อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การตรวจสอบความเป็นพิษและผลของใบกะเพราต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในหนูทดลอง"

"Investigation the toxicity of *Ocinum sanctum* and its effect on reproductive function of experimental rats"

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 15 ก.ย. 2558
เลขทะเบียน 1685243X
เลขเรียกหนังสือ ๑ QK
495
.L25
พ124ร5
2556

โดย ดร. พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์ และคณะ

ธันวาคม 2556

บทคัดย่อ

กะเพรา หรือ *Ocimum sanctum* เป็นเครื่องเทศที่นิยมมากชนิดหนึ่งสำหรับใช้ในการปรุงอาหารไทยหลายชนิด แต่มีรายงานว่าบางประเทศในแถบยุโรปได้มีการสั่งระงับการนำเข้าต้น ใบ และผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกะเพราเนื่องจากมีรายงานว่าการบริโภคใบกะเพราอาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาของใบกะเพราสดปั่นรวมกับน้ำเมื่อป้อนให้หนูแรทหนุ่มด้วยขนาด 10, 100 หรือ 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว วันละครั้งทุกวันติดต่อกันนาน 30 วัน ซึ่งผลการศึกษาพบว่าหนูทดลองในกลุ่มทดสอบมีการเจริญเติบโตตามปกติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม โดยไม่เกิดภาวะผิดปกติของเซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน เช่น สมอง หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ ลูกอัณฑะ และต่อมลูกหมาก สำหรับการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) และ testosterone (T) ในพลาสมา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 10 และ 100 มก./กก. มีการลดลงของระดับ testosterone ในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบหนูกลุ่มควบคุม สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 1000 มก./กก. มีการลดลงของระดับ luteinizing hormone ต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และนอกจากนี้หนูที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 100 และ 1000 มก./กก. มีจำนวนตัวอสุจิใน caudal epididymis ลดต่ำกว่าของหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ : กะเพรา การทดสอบความเป็นพิษ ฮอร์โมนเพศ จำนวนอสุจิ

Abstract

Ocimum sanctum (OS) is one of the common oriental spices used in many Thai dishes. However, the European Union has banned to import any products that contain OS due to the risk of health safety for the consumers. The present study, therefore, was designed to address this issue directly by investigating an oral administration of OS leave at a single dose of 10, 100, and 1000 mg/kg daily for 30 days. We found that the test group had normal growth rate when compared to the control group. There was no abnormal cell or tissue found in the major internal organs such as the brain, heart, lungs, liver, spleens, kidneys, stomach, small intestine, testis and prostate gland. For the plasma assay of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and testosterone (T), there was a significant decrease of testosterone and luteinizing hormone in the rats treated with 10 or 100 mg/kg OS, and 1000 mg/kg OS, respectively. Moreover, the rats treated with 10 or 100 mg/kg OS had a significant lower number of sperms in caudal epididymis than that of the control group.

Keywords : Thai basil, toxicity test, sex hormone, sperm count

Executive summary

ใบกะเพราจัดเป็นเครื่องเทศที่ถูกนำมาใช้ประกอบอาหารมาอย่างยาวนาน จากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พบว่ามีการศึกษาวิจัยผลของสารสกัดใบกะเพราต่อระบบต่างๆอาทิ ระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์เพศชายโดยเฉพาะฤทธิ์การคุมกำเนิดของใบกะเพราได้ถูกระบุไว้ในตำราอายุรเวชของประเทศอินเดียและการศึกษาวิจัยในหนูและกระต่ายที่ผ่านมาแสดงผลว่าใบกระเพรามีผลลดจำนวนการสร้าง ลดความเร็วในการว่าย และเพิ่มเปอร์เซนต์ความผิดปกติของตัวอสุจิ ซึ่งผลการวิจัยนี้ก่อให้เกิดความกังวลในการนำใบกระเพรามาบริโภคซึ่งเป็นที่มาหรือวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ที่จะตรวจสอบและยืนยันฤทธิ์ของใบกะเพราต่อการทำงานของ ระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะผลในการเปลี่ยนแปลงจำนวนของตัวอสุจิและระดับฮอร์โมนเพศที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งตรวจสอบทางด้านพิษวิทยาในหนูชุดเดียวกันนี้ว่าก่อให้เกิดความผิดปกติหรือเกิดพิษต่ออวัยวะหลักๆของร่างกายหรือไม่อย่างไรเนื่องจากยังไม่มีผู้ใดศึกษาถึงพิษวิทยามาก่อนจึงยังไม่มีข้อมูล

