกระบวนการวิจัยเพื่อระบุสารที่มีผลออกฤทธิ์โดยตรงต่อโปรตีนเป้าหมาย ทำให้สามารถบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนถึงประโยชน์ที่จะได้รับและเป็นที่ยอมรับในทุกส่วนของโลก อย่างไรก็ตามด้วยเหตุนี้เองทำให้ยาแผนตะวันตกเป็นการรักษาแบบเฉพาะส่วน ในทางกลับกันการรักษาแบบแพทย์แผนไทยเป็นการรักษาทั้งสุขภาพกายและสุขภาพใจ การแพทย์แผนไทยพัฒนามาจากการใช้ภูมิปัญญาไทยในการเรียนรู้ทดสอบสรรพคุณของสมุนไพรจดจำชนิดของสมุนไพรที่สามารถช่วยรักษาอาการได้ ทำให้เกิดเป็นแพทย์แผนไทยสืบทอดความรู้จากรุ่นสู่รุ่น ซึ่งสมุนไพรไทยนั้นมีประโยชน์และสรรพคุณมากมายถูกนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายหรือที่มีการบันทึกไว้ทำให้หลายงานวิจัยมุ่งเน้นการหาผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีฤทธิ์ช่วยในการรักษา เพื่อนำสารออกฤทธิ์ไปผลิตเป็นยาในลักษณะเดียวกับยาแผนตะวันตกต่อไป

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการแพทย์แผนไทยซึ่งใช้สมุนไพรในการรักษา ยังไม่ได้เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางและยังไม่ได้มีการนำมาใช้รักษาผสมผสานกับการแพทย์แผนตะวันตกอย่างแท้จริงซึ่งต่างกับการรักษาในประเทศจีนหรือเกาหลีใต้ ซึ่งเหตุผลส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่งานวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรส่วนใหญ่มุ่งเน้นการหาโครงสร้างของสารออกฤทธิ์เท่านั้นโดยไม่ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารในร่างกายอย่างเป็นระบบ เช่น มักไม่มีการศึกษาว่าสารนั้นๆ ทำงานโดยการยับยั้งหน้าที่ของโปรตีนหรือเอนไซม์ใด นอกจากนี้สารสกัดจากสมุนไพรไทยมักมีสารหลายชนิดผสมกัน ในทางเภสัชวิทยาสารมากกว่า 1 ชนิด อาจทำให้เกิดผลการรักษาที่ต่างออกไปจากการใช้สารชนิดเดียวได้ (synergistic effect)

เทคโนโลยีโอมิกส์ อันได้แก่ จีโนมิกส์ ทรานสคริปโทมิกส์ โปรตีโอมิกส์ และเมทาโบโลมิกส์ [1] เป็นเทคโนโลยีที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาระบบการทำงานในสิ่งมีชีวิตแบบองค์รวม ทำให้เห็นภาพใหญ่ที่ถูกต้อง นำไปสู่ความเข้าใจระบบเหล่านั้นอย่างแท้จริง เมื่อประยุกต์ใช้เทคนิคเหล่านี้กับสมุนไพรไทยหรือการรักษาด้วยสมุนไพรไทยในคนหรือสัตว์ทดลองต่างๆ เทคนิคเหล่านี้จึงอาจช่วยทำให้เห็นภาพรวมของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรในการรักษาสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ดีขึ้น

เมทาโบโลมิกส์เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบเปรียบเทียบและวิเคราะห์หาปริมาณสารเมทาโบไลต์ในตัวอย่างกลุ่มต่างๆ จุดประสงค์หลักของเทคนิคเมทาโบโลมิกส์คือสามารถตรวจสอบและระบุเมทาโบไลต์ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะที่ต้องการศึกษาได้ เช่น การกลายพันธุ์ในยีน, การเกิดโรคทางพันธุกรรม [2] เมื่อทราบเมทาโบไลต์ที่เปลี่ยนแปลงก็อาจนำไปสู่การทำนายสภาพของสิ่งมีชีวิตได้ เช่น อยู่ในสภาวะที่เป็นโรคหรือสภาวะปกติ เป็นต้น และอาจเชื่อมโยงเมทาโบไลต์เหล่านี้เข้ากับเอมไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มันได้จากวิถีเมทาบอลิซึมทำให้ได้เป้าหมาย

ใหม่ของยาเพื่อรักษาโรคนั้นๆ

โรคกระดูกพรุนชนิดปฐมภูมิเป็นปัญหาสุขภาพที่พบได้บ่อยในผู้หญิงในวัยหลังหมดประจำเดือน [3] ผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกพรุนจะมีความหนาแน่นของเนื้อกระดูกลดลง โครงสร้างของกระดูกเสื่อมลง ทำให้กระดูกบางและนำไปสู่การแตกและหักของกระดูกได้ง่าย โรคกระดูกพรุนชนิดปฐมภูมิเกิดจากสาเหตุการลดลงของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศหญิงวัยหลังหมดประจำเดือน ซึ่งส่งผลให้อัตราการทำลายกระดูกมากกว่าการสร้างกระดูก ความหนาแน่นของเนื้อกระดูกจึงลดลง วิธีการในปัจจุบันจะใช้ยาในกลุ่มของบิสฟอสโฟเนตซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการทำลายกระดูก แต่การรับประทานยาชนิดนี้ต้องระมัดระวังวิธีการรับประทานเนื่องจากมีผลข้างเคียงทำให้หลอดเลือดเป็นแผลได้ อีกหนึ่งวิธีคือรักษาโดยใช้ยาเม็ดฮอร์โมนทดแทน โดยยาเม็ดฮอร์โมนนี้มีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนแต่ข้อเสียคือถ้ารับประทานยาชนิดนี้ในระยะยาวก็มีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความสนใจเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนมากขึ้น สารกลุ่มหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจค่อนข้างมากคือไฟโตเอสโตรเจน ซึ่งไฟโตเอสโตรเจนเป็นสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนแต่มีฤทธิ์ป้องกันมะเร็งได้ [4] เช่น ในว่านชักมดลูกตัวเมีย

ว่านชักมดลูกเป็นพืชในวงศ์เดียวกับขิง เป็นยาสมุนไพรซึ่งในการรักษาอาการของสตรี เช่น ปวดท้องระหว่างมีประจำเดือน ตกขาว การทดลองในหนูซึ่งใช้สารไฟโตเอสโตรเจนที่อยู่ในว่านชักมดลูกตัวเมีย (Diarylheptanoid) สามารถป้องกันการสูญเสียแคลเซียมและรักษาความหนาแน่นของมวลกระดูกได้ [5] อย่างไรก็ตาม ยาจากสารออกฤทธิ์อาจให้ผลไม่เหมือนกับการรับประทานยาตามปกติ ดังนั้นเพื่อทำให้ยาสมุนไพรไทยได้รับการยอมรับและนำไปใช้คู่กับการรักษาแผนปัจจุบันมากขึ้น ดังเช่นในประเทศจีน เกาหลีใต้ โครงการนี้จึงดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากว่านชักมดลูกในการรักษาโรคกระดูกพรุนโดยใช้หนูที่ถูกตัดรังไข่ออก (OVX) ที่มีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) เทียบกับประสิทธิภาพของไฟโตเอสโตรเจนในการรักษาหนูดังกล่าวโดยการใช้วิธีการเมทาโบโลมิกส์ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปสู่การพัฒนาประสิทธิภาพของยาสมุนไพรไทยเพื่อใช้ควบคู่กับการรักษาแผนปัจจุบันในอนาคตต่อไป

2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

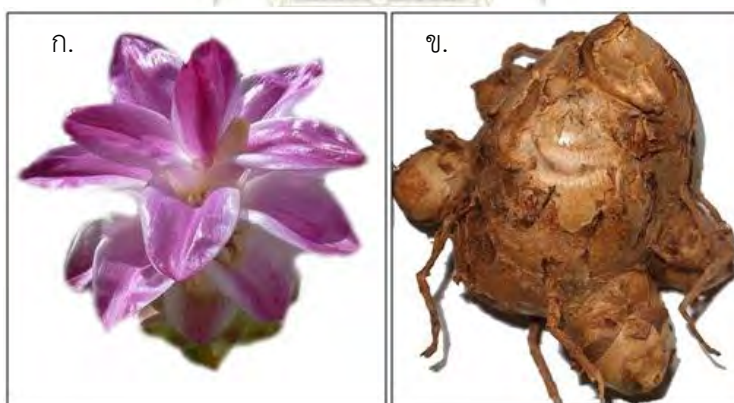
เมทาโบโลมิกส์เป็นเทคนิคที่ใช้เปรียบเทียบเมทาโบไลต์เชิงปริมาณในสารตัวอย่างกลุ่มต่างๆ [6] งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคเมทาโบโลมิกส์มาประยุกต์ใช้เพื่อประเมินประสิทธิภาพการรักษาโรคกระดูกพรุนของสารสกัดจากว่านชักมดลูกเทียบกับสารไฟโตเอสโตรเจน (diarylheptanoid) บริสุทธิ์ โดยใช้หนูที่ถูกตัดรังไข่ออก (OVX) เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism)

2.1) เมทาโบโลมิิกส์

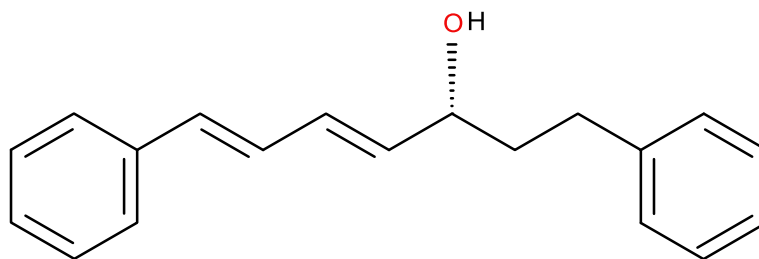
เมทาโบไลต์เป็นสารโมเลกุลเล็กเช่น ไขมัน กรดอะมิโน เปปไทด์ กรดนิวคลีอิก กรดอินทรีย์ วิตามิน ไทออล และคาร์โบไฮเดรต [7] ที่ผลิตออกมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึม มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การแปรรหัสพันธุกรรม กระบวนการแสดงออกทางพันธุกรรม [8] เมทาโบโลมิิกส์ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางการแพทย์โดยสามารถเทียบเคียงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของเมทาโบไลต์ในสภาวะปกติกับสภาวะที่เกิดโรคหลังจากรักษาด้วยยาแผนจีนซึ่งช่วยให้เข้าใจลักษณะของการเกิดโรคมมากขึ้น [9]

2.2) ว่านชักมดลูก *Curcuma comasa* Roxb. (*C. comasa*)

ว่านชักมดลูก (รูปที่ 1.1) เป็นพืชสมุนไพรไทยในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชในตระกูลเดียวกับ ขิง ขมิ้นชัน ว่านนางคำ ซึ่งพืชตระกูลนี้สามารถรักษาโรคต่างๆได้หลากหลาย เช่น ด้านการอักเสบ [10,11] ด้านโรคมะเร็ง ยับยั้งการเกิดเนื้องอก [12,13] ในปัจจุบันสารสกัดจากว่านชักมดลูกมักถูกนำมาใช้ในประเทศไทยเพื่อช่วยบรรเทาโรคของผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน ด้านการอักเสบและด้านสารพิษในตับ [14] รวมทั้งสามารถลดระดับคอเลสเตอรอล [15] และช่วยระบบการทำงานของมดลูกนอกจากนี้การศึกษาเมื่อเร็วๆนี้พบว่าสารสกัดจากว่านชักมดลูกยังช่วยป้องกันการลดลงของเนื้อกระดูกในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่ได้ด้วย [5] โดยสารประกอบสำคัญชนิดหนึ่งที่สกัดได้จากว่านชักมดลูก คือ (3R)-1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD) (รูปที่ 1.2) DPHD เป็นอนุพันธ์ของสารไดเอริลเฮปทานอยด์ซึ่งออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดเอสตราไดออล (estradiol, E2) ในการศึกษาครั้งนี้ เราจึงสนใจประสิทธิภาพการรักษาโรคกระดูกพรุนด้วยสารสกัดจากว่านชักมดลูกเทียบกับการรักษาด้วย DPHD และฮอร์โมน E2



รูปที่ 1.1 (ก.) ดอกและ (ข.) เหง้าของว่านชักมดลูก

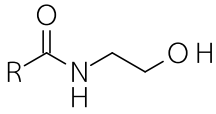
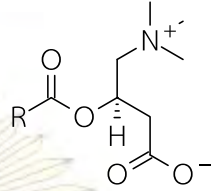
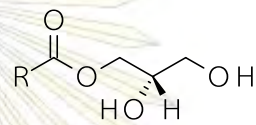
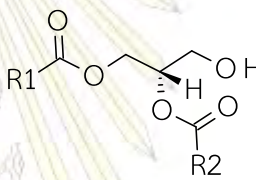
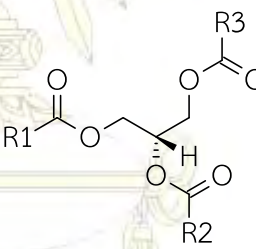
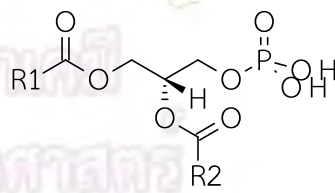
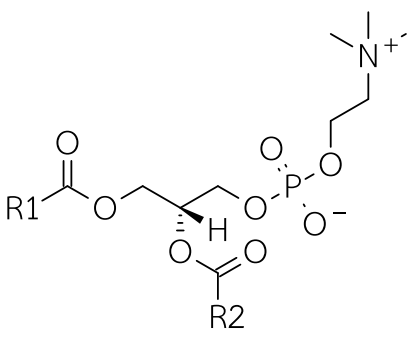


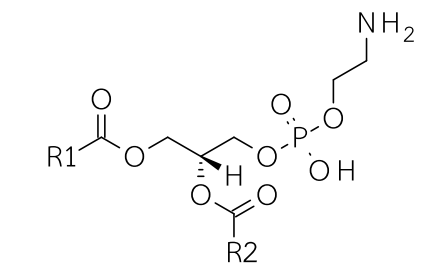
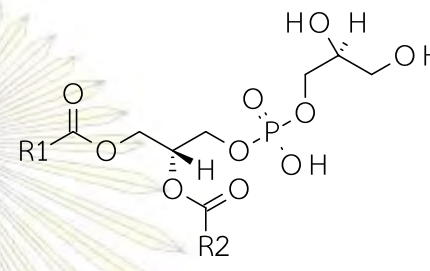
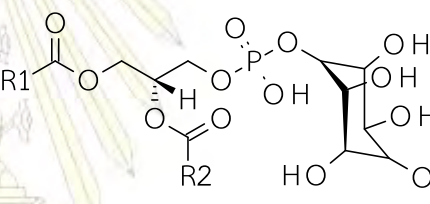
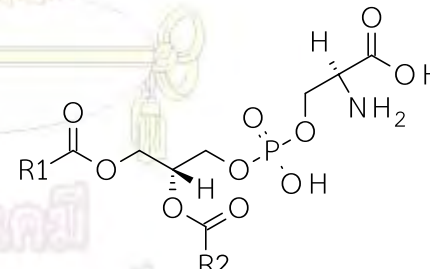
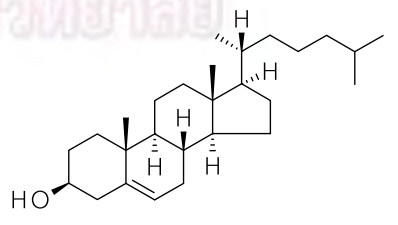
รูปที่ 1.2 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารโคเอริลเฮปทานอยด์, (3*R*)-1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD)

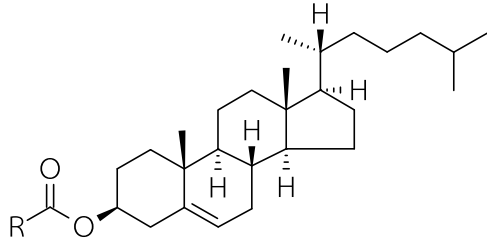
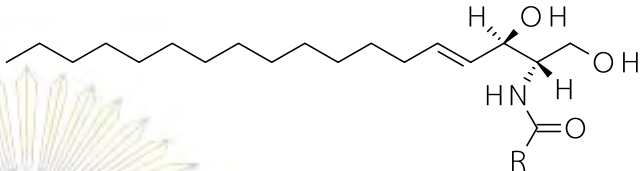
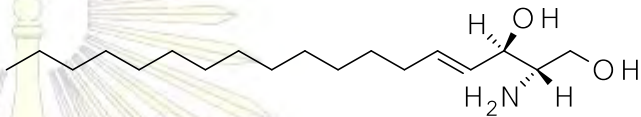
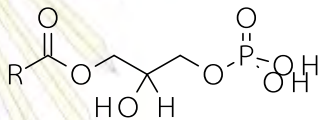
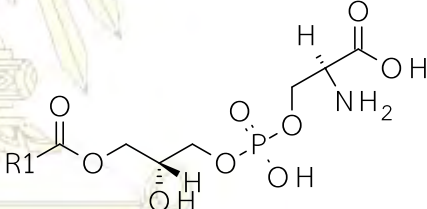
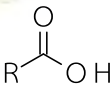
2.3) ไขมัน (lipid)