ผลจากโครงการวิจัยนี้สรุปได้ว่า สารสำคัญหลักของใบกะเพราสด เป็นสารจำพวก methyl eugenol, trans-caryophyllene และ germacrene-D โดยพบว่ามี 38.2, 18.97 และ 11.52 เปอร์เซนต์ตามลำดับ หนูทดลองได้รับใบกะเพราสดปริมาณมากคือขนาด 100 หรือ 1000 มก./กก.นน.ตัว วันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 30 วัน มีจำนวนตัวอสุจิที่บริเวณ caudal epididymis ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและหากได้รับในปริมาณน้อยคือ ขนาด 10 มก/กก.น้ำหนักตัว จะไม่ส่งผลให้จำนวนตัวอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ต่อมลูกหมาก seminal vesicle และอัณฑะ ไม่พบความผิดปกติของรูปร่างของเซลล์ใดๆ ของเนื้อเยื่อดังกล่าวในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราและไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย

สิ่งที่น่าสนใจคือ เฉพาะการบริโภคในปริมาณมากเท่านั้นถึงจะส่งผลให้เกิดการลดลงของจำนวนตัวอสุจิซึ่งเมื่อคิดเทียบหากคนมีน้ำหนักประมาณ 60 กก. จะต้องบริโภคใบกระเพราสดเป็นปริมาณ 6 กรัมทุกวันติดต่อกันอย่างน้อย 1 เดือนและหากหยุดบริโภคสักระยะหนึ่งจำนวนอสุจิก็จะกลับมาอยู่ในระดับปกติได้ จึงไม่น่าจะก่อให้เกิดความกังวลในการนำใบกระเพรามาบริโภคตามบทความจากหนังสือพิมพ์ของชาวไทยในต่างแดนได้ ที่สำคัญอาจนำมาประยุกต์ใช้ในกรณีนำมาเป็นยาคุมกำเนิดสำหรับผู้ที่ไม่ประสงค์อยากมีบุตรได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	2
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	3
Executive summary	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
บทนำ	9
วิธีดำเนินการวิจัย	11
ผลการทดลอง	15
สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล	29
ข้อเสนอแนะ	30
บรรณานุกรม	31

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ต้นกะเพราจากแหล่งปลูกที่ตำบลท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก	11
รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการกลั่น (ซ้าย) และแยก (กลาง) สารสกัดใบกะเพราด้วยไอน้ำ และสารสกัดใบกะเพราที่แยกได้ (ขวา)	12
รูปที่ 3 อุปกรณ์ haemocytometer (Counting Chamber ของ Makler®) สำหรับใช้ในการนับตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา	13
รูปที่ 4 chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดกะเพราโดยใช้ GC/MS	15
รูปที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวหนูแต่ละกลุ่มที่ชั่งในวันแรก และในทุกๆ สัปดาห์ (Week 1-4)	17
รูปที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนตัวอสุจิจาก caudal epididymis และ vas deferen แต่ละข้างในหนูกลุ่มควบคุม (Control) กับกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 10, 100 และ 1000 มก./กก.น้ำหนักตัว	20
รูปที่ 7 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วน หัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) กระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มควบคุม (Vehicle Control)	21
รูปที่ 8 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มควบคุม (Vehicle Control)	22
รูปที่ 9 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วน หัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) กระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 10 มก./กก.	23
รูปที่ 10 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 10 มก./กก.	24
รูปที่ 11 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนหัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) กระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 100 มก./กก.	25
รูปที่ 12 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 100 มก./กก.	26
รูปที่ 12 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนหัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) กระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 1000 มก./กก.	27
รูปที่ 14 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 1000 มก./กก.	28

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

b.w.	=	body weight
LH	=	lutenizing hormone
FSH	=	follicle stimulating hormone
OS	=	*Ocimum sanctum*
RT	=	retention time
s.d.	=	standard deviation
s.e.m.	=	standard error of the mean
T	=	testosterone
ก./กก.	=	กรัม / กิโลกรัม
มก./กก.	=	มิลลิกรัม / กิโลกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร

บทนำ

กะเพรา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum sanctum* ชื่อสามัญคือ holy basil อยู่ในวงศ์ Lamiaceae ซึ่งจัดอยู่ในพืชวงศ์เดียวกับมิ้นท์ (mints) มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะประเทศไทยและมาเลเซีย ใบกะเพราจัดเป็นพืชผักจำพวกเครื่องเทศที่ใช้ใบอ่อนสดในการประกอบอาหาร ใช้เป็นผักชูรสและช่วยดับกลิ่นคาวและช่วยให้อาหารมีกลิ่นหอม นอกจากจะมีคุณค่าทางอาหารมากมายแล้ว ผลพลอยได้จาการบริโภคใบกะเพรายังช่วยให้ร่างกายได้รับประโยชน์จากการเป็นยาสมุนไพร ทำให้เลือดลมดี แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียด แก้ปวดท้อง ช่วยให้สตรีหลังคลอดมีน้ำนมและช่วยขับน้ำนม (Gupta et al., 2002, Prakash and Gupta, 2005, Verma et al., 2010)

สำหรับผลของสารสกัดใบกะเพราต่อระบบประสาท ได้มีรายงานวิจัยจากวารสารประเทศอินเดียที่ระบุว่า หนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วยการฉีดสาร scopolamine เข้าช่องท้องด้วยขนาด 0.4 มก./กก. นน.ตัว เมื่อได้รับสารสกัดทั้งในรูปน้ำ (aqueous extract) ในขนาด 100 หรือ 200 มก./กก. นน.ตัว วันละครั้ง ทุกวันติดต่อกัน 8 วัน สามารถฟื้นความทรงจำที่เกี่ยวกับพฤติกรรมความกลัว เมื่อทดสอบด้วยอุปกรณ์ elevated plus maze ซึ่งใช้ความสูงเป็นสิ่งกระตุ้นความกลัว และ passive avoidance apparatus ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้าเป็นสิ่งกระตุ้นความกลัว (Joshi and Parle, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยชาวอินเดียอีกกลุ่มหนึ่ง ที่ให้หนูทดลองเกิดภาวะความจำบกพร่องด้วยสาร atropine และ cyclosporine เมื่อได้รับสารสกัดทั้งในรูปน้ำหรือสารสกัดเอธานอล (ethanolic extract) ของใบกะเพราในขนาด 300 มก./กก. นน.ตัว ทำให้มีความจำที่เกี่ยวกับพฤติกรรมความกลัวดีขึ้น และพบว่ามีการทำงานเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (Giridharan et al., 2011)

เกี่ยวกับฤทธิ์การคุมกำเนิดของใบกะเพราได้ถูกระบุไว้ในตำราอายุรเวชของประเทศอินเดีย ซึ่งบรรพบุรุษของชาวอินเดียได้ใช้สืบต่อกันมาจวบจนปัจจุบันก็ยังคงมีใช้อยู่ โดยเฉพาะชาวบ้านและหมออายุรเวชที่อาศัยอยู่ในแถบชนบทนอกเมือง ได้ใช้ใบกะเพราเป็นสมุนไพรช่วยในการคุมกำเนิด (Verma et al., 2010) นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยโดย Ahmed และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ซึ่งได้ป้อนสารสกัด benzene ของใบกะเพราให้แก่หนูแรกขนาด 250 มก./กก. นน.ตัว นาน 48 วัน มีผลลดจำนวนการสร้าง ลดความเร็วในการว่าย และเพิ่มเปอร์เซนต์ความผิดปกติของตัวอสุจิ ซึ่งผลนี้สามารถกลับคืนสู่ภาวะปกติได้ภายในเวลา 2 สัปดาห์หลังการหยุดป้อนสารสกัด (Ahmed et al., 2002) ทำให้เมื่อเร็วๆ นี้ Sethi และคณะ (2010) ได้ศึกษาวิจัยฤทธิ์หรือสรรพคุณของใบกะเพราในการเป็น anti-fertility หรือมีฤทธิ์ contraceptive effect ในสัตว์ทดลอง โดยพบว่ากระต่ายที่กินใบกะเพราสดวันละ 2 กรัมทุกวันเป็นเวลา 30 วัน มีจำนวนตัวอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกระต่ายที่กินอาหารปกติ (ซึ่งไม่มีใบกะเพรา) นอกจากนี้ พวกเขายังพบว่ากระต่ายที่ได้รับใบกะเพรามีระดับฮอร์โมน Testosterone มีค่ามากขึ้น สวนทางกับระดับของฮอร์โมน Lutenizing hormone และ Follicle stimulating hormone ที่มีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกระต่ายที่กินอาหารปกติ (Sethi et al., 2010) อย่างไรก็ตาม รายงานวิจัยดังกล่าวมาแล้วไม่ได้ระบุว่าผลสารสกัดใบ

กะเพราต่อขนาดของลูกอัณฑะ (น้ำหนักอวัยวะ/100 กรัม นน.ตัว) และส่งผลอย่างไรต่อพฤติกรรมการสืบพันธุ์ในหนูทดลอง

จากรายงานวิจัยดังกล่าวทำให้เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีบทความจากหนังสือพิมพ์ของชาวไทยในต่างแดน ชื่อ Thaitangdaen Newspaper (www.thaitangdaen-news.eu) ลงข่าวในวันที่ 25 มกราคม 2555 ได้ระบุว่าเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2555 ที่ ผ่านมา หน่วยงานสำนักงานคณะกรรมการอาหารประเทศเดนมาร์ก แจ้งผ่านทางเว็บไซค์ www.foedevarestyrelsen.dk ว่า ใบกะเพราไม่เหมาะต่อการเป็นอาหารภายใต้กฎระเบียบข้อ 14 ซึ่งหมายความว่า “ใบกะเพราไม่ควรใช้เป็นอาหารทุกชนิด” ไม่ว่าจะใช้เป็นอาหารเสริม หรือใช้เป็นสมุนไพร เครื่องเทศ หรืออื่น ๆ ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาของหน่วยงานอาหารเดนมาร์กพบว่าสัตว์ที่อยู่กับใบกะเพราซึ่งมีขนาดเล็กมากไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า นอกจากนี้เมื่อรับประทานใบกะเพราะเข้าไปแล้ว อาจทำให้เกิดผลร้ายต่อร่างกายในระบบสืบพันธุ์ซึ่งถือว่าเป็นอันตรายต่อสุขภาพร่างกาย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอ้างอิงจากผลที่ได้จากการทดสอบการกินใบสดและการสกัดสารจากใบสด การออกประกาศอย่างไม่เป็นทางการถึงการห้ามวางขายในตลาดเดนมาร์กนี้ ส่งผลให้ใบกะเพราจากประเทศไทยโดนทางหน่วยงานอาหารเดนมาร์กตรวจเข้มข้น ส่งผลกระทบต่อการส่งออกใบกะเพราของประเทศไทยเป็นอย่างมาก

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบและยืนยันฤทธิ์ของใบกะเพราต่อการทำงานของระบบสืบพันธ์เพศชาย โดยเฉพาะผลในการเปลี่ยนแปลงจำนวนของตัวอสุจิและระดับฮอร์โมนเพศที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งตรวจสอบทางด้านพิษวิทยาในหนูชุดเดียวกันนี้ว่าก่อให้เกิดความผิดปกติหรือเกิดพิษต่ออวัยวะหลักๆ ของร่างกายหรือไม่อย่างไรเนื่องจากยังไม่มีผู้ใดศึกษาถึงพิษวิทยามาก่อนจึงยังไม่มีข้อมูล ประกอบกับข้อมูลในเรื่องของผลต่อระบบสืบพันธ์ที่ทางการเดนมารค์อ้างถึงมีการตีพิมพ์เป็นภาษาดัทช์ ทีมผู้วิจัยจึงวางแผนทำการทดลองโดยใช้ข้อมูลจากงานวิจัยของ Sethi และคณะ (2010) เป็นพื้นฐาน โดยในการศึกษาวิจัยนี้จะทำการทดสอบผลของการบริโภคใบสดขนาดต่างๆ กัน 3 ขนาดโดยขนาดสูงสุดจะอ้างอิงตามที่ Sethi และคณะ (2010) ใช้คือ 1 ก./กก.น้ำหนักตัว และลดลงเป็น 100 มก./กก. และ10 มก./กก.น้ำหนักตัวตามลำดับ เพื่อให้สอดคล้องกับสภาพจริงที่มักนิยมใช้ในการบริโภค ซึ่งผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการแนะนำผู้บริโภคถึงขนาดของใบกะเพราที่เหมาะสมในการบริโภคในชีวิตประจำวัน เพื่อป้องกันสรรพคุณที่ไม่พึงประสงค์ของใบกะเพราที่อาจเกิดขึ้นในการลดจำนวนตัวอสุจิและทำให้สมดุลย์ของระดับฮอร์โมนเพศสูญเสียไป นอกจากนี้ผลการวิจัยอาจมีประโยชน์ในการพัฒนาใบกะเพราหรือสารสกัดจากใบกะเพราในการสารช่วยคุมกำเนิดในเพศชายได้ในอนาคตอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษเมื่อป้อนใบกะเพราสดในปริมาณต่างๆ 3 ขนาด และศึกษาผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเพศชาย 3 ชนิด ได้แก่ 1) Testosterone 2) Lutenizing hormone (LH) และ 3) Follicle stimulating hormone (FSH) ในพลาสมา และจำนวนตัวอสุจิ และการศึกษาทาง histology ของอวัยวะภายในที่สำคัญของหนูแรทหลังจากที่ได้รับใบกะเพราวันละครั้ง ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนและวิธีวิจัยทุกอย่างที่นำเสนอในรายงานนี้ได้รับการเห็นชอบและอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อวันที่ 15 มิ.ย 2554 (เลขที่โครงการ NU-AE550522) โดยมีลำดับขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้

งานวิจัยในส่วนนี้ได้ทำการทดสอบในหนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (S.D.) อายุ 8 สัปดาห์ จำนวนรวม 40 ตัว โดยได้สั่งจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล แบ่งเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 หนูได้รับน้ำกรอง (vehicle control) จำนวน 10 ตัว

กลุ่มที่ 2 หนูได้รับใบกะเพราสดปั่นในน้ำกลั่น ขนาด 10 มก/กก. จำนวน 10 ตัว

กลุ่มที่ 3 หนูได้รับใบกะเพราสดปั่นในน้ำกลั่น ขนาด 100 มก/กก. จำนวน 10 ตัว

กลุ่มที่ 4 หนูได้รับใบกะเพราสดปั่นในน้ำกลั่น ขนาด 1000 มก/กก. จำนวน 10 ตัว

การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

ใบจากพืชในวงศ์ Labiatae ได้แก่ *Ocimum sanctum* (กะเพรา, holy basil; รูปที่ 1) ถูกเก็บจากแหล่งปลูกที่ตำบลท่าโพธิ์ จังหวัดพิษณุโลก ในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 ใบกระเพราสดที่เก็บจะถูกนำมาสกัดแยกน้ำมันด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (hydrodistillation) ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยนำพืชแต่ละชนิดจำนวน 2 กก. ใส่ในภาชนะแก้วที่จะกลั่น (ขนาดภาชนะ 10 ลิตร) ใส่น้ำพอท่วม แล้วตั้งความร้อนของ heating mantle ที่อุณหภูมิ 200°C และตั้งอุณหภูมิของ cooling bath ที่ อุณหภูมิ 4°C เมื่อเริ่มมีการกลั่นตัวจะลดอุณหภูมิของ heating mantle ลงเหลือ 150°C ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่เห็นว่า distillate มีสารสกัดออกมาด้วย แยกสารสกัดออกจากชั้นน้ำ แล้วดูดน้ำที่เหลือด้วย anhydrous sodium sulfate บรรจุสารสกัดที่แยกได้ในภาชนะแก้วปิดสนิทและหุ้มด้วย aluminium foil น้ำมันที่ได้จะถูกเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท ป้องกันแสง และในที่เย็น (ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 – 8°C) จนกว่าจะนำมาทดสอบและวิเคราะห์ นอกจากนี้ในส่วนของลำต้นเหนือดินได้ถูกนำมาทำ herbarium และส่งไปพิสูจน์เอกลักษณ์และจัดเก็บที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรเพื่อนำไว้ใช้อ้างอิง

รูปที่ 1 ต้นกะเพราจากแหล่งปลูกที่ตำบลท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก

รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการกลั่น (ซ้าย) และแยก (กลาง) สารสกัดใบกะเพราด้วยไอน้ำ และสารสกัดใบกะเพราที่แยกได้ (ขวา)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ

สารสกัดได้จะถูกวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ โดยใช้เครื่อง Gas Chromatographer (Model 6890 N, Agilent, Waldbronn, Germany) ซึ่งต่ออยู่กับเครื่อง Mass Spectrometer Gas Chromatographer (Model 5973, Agilent, Waldbronn, Germany) หรือที่เรียกโดยย่อว่า GC/MS โดยสภาวะที่ใช้มีดังต่อไปนี้

Column coating :	HP5-MS, 0.25 mm i.d. x 30 m, 0.25 μm thickness, fused silica capillary column
ความเข้มข้นของสารสกัด :	10% v/v ในสารละลาย dichlromethane
Injection volume :	0.1 mL
Carrier gas :	1.02 mL/min helium
Injector temperature :	220^{o}C
Transfer line temperature :	240^{o}C
Detector temperature :	260^{o}C
Oven temperature program :	60 - 260^{o}C, 3^{o}C/min

การป้อนสารให้แก่สัตว์ทดลอง

นำใบกะเพราสดที่ได้ มาบดด้วยเครื่องบดอาหาร โดยผสมน้ำกรองด้วยกรรมวิธี reverse osmosis (RO) ปริมาตร 1 มล.ต่อน้ำหนักใบสด 1 กรัม และป้อน (force feeding) ทางปาก โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. และใช้เข็มป้อนสารปลายมน เบอร์ 18 ยาว 4 นิ้ว เพื่อป้อนให้ถึงกระเพาะอาหารโดยไม่ทำให้เกิดการ

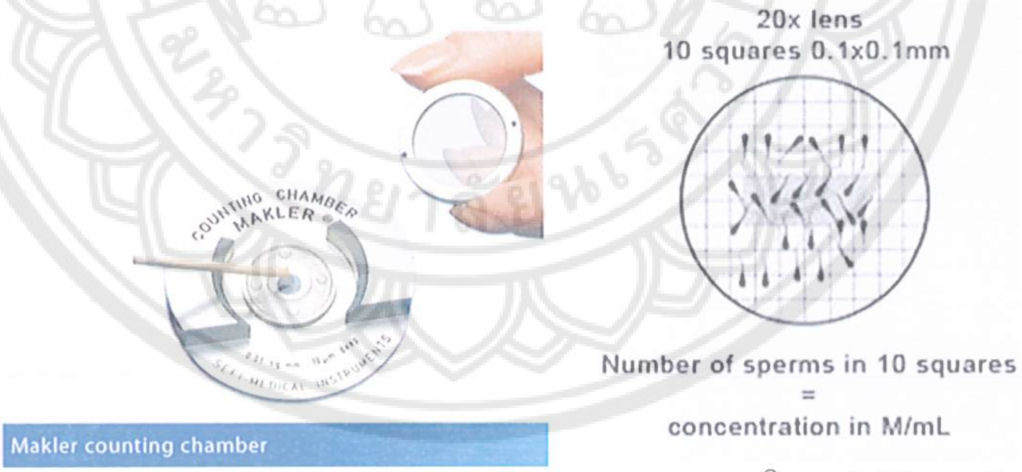
บาดเจ็บต่อทางเดินอาหารส่วนต้น ปริมาณสารที่ให้กำหนดเป็น 1 มล./น้ำหนักตัว 100 กรัม ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับหนูแรท คือไม่เกิน 10 มล. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. การป้อนใบกะเพราสดได้กระทำทุกวันๆ ละ 1 ครั้ง ติดต่อกันนาน 30 วัน

การวัดระดับฮอร์โมนเพศในพลาสม่า

หลังจากป้อนใบกะเพราสดครบ 30 วันแล้วนำหนูมาชั่งน้ำหนักครั้งสุดท้ายเพื่อเตรียมยาสลบ แล้วจึงทำให้สลบลึกด้วยการฉีด Sodium Pentobarbital ขนาด 100 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าช่องท้อง จากนั้นตรวจเช็ครีเฟล็กซ์หรือปฏิกิริยาตอบสนองที่ขาเพื่อประเมินระดับการสลบ จนมั่นใจว่าไม่มีการตอบสนองของรีเฟล็กซ์ โดยการใช้ forceps หนีบที่อุ้งเท้าข้างใดข้างหนึ่ง แล้วหนูไม่แสดง withdrawal reflex แล้วจึงทำการเจาะเลือดจากหัวใจด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 18 แทงตรงส่วน apex ของหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricle) ใส่หลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนได้แก่ testosterone, lutenizing hormone และ follicle stimulating hormone ด้วยวิธี ELISA โดยจะทำการศึกษา 3 ซ้ำ