ไขมันหรือลิพิดเป็นเมทาโบไลต์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว มีหลากหลายประเภท เช่น โคเลสเตอรอล (Cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) กรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid) และสเตียรอยด์ (steroids) นอกจากไขมันจะเป็นสารที่ใช้ในการเก็บพลังงานของร่างกายแล้ว ไขมันยังเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเซลล์และเป็นสารเริ่มต้นในการสร้างฮอร์โมนต่างๆด้วย ระดับไขมันในร่างกายที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดโรคต่างๆได้ เช่น การมีโคเลสเตอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์ที่สูงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด โรคอัมพาต ความดันโลหิตสูง [16] ไขมันที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีหลายประเภท ดังแสดงในตารางที่ 1 สัญลักษณ์ที่อยู่หลังชื่อของไขมัน เช่น (C18:1) หมายถึง โซ่เอซิลของไขมันนั้นๆมีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอมและมีจำนวนพันธะคู่ที่ตำแหน่งใดๆ 1 พันธะ

ตารางที่ 1.1 ไขมันประเภทต่างๆที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Lipid class	structure
N-acylethanolamines (NAEs)	
Fatty acyl carnitines	
Monoacylglycerols (MAGs)	
Diacylglycerols (DAGs)	
Triacylglycerols (TAGs)	
Diacylglycerophosphates (PA)	
Diacylglycerophosphocholines (PC)	

lipid class	structure
Diacylglycerophosphoethanolamines (PE)	
Diacylglycerophosphoglycerols (PG)	
Diacylglycerophosphoinositols (PI)	
Diacylglycerophosphoserines (PS)	
Cholesterol	

lipid class	structure
Cholesteryl ester	
N-acyspingosines (ceramides)	
Sphingosine	
Lysophosphatidic acid (LPA)	
Lysophosphoserine (LPS)	
Free Fatty acid (FFA)	

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ใช้วิธีการเมทาโบโลมิกส์ตรวจสอบสารเมทาโบไลต์ในเซรัมของหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนเทียบกับหนูในสภาวะปกติ เพื่อหาเมทาโบไลต์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและโรคกระดูกพรุน
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการรักษาหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสารไดเอริลเฮปทานอยด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในว่านชักมดลูกเทียบกับการรักษาด้วยสารสกัดเอทานอลหรือเฮกเซนจากว่านชักมดลูก โดยการเปรียบเทียบปริมาณเมทาโบไลต์ในเซรัมที่เปลี่ยนไปตั้งได้จากวัตถุประสงค์ข้อที่ 1

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสารเมทาโบไลต์และวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับภาวะการพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน
2. ทราบความเหมือนและความแตกต่างของการรักษาหนูในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสารไดเอริลเฮปทานอยด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในว่านชักมดลูกเทียบกับการรักษาด้วยสารสกัดเอทานอลหรือเฮกเซนจากว่านชักมดลูก



บทที่ 2

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. วัสดุดิบ

เซรุ่มหนูทดลองจำนวน 7 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว โดยทำการเลี้ยงและให้สารต่างๆทุกวันเป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์

- 1.1) เซรุ่มจากหนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่ (sham-operated control)
- 1.2) เซรุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่ (OVX)
- 1.3) เซรุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่และให้สาร 17β -estradiol 10 $\mu\text{L}/\text{kg}$ (OVX+E2)
- 1.4) เซรุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่และให้สารสกัดเอทานอลจากว่านชักมดลูก 500 mg (OVX+EXT)
- 1.5) เซรุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่และให้สารสกัดเฮกเซนจากว่านชักมดลูก 1,000 mg (OVX+P1000)
- 1.6) เซรุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่และให้สารสกัดเฮกเซนจากว่านชักมดลูก 2,000 mg (OVX+P2000)
- 1.7) เซรุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่และให้สารไดเอริลเฮปทานอยด์ (3R)-1,7- diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol 50 mg/kg (OVX+DPHD)

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1) วัสดุพื้นฐานภายใน
 - 2.1.1) ปีกเกอร์
 - 2.1.2) หลอดหยด
 - 2.1.3) ขวดสารตัวอย่าง ขนาด 20 ml
 - 2.1.4) ฝาปิดขวดสารตัวอย่างชนิดเทฟลอน
 - 2.1.5) Micropipette ขนาด 20-200 μl
 - 2.1.6) Micropipette ขนาด 100-1000 μl
 - 2.1.7) Pipette tip
 - 2.1.8) กระจกตวง
 - 2.1.9) Glass insert
 - 2.1.10) หลอดฉีดยาขนาด 10 ml
 - 2.1.11) แก๊สไนโตรเจน
 - 2.1.12) กล่องกระดาษชนิดมีหลุม

2.2) เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 2.2.1) เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 2.2.2) เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 2.2.3) ตู้ดูดควัน (safety laboratory hood)
- 2.2.4) เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer)
- 2.2.5) เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high-performance liquid chromatography)
- 2.2.6) เครื่องเป่าแก๊สไนโตรเจน
- 2.2.7) เครื่องทำความสะอาดด้วยแรงสั่น (sonicator)

3. สารเคมี

- 3.1) Chloroform (ACS grade)
- 3.2) Methanol (HPLC grade)
- 3.3) Formic acid
- 3.4) Sodium hydroxide
- 3.5) Water (HPLC grade)
- 3.6) Isopropanol (HPLC grade)
- 3.7) 1% Sodium chloride
- 3.8) Ammonium formate
- 3.9) Ammonium hydroxide

4. ขั้นตอนการทำการทดลอง

4.1) การสกัดเซรุ่มหนูทดลองเพื่อวิเคราะห์ด้วย liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS)

นำเซรุ่มหนูทดลองที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 μl เจือจางด้วยสารละลาย 1% (v/v) sodium chloride ปริมาตร 900 μl ในขวดสารตัวอย่างและปิดฝาด้วยฝาปิดขวดสารตัวอย่างชนิดเทพลอนและนำตัวทำละลายผสมระหว่าง chloroform และ methanol ในอัตราส่วนของ chloroform:methanol เป็น 2:1 ปริมาตร 3 ml ใส่ลงไปในขวดสารตัวอย่างที่มีเซรุ่มที่เจือจางอยู่ จากนั้นเขย่าและนำไปเซนตริฟิวส์ (centrifuge) ที่ 4 องศา ที่ 2,500 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น จากนั้นแยกชั้นสารอินทรีย์ใส่ขวดสารตัวอย่างขวดใหม่นำไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 30 นาที จนแห้ง นำสารมาละลายด้วย chloroform ปริมาตร 160 μl และใส่สารละลายที่ได้ปริมาตร 50 μl ใน glass insert สำหรับวิเคราะห์ด้วย LC-MS ในขั้นต่อไป

4.2) การวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS

นำเซรัมที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 4.1 มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง liquid chromatography - mass spectrometer (LC-MS) การวิเคราะห์แบ่งเป็น 2 โหมด ได้แก่ ขั้วบวก (positive mode) และขั้วลบ (negative mode) การวิเคราะห์ในขั้วบวกใช้คอลัมน์ Luna C5 (5 μ m, 4.6 X 50 mm) และ Guard column จาก Phenomenex โดย Mobile phase A ประกอบด้วย 95% (v/v) water/5% (v/v) methanol และ Mobile phase B ประกอบด้วย 60% (v/v) isopropanol/35% (v/v) methanol/5% water โดย Mobile phase ทั้งสองชนิดมี 0.1% (v/v) formic acid และ 5 mM ammonium formate เป็นองค์ประกอบการวิเคราะห์ในขั้วลบใช้คอลัมน์ Gemini C18 (5 μ m, 4.6 X 50 mm) และ Guard column จาก Phenomenex โดยใช้ Mobile phase A และ Mobile phase B เหมือนในขั้วบวก แต่ใช้ 0.1% (v/v) sodium hydroxide เป็นองค์ประกอบเสริมแทน 0.1% (v/v) formic acid และ 5 mM ammonium formate

การวิเคราะห์สารด้วย LC ใช้เวลาทั้งสิ้น 60 นาทีต่อตัวอย่างโดย Mobile phase เริ่มต้นจาก 0% B นาน 5 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.1 ml/min จากนั้นเปลี่ยนสัดส่วน Mobile phase เป็น 20% B และค่อยๆเพิ่มสัดส่วนขึ้นจนถึง 100% B ในเวลา 45 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.4 ml/min วิเคราะห์ต่อที่สัดส่วนคงที่ 100% B นาน 8 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.5 ml/min ก่อนปรับสัดส่วน %B เป็น 0 และปล่อยไหล นาน 7 นาที (min) ด้วยอัตราการไหล 0.5 ml/min

การวิเคราะห์ด้วย Mass-Spectrometer ใช้พารามิเตอร์ต่างๆดังนี้: end Plate offset ที่ -500 V, capillary voltage ที่ 4000 V, Nebulizer pressure ที่ 3.0 Bar, dry gas ที่ 80 L/min, Dry temp ที่ 200 องศาเซลเซียส, collision RF ที่ 150.0 Vpp. เก็บข้อมูลในช่วง mass range 100-1500 Da และใช้ 10 mM sodium formate เป็น calibrant

4.3) การวิเคราะห์ข้อมูลจาก LC-MS ด้วยวิธีการเมทาโบลิมิกส์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (untargeted metabolomics)

นำข้อมูลโครมาโทแกรมที่ได้รับจากเครื่อง LC-MS มาวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม XCMS ซึ่งโปรแกรม XCMS จะค้นหาพีค (peak) ของไอออนต่างๆในตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง นำมาจับคู่กันและทำการวิเคราะห์ปริมาณของไอออนต่างๆที่ค้นพบ ข้อมูลที่ได้ออกมาจากโปรแกรม XCMS (XCMS output file) ประกอบด้วย ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ค่า retention time และค่า integrated mass ion intensity ของแต่ละไอออนในตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์เปรียบเทียบไอออนต่างๆเชิงปริมาณ โดยมีการคัดกรองไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับกลุ่ม OVX ด้วยเงื่อนไขดังนี้ (i) ไอออนมีอัตราส่วนการเปลี่ยนแปลง mass ion intensity ในตัวอย่าง 2 กลุ่ม 1.5 เท่าขึ้นไปในตัวอย่างจากกลุ่มหนูที่ผ่านการทดลองนาน 6 สัปดาห์ และไอออนมีอัตราส่วนการเปลี่ยนแปลง 2.0 เท่าขึ้นไปในตัวอย่างจากกลุ่มหนูที่ผ่านการทดลองนาน 12 สัปดาห์,

(ii) นัยสำคัญทางสถิติ (t-test with $p < 0.05$), (iii) mass ion intensity ของ sham อย่างน้อย 5,000 counts จากนั้นตรวจสอบไอออนเหล่านี้อีกครั้งในโครมาโทแกรมที่ได้รับจากเครื่อง LC-MS เพื่อกำจัดไอโซโทป (isotope) หรือค่าผลบวกวง (false positive) ออกไป ไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham ก็ผ่านการคัดกรองในลักษณะเดียวกัน โดยเปลี่ยนเงื่อนไข (iii) mass ion intensity จากของ sham เป็นของ OVX โดยต้องพบในปริมาณ 5,000 counts ขึ้นไป ในขั้นสุดท้ายนำไอออนที่ผ่านการคัดกรองแล้วนี้มาเปรียบเทียบกับปริมาณของกลุ่ม OVX+DPHD, OVX+EXT, OVX+P1000 และ OVX+P2000 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการรักษาหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสารไดเอริลเฮปทานอยด์บริสุทธิ์ที่เทียบกับการรักษาด้วยสารสกัดเอทานอลหรือเฮกเซนจากว่านชักมดลูกต่อไป

4.4) การวิเคราะห์ข้อมูลจาก LC-MS ด้วยวิธีการเมทาโบลิมิกส์แบบจำเพาะเจาะจง (targeted metabolomics)

นำข้อมูลจาก XCMS output file มาตรวจสอบเพื่อหาไอออนที่มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลของไขมันที่มีการเก็บรวบรวมไว้ (± 20 ppm) ไอออนที่มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วงนี้มีโอกาสสูงที่จะเป็นไอออนของไขมันนั้นๆ ซึ่งต้องทำการยืนยันเอกลักษณ์ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานหรือโดยการทำ tandem MS ต่อไป

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

เมทาโบโลมิกส์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (Untargeted metabolomics)

ตอนที่ 1 ทำการสกัดเซรุ่มหนูทดลองจำนวน 7 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว โดยทำการเลี้ยงและให้สารต่างๆทุกวัน เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์

งานวิจัยนี้ศึกษาคุณภาพของสารสกัดจากว่านชักมดลูกที่มีผลต่อหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยใช้วิธีเมทาโบโลมิกส์ โดยทำการสกัดเซรุ่มหนูตัวอย่างที่อยู่ในสถานะต่างๆทั้ง 7 กลุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ ได้แก่ หนูที่อยู่ในภาวะปกติ (sham), เซรุ่มหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยทำการตัดรังไข่ทั้งสองข้าง (OVX), เซรุ่มหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและให้สาร 17β -estradiol 10 $\mu\text{L}/\text{kg}$ (OVX+E2), เซรุ่มหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและให้สารสกัดด้วยเอทานอลจากว่านชักมดลูก 500 mg (OVX+EXT), เซรุ่มหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและให้สารสกัดด้วยเฮกเซนจากว่านชักมดลูก 1,000 mg (OVX+P1000), เซรุ่มหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและให้สารสกัดด้วยเฮกเซนจากว่านชักมดลูก 2,000 mg (OVX+P2000) และเซรุ่มหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและให้สารไดเอริลเฮปทานอยด์ (3R)-1,7- diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol 50 mg/kg (OVX+DPHD) ซึ่งจะให้สารที่กล่าวมาข้างต้นทุกวันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ ทำการสกัดไขมันในเซรุ่มของหนูกลุ่มตัวอย่างต่างๆ ด้วยตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอล สารที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลว ไม่มีสี

ตอนที่ 2 วิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS

หลังจากนั้นนำเซรุ่มหนูทั้ง 7 กลุ่มตัวอย่างที่สกัดเรียบร้อยแล้วไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS โดยทำการวิเคราะห์ทั้งในขั้วบวก (positive mode) และขั้วลบ (negative mode) จากนั้นนำข้อมูลดิบทั้ง 42 โครมาทोगแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม XCMS

ตอนที่ 3 วิเคราะห์ข้อมูลดิบที่ได้จาก LC-MS ด้วยโปรแกรม XCMS

โปรแกรม XCMS ทำหน้าที่ค้นหาพีค (peak) ของไอออนต่างๆในตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง นำมาจับคู่กัน และทำการวิเคราะห์ปริมาณของไอออนต่างๆที่ค้นพบ

เนื่องจากงานวิจัยนี้สนใจเกี่ยวกับเมทาโบไลต์ที่เกี่ยวข้องกับหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งอาจเกี่ยวกับโรคกระดูกพรุน ผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบผลของตัวอย่างในกลุ่ม OVX และ sham โดยไอออนที่มีปริมาณแตกต่างกันระหว่าง sham กับ OVX คือไอออนที่มีค่าต่างๆในเชิงสถิติดังนี้ 1) student t-test โดยมี p-value < 0.05, 2) ไอออนมีอัตราส่วนการเปลี่ยนแปลง mass ion intensity ในตัวอย่างกลุ่ม sham เทียบกับ OVX อย่างน้อย 1.5 เท่า (fold change ≥ 1.5) ในตัวอย่างหนู

ทดลองที่ให้สารต่างๆทุกวันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และปริมาณเมทาโบลิต์ต่างกันระหว่าง sham และ OVX อย่างน้อย 2.0 เท่า (fold change ≥ 2.0) ในตัวอย่างหนูทดลองที่ให้สารต่างๆทุกวันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ และ 3) มีปริมาณมากพอที่จะตรวจพบได้ โดยในขั้นต้นได้ทำการเลือกไอออนที่มี ion mass intensity อย่างต่ำ 5,000 counts สำหรับตัวอย่างในกลุ่มที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ผลจากการคัดกรองไอออนข้างต้นนี้ทำให้ได้ไอออนจำนวน 77 ไอออน ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่มของ sham และ 125 ไอออน ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มตัวอย่าง OVX จากนั้นเพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงของไอออนเหล่านี้และเพื่อคัดแยก monoisotopic ion ออกจากไอโซโทป (isotope) ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบข้อมูลจากโครมาโทแกรมอีกครั้ง ซึ่งในขั้นนี้ทำให้ได้ไอออนจำนวน 25 ไอออน ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นใน sham และ 37 ไอออนที่เพิ่มขึ้นใน OVX หลังให้สารต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ดังแสดงโดยละเอียดในตารางที่ 3.1-3.4

สำหรับหนูทดลองที่หลังจากให้สารต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อผ่านการคัดกรองเบื้องต้นแล้วพบว่าได้ไอออนจำนวน 444 ไอออนที่เพิ่มขึ้นใน sham และ 426 ไอออนที่เพิ่มขึ้นใน OVX เพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงของไอออนเหล่านี้และเพื่อคัดแยก monoisotopic ion ออกจากไอโซโทป (isotope) ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบข้อมูลจากโครมาโทแกรมอีกครั้ง ซึ่งในขั้นนี้ทำให้ได้ไอออนจำนวน 74 ไอออน ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นใน sham และ 128 ไอออนที่เพิ่มขึ้นใน OVX หลังให้สารต่างๆ เป็น ดังแสดงโดยละเอียดในตารางที่ 3.5-3.8

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีเมทาโบลิต์ที่เกี่ยวข้องกับหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนจำนวน 62 ไอออน หลังจากให้สารต่างๆเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และมีเมทาโบลิต์จำนวน 202 ไอออน หลังจากให้สารต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพการรักษาหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสารสกัดจากว่านชั้กมดลูกเทียบกับสารไดเอริลเฮปทานอยด์ ผู้วิจัยเลือกพิจารณาข้อมูลจากตารางที่ 3.5-3.8 ซึ่งเป็นข้อมูลของการเปลี่ยนแปลงระดับปริมาณเมทาโบลิต์หลังจากให้สารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สาเหตุที่ไม่เลือกพิจารณาจากตารางที่ 3.1-3.4 เนื่องจากการให้สารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมทาโบลิต์ไม่ชัดเจน

การพิจารณาจะคัดกรองเมทาโบลิต์ในหนูกลุ่ม OVX+E2 ที่มีระดับเมทาโบลิต์ใกล้เคียงกับหนูในกลุ่ม sham เหตุที่พิจารณาหนูกลุ่ม OVX+E2 เพื่อยืนยันให้เห็นว่าเมทาโบลิต์นั้นอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกระดูกพรุนเนื่องจากที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าสาเหตุของการเกิดโรคกระดูกพรุนมาจากการพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน เมื่อหนูกลุ่ม OVX ถูกให้สาร 17 β -estradiol (E2) แล้วผลที่ได้ควรจะมียปริมาณเมทาโบลิต์ใกล้เคียงกับหนูในกลุ่ม sham ถ้าหากไม่เป็นไปตามนี้แสดงว่าเมทาโบลิต์ตัวนั้นอาจไม่ได้มีผลโดยตรงเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกระดูกพรุนและจะไม่นำเมทาโบลิต์ตัวนั้นๆมาพิจารณา ผลจากการคัดกรองมีจำนวนเมทาโบลิต์ที่เมื่อให้สาร E2 แล้วมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณเมทาโบลิต์ในหนูกลุ่ม sham จำนวน 169 ไอออน ดังแสดงโดยละเอียดในตารางที่ 3.9

เมื่อนำเมทาโบลิต์ในตารางที่ 3.9 มาพิจารณาเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการรักษาหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสารสกัดจากว่านชั้กมดลูกเทียบกับสารไดเอริลเฮปทานอยด์ โดยเปรียบเทียบปริมาณ mass ion intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม sham พบว่ามีเมทาโบลิต์จำนวน 130 ไอออนของหนู

ในในกลุ่ม OVX+EXT, OVX+P1000, OVX+P2000 ซึ่งเป็นหนูในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและให้สารสกัดจากว่านชักมดลูกที่ปริมาณต่างกันตามลำดับที่มีปริมาณเมทาโบไลต์ใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม sham ดังแสดงโดยละเอียดในตารางที่ 3.10 และมีเมทาโบไลต์จำนวน 39 ไอออน ของหนูกลุ่ม OVX+DPHD ที่มีปริมาณใกล้เคียงกับหนูในกลุ่ม sham ดังแสดงโดยละเอียดในตารางที่ 3.11 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากว่านชักมดลูก EXT, P1000, P2000 มีประสิทธิภาพช่วยให้หนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนมีระดับ mass ion intensity ใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม sham มากกว่าสาร DPHD แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากว่านชักมดลูกอาจมีผลทำให้ไอออนในกลุ่มนี้ที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกระดูกพรุน มีความสมดุลมากยิ่งขึ้น



ตารางที่ 3.1 ไอออนในขั้วบวก (positive mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม OVX หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ที่เพิ่มขึ้นใน sham เมื่อเทียบกับ OVX (fold change), p-value จาก student's t-test และ ปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (sham/OVX)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
243.2094	48.17	1.6	2.58E-02	441,964	638,854	365,216	575,641	543,086	515,156	685,369
296.2917	30.71	3.9	3.46E-02	7,169	8,538	7,375	10,962	12,974	8,740	27,979
303.2286	35.17	1.6	2.14E-02	75,109	90,221	101,266	104,504	131,761	138,868	117,677
308.2928	42.45	2.0	9.89E-03	4,992	6,638	8,393	11,387	13,804	7,602	10,268
315.2242	20.71	4.4	8.15E-04	2,413	2,761	2,500	2,960	1,554	2,642	10,724
317.2461	22.50	15.4	5.85E-03	7,808	1,916	2,158	4,138	2,941	8,059	120,143
367.3354	47.84	1.7	2.03E-02	1,161,122	1,136,766	1,473,621	989,511	635,167	634,364	1,971,562
495.4370	47.46	1.7	4.12E-02	22,493	28,755	35,258	32,287	61,992	47,076	38,392
535.0338	20.24	2.9	1.55E-03	6,864	13,672	304,572	14,038	11,810	16,916	20,135
782.7156	47.78	1.6	4.54E-02	47,306	57,901	47,263	79,479	177,845	119,102	77,607
858.5954	43.63	1.5	8.36E-05	85,732	125,654	120,001	129,372	154,774	148,760	132,365

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 ไอออนในขั้วบวก (positive mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม sham หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบลิต์ที่เพิ่มขึ้นใน OVX เทียบกับ sham (fold change), p-value จาก student's t-test และ ปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
271.1018	11.56	1.5	2.06E-02	56,075	63,862	45,887	40,425	25,060	45,301	37,334
570.3508	32.48	1.7	4.05E-02	78,172	59,804	110,013	47,711	53,132	45,580	46,037
578.4169	35.74	1.6	3.87E-02	221,008	159,277	227,787	187,520	132,374	154,751	139,544
739.5325	39.37	1.6	1.45E-03	18,924	8,156	11,857	6,098	6,343	6,207	12,134
888.7576	46.79	2.7	3.44E-02	65,561	70,338	119,383	65,460	46,745	94,230	24,223
914.7328	47.36	1.6	4.22E-02	230,379	138,744	239,664	89,152	116,328	92,376	145,965
966.7524	47.65	1.6	2.48E-02	1,387,563	676,219	1,762,060	663,450	501,920	348,077	858,501
1001.6509	30.01	1.7	1.34E-02	8,332	6,131	16,776	9,524	6,204	6,926	5,038
1023.6354	29.80	1.7	4.05E-02	17,420	9,782	27,703	17,613	11,327	12,158	10,588
1089.6800	31.58	1.7	3.76E-02	38,789	23,900	48,392	40,316	25,391	35,104	22,614
1274.8256	31.07	1.6	3.85E-02	35,977	27,962	54,394	39,864	23,979	28,398	22,926
1478.1258	40.69	1.5	1.38E-02	10,547	4,619	7,698	2,340	2,627	3,143	6,933

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 ไอออนในขั้วลบ (negative mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม OVX หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ที่เพิ่มขึ้นใน sham เทียบกับ OVX (fold change), p-value จาก student's t-test และ ปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (sham/OVX)	t-test (OVX vs sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
317.1756	9.59	2.1	1.16E-02	6,005	4,156	12,897	3,092	4,403	2,625	12,568
345.2058	11.81	2.7	1.94E-03	9,655	8,667	25,247	6,974	9,191	8,755	26,118
347.2211	12.10	2.1	1.17E-02	5,265	3,067	12,631	3,393	4,688	4,754	11,261
349.2374	10.54	8.9	6.95E-04	9,183	2,536	3,643	4,035	3,662	5,065	81,330
400.2818	23.54	2.0	2.59E-02	3,038	5,344	3,368	4,749	9,871	5,470	6,276
413.2003	10.92	8.4	1.29E-02	1,014	624	726	604	1,254	1,060	8,497
425.2686	15.78	2.4	1.08E-02	2,095	2,348	2,646	1,653	2,187	2,237	5,103
427.2852	16.32	3.0	1.39E-03	2,668	3,332	3,016	2,750	2,528	2,545	8,074
428.3162	25.77	2.2	4.29E-02	20,972	33,930	24,772	32,446	72,675	38,164	45,970
633.4515	30.80	2.5	1.29E-03	5,252	5,505	15,421	3,786	3,428	4,379	12,900
688.4916	33.55	3.4	1.19E-02	2,793	5,085	11,148	9,963	13,191	7,511	9,376
740.5219	34.58	1.5	4.12E-02	14,800	18,415	20,955	32,517	36,420	19,760	22,842
786.5066	33.87	1.6	3.48E-02	9,514	12,979	25,073	17,644	18,450	11,450	15,122
788.5237	34.48	1.8	4.90E-02	5,762	8,363	13,590	12,920	12,556	8,696	10,502

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 ไอออนในขั้วลบ (negative mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม sham หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ต่างกันระหว่าง OVX และ sham (fold change), p-value จาก student's t-test และ ปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
149.0605	45.55	1.6	4.80E-02	5,463	6,825	4,814	7,299	3,373	4,290	3,397
347.2209	19.77	1.7	1.72E-02	28,572	18,446	8,355	13,083	24,286	23,424	16,435
387.1745	12.34	1.7	4.75E-02	6,521	3,448	5,484	10,759	2,674	3,233	3,914
415.3565	45.55	1.7	1.14E-02	112,905	136,228	101,602	150,728	68,747	87,848	65,918
459.2522	33.92	1.7	3.91E-02	111,693	82,643	102,899	104,644	99,653	98,449	67,034
474.3575	31.75	1.7	4.27E-02	17,053	10,567	10,896	8,384	7,748	9,272	9,883
477.3036	27.98	1.5	1.33E-02	131,922	67,262	114,959	47,611	62,756	65,565	87,559
485.2654	33.93	1.7	3.54E-02	25,089	20,419	23,146	23,469	22,181	22,119	15,175
534.4833	45.56	1.6	3.69E-02	12,977	5,258	6,744	2,929	4,696	3,703	7,952
536.3419	29.64	11.3	4.83E-02	5,276	8,554	560	1,463	2,656	2,592	466
561.4118	42.45	1.5	5.03E-03	9,609	4,135	4,178	1,989	3,250	3,903	6,405
579.3879	30.86	2.2	7.43E-05	28,195	13,798	10,297	5,985	4,508	6,111	12,804
586.2760	41.11	1.6	2.09E-02	10,671	9,552	11,820	7,605	7,784	15,322	6,701
588.2333	16.76	2.0	4.87E-02	7,654	6,185	7,202	2,833	2,779	5,626	3,884
598.3123	43.54	1.8	2.36E-03	5,398	4,173	4,598	3,177	2,951	4,098	2,970
678.6289	50.66	1.6	4.48E-02	17,254	13,484	18,185	10,139	13,534	18,124	10,708

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
742.5388	40.98	1.6	3.11E-02	46,669	41,929	43,557	33,943	29,779	64,090	29,888
794.5249	40.48	2.4	1.17E-02	11,976	7,011	8,545	3,282	3,209	5,549	4,983
835.5589	44.92	1.8	1.17E-02	9,123	3,804	4,337	1,379	1,142	922	4,994
850.9535	14.87	2.5	3.05E-02	11,575	7,940	10,175	3,280	2,027	6,381	4,563
918.4836	41.76	1.5	2.86E-02	9,275	5,701	5,882	4,241	3,793	6,452	6,090
931.6122	28.48	1.5	4.15E-02	9,837	5,843	7,493	4,091	6,312	7,947	6,463
968.5968	33.81	1.7	3.03E-02	8,344	6,464	8,726	8,569	7,426	7,936	4,905
1333.0504	45.16	1.6	2.34E-02	8,339	4,156	5,899	2,094	4,014	3,312	5,124
1435.1245	45.15	2.1	4.59E-02	12,996	2,736	5,211	926	3,555	2,590	6,250

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.5 ไอออนในขั้วบวก (positive mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม OVX หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ต่างกันระหว่าง sham และ OVX (fold change), p-value จาก student's t-test และปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (sham/OVX)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX/sham	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
116.0169	21.35	2.3	4.48E-02	4,440	9,359	15,684	7,325	2,393	7,505	10,409
162.0579	21.34	2.3	4.35E-02	24,997	50,568	89,852	40,950	14,227	43,149	58,353
221.1105	21.34	2.4	3.85E-02	167,987	350,268	605,547	278,307	100,013	296,846	401,341
221.1104	9.49	3.2	1.79E-02	253,609	489,154	665,974	566,354	203,528	809,479	809,171
221.1098	39.62	3.2	3.93E-02	72,283	252,225	637,344	182,390	42,250	72,248	232,199
222.0970	9.28	2.3	4.74E-02	85,889	149,472	275,229	174,198	30,434	175,023	195,861
223.1089	21.35	2.2	4.41E-02	10,118	20,038	31,788	16,327	5,964	17,888	22,056
235.0911	19.97	2.4	4.43E-02	15,856	90,479	42,795	79,533	1,634	85,556	38,447
293.1317	21.34	2.4	3.60E-02	476,383	1,005,049	1,708,189	779,904	280,457	835,218	1,132,440
293.1317	11.92	2.4	4.33E-02	34,940	70,953	120,264	51,661	15,984	68,013	82,660
315.2298	22.44	22.0	3.46E-03	9,076	14,909	16,811	9,392	4,392	8,525	199,038
317.2459	22.33	14.6	1.89E-04	12,027	4,859	7,274	3,627	2,356	4,763	176,079
333.2406	20.47	3.6	7.25E-03	7,738	4,873	7,023	3,132	2,441	5,382	27,763
333.2412	22.08	14.8	2.77E-04	5,327	3,876	3,315	3,971	3,736	4,533	78,975
337.2150	22.43	7.9	1.23E-02	3,811	4,482	4,597	3,513	3,106	3,835	29,960
339.2286	22.33	10.3	2.36E-04	5,386	3,332	3,504	2,876	2,456	3,482	55,394
352.2820	23.70	28.3	9.82E-04	1,173	319	827	395	207	334	33,235
355.2117	22.39	4.4	7.42E-04	3,178	2,996	2,229	2,935	2,281	2,634	14,081

m/z	rt (min)	fold change (sham/OVX)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
459.3369	35.15	3.0	4.70E-02	9,017	27,680	47,594	17,972	6,497	11,807	26,500
483.3405	39.63	3.3	3.80E-02	113,772	369,494	683,470	208,344	63,881	116,236	373,229
485.3533	40.61	3.4	3.86E-02	80,806	253,378	390,474	163,276	54,810	93,474	271,874
487.3685	41.76	4.2	2.96E-02	4,965	16,781	27,482	10,484	4,100	4,860	20,938
505.3242	34.99	2.2	2.15E-02	13,406	30,212	58,387	14,121	8,243	11,973	29,572
507.3417	39.61	4.0	1.87E-02	29,570	110,151	427,067	66,908	14,165	35,985	116,210
535.0348	19.94	3.6	1.94E-03	12,311	27,995	285,786	24,967	14,078	26,366	43,768
557.0195	19.91	3.0	8.53E-04	2,663	5,038	41,162	4,467	2,834	4,859	8,058
568.5233	40.04	2.2	2.95E-02	6,487	16,092	8,811	17,667	12,151	17,902	14,044
649.4753	37.10	6.3	4.81E-02	65,011	55,169	91,933	12,551	87,808	158,074	409,957
723.4432	20.06	2.4	1.28E-02	2,719	5,943	3,307	3,477	1,155	6,731	6,513
796.5400	26.10	2.2	4.97E-03	52,464	62,279	76,124	50,270	55,774	72,918	112,739
848.5394	40.93	2.1	3.19E-02	18,506	45,052	17,662	60,144	54,270	53,557	39,180
934.8718	49.44	2.1	4.37E-04	200,046	189,676	388,652	727,284	261,498	446,499	423,062
956.8553	49.08	2.0	2.82E-04	189,641	201,589	350,055	616,035	234,593	411,124	387,745
958.8742	49.32	2.4	6.02E-05	208,841	184,431	494,312	834,876	271,154	503,707	492,626
960.8896	49.61	2.3	2.33E-04	224,891	172,205	487,301	874,748	261,877	479,214	506,426
962.9041	49.91	2.1	1.70E-03	172,961	133,467	323,888	580,456	214,922	362,592	366,186
963.8380	49.27	5.5	2.90E-03	3,977	12,931	13,381	40,838	15,966	25,266	21,847
970.8596	49.37	2.4	4.55E-02	31,386	18,672	45,159	164,250	40,158	85,046	74,195
984.8893	49.49	2.2	3.03E-04	179,393	149,459	359,437	665,354	228,938	415,440	393,446

m/z	rt (min)	fold change (sham/OVX)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
1097.0141	51.60	2.1	1.49E-02	18,273	8,942	27,513	44,021	18,115	25,805	37,564
1128.3114	50.40	2.2	1.32E-02	673,777	329,090	730,984	718,408	686,625	779,181	1,497,212
1141.3113	50.32	2.1	2.43E-03	4,510	3,329	4,616	4,738	3,244	4,080	9,403
1202.3285	51.30	2.3	9.98E-03	558,269	268,652	612,445	604,286	576,288	634,671	1,291,422
1216.3301	51.22	3.0	9.91E-04	3,678	3,944	4,924	5,797	3,490	4,208	10,785
1276.3473	52.33	2.3	7.35E-03	443,355	212,914	481,547	476,106	446,034	493,929	1,014,023
1350.3645	53.54	2.4	7.15E-03	326,233	157,074	350,955	351,137	325,859	348,480	767,030
1424.3827	54.94	2.3	1.06E-02	205,564	94,462	225,064	211,478	179,011	220,551	475,056



 ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.6 ไอออนในขั้วบวก (positive mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม sham หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ต่างกันระหว่าง OVX และ sham (fold change), p-value จาก student's t-test และปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
203.0526	5.74	2.3	4.58E-02	53,901	36,929	31,020	21,536	24,195	24,399	23,101
373.2348	19.29	2.3	3.36E-02	50,377	40,743	16,633	43,988	40,737	59,588	21,737
383.1160	5.75	3.9	2.95E-02	8,202	6,478	4,952	2,760	3,523	2,213	2,117
515.3221	35.00	2.4	1.96E-04	9,492	4,683	6,895	1,752	2,093	584	3,924
617.5771	44.82	2.6	7.99E-03	26,282	84	14,074	-	636	47	10,098
743.5570	39.62	2.5	1.76E-03	75,030	38,500	67,949	13,608	25,662	19,838	30,370
1417.6203	40.26	2.1	4.50E-02	34,280	12,280	15,057	3,781	11,113	10,795	16,357

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.7 ไอออนในชั่วลบ (negative mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม OVX หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ต่างกันระหว่าง sham และ OVX (fold change), p-value จาก student's t-test และปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (sham/OVX)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
349.2370	10.36	12.7	1.03E-03	7,305	3,773	3,223	2,032	2,775	3,886	92,427
371.2163	11.34	14.5	4.65E-03	431	134	207	187	176	213	6,255
413.1991	10.70	7.8	1.93E-03	1,200	367	576	1,210	1,711	1,104	9,302
427.2871	16.03	2.8	3.97E-02	4,012	3,893	3,945	3,111	1,544	2,743	11,156
455.3157	15.22	3.5	8.53E-03	2,514	6,171	11,413	9,952	3,021	3,838	8,836

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.8 ไอออนในชั่วลบ (negative mode) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม sham หลังให้สารชนิดต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), ปริมาณเมทาโบไลต์ต่างกันระหว่าง OVX และ sham (fold change), p-value จาก student's t-test และปริมาณไอออนที่ตรวจพบได้ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
163.0760	46.16	2.1	2.96E-03	50,715	25,891	39,829	16,145	18,313	19,660	23,713
174.1033	47.43	4.1	3.53E-04	12,351	9,887	5,201	8,415	4,218	13,897	3,046
196.0389	19.13	5.2	1.76E-02	10,015	3,578	8,789	2,543	1,094	1,782	1,934
203.1814	17.80	2.2	2.29E-02	10,259	5,783	7,923	4,020	2,228	3,646	4,758
231.2106	18.20	2.0	2.07E-02	27,424	15,681	17,925	14,376	10,425	12,952	13,157
285.2219	47.41	3.4	9.39E-04	165,265	134,143	65,352	113,300	63,692	153,488	48,102
367.1047	4.56	3.1	3.93E-02	19,946	27,364	22,404	21,414	9,069	8,141	6,362
381.2048	20.44	17.4	7.23E-03	33,974	9,760	16,149	3,492	770	2,061	1,953
385.3502	45.44	2.4	1.51E-03	7,234	3,259	4,565	2,087	3,214	2,736	3,027
390.2638	18.94	5.2	1.14E-02	7,624	3,326	5,288	2,099	1,154	1,470	1,481
403.1866	20.55	5.0	1.70E-02	5,731	2,315	3,125	1,442	837	893	1,137
427.3572	45.40	6.9	9.65E-03	11,763	2,303	8,846	2,665	2,623	2,449	1,707
429.3735	46.16	2.2	4.07E-03	1,176,471	606,251	933,980	388,277	426,937	437,597	533,245
436.2821	19.23	10.3	1.49E-02	44,399	9,735	22,640	3,844	2,431	3,714	4,295
451.2859	38.04	2.3	1.57E-02	235,394	89,572	150,314	56,218	65,649	47,240	104,081
452.2787	19.10	5.0	4.35E-03	105,161	39,023	109,312	28,897	12,278	18,208	21,237
462.2999	19.44	9.9	1.96E-02	41,978	7,856	20,319	4,096	2,475	3,250	4,258
474.2605	19.08	5.3	5.11E-03	13,056	5,206	13,702	3,965	1,766	2,330	2,487

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
478.2938	19.35	8.8	1.22E-02	25,248	7,052	19,354	4,928	2,415	3,545	2,857
480.3099	19.70	9.6	2.16E-02	110,084	17,566	70,329	15,769	6,970	11,562	11,462
499.3777	30.14	2.3	6.17E-03	32,762	19,789	20,733	9,643	12,585	12,892	14,166
500.2776	19.18	6.1	5.45E-03	37,116	15,188	38,308	12,548	5,190	8,044	6,130
502.2922	19.67	8.7	1.46E-02	14,312	2,844	9,769	2,616	1,649	2,153	1,643
508.3060	19.12	4.8	1.09E-03	18,319	9,522	24,384	2,947	1,981	2,220	3,814
524.2905	19.07	4.7	1.90E-03	29,633	15,033	38,199	9,235	4,809	6,117	6,296
534.4870	45.51	2.3	5.25E-03	15,746	5,717	8,146	3,499	4,958	4,676	6,900
536.3738	37.40	2.4	5.95E-03	16,677	9,040	14,267	4,754	7,003	6,107	7,111
536.5046	46.30	2.4	2.49E-03	189,046	88,628	89,462	96,009	89,221	91,582	80,509
545.4551	45.51	2.2	7.81E-03	8,875	5,127	4,849	5,191	4,775	4,602	4,000
550.5188	46.79	2.4	2.03E-03	6,980	3,811	3,441	3,692	2,720	3,468	2,940
552.3307	19.56	6.3	9.43E-03	12,782	3,785	11,384	1,963	1,365	1,431	2,024
562.5192	46.60	3.2	2.62E-03	18,610	8,053	8,875	3,790	4,495	4,864	5,799
563.5177	46.60	7.9	1.47E-02	6,494	1,948	1,663	-	469	369	828
564.5369	47.31	2.9	2.71E-03	113,196	49,828	55,933	29,616	39,995	40,683	39,327
566.5477	47.55	2.5	3.60E-03	21,245	19,316	11,265	13,977	9,420	15,179	8,617
578.5506	47.77	3.9	6.51E-03	14,655	7,413	5,005	4,427	3,790	5,774	3,761
579.3906	30.49	3.0	2.43E-03	32,619	10,941	10,177	5,177	9,573	5,880	10,925
588.4408	43.57	2.1	5.75E-05	99,120	46,541	69,654	18,724	33,166	31,032	47,786
590.5535	47.52	4.6	8.73E-04	18,164	5,430	8,325	2,617	3,574	4,162	3,968
592.5679	48.26	3.8	7.89E-03	115,988	53,362	41,837	29,547	31,840	44,772	30,963

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
594.5795	48.51	3.1	1.96E-02	22,594	18,176	9,505	16,127	8,641	16,064	7,235
599.3229	30.35	5.6	4.14E-02	10,430	2,975	18,302	1,805	1,649	1,333	1,858
601.3719	30.38	5.9	1.21E-03	7,083	1,886	1,881	737	1,604	972	1,193
603.2946	28.74	2.4	1.14E-02	5,275	2,599	4,250	2,727	3,755	2,508	2,195
606.5839	48.78	3.5	4.30E-03	37,317	17,992	14,764	14,588	11,774	16,415	10,758
607.4324	31.88	2.6	3.02E-02	17,886	13,138	8,569	1,633	2,911	1,655	6,802
608.2561	19.66	6.0	4.55E-02	5,403	1,412	3,576	1,458	970	1,275	903
608.5976	49.06	3.6	1.07E-02	9,688	8,220	5,358	9,874	4,618	8,355	2,663
610.4139	43.58	2.2	1.83E-04	18,958	9,161	14,037	3,673	6,403	5,572	8,574
610.5764	47.72	4.1	4.12E-03	10,674	7,075	6,581	6,337	3,681	6,769	2,591
616.5626	47.73	6.7	2.74E-02	8,540	3,260	3,868	1,761	1,460	2,482	1,274
618.5835	48.46	4.7	5.38E-03	177,563	53,655	62,964	33,157	37,095	48,127	37,740
620.5995	49.31	3.1	2.21E-03	1,139,099	524,386	513,510	401,103	446,865	549,662	366,148
624.5944	48.33	3.5	4.42E-03	9,401	6,178	6,227	5,411	3,550	6,338	2,670
632.5998	49.06	4.0	1.94E-03	152,948	44,525	67,353	30,488	31,572	40,652	38,148
634.6156	49.89	2.8	3.40E-03	1,304,309	508,649	692,524	489,655	510,515	580,597	473,302
636.3900	24.17	3.8	3.87E-03	7,791	3,311	8,519	4,426	2,932	3,506	2,078
638.6095	48.70	2.9	1.31E-03	66,164	45,084	41,812	51,891	30,397	47,407	22,657
644.5940	48.66	3.9	1.30E-03	349,889	202,697	156,602	134,605	120,931	188,640	89,206
646.6156	49.41	3.2	2.79E-03	2,230,253	1,043,425	1,091,840	857,157	908,087	1,162,069	697,049
651.4311	18.18	2.0	4.55E-02	18,402	11,591	10,786	10,102	6,612	8,453	9,056
651.4634	46.98	2.6	9.54E-03	11,293	6,761	7,063	4,766	2,522	5,190	4,391

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
652.6251	49.24	2.3	1.28E-03	104,815	59,429	82,601	89,988	55,099	71,551	45,131
654.6037	48.24	2.9	1.65E-02	13,824	9,885	6,709	8,527	5,319	9,515	4,787
660.6314	50.01	3.3	9.78E-03	113,593	34,739	55,231	33,232	37,952	41,249	34,639
664.6219	48.77	3.7	1.40E-03	93,484	74,386	57,851	76,758	49,219	80,308	25,457
666.6413	49.79	2.5	1.03E-03	349,524	210,270	267,551	301,440	207,351	246,658	139,003
670.6112	50.51	2.1	3.19E-02	91,725	48,203	56,994	48,965	45,154	56,321	42,826
672.6243	49.75	3.5	8.65E-04	40,102	14,456	20,820	11,133	15,091	16,088	11,577
677.4836	47.42	3.0	2.25E-03	27,616	20,121	16,014	19,392	6,979	17,893	9,232
678.6372	49.26	2.3	3.00E-02	15,683	14,748	9,492	19,343	9,739	17,697	6,957
679.4978	47.98	6.0	3.14E-02	27,796	18,684	11,692	21,950	4,445	18,043	4,620
680.6065	48.25	2.9	3.64E-02	21,677	16,916	10,213	18,861	8,453	18,905	7,461
682.6333	49.26	2.6	2.36E-03	60,146	36,791	40,801	35,800	25,366	36,102	22,806
688.6152	50.52	2.1	5.39E-03	50,086	22,979	32,259	25,797	23,859	30,095	23,367
692.4162	24.10	6.3	3.99E-03	6,699	1,655	5,522	1,262	1,179	1,277	1,057
692.6514	49.84	2.4	2.16E-02	51,627	42,697	31,639	53,527	32,563	46,117	21,968
697.3632	25.02	2.9	4.08E-02	7,209	4,269	12,588	3,059	4,343	1,120	2,524
698.5579	45.39	3.5	2.06E-03	109,906	28,265	69,360	13,589	26,813	27,146	31,429
716.3835	43.58	2.8	9.65E-04	8,914	4,463	6,476	866	2,728	2,716	3,234
723.3789	25.65	5.0	5.92E-04	10,034	4,350	13,720	1,706	1,328	990	1,991
727.5753	45.54	2.7	2.88E-03	26,142	9,749	16,374	3,616	7,828	5,831	9,580
729.3873	25.04	3.1	1.14E-02	6,999	4,428	11,255	3,481	2,510	1,844	2,257
753.3891	24.72	5.3	4.53E-04	8,070	3,401	10,893	1,611	1,233	1,080	1,528

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
761.5433	44.15	2.1	1.66E-04	112,778	49,668	73,871	20,698	39,132	33,862	53,406
768.6192	49.92	2.0	1.52E-02	24,559	14,277	18,214	8,578	14,698	12,336	12,153
772.5269	40.60	2.7	2.75E-02	63,631	30,749	48,257	20,406	31,578	24,273	23,468
785.4144	24.75	4.9	1.69E-02	6,725	2,961	8,207	1,318	1,151	818	1,382
789.5582	45.53	2.1	1.03E-03	79,242	38,523	46,606	16,816	33,603	31,805	37,031
793.5021	28.49	4.3	4.34E-02	8,365	2,632	12,187	1,532	1,170	934	1,944
816.5776	43.53	18.5	5.76E-03	25,069	6,031	23,082	3,544	1,757	1,634	1,354
821.4135	25.12	3.6	2.93E-02	5,044	2,410	8,045	1,088	1,330	813	1,411
861.6685	48.20	2.9	8.70E-03	38,668	19,412	26,006	9,617	17,473	14,385	13,335
869.5191	27.68	4.7	2.34E-02	8,175	2,393	10,971	918	1,005	658	1,751
880.6777	39.38	2.2	7.05E-03	9,745	6,475	9,248	3,379	4,900	3,653	4,448
931.6073	28.18	2.5	1.58E-02	7,371	3,984	4,734	3,176	4,951	4,925	3,005
933.5356	30.27	4.6	3.25E-02	7,405	2,484	11,020	1,243	1,046	628	1,626
944.6030	34.45	2.4	4.01E-02	14,914	5,823	11,786	4,440	5,098	3,853	6,237
946.6209	28.14	2.2	1.88E-02	13,940	7,385	12,092	8,967	8,809	8,899	6,261
949.5316	29.45	7.1	2.44E-03	32,569	13,091	51,047	3,990	3,011	1,319	4,586
949.5316	30.35	8.2	2.14E-04	34,258	12,342	49,632	3,402	3,297	1,132	4,179
955.6774	18.19	2.1	3.27E-02	9,982	7,000	5,766	7,536	3,964	5,876	4,809
1015.6737	33.73	2.1	9.42E-03	31,269	22,595	34,575	19,768	20,477	19,164	14,932
1025.8572	49.45	5.5	3.83E-02	42,665	44,601	25,585	30,913	19,331	35,139	7,831
1077.6734	33.75	2.1	1.21E-02	8,218	6,199	8,737	5,456	5,955	5,125	3,982
1121.7371	36.57	2.1	1.02E-02	33,292	16,434	28,870	10,825	12,889	10,272	15,594

m/z	rt (min)	fold change (OVX/sham)	t-test (OVX vs. sham)	ion intensity (counts)						
				OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
1186.9371	46.07	2.2	1.07E-02	9,831	4,991	8,825	2,966	3,775	3,395	4,415
1225.7426	44.27	2.1	1.19E-02	12,701	6,823	9,414	3,843	7,636	6,280	6,168
1247.7308	44.30	2.4	3.72E-03	5,014	2,881	3,235	1,735	2,607	2,947	2,076
1404.1263	45.13	2.9	4.95E-03	50,677	20,243	25,549	7,669	22,202	14,766	17,328
1405.1297	45.13	3.1	2.59E-03	48,532	18,958	23,668	6,888	20,491	13,121	15,688
1435.6318	45.12	5.8	3.09E-03	18,428	6,281	5,528	817	4,122	3,048	3,176
1436.6332	45.12	5.9	2.98E-03	10,371	3,472	3,544	432	2,259	1,862	1,772
1446.6210	45.12	5.6	7.28E-03	14,442	5,924	5,041	1,271	3,788	3,900	2,572
1447.6258	45.12	5.0	8.78E-03	8,132	3,354	2,883	747	2,059	2,209	1,620
1466.1289	45.13	2.9	1.09E-02	47,557	19,866	25,757	7,584	22,624	14,589	16,343
1467.1318	45.13	2.9	8.69E-03	43,647	17,905	23,490	7,074	20,829	13,042	15,162
1477.6199	45.12	5.0	5.04E-03	19,788	8,049	5,491	1,855	5,319	5,202	3,984
1478.1214	45.12	4.7	2.37E-02	17,450	7,944	7,077	1,436	5,629	4,895	3,700
1489.1140	45.12	2.5	4.09E-02	27,413	16,269	15,540	7,510	13,916	12,395	10,963

ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.9 ไอออนโนซ์บวกและขั้วลบ ที่มีปริมาณแตกต่างกันใน OVX เมื่อเทียบกับ sham แต่มีระดับ mass ion intensity ใกล้เคียงกับ sham หลังให้สาร E2 (OVX+E2) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดง m/z, retention time (rt) และปริมาณไอออนที่ตรวจพบ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
116.0169	21.35	4,440	9,359	15,684	7,325	2,	7,505	10,409
162.0579	21.34	24,997	50,568	89,852	40,950	14,227	43,149	58,353
163.0760	46.16	50,715	25,891	39,829	16,145	18,313	19,660	23,713
174.1033	47.43	12,351	9,887	5,201	8,415	4,218	13,897	3,046
196.0389	19.13	10,015	3,578	8,789	2,543	1,094	1,782	1,934
203.0526	5.74	53,901	36,929	31,020	21,536	24,195	24,399	23,101
203.1814	17.80	10,259	5,783	7,923	4,020	2,228	3,646	4,758
221.1098	39.62	72,283	252,225	637,344	182,390	42,250	72,248	232,199
221.1104	9.49	253,609	489,154	665,974	566,354	203,528	809,479	809,171
221.1105	21.34	167,987	350,268	605,547	278,307	100,013	296,846	401,341
222.0970	9.28	85,889	149,472	275,229	174,198	30,434	175,023	195,861
223.1089	21.35	10,118	20,038	31,788	16,327	5,964	17,888	22,056
231.2106	18.20	27,424	15,681	17,925	14,376	10,425	12,952	13,157
235.0911	19.97	15,856	90,479	42,795	79,533	1,634	85,556	38,447
285.2219	47.41	165,265	134,143	65,352	113,300	63,692	153,488	48,102
293.1317	11.92	34,940	70,953	120,264	51,661	15,984	68,013	82,660
293.1317	21.34	476,383	1,005,049	1,708,189	779,904	280,457	835,218	1,132,440
315.2298	22.44	9,076	14,909	16,811	9,392	4,392	8,525	199,038
337.2150	22.43	3,811	4,482	4,597	3,513	3,106	3,835	29,960
373.2348	19.29	50,377	40,743	16,633	43,988	40,737	59,588	21,737

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
385.3502	45.44	7,234	3,259	4,565	2,087	3,214	2,736	3,027
383.1160	5.75	8,202	6,478	4,952	2,760	3,523	2,213	2,117
390.2638	18.94	7,624	3,326	5,288	2,099	1,154	1,470	1,481
403.1866	20.55	5,731	2,315	3,125	1,442	837	893	1,137
427.3572	45.40	11,763	2,303	8,846	2,665	2,623	2,449	1,707
429.3735	46.16	1,176,471	606,251	933,980	388,277	426,937	437,597	533,245
436.2821	19.23	44,399	9,735	22,640	3,844	2,431	3,714	4,295
451.2859	38.04	235,394	89,572	150,314	56,218	65,649	47,240	104,081
455.3157	15.22	2,514	6,171	11,413	9,952	3,021	3,838	8,836
459.3369	35.15	9,017	27,680	47,594	17,972	6,497	11,807	26,500
459.3392	40.11	62,881	205,467	436,932	134,739	34,409	63,967	195,531
462.2999	19.44	41,978	7,856	20,319	4,096	2,475	3,250	4,258
478.2938	19.35	25,248	7,052	19,354	4,928	2,415	3,545	2,857
480.3099	19.70	110,084	17,566	70,329	15,769	6,970	11,562	11,462
483.3405	39.63	113,772	369,494	683,470	208,344	63,881	116,236	373,229
485.3533	40.61	80,806	253,378	390,474	163,276	54,810	93,474	271,874
487.3685	41.76	4,965	16,781	27,482	10,484	4,100	4,860	20,938
499.3777	30.14	32,762	19,789	20,733	9,643	12,585	12,892	14,166
502.2922	19.67	14,312	2,844	9,769	2,616	1,649	2,153	1,643
505.3242	34.99	13,406	30,212	58,387	14,121	8,243	11,973	29,572
507.3417	39.61	29,570	110,151	427,067	66,908	14,165	35,985	116,210
515.3221	35.00	9,492	4,683	6,895	1,752	2,093	584	3,924
534.4870	45.51	15,746	5,717	8,146	3,499	4,958	4,676	6,900

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
536.3738	37.40	16,677	9,040	14,267	4,754	7,003	6,107	7,111
536.5046	46.30	189,046	88,628	89,462	96,009	89,221	91,582	80,509
545.4551	45.51	8,875	5,127	4,849	5,191	4,775	4,602	4,000
550.5188	46.79	6,980	3,811	3,441	3,692	2,720	3,468	2,940
552.3307	19.56	12,782	3,785	11,384	1,963	1,365	1,431	2,024
557.0195	19.91	2,663	5,038	41,162	4,467	2,834	4,859	8,058
562.5192	46.60	18,610	8,053	8,875	3,790	4,495	4,864	5,799
563.5177	46.60	6,494	1,948	1,663	-	469	369	828
564.5369	47.31	113,196	49,828	55,933	29,616	39,995	40,683	39,327
566.5477	47.55	21,245	19,316	11,265	13,977	9,420	15,179	8,617
568.5233	40.04	6,487	16,092	8,811	17,667	12,151	17,902	14,044
578.5506	47.77	14,655	7,413	5,005	4,427	3,790	5,774	3,761
579.3906	30.49	32,619	10,941	10,177	5,177	9,573	5,880	10,925
588.4408	43.57	99,120	46,541	69,654	18,724	33,166	31,032	47,786
590.5535	47.52	18,164	5,430	8,325	2,617	3,574	4,162	3,968
592.5679	48.26	115,988	53,362	41,837	29,547	31,840	44,772	30,963
594.5795	48.51	22,594	18,176	9,505	16,127	8,641	16,064	7,235
601.3719	30.38	7,083	1,886	1,881	737	1,604	972	1,193
603.2946	28.74	5,275	2,599	4,250	2,727	3,755	2,508	2,195
606.5839	48.78	37,317	17,992	14,764	14,588	11,774	16,415	10,758
607.4324	31.88	17,886	13,138	8,569	1,633	2,911	1,655	6,802
608.2561	19.66	5,403	1,412	3,576	1,458	970	1,275	903
608.5976	49.06	9,688	8,220	5,358	9,874	4,618	8,355	2,663

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
610.4139	43.58	18,958	9,161	14,037	3,673	6,403	5,572	8,574
610.5764	47.72	10,674	7,075	6,581	6,337	3,681	6,769	2,591
616.5626	47.73	8,540	3,260	3,868	1,761	1,460	2,482	1,274
617.5771	44.82	26,282	84	14,074	-	636	47	10,098
618.5835	48.46	177,563	53,655	62,964	33,157	37,095	48,127	37,740
620.5995	49.31	1,139,099	524,386	513,510	401,103	446,865	549,662	366,148
624.5944	48.33	9,401	6,178	6,227	5,411	3,550	6,338	2,670
632.5998	49.06	152,948	44,525	67,353	30,488	31,572	40,652	38,148
634.6156	49.89	1,304,309	508,649	692,524	489,655	510,515	580,597	473,302
638.6095	48.70	66,164	45,084	41,812	51,891	30,397	47,407	22,657
644.5940	48.66	349,889	202,697	156,602	134,605	120,931	188,640	89,206
646.6156	49.41	2,230,253	1,043,425	1,091,840	857,157	908,087	1,162,069	697,049
649.4753	37.10	65,011	55,169	91,933	12,551	87,808	158,074	409,957
651.4311	18.18	18,402	11,591	10,786	10,102	6,612	8,453	9,056
651.4634	46.98	11,293	6,761	7,063	4,766	2,522	5,190	4,391
652.6251	49.24	104,815	59,429	82,601	89,988	55,099	71,551	45,131
654.6037	48.24	13,824	9,885	6,709	8,527	5,319	9,515	4,787
660.6314	50.01	113,593	34,739	55,231	33,232	37,952	41,249	34,639
664.6219	48.77	93,484	74,386	57,851	76,758	49,219	80,308	25,457
666.6413	49.79	349,524	210,270	267,551	301,440	207,351	246,658	139,003
670.6112	50.51	91,725	48,203	56,994	48,965	45,154	56,321	42,826
672.6243	49.75	40,102	14,456	20,820	11,133	15,091	16,088	11,577
677.4836	47.42	27,616	20,121	16,014	19,392	6,979	17,893	9,232

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
678.6372	49.26	15,683	14,748	9,492	19,343	9,739	17,697	6,957
679.4978	47.98	27,796	18,684	11,692	21,950	4,445	18,043	4,620
680.6065	48.25	21,677	16,916	10,213	18,861	8,453	18,905	7,461
682.6333	49.26	60,146	36,791	40,801	35,800	25,366	36,102	22,806
688.6152	50.52	50,086	22,979	32,259	25,797	23,859	30,095	23,367
692.4162	24.10	6,699	1,655	5,522	1,262	1,179	1,277	1,057
692.6514	49.84	51,627	42,697	31,639	53,527	32,563	46,117	21,968
698.5579	45.39	109,906	28,265	69,360	13,589	26,813	27,146	31,429
716.3835	43.58	8,914	4,463	6,476	866	2,728	2,716	3,234
723.4432	20.06	2,719	5,943	3,307	3,477	1,155	6,731	6,513
727.5753	45.54	26,142	9,749	16,374	3,616	7,828	5,831	9,580
743.5570	39.62	75,030	38,500	67,949	13,608	25,662	19,838	30,370
761.5433	44.15	112,778	49,668	73,871	20,698	39,132	33,862	53,406
768.6192	49.92	24,559	14,277	18,214	8,578	14,698	12,336	12,153
772.5269	40.60	63,631	30,749	48,257	20,406	31,578	24,273	23,468
789.5582	45.53	79,242	38,523	46,606	16,816	33,603	31,805	37,031
796.5400	26.10	52,464	62,279	76,124	50,270	55,774	72,918	112,739
816.5776	43.53	25,069	6,031	23,082	3,544	1,757	1,634	1,354
861.6685	48.20	38,668	19,412	26,006	9,617	17,473	14,385	13,335
880.6777	39.38	9,745	6,475	9,248	3,379	4,900	3,653	4,448
931.6073	28.18	7,371	3,984	4,734	3,176	4,951	4,925	3,005
934.8718	49.44	200,046	189,676	388,652	727,284	261,498	446,499	423,062
944.6030	34.45	14,914	5,823	11,786	4,440	5,098	3,853	6,237

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
946.6209	28.14	13,940	7,385	12,092	8,967	8,809	8,899	6,261
955.6774	18.19	9,982	7,000	5,766	7,536	3,964	5,876	4,809
956.8553	49.08	189,641	201,589	350,055	616,035	234,593	411,124	387,745
958.8742	49.32	208,841	184,431	494,312	834,876	271,154	503,707	492,626
960.8896	49.61	224,891	172,205	487,301	874,748	261,877	479,214	506,426
962.9041	49.91	172,961	133,467	323,888	580,456	214,922	362,592	366,186
963.8380	49.27	3,977	12,931	13,381	40,838	15,966	25,266	21,847
970.8596	49.37	31,386	18,672	45,159	164,250	40,158	85,046	74,195
984.8893	49.49	179,393	149,459	359,437	665,354	228,938	415,440	393,446
986.9054	49.76	217,829	154,487	456,154	777,083	253,619	441,521	501,995
988.9200	50.07	193,349	118,135	396,613	631,190	206,151	353,130	425,418
990.9336	50.40	115,466	70,570	205,774	318,202	122,088	197,050	239,260
1000.9183	50.02	28,822	20,297	45,680	85,986	29,243	45,528	60,482
1002.9327	50.36	30,465	20,254	51,304	82,893	29,697	43,157	61,872
1004.9540	50.68	20,696	14,854	35,953	55,658	18,985	30,747	42,115
1006.8745	49.22	60,746	56,972	105,779	171,758	82,279	137,752	123,882
1008.8875	49.47	80,184	66,513	130,971	235,315	100,766	168,114	161,443
1010.9055	49.72	129,664	98,713	205,512	410,266	180,723	284,770	282,093
1012.9203	49.93	139,906	90,865	262,937	444,717	165,196	281,649	316,998
1014.9353	50.24	126,300	67,711	249,095	366,092	125,132	210,336	276,924
1016.9496	50.57	93,247	46,608	188,471	244,242	85,311	138,407	203,866
1025.8572	49.45	42,665	44,601	25,585	30,913	19,331	35,139	7,831
1038.9311	50.22	50,271	31,881	68,037	125,567	58,093	81,706	101,850

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
1040.9491	50.40	47,721	23,184	86,292	117,223	48,121	74,979	107,748
1044.9806	51.15	45,584	18,719	85,076	98,642	38,120	58,666	91,636
1054.2930	49.61	746,851	382,708	780,456	757,862	724,575	860,472	1,536,971
1055.2946	49.61	761,446	397,742	795,197	776,272	762,370	871,143	1,577,563
1056.2926	49.61	750,366	392,738	789,689	764,435	734,656	864,843	1,536,550
1057.2932	49.61	478,237	253,116	507,722	494,399	480,281	547,410	995,936
1066.9592	50.76	13,002	4,046	19,572	38,920	15,023	27,519	30,593
1068.9813	50.95	22,675	10,503	40,993	55,683	21,065	33,004	47,588
1097.0141	51.60	18,273	8,942	27,513	44,021	18,115	25,805	37,564
1121.7371	36.57	33,292	16,434	28,870	10,825	12,889	10,272	15,594
1128.3114	50.40	673,777	329,090	730,984	718,408	686,625	779,181	1,497,212
1141.3113	50.32	4,510	3,329	4,616	4,738	3,244	4,080	9,403
1186.9371	46.07	9,831	4,991	8,825	2,966	3,775	3,395	4,415
1202.3285	51.30	558,269	268,652	612,445	604,286	576,288	634,671	1,291,422
1216.3301	51.22	3,678	3,944	4,924	5,797	3,490	4,208	10,785
1225.7426	44.27	12,701	6,823	9,414	3,843	7,636	6,280	6,168
1247.7308	44.30	5,014	2,881	3,235	1,735	2,607	2,947	2,076
1276.3473	52.33	443,355	212,914	481,547	476,106	446,034	493,929	1,014,023
1350.3645	53.54	326,233	157,074	350,955	351,137	325,859	348,480	767,030
1404.1263	45.13	50,677	20,243	25,549	7,669	22,202	14,766	17,328
1405.1297	45.13	48,532	18,958	23,668	6,888	20,491	13,121	15,688
1417.6203	40.26	34,280	12,280	15,057	3,781	11,113	10,795	16,357
1424.3827	54.94	205,564	94,462	225,064	211,478	179,011	220,551	475,056

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
1435.6318	45.12	18,428	6,281	5,528	817	4,122	3,048	3,176
1436.6332	45.12	10,371	3,472	3,544	432	2,259	1,862	1,772
1446.6210	45.12	14,442	5,924	5,041	1,271	3,788	3,900	2,572
1447.6258	45.12	8,132	3,354	2,883	747	2,059	2,209	1,620
1466.1289	45.13	47,557	19,866	25,757	7,584	22,624	14,589	16,343
1467.1318	45.13	43,647	17,905	23,490	7,074	20,829	13,042	15,162
1477.6199	45.12	19,788	8,049	5,491	1,855	5,319	5,202	3,984
1478.1214	45.12	17,450	7,944	7,077	1,436	5,629	4,895	3,700
1489.1140	45.12	27,413	16,269	15,540	7,510	13,916	12,395	10,963

ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.10 ไอออนในขั้วบวกและขั้วลบ ที่มีปริมาณแตกต่างกันใน OVX เมื่อเทียบกับ sham แต่มีระดับ mass ion intensity ใกล้เคียงกับ sham หลังให้ สารสกัดจากว่านชักมดลูก (OVX+EXT, OVX+P1000, OVX+P2000) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt), และไอออนที่ตรวจพบ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
174.1033	47.43	12,351	9,887	5,201	8,415	4,218	13,897	3,046
196.0389	19.13	10,015	3,578	8,789	2,543	1,094	1,782	1,934
203.0526	5.74	53,901	36,929	31,020	21,536	24,195	24,399	23,101
203.1814	17.80	10,259	5,783	7,923	4,020	2,228	3,646	4,758
221.1104	9.49	253,609	489,154	665,974	566,354	203,528	809,479	809,171
222.0970	9.28	85,889	149,472	275,229	174,198	30,434	175,023	195,861
231.2106	18.20	27,424	15,681	17,925	14,376	10,425	12,952	13,157
235.0911	19.97	15,856	90,479	42,795	79,533	1,634	85,556	38,447
285.2219	47.41	165,265	134,143	65,352	113,300	63,692	153,488	48,102
373.2348	19.29	50,377	40,743	16,633	43,988	40,737	59,588	21,737
381.2048	20.44	33,974	9,760	16,149	3,492	770	2,061	1,953
383.1160	5.75	8,202	6,478	4,952	2,760	3,523	2,213	2,117
385.3502	45.44	7,234	3,259	4,565	2,087	3,214	2,736	3,027
390.2638	18.94	7,624	3,326	5,288	2,099	1,154	1,470	1,481
403.1866	20.55	5,731	2,315	3,125	1,442	837	893	1,137
436.2821	19.23	44,399	9,735	22,640	3,844	2,431	3,714	4,295
455.3157	15.22	2,514	6,171	11,413	9,952	3,021	3,838	8,836
462.2999	19.44	41,978	7,856	20,319	4,096	2,475	3,250	4,258
478.2938	19.35	25,248	7,052	19,354	4,928	2,415	3,545	2,857

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
499.3777	30.14	32,762	19,789	20,733	9,643	12,585	12,892	14,166
502.2922	19.67	14,312	2,844	9,769	2,616	1,649	2,153	1,643
536.3738	37.40	16,677	9,040	14,267	4,754	7,003	6,107	7,111
545.4551	45.51	8,875	5,127	4,849	5,191	4,775	4,602	4,000
550.5188	46.79	6,980	3,811	3,441	3,692	2,720	3,468	2,940
552.3307	19.56	12,782	3,785	11,384	1,963	1,365	1,431	2,024
562.5192	46.60	18,610	8,053	8,875	3,790	4,495	4,864	5,799
563.5177	46.60	6,494	1,948	1,663	-	469	369	828
564.5369	47.31	113,196	49,828	55,933	29,616	39,995	40,683	39,327
566.5477	47.55	21,245	19,316	11,265	13,977	9,420	15,179	8,617
568.5233	40.04	6,487	16,092	8,811	17,667	12,151	17,902	14,044
578.5506	47.77	14,655	7,413	5,005	4,427	3,790	5,774	3,761
590.5535	47.52	18,164	5,430	8,325	2,617	3,574	4,162	3,968
592.5679	48.26	115,988	53,362	41,837	29,547	31,840	44,772	30,963
594.5795	48.51	22,594	18,176	9,505	16,127	8,641	16,064	7,235
601.3719	30.38	7,083	1,886	1,881	737	1,604	972	1,193
603.2946	28.74	5,275	2,599	4,250	2,727	3,755	2,508	2,195
606.5839	48.78	37,317	17,992	14,764	14,588	11,774	16,415	10,758
607.4324	31.88	17,886	13,138	8,569	1,633	2,911	1,655	6,802
608.2561	19.66	5,403	1,412	3,576	1,458	970	1,275	903
608.5976	49.06	9,688	8,220	5,358	9,874	4,618	8,355	2,663
610.5764	47.72	10,674	7,075	6,581	6,337	3,681	6,769	2,591
616.5626	47.73	8,540	3,260	3,868	1,761	1,460	2,482	1,274

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
617.5771	44.82	26,282	84	14,074	-	636	47	10,098
618.5835	48.46	177,563	53,655	62,964	33,157	37,095	48,127	37,740
620.5995	49.31	1,139,099	524,386	513,510	401,103	446,865	549,662	366,148
624.5944	48.33	9,401	6,178	6,227	5,411	3,550	6,338	2,670
632.5998	49.06	152,948	44,525	67,353	30,488	31,572	40,652	38,148
634.6156	49.89	1,304,309	508,649	692,524	489,655	510,515	580,597	473,302
638.6095	48.70	66,164	45,084	41,812	51,891	30,397	47,407	22,657
644.5940	48.66	349,889	202,697	156,602	134,605	120,931	188,640	89,206
646.6156	49.41	2,230,253	1,043,425	1,091,840	857,157	908,087	1,162,069	697,049
649.4753	37.10	65,011	55,169	91,933	12,551	87,808	158,074	409,957
651.4311	18.18	18,402	11,591	10,786	10,102	6,612	8,453	9,056
651.4634	46.98	11,293	6,761	7,063	4,766	2,522	5,190	4,391
652.6251	49.24	104,815	59,429	82,601	89,988	55,099	71,551	45,131
654.6037	48.24	13,824	9,885	6,709	8,527	5,319	9,515	4,787
664.6219	48.77	93,484	74,386	57,851	76,758	49,219	80,308	25,457
666.6413	49.79	349,524	210,270	267,551	301,440	207,351	246,658	139,003
670.6112	50.51	91,725	48,203	56,994	48,965	45,154	56,321	42,826
672.6243	49.75	40,102	14,456	20,820	11,133	15,091	16,088	11,577
677.4836	47.42	27,616	20,121	16,014	19,392	6,979	17,893	9,232
678.6372	49.26	15,683	14,748	9,492	19,343	9,739	17,697	6,957
679.4978	47.98	27,796	18,684	11,692	21,950	4,445	18,043	
680.6065	48.25	21,677	16,916	10,213	18,861	8,453	18,905	7,461

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
682.6333	49.26	60,146	36,791	40,801	35,800	25,366	36,102	22,806
692.4162	24.10	6,699	1,655	5,522	1,262	1,179	1,277	1,057
692.6514	49.84	51,627	42,697	31,639	53,527	32,563	46,117	21,968
716.3835	43.58	8,914	4,463	6,476	866	2,728	2,716	3,234
723.4432	20.06	2,719	5,943	3,307	3,477	1,155	6,731	6,513
743.5570	39.62	75,030	38,500	67,949	13,608	25,662	19,838	30,370
768.6192	49.92	24,559	14,277	18,214	8,578	14,698	12,336	12,153
772.5269	40.60	63,631	30,749	48,257	20,406	31,578	24,273	23,468
796.5400	26.10	52,464	62,279	76,124	50,270	55,774	72,918	112,739
816.5776	43.53	25,069	6,031	23,082	3,544	1,757	1,634	1,354
861.6685	48.20	38,668	19,412	26,006	9,617	17,473	14,385	13,335
880.6777	39.38	9,745	6,475	9,248	3,379	4,900	3,653	4,448
931.6073	28.18	7,371	3,984	4,734	3,176	4,951	4,925	3,005
934.8718	49.44	200,046	189,676	388,652	727,284	261,498	446,499	423,062
955.6774	18.19	9,982	7,000	5,766	7,536	3,964	5,876	4,809
956.8553	49.08	189,641	201,589	350,055	616,035	234,593	411,124	387,745
958.8742	49.32	208,841	184,431	494,312	834,876	271,154	503,707	492,626
960.8896	49.61	224,891	172,205	487,301	874,748	261,877	479,214	506,426
962.9041	49.91	172,961	133,467	323,888	580,456	214,922	362,592	366,186
963.8380	49.27	3,977	12,931	13,381	40,838	15,966	25,266	21,847
970.8596	49.37	31,386	18,672	45,159	164,250	40,158	85,046	74,195
984.8893	49.49	179,393	149,459	359,437	665,354	228,938	415,440	393,446

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
986.9054	49.76	217,829	154,487	456,154	777,083	253,619	441,521	501,995
988.9200	50.07	193,349	118,135	396,613	631,190	206,151	353,130	425,418
990.9336	50.40	115,466	70,570	205,774	318,202	122,088	197,050	239,260
1000.9183	50.02	28,822	20,297	45,680	85,986	29,243	45,528	60,482
1002.9327	50.36	30,465	20,254	51,304	82,893	29,697	43,157	61,872
1004.9540	50.68	20,696	14,854	35,953	55,658	18,985	30,747	42,115
1006.8745	49.22	60,746	56,972	105,779	171,758	82,279	137,752	123,882
1008.8875	49.47	80,184	66,513	130,971	235,315	100,766	168,114	161,443
1010.9055	49.72	129,664	98,713	205,512	410,266	180,723	284,770	282,093
1012.9203	49.93	139,906	90,865	262,937	444,717	165,196	281,649	316,998
1014.9353	50.24	126,300	67,711	249,095	366,092	125,132	210,336	276,924
1016.9496	50.57	93,247	46,608	188,471	244,242	85,311	138,407	203,866
1025.8572	49.45	42,665	44,601	25,585	30,913	19,331	35,139	7,831
1038.9311	50.22	50,271	31,881	68,037	125,567	58,093	81,706	101,850
1040.9491	50.40	47,721	23,184	86,292	117,223	48,121	74,979	107,748
1044.9806	51.15	45,584	18,719	85,076	98,642	38,120	58,666	91,636
1054.2930	49.61	746,851	382,708	780,456	757,862	724,575	860,472	1,536,971
1055.2946	49.61	761,446	397,742	795,197	776,272	762,370	871,143	1,577,563
1056.2926	49.61	750,366	392,738	789,689	764,435	734,656	864,843	1,536,550
1057.2932	49.61	478,237	253,116	507,722	494,399	480,281	547,410	995,936
1066.9592	50.76	13,002	4,046	19,572	38,920	15,023	27,519	30,593
1068.9813	50.95	22,675	10,503	40,993	55,683	21,065	33,004	47,588

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
1097.0141	51.60	18,273	8,942	27,513	44,021	18,115	25,805	37,564
1128.3114	50.40	673,777	329,090	730,984	718,408	686,625	779,181	1,497,212
1141.3113	50.32	4,510	3,329	4,616	4,738	3,244	4,080	9,403
1202.3285	51.30	558,269	268,652	612,445	604,286	576,288	634,671	1,291,422
1216.3301	51.22	3,678	3,944	4,924	5,797	3,490	4,208	10,785
1225.7426	44.27	12,701	6,823	9,414	3,843	7,636	6,280	6,168
1247.7308	44.30	5,014	2,881	3,235	1,735	2,607	2,947	2,076
1276.3473	52.33	443,355	212,914	481,547	476,106	446,034	493,929	1,014,023
1350.3645	53.54	326,233	157,074	350,955	351,137	325,859	348,480	767,030
1404.1263	45.13	50,677	20,243	25,549	7,669	22,202	14,766	17,328
1405.1297	45.13	48,532	18,958	23,668	6,888	20,491	13,121	15,688
1424.3827	54.94	205,564	94,462	225,064	211,478	179,011	220,551	475,056
1435.6318	45.12	18,428	6,281	5,528	817	4,122	3,048	3,176
1436.6332	45.12	10,371	3,472	3,544	432	2,259	1,862	1,772
1446.6210	45.12	14,442	5,924	5,041	1,271	3,788	3,900	2,572
1447.6258	45.12	8,132	3,354	2,883	747	2,059	2,209	1,620
1466.1289	45.13	47,557	19,866	25,757	7,584	22,624	14,589	16,343
1467.1318	45.13	43,647	17,905	23,490	7,074	20,829	13,042	15,162
1477.6199	45.12	19,788	8,049	5,491	1,855	5,319	5,202	3,984
1478.1214	45.12	17,450	7,944	7,077	1,436	5,629	4,895	3,700
1489.1140	45.12	27,413	16,269	15,540	7,510	13,916	12,395	10,963

ตารางที่ 3.11 ไอออนในชั่ววอกและชั่วลน ที่มีปริมาณแตกต่างกันใน OVX เมื่อเทียบกับ sham แต่มีระดับ mass ion intensity ใกล้เคียงกับ sham หลังให้สาร DPHD (OVX+DPHD) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย m/z, retention time (rt) และปริมาณไอออนที่ตรวจพบ (mass ion intensity)

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
116.0169	21.35	4,440	9,359	15,684	7,325	2,393	7,505	10,409
162.0579	21.34	24,997	50,568	89,852	40,950	14,227	43,149	58,353
163.0760	46.16	50,715	25,891	39,829	16,145	18,313	19,660	23,713
221.1098	39.62	72,283	252,225	637,344	182,390	42,250	72,248	232,199
221.1105	21.34	167,987	350,268	605,547	278,307	100,013	296,846	401,341
223.1089	21.35	10,118	20,038	31,788	16,327	5,964	17,888	22,056
293.1317	11.92	34,940	70,953	120,264	51,661	15,984	68,013	82,660
293.1317	21.34	476,383	1,005,049	1,708,189	779,904	280,457	835,218	1,132,440
315.2298	22.44	9,076	14,909	16,811	9,392	4,392	8,525	199,038
337.2150	22.43	3,811	4,482	4,597	3,513	3,106	3,835	29,960
427.3572	45.40	11,763	2,303	8,846	2,665	2,623	2,449	1,707
429.3735	46.16	1,176,471	606,251	933,980	388,277	426,937	437,597	533,245
451.2859	38.04	235,394	89,572	150,314	56,218	65,649	47,240	104,081
459.3369	35.15	9,017	27,680	47,594	17,972	6,497	11,807	26,500
459.3392	40.11	62,881	205,467	436,932	134,739	34,409	63,967	195,531
483.3405	39.63	113,772	369,494	683,470	208,344	63,881	116,236	373,229
485.3533	40.61	80,806	253,378	390,474	163,276	54,810	93,474	271,874
487.3685	41.76	4,965	16,781	27,482	10,484	4,100	4,860	20,938
505.3242	34.99	13,406	30,212	58,387	14,121	8,243	11,973	29,572
507.3417	39.61	29,570	110,151	427,067	66,908	14,165	35,985	116,210

m/z	rt (min)	ion intensity (counts)						
		OVX	OVX+DPHD	OVX+E2	OVX+EXT	OVX+P1000	OVX+P2000	sham
515.3221	35.00	9,492	4,683	6,895	1,752	2,093	584	3,924
534.4870	45.51	15,746	5,717	8,146	3,499	4,958	4,676	6,900
535.0348	19.94	12,311	27,995	285,786	24,967	14,078	26,366	43,768
536.5046	46.30	189,046	88,628	89,462	96,009	89,221	91,582	80,509
557.0195	19.91	2,663	5,038	41,162	4,467	2,834	4,859	8,058
579.3906	30.49	32,619	10,941	10,177	5,177	9,573	5,880	10,925
588.4408	43.57	99,120	46,541	69,654	18,724	33,166	31,032	47,786
610.4139	43.58	18,958	9,161	14,037	3,673	6,403	5,572	8,574
660.6314	50.01	113,593	34,739	55,231	33,232	37,952	41,249	34,639
688.6152	50.52	50,086	22,979	32,259	25,797	23,859	30,095	23,367
698.5579	45.39	109,906	28,265	69,360	13,589	26,813	27,146	31,429
727.5753	45.54	26,142	9,749	16,374	3,616	7,828	5,831	9,580
761.5433	44.15	112,778	49,668	73,871	20,698	39,132	33,862	53,406
789.5582	45.53	79,242	38,523	46,606	16,816	33,603	31,805	37,031
944.6030	34.45	14,914	5,823	11,786	4,440	5,098	3,853	6,237
946.6209	28.14	13,940	7,385	12,092	8,967	8,809	8,899	6,261
1121.7371	36.57	33,292	16,434	28,870	10,825	12,889	10,272	15,594
1186.9371	46.07	9,831	4,991	8,825	2,966	3,775	3,395	4,415
1417.6203	40.26	34,280	12,280	15,057	3,781	11,113	10,795	16,357

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

เมทาโบโลมิกส์แบบจำเพาะเจาะจง (Targeted metabolomics)

เมทาโบโลมิกส์แบบจำเพาะเจาะจงเป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเมทาโบไลต์ที่สนใจในกลุ่มตัวอย่างต่างๆ ในที่นี้ผู้วิจัยสนใจวิเคราะห์ปริมาณของไขมันชนิดต่างๆที่พบมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพราะไขมันเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับระบบในร่างกายค่อนข้างมาก ถ้าไขมันในร่างกายอยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้เกิดโรคต่างๆได้ เช่น การพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งเป็นกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนก่อให้เกิดโรคกระดูกพรุน เป็นต้น

คณะผู้วิจัยได้ทำการค้นหาไอออนของไขมันชนิดต่างๆที่สนใจ โดยการเปรียบเทียบ มวลต่อประจุ (m/z) ของไอออนของเมทาโบไลต์เหล่านี้ที่พบได้ในข้อมูลและข้อมูลใน XCMS output file กับ m/z ของไขมันนั้นๆ โดยมีค่าความผิดพลาด ไม่เกิน ± 20 ppm