การนับจำนวนตัวอสุจิ

ขณะที่หนูทดลองกำลังสลบอยู่ ผู้วิจัยทำการผ่าตัดเพื่อแยกเอาส่วน caudal epididymis ทั้ง 2 ข้างออก นำมาล้างหลายๆ ครั้งใน สารละลาย normal physiological saline ปริมาตร 10 มล. แล้วใช้ forceps รีดเอาน้ำอสุจิออกมาเพื่อนำไปนับจำนวนอสุจิ โดยนับจาก sperm suspension ปริมาตร 1 มล. และใช้ haemocytometer (Counting Chamber, Makler®) ดังแสดงในรูปที่ 2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา โดยเลือกนับแบบสุ่มในช่อง grid ที่ 1, 5 และ 10 แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 3 อุปกรณ์ haemocytometer (Counting Chamber ของ Makler®) สำหรับใช้ในการนับตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

การศึกษากายวิภาคและจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน

ขณะที่หนูทดลองกำลังสลบอยู่ ผู้วิจัยได้ทำการผ่าตัดเปิดช่องอก และทำการดูดเลือดด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 18 แทงตรงส่วน apex ของหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricle) เพื่อดูดเลือดออกนำไปตรวจสอบระดับฮอร์โมนเพศ และทำการผ่าซากเพื่อเก็บอวัยวะภายใน เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม กระเพาะ ลำไส้เล็ก

seminal vesicle ต่อมลูกหมาก caudal epididymis และลูกอัณฑะ เป็นต้น โดยนำอวัยวะแต่ละชนิดมาชั่งน้ำหนักก่อนนำไป fix ใน 10% formalin

หลังจากเนื้อเยื่อถูกแช่ใน 10% formalin ประมาณ 1 สัปดาห์ สามารถนำมาทำบล็อคพาราฟิน โดยเริ่มจากนำอวัยวะแต่ละชิ้นมาล้าง fixative ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ต่อด้วยการ dehydration ด้วย ethanol ทั้งนี้เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปหาสูง เช่น ใช้ 70%, 80%, 95% และ 100% ethanol ตามลำดับ จากนั้นทำการ clearing ซึ่งเป็นการนำชิ้นเนื้อที่แห้งน้ำไปแช่ในสารละลาย xylene, และทำการ infiltrate ด้วย parapast จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการ embed โดยใช้เครื่องทำพาราฟินบล็อก

การทำแผ่นฝานเนื้อเยื่อ เริ่มจากทำการตัดบล็อกเนื้อเยื่อที่ embed ในพาราฟิน โดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (microtome) โดยตั้งความหนาที่ 5 ไมครอน เมื่อตัดแผ่นฝานเนื้อเยื่อได้จำนวนตามต้องการแล้ว นำแผ่นฝานตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง 3-4 วัน แล้วนำมาย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H & E technique)

การศึกษาความแตกต่างทาง morphology ของเนื้อเยื่ออวัยวะแต่ละส่วนของหนูที่ได้รับใบกะเพราในแต่ละกลุ่มถูกนำมาเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันในหนูกลุ่มควบคุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ที่กำลังขยาย x4, x10 หรือ x40 เท่า ตามความเหมาะสม และถ่ายภาพโดยใช้กล้องถ่ายรูประบบดิจิตอล เพื่อการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาและเก็บไว้เป็นไฟล์รูปภาพสำหรับการทำรายงาน

สถิติที่ใช้

การแสดงค่าของข้อมูลจะอยู่ในรูปของ mean ± s.e.m. การเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดข้อมูลใช้ repeated measures one-way ANOVA (โปรแกรม SigmaStat version 3.0) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อพบความแตกต่างของข้อมูลจึงนำมาทดสอบต่อด้วย Dunnett's post hoc test โดยตั้งค่านัยสำคัญทางสถิติไว้ที่ $\alpha = 0.05$ สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างชุดข้อมูล 2 ชุด ได้ใช้ Student's t-test โดยตั้งค่านัยสำคัญทางสถิติไว้ที่ $\alpha = 0.05$

ผลการวิจัย