ตารางที่ 4.1 และ 4.2 แสดงปริมาณเชิงเปรียบเทียบของไอออนของไขมันต่างๆที่เป็นไปได้ในกลุ่ม sham กับกลุ่ม OVX ในข้อมูลและข้อมูลตามลำดับ จากไอออนที่พบนี้ ไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับกลุ่ม OVX ที่มีอัตราส่วนการเปลี่ยนแปลง mass ion intensity ในตัวอย่าง 2 กลุ่ม 2 เท่าขึ้นไปมีจำนวน 1 ไอออน ได้แก่ Alkyl-PE C36:4 m/z 724.5296 และไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham ที่ผ่านการคัดกรองในลักษณะเดียวกัน มี 9 ไอออน ได้แก่ FFA C18:0 m/z 283.2648, LPA C14:0 m/z 381.2048, Alkyl-PE C38:5 m/z 750.5415, LPS C18:0 m/z 524.2905, Alkyl-LPS C18:1 m/z 508.3060, PG C34:1 m/z 747.5189, PG C36:1 m/z 775.5455 , PI C32:1 m/z 807.5048 และ Sphingosine 1-PG m/z 452.2716 โดยไอออนทั้งหมดนี้เป็นไอออนที่พบในการวิเคราะห์ข้อมูล (Negative mode) ทั้งสิ้น

เนื่องจาก OVX เป็นหนูที่ถูกตัดรังไข่ ซึ่งรังไข่ไม่ได้ส่งผลต่อการผลิตเอสโตรเจนเท่านั้น รังไข่อาจเกี่ยวข้องกับการผลิตเมทาโบไลต์ในระบบอื่นๆของร่างกายด้วย ดังนั้นการหาว่าเมทาโบไลต์ใดที่เกี่ยวข้องกับภาวะการพร่องเอสโตรเจนเท่านั้น สารที่เราสนใจอีกกลุ่มหนึ่งคือ OVX+E2 เนื่องจากถ้าเมทาโบไลต์เหล่านี้เป็นผลมาจากการพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนเมื่อให้เอสโตรเจนกับหนูที่ตัดรังไข่ออก เมทาโบไลต์นั้นก็ควรที่จะเพิ่มสูงขึ้นหรือลดลงให้ใกล้เคียงกับเมทาโบไลต์ที่พบในกลุ่ม sham จากไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับกลุ่ม OVX และไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่ม OVX เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham ที่ผ่านการคัดกรองในลักษณะเดียวกัน จำนวน 10 ไอออนข้างต้น พบว่าเมทาโบไลต์ที่ตรงกับลักษณะดังกล่าวมี 6 ไอออน ได้แก่ FFA C18:0 , LPA C14:0, Alkyl-PE C38:5, PG C34:1, PG C36:1 และ Sphingosine 1-PG

เมื่อนำเมทาโบไลต์ทั้ง 6 ไอออนมาพิจารณาเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการรักษาหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสาร DPHD และสารสกัดจากว่านชักมดลูก โดยเปรียบเทียบปริมาณ mass ion intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม sham จากการศึกษาพบว่าสาร DPHD ส่งผลกระทบต่อระดับของเมทาโบไลต์ 1 ตัวเท่านั้น คือ Sphingosine 1-PG ส่วนสารสกัดจากว่านชักมดลูกส่งผลกระทบต่อระดับของเมทาโบไลต์ 5 ชนิด ได้แก่ FFA C18:0 , LPA C14:0, Alkyl-PE C38:5, PG C34:1, PG C36:1 เป็นที่น่าสนใจว่าสาร DPHD ซึ่งเป็นสารหนึ่งในสารสกัดจากว่านชักมดลูกส่งผลกระทบต่อระดับเมทาโบไลต์คนละกลุ่มกับสารสกัดจากว่านชักมดลูกโดยสิ้นเชิง แสดงให้เห็นถึงผลการรักษาที่แตกต่างกันที่อาจพบได้จากการรักษาด้วยสมุนไพรเทียบกับสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ดังเช่นในยาแผนตะวันตก



ตารางที่ 4.1 ไอออนในชั่ววอกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูกุ่ม OVX หลังให้สารต่างๆเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย ประเภทของไขมัน, Acyl chain Ion, m/z (theoretical), m/z (measured), retention time (rt), ttest (OVX vs. sham), OVX/sham, sham/OVX

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
NAE							
C14:0	[M + H] ⁺	272.2590	272.2576	24.64	8.83E-01	1.05	0.95
C14:0	[M + H] ⁺	272.2590	272.2562	23.91	5.75E-01	0.67	1.50
C16:0	[M + H] ⁺	300.2903	300.2894	27.63	7.53E-01	0.95	1.05
C20:4	[M + H] ⁺	348.2903	348.2850	29.32	7.46E-01	0.92	1.09
C16:0	[M + Na] ⁺	322.2722	322.2702	27.60	2.81E-01	1.09	0.91
MAGs							
C18:0	[M + H] ⁺	359.3161	359.3138	35.60	5.13E-01	1.08	0.92
C20:4	[M + H] ⁺	379.2848	379.2819	34.23	1.89E-01	0.73	1.38
C16:0	[M + Na] ⁺	353.2668	353.2657	33.49	7.35E-01	1.08	0.93
C18:2	[M + Na] ⁺	377.2668	377.2696	32.54	2.55E-01	0.58	1.73
C18:1	[M + Na] ⁺	379.2824	379.2819	34.23	1.89E-01	0.73	1.38
C18:0	[M + Na] ⁺	381.2981	381.2973	35.60	6.52E-01	1.06	0.95
C16:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	313.2743	313.2728	33.46	7.44E-01	1.04	0.96
C18:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	341.3056	341.3041	35.61	6.68E-01	1.05	0.95

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
DAGs							
C34:1	[M + H] ⁺	595.5302	595.5327	44.25	4.11E-01	1.14	0.88
C34:2	[M + H] ⁺	593.5145	593.5119	43.61	8.66E-01	1.02	0.98
C36:4	[M + H] ⁺	617.5145	617.5117	43.39	3.95E-01	1.11	0.90
C36:2	[M + H] ⁺	621.5458	621.5434	44.48	1.61E-01	0.64	1.57
C38:4	[M + H] ⁺	645.5458	645.5401	44.49	4.26E-01	0.83	1.21
C34:1	[M + Na] ⁺	617.5121	617.5110	44.30	7.95E-02	0.76	1.32
C34:2	[M + Na] ⁺	615.4964	615.4963	43.53	2.75E-01	0.70	1.43
C36:4	[M + Na] ⁺	639.4964	639.4992	43.42	7.08E-01	1.09	0.92
C36:1	[M + Na] ⁺	645.5434	645.5401	44.49	4.26E-01	0.83	1.21
C34:1	[M + NH ₄] ⁺	612.5567	612.5541	44.23	8.17E-01	1.03	0.97
C36:3	[M + NH ₄] ⁺	636.5567	636.5550	43.98	2.44E-01	1.14	0.88
C36:2	[M + NH ₄] ⁺	638.5723	638.5704	44.37	6.33E-01	0.97	1.04
C38:5	[M + NH ₄] ⁺	660.5567	660.5535	44.06	1.49E-01	1.34	0.75
C38:4	[M + NH ₄] ⁺	662.5723	662.5726	44.63	3.49E-01	1.14	0.88
C34:1	[M + H - H ₂ O] ⁺	577.5196	577.5189	44.26	1.09E-01	1.20	0.83
C34:2	[M + H - H ₂ O] ⁺	575.5039	575.5020	43.64	1.72E-01	1.21	0.83
C34:3	[M + H - H ₂ O] ⁺	573.4883	573.4831	43.16	1.06E-01	1.31	0.77
C36:4	[M + H - H ₂ O] ⁺	599.5039	599.5027	43.43	1.98E-01	1.22	0.82

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measure)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
DAGs							
C36:3	[M + H - H ₂ O] ⁺	601.5196	601.5171	44.01	1.92E-01	1.21	0.83
C36:2	[M + H - H ₂ O] ⁺	603.5352	603.5348	44.54	3.24E-01	1.14	0.88
C36:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	607.5665	607.5628	45.46	8.75E-01	0.98	1.02
C38:5	[M + H - H ₂ O] ⁺	625.5196	625.5181	44.11	1.66E-01	1.33	0.75
TAGs							
C54:4	[M + H] ⁺	883.7755	883.7704	48.76	7.43E-02	0.81	1.24
C56:8	[M + H] ⁺	903.7442	903.7404	47.70	8.01E-02	0.64	1.55
C50:2	[M + Na] ⁺	853.7261	853.7260	47.60	2.32E-01	1.16	0.86
C50:1	[M + Na] ⁺	855.7418	855.7406	47.81	2.88E-01	1.14	0.88
C54:6	[M + Na] ⁺	901.7261	901.7298	47.56	2.70E-01	0.86	1.17
C54:5	[M + Na] ⁺	903.7418	903.7404	47.70	8.01E-02	0.64	1.55
C54:1	[M + Na] ⁺	911.8044	911.8051	49.10	4.71E-04	0.64	1.57
C56:2	[M + Na] ⁺	937.8200	937.8272	49.22	5.09E-04	0.43	2.35
C50:1	[M + NH ₄] ⁺	850.7864	850.7817	48.26	2.60E-01	1.11	0.90
C54:5	[M + NH ₄] ⁺	898.7864	898.7827	47.98	9.59E-01	1.00	1.00
C54:3	[M + NH ₄] ⁺	902.8177	902.8136	48.58	3.04E-01	0.88	1.13
C54:1	[M + NH ₄] ⁺	906.8490	906.8401	49.01	2.16E-03	0.69	1.46
C56:10	[M + NH ₄] ⁺	916.7394	916.7373	47.28	7.61E-01	0.96	1.05

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
LPC							
C14:0	[M + H] ⁺	468.3090	468.3083	28.19	1.35E-01	1.13	0.88
C16:0	[M + H] ⁺	496.3403	496.3458	30.71	1.13E-01	1.06	0.95
C18:2	[M + H] ⁺	520.3403	520.3417	29.95	3.27E-01	1.06	0.94
C18:1	[M + H] ⁺	522.3560	522.3576	31.39	4.03E-02	1.13	0.89
C18:0	[M + H] ⁺	524.3716	524.3781	33.07	1.99E-01	1.13	0.89
C20:4	[M + H] ⁺	544.3403	544.3421	30.21	6.87E-01	1.05	0.95
C22:0	[M + H] ⁺	580.4342	580.4326	36.98	1.22E-02	1.41	0.71
C14:0	[M + Na] ⁺	490.2910	490.2902	28.19	3.04E-01	1.09	0.92
C16:0	[M + Na] ⁺	518.3223	518.3215	30.94	5.50E-01	0.89	1.12
C18:2	[M + Na] ⁺	542.3223	542.3217	29.88	8.64E-01	0.98	1.02
C18:1	[M + Na] ⁺	544.3379	544.3377	31.41	7.18E-01	1.02	0.98
C18:0	[M + Na] ⁺	546.3536	546.3529	33.29	9.32E-01	0.99	1.01
C20:4	[M + Na] ⁺	566.3223	566.3215	30.25	2.73E-01	0.80	1.24
C22:0	[M + Na] ⁺	602.4162	602.4151	36.96	4.80E-03	1.95	0.51
C14:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	450.2985	450.2990	28.19	1.01E-01	1.16	0.86
C16:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	478.3298	478.3292	30.68	2.03E-02	1.10	0.91
C18:2	[M + H - H ₂ O] ⁺	502.3298	502.3288	29.95	2.44E-01	1.09	0.92
C18:1	[M + H - H ₂ O] ⁺	504.3454	504.3441	31.42	4.42E-02	1.13	0.88

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
LPC							
C18:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	506.3611	506.3600	32.98	1.86E-02	1.14	0.88
C20:4	[M + H - H ₂ O] ⁺	526.3298	526.3286	30.20	7.20E-01	1.05	0.95
Alkyl-LPC							
C18:1	[M + H] ⁺	508.3767	508.3755	32.35	1.07E-01	1.10	0.91
C16:0	[M + Na] ⁺	504.3430	504.3441	31.42	4.42E-02	1.13	0.88
C18:1	[M + Na] ⁺	530.3586	530.3585	32.33	7.64E-01	1.03	0.97
PC							
C32:1	[M + H] ⁺	732.5543	732.5535	40.77	9.65E-02	1.28	0.78
C34:1	[M + H] ⁺	760.5856	760.5863	41.91	4.48E-01	1.04	0.96
C34:2	[M + H] ⁺	758.5700	758.5727	41.12	6.43E-01	1.02	0.98
C34:3	[M + H] ⁺	756.5543	756.5521	40.53	1.75E-01	1.18	0.85
C36:4	[M + H] ⁺	782.5700	782.5725	41.42	7.87E-01	1.02	0.98
C36:2	[M + H] ⁺	786.6013	786.6026	42.21	6.88E-01	0.98	1.02
C36:1	[M + H] ⁺	788.6169	788.6171	43.03	8.52E-01	1.01	0.99
C38:5	[M + H] ⁺	808.5856	808.5845	41.79	6.73E-01	0.97	1.03
C38:4	[M + H] ⁺	810.6013	810.6063	42.55	5.90E-01	1.03	0.97
C32:1	[M + Na] ⁺	754.5363	754.5365	40.82	7.00E-01	0.90	1.11
C38:4	[M + Na] ⁺	832.5832	832.5802	42.86	1.43E-01	0.80	1.24

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
PC							
C34:1	[M + H - H ₂ O] ⁺	742.5751	742.5715	41.97	9.05E-01	1.01	0.99
C38:5	[M + H - H ₂ O] ⁺	790.5751	790.5759	41.99	9.99E-01	1.00	1.00
Alkyl-PC							
C34:1	[M + H] ⁺	746.6064	746.6033	42.69	5.85E-01	0.95	1.06
C38:5	[M + H] ⁺	794.6064	794.6021	42.28	2.66E-01	1.10	0.91
C32:0	[M + Na] ⁺	742.5727	742.5715	41.97	9.05E-01	1.01	0.99
C34:1	[M + Na] ⁺	768.5883	768.5882	42.07	3.63E-02	1.19	0.84
C36:2	[M + Na] ⁺	794.6040	794.6025	43.24	5.75E-01	1.06	0.95
C36:4	[M + Na] ⁺	790.5727	790.5759	41.99	9.99E-01	1.00	1.00
C38:5	[M + Na] ⁺	816.5883	816.5892	42.16	6.32E-01	0.92	1.09
LPE							
C16:0	[M + H] ⁺	454.2934	454.2931	30.99	3.08E-01	1.11	0.90
C18:0	[M + H] ⁺	482.3247	482.3249	33.28	2.86E-01	1.13	0.89
C22:0	[M + H] ⁺	538.3873	538.3860	34.02	8.07E-03	1.39	0.72
C16:0	[M + Na] ⁺	476.2753	476.2744	31.04	8.08E-01	0.97	1.03
C22:0	[M + Na] ⁺	560.3692	560.3682	34.02	1.88E-02	1.44	0.69
C16:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	436.2828	436.2847	30.98	2.05E-01	1.21	0.83
C18:1	[M + H - H ₂ O] ⁺	462.2985	462.2993	31.55	8.01E-01	0.95	1.05

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
LPE							
C18:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	464.3141	464.3131	33.24	8.84E-01	0.98	1.02
C20:4	[M + H - H ₂ O] ⁺	484.2828	484.2822	30.48	7.38E-01	0.92	1.09
PE							
C36:2	[M + H] ⁺	744.5543	744.5515	40.61	1.51E-01	1.18	0.85
C34:1	[M + Na] ⁺	740.5206	740.5283	41.62	4.71E-01	0.84	1.19
C36:2	[M + Na] ⁺	766.5363	766.5351	40.59	1.66E-01	1.11	0.90
C36:1	[M + Na] ⁺	768.5519	768.5529	42.85	5.25E-01	0.94	1.07
C34:2	[M + NH ₄] ⁺	733.5496	733.5465	39.99	2.97E-01	0.70	1.43
Cholesterol	[M + Na] ⁺	409.3446	409.3438	39.61	1.13E-01	1.32	0.76
Cholesterol	[M + NH ₄] ⁺	404.3892	404.3836	39.62	9.52E-02	1.24	0.81
Cholesteryl ester							
C18:2	[M + H] ⁺	649.5924	649.5942	46.35	9.57E-01	1.00	1.00
C20:4	[M + H] ⁺	673.5924	673.5900	48.07	5.07E-01	0.95	1.05
C18:2	[M + Na] ⁺	671.5743	671.5738	46.01	3.87E-02	0.70	1.43
C18:1	[M + Na] ⁺	673.5900	673.5900	48.07	5.07E-01	0.95	1.05
Ether lipid							
C18:2	[M + Na] ⁺	363.2875	363.2857	36.39	8.23E-01	0.99	1.02

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
Ceramides							
C16:0	[M + H] ⁺	538.5199	538.5162	40.75	4.25E-01	1.09	0.92
C18:2	[M + H] ⁺	562.5199	562.5169	45.68	6.84E-01	0.80	1.25
C18:0	[M + H] ⁺	566.5512	566.5534	49.14	9.47E-01	0.97	1.03
C20:4	[M + H] ⁺	586.5199	586.5186	41.96	1.38E-01	0.68	1.47
C16:0	[M + Na] ⁺	560.5019	560.5017	45.27	8.43E-01	0.90	1.11
C18:1	[M + Na] ⁺	586.5175	586.5186	41.96	1.38E-01	0.68	1.47
C18:0	[M + Na] ⁺	588.5332	588.5370	46.15	9.16E-01	1.02	0.98
C22:0	[M + Na] ⁺	644.5958	644.5935	44.97	1.99E-02	1.26	0.80
C16:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	520.5094	520.5070	46.74	2.48E-02	1.29	0.78
C16:0	[M + H - H ₂ O] ⁺	520.5094	520.5058	42.00	3.15E-01	1.21	0.83
Galactosylceramides							
C16:0	[M + Na] ⁺	722.5547	722.5552	40.79	2.48E-01	0.83	1.20
C18:2	[M + Na] ⁺	746.5547	746.5572	40.59	1.38E-01	1.21	0.83
C18:1	[M + Na] ⁺	748.5703	748.5765	41.99	8.08E-01	0.98	1.02
fatty acyl carnitine							
C16:0	[M + H] ⁺	400.3427	400.3417	28.72	9.88E-01	1.00	1.00
C18:2	[M + H] ⁺	424.3427	424.3417	28.10	4.23E-01	0.91	1.10
C18:1	[M + H] ⁺	426.3583	426.3569	29.53	1.60E-01	0.87	1.15

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
fatty acyl carnitine							
C18:0	[M + H] ⁺	428.3740	428.3729	31.10	9.80E-01	1.00	1.00
C20:4	[M + H] ⁺	448.3427	448.3412	28.33	9.00E-01	1.01	0.99
C16:0	[M + Na] ⁺	422.3246	422.3274	28.73	2.74E-01	1.11	0.90

ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ไอออนในชั้นไขมันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม OVX หลังให้สารต่างๆเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ โดยแสดงด้วย ประเภทของไขมัน, Acyl chain Ion, m/z (theoretical), m/z (measured), retention time (rt), ttest (OVX vs. sham), OVX/sham, sham/OVX

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
FFA							
C14:0	[M - H]-	227.2011	227.2016	17.1	3.95E-02	1.64	0.61
C16:0	[M - H]-	255.2324	255.2354	18.0	2.02E-01	1.26	0.79
C18:2	[M - H]-	279.2324	279.2372	18.0	3.50E-01	1.13	0.88
C18:0	[M - H]-	283.2637	283.2648	18.8	2.86E-02	2.11	0.47
C20:4	[M - H]-	303.2324	303.2346	18.2	5.23E-02	1.65	0.61
C22:6	[M - H]-	327.2324	327.2331	18.4	1.34E-01	1.86	0.54
odd-chain FFA							
C15:0	[M - H]-	241.2168	241.2158	17.6	9.63E-02	1.32	0.76
NATs							
C16:0	[M - H]-	362.2365	362.2353	22.5	3.74E-01	1.09	0.92
C18:2	[M - H]-	386.2365	386.2344	21.8	3.40E-01	1.45	0.69
C18:1	[M - H]-	388.2522	388.2524	23.2	4.63E-01	0.89	1.13
C18:0	[M - H]-	390.2678	390.2681	24.9	1.60E-01	1.09	0.92
C22:0	[M - H]-	446.3304	446.3307	29.3	1.13E-02	1.34	0.75

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
LPA							
C14:0	[M - H]-	381.2042	381.2048	20.4	7.23E-03	17.40	0.06
PA							
C32:0	[M - H]-	647.4652	647.4678	27.7	6.34E-01	0.78	1.28
C34:2	[M - H]-	671.4652	671.4668	27.3	5.72E-01	1.32	0.76
LPE							
C16:0	[M - H]-	452.2777	452.2787	25.4	4.82E-01	1.09	0.92
C18:2	[M - H]-	476.2777	476.2783	24.5	9.67E-01	1.01	0.99
C18:1	[M - H]-	478.2934	478.2943	26.1	7.72E-01	1.06	0.94
C20:4	[M - H]-	500.2777	500.2779	24.6	5.53E-01	1.21	0.82
Alkyl-LPE							
C16:0	[M - H]-	438.2985	438.2975	26.6	2.81E-01	1.21	0.83
C18:1	[M - H]-	464.3141	464.3152	29.3	1.64E-01	1.29	0.77
PE							
C32:1	[M - H]-	688.4917	688.4943	32.7	8.56E-01	0.88	1.13
C32:0	[M - H]-	690.5074	690.5093	33.8	8.05E-01	0.84	1.19
C34:1	[M - H]-	716.5230	716.5252	34.2	6.22E-01	0.72	1.39

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
PE							
C34:2	[M - H]-	714.5074	714.5020	34.1	9.37E-01	0.93	1.07
C34:2	[M - H]-	714.5074	714.5093	33.3	4.27E-01	0.53	1.90
C36:4	[M - H]-	738.5074	738.5011	34.2	9.55E-01	1.04	0.96
C36:3	[M - H]-	740.5230	740.5236	33.7	4.35E-01	0.57	1.74
C36:2	[M - H]-	742.5387	742.5318	35.8	9.95E-01	1.01	0.99
C36:2	[M - H]-	742.5387	742.5397	34.8	3.97E-01	0.53	1.88
C36:1	[M - H]-	744.5543	744.5539	35.5	4.89E-01	0.57	1.76
C38:5	[M - H]-	764.5230	764.5265	33.9	8.11E-01	0.89	1.13
Alkyl-PE							
C32:0	[M - H]-	676.5281	676.5251	34.5	6.56E-01	0.71	1.41
C34:1	[M - H]-	702.5438	702.5445	36.5	6.17E-01	1.20	0.83
C36:4	[M - H]-	724.5281	724.5249	35.4	8.99E-01	0.89	1.12
C36:4	[M - H]-	724.5281	724.5296	34.5	4.30E-01	0.50	2.02
C38:5	[M - H]-	750.5438	750.5435	40.8	9.98E-01	1.00	1.00
C38:5	[M - H]-	750.5438	750.5415	42.1	3.56E-01	2.18	0.46

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
LPS							
C18:2	[M - H]-	520.2675	520.2692	16.4	2.59E-01	1.34	0.75
C18:1	[M - H]-	522.2832	522.2862	16.9	4.20E-01	1.16	0.86
C18:0	[M - H]-	524.2988	524.2905	19.1	1.90E-03	4.71	0.21
C20:4	[M - H]-	544.2675	544.2690	16.5	1.47E-01	1.32	0.76
Alkyl-LPS							
C18:1	[M - H]-	508.3039	508.3060	19.1	1.09E-03	4.80	0.21
PS							
C36:2	[M - H]-	786.5285	786.5280	31.1	7.39E-01	0.81	1.23
C36:1	[M - H]-	788.5442	788.5456	31.8	4.87E-01	0.58	1.72
C38:5	[M - H]-	808.5129	808.5148	30.1	6.45E-01	0.74	1.35
LPG							
C18:0	[M - H]-	511.3036	511.3052	25.2	8.46E-01	0.98	1.02
PG							
C34:1	[M - H]-	747.5176	747.5189	40.3	2.23E-01	2.84	0.35
C36:2	[M - H]-	773.5333	773.5330	39.2	8.14E-01	1.22	0.82
C36:1	[M - H]-	775.5489	775.5477	40.6	6.06E-01	1.38	0.73

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
PG							
C36:1	[M - H]-	775.5489	775.5455	42.1	2.46E-01	2.86	0.35
C36:0	[M - H]-	777.5646	777.5636	41.1	4.89E-01	1.54	0.65
LPI							
C16:0	[M - H]-	571.2883	571.2868	22.6	7.82E-01	1.06	0.94
C18:1	[M - H]-	597.3040	597.3020	23.6	4.78E-01	0.86	1.17
C20:4	[M - H]-	619.2883	619.2895	21.9	4.46E-01	1.12	0.90
PI							
C32:1	[M - H]-	807.5024	807.5048	33.9	1.62E-01	3.54	0.28
C32:0	[M - H]-	809.5180	809.5112	35.0	3.53E-01	1.87	0.53
C34:2	[M - H]-	833.5180	833.5117	34.5	3.85E-01	1.99	0.50
C34:3	[M - H]-	831.5024	831.5049	33.0	3.69E-01	0.63	1.60
C34:3	[M - H]-	831.5024	831.5046	34.0	5.66E-01	1.38	0.73
C36:4	[M - H]-	857.5180	857.5121	34.7	4.08E-01	1.91	0.52
C36:2	[M - H]-	861.5493	861.5487	35.2	9.99E-01	1.00	1.00
C36:1	[M - H]-	863.5650	863.5616	36.1	5.11E-01	1.33	0.75
C38:5	[M - H]-	883.5337	883.5339	35.1	3.29E-01	1.61	0.62

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
PI							
C38:4	[M - H]-	885.5493	885.5469	36.5	4.77E-01	1.76	0.57
Alkyl-PI							
C32:0	[M - H]-	795.5387	795.5314	36.8	5.56E-01	1.59	0.63
C34:1	[M - H]-	821.5544	821.5533	36.2	9.86E-01	1.01	0.99
C36:2	[M - H]-	847.5700	847.5770	37.4	9.15E-01	1.03	0.97
C36:4	[M - H]-	843.5387	843.5378	34.6	7.12E-01	1.17	0.85
C38:5	[M - H]-	869.5544	869.5528	34.9	9.23E-01	1.05	0.95
GM3 gangliosides							
C18:0	[M - H]-	1179.7366	1179.7330	34.8	4.00E-01	1.87	0.53
retinoic acid	[M - H]-	301.2168	301.2164	17.9	3.88E-02	1.86	0.54
Ceramide-PA							
C18:2	[M - H]-	640.4706	640.4714	44.1	1.81E-06	1.90	0.53
C18:0	[M - H]-	644.5019	644.5085	46.4	1.32E-01	1.23	0.81
C22:0	[M - H]-	700.5645	700.5658	48.3	1.44E-03	1.40	0.71
Ceramide-PE							
C16:0	[M - H]-	645.5097	645.5082	46.4	1.05E-01	1.23	0.81

Lipid class / Acyl chain	Ion	m/z (theoretical)	m/z (measured)	rt (min)	ttest (ovx vs. sham)	ovx/sham	sham/ovx
Ceramide-PG							
C16:0	[M - H]-	690.5074	690.5017	34.6	9.58E-01	1.05	0.95
C18:1	[M - H]-	716.5230	716.5252	34.2	6.22E-01	0.72	1.39
Sphingosine 1-PG	[M - H]-	452.2777	452.2716	38.0	6.41E-03	2.20	0.45
Glycodeoxycholate	[M - H]-	448.3063	448.2977	47.7	9.06E-02	1.18	0.84
Chenodeoxyglycocholate	[M - H]-	448.3063	448.2977	47.7	9.06E-02	1.18	0.84
Glycochenodeoxycholate	[M - H]-	448.3063	448.2977	47.7	9.06E-02	1.18	0.84
Glycocholate	[M - H]-	464.3012	464.3042	27.2	2.14E-01	1.26	0.79
HETE	[M - H]-	319.2273	319.2289	16.5	4.25E-01	1.16	0.87
OxoHETE	[M - H]-	317.2117	317.2116	15.7	6.40E-02	1.66	0.60
PGA1, PGB1	[M - H]-	335.2222	335.2294	18.4	5.57E-01	0.79	1.27
PGA2, PGB2, PGJ2	[M - H]-	333.2066	333.2041	18.0	9.38E-01	0.99	1.01
PGF1	[M - H]-	355.2485	355.2412	24.0	9.01E-01	1.04	0.96

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองเมทาโบลอมิกส์ (metabolomics)

ตอนที่ 1 เมทาโบลอมิกส์แบบไม่จำเพาะเจาะจง

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีเมทาโบลอมิกส์ตรวจสอบสารเมทาโบลิตในหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน เทียบกับหนูที่อยู่ในภาวะปกติพบว่าเมทาโบลิตที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ให้สารต่างๆทุกวัน เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จำนวน 62 ไอออน และระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 202 ไอออน

ตอนที่ 2 เมทาโบลอมิกส์แบบจำเพาะเจาะจง

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองพบเมทาโบลิตที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน 10 ไอออน อันได้แก่ Alkyl-PE C36:4 (m/z 724.5296), FFA C18:0 (m/z 283.2648), LPA C14:0 (m/z 381.2048), Alkyl-PE C38:5 (m/z 750.5415), LPS C18:0 (m/z 524.2905), Alkyl-LPS C18:1 (m/z 508.3060), PG C34:1 (m/z 747.5189), PG C36:1 (m/z 775.5455), PI C32:1 (m/z 807.5048) และ Sphingosine 1-PG (m/z 452.271)

ผลการศึกษาเมทาโบลอมิกส์แบบไม่จำเพาะเจาะจงและแบบจำเพาะเจาะจง พบว่าประสิทธิภาพของการรักษาหนูที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสารสกัดจากว่านชักมดลูกดีกว่าสารไตรเฮลิคเฮปทานอยด์ โดยเปรียบเทียบจำนวนเมทาโบลิตที่มี mass ion intensity ของหนูกลุ่ม OVX+EXT, OVX+P1000, OVX+P2000 ระยะเวลา 12 สัปดาห์ใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม sham มากกว่าจำนวนเมทาโบลิตในหนูกลุ่ม OVX+DPHD

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] Ma, Ch.; Hu, L.; Tao, G.; Lv, W.; Wang, H. An UPLC-MS-Based Metabolomics Investigation on the Anti-Fatigue effect of Salidroside in Mice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *105*, 84-90.
- [2] Koddurah-Daouk, R.; Kristal, B.S.; Weinshilboom, R. M. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *48*, 653-683.
- [3] Sun, T.; Chen, M.; Lin, X.; Yu, R.; Zhao, Y.; Wang, J. The Influence of Osteoprotegerin Genetic Polymorphisms on Bone Mineral Density and Osteoporosis in Chinese Postmenopausal Women. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *22*, 200-203.
- [4] Adlercreutz, H. Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2002**, *83*, 113-118.
- [5] Weerachayaphorn, J.; Chunchrunee, A.; Mahagita, C.; Lewchalermwongse, B.; Suksamran, A.; Piyachaturawat, P. A protective effect of Curcuma comosa Roxb. On bone loss in estrogen deficient mice. *J Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 956-962.
- [6] Vinayavekhin, N.; Saghatelian, A. Untargeted metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2010**, *30*, 1.1-24.
- [7] Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X. Modern analytical techniques In metabolomics analysis. *Analyst.* **2012**, *137*, 293-300.
- [8] Patti, G.J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: the apogee of the omic triology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2012**, *13*, 263-269.
- [9] Sun, H.; Zhang, A.; Wang, X. Potential role of metabolomics approaches for Chinese medicine syndromes and herbal medicine. *Phytother Res.* **2012**, *26*, 1466-71.

- [10] Ozaki, Y.; Anti-inflammatory effects of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb, and its active principle. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1045-1048.
- [11] Claeson, P.; Panthong, A.; Tuchinda, P.; Reutrakul, V.; Kanjanapothi, D.; Taylor, W.C.; Santisuk, T. Three non-phenolic diarylheptanoids with anti-inflammatory activity from *Curcuma xanthorrhiza*. *Planta Med.* **1993**, *59*, 451-454.
- [12] Kutten, R.; Bhanumathy, P.; Nirmala, K.; George, M. C. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett.* **1985**, *29*, 197-202.
- [13] Itokawa, H.; Hirayama, F.; Funakoshi, K.; Takeya, K. Studies on the antitumor bisabolane sesquiterpenoids isolated from *Curcuma xanthorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 3488-3492.
- [14] Weerachayaphorn, J.; Chuncharunee, A.; Jariyawat, S.; Lewchalermwongse, B.; Amonpatumrat, S.; Suksamrarn, A.; Piyachaturawat, P. Protection of centrilobular necrosis by *Curcuma comosa* Roxb. In carbon tetrachloride-induced mice liver injury. *Ethnopharmacol.* **2010**, *129*, 254-60.
- [15] Piyachaturawat, P.; Charoenpiboonsin, J.; Toskulkao, C.; Suksamrarn, A. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. *J Ethnopharmacol.* **1999**, *66*, 199-204.
- [16] Lye, H.S.; Kuan, C.Y.; Ewe, J.A.; Fung, W.Y.; Liong, M.T. The improvement of hypertension by probiotics: Effects on cholesterol, diabetes, Renin and phytoestrogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3755-3775.

ประวัติผู้ทำวิจัย

นางสาวณิชาบูล ชายหาด เกิดเมื่อวันที่ 25 เมษายน พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดตราด สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนสตรีประเสริฐศิลป์ จังหวัดตราด เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี 4/1 หมู่ 5 ตำบลท่าพรุก อำเภอเมือง จังหวัดตราด 23000

นางสาวรัชณี ปานรักษ์ เกิดเมื่อวันที่ 7 มกราคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนสุราษฎร์ธานี จังหวัด สุราษฎร์ธานี เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี 97/1 หมู่ 2 ตำบลอิปัน อำเภอพระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84210

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย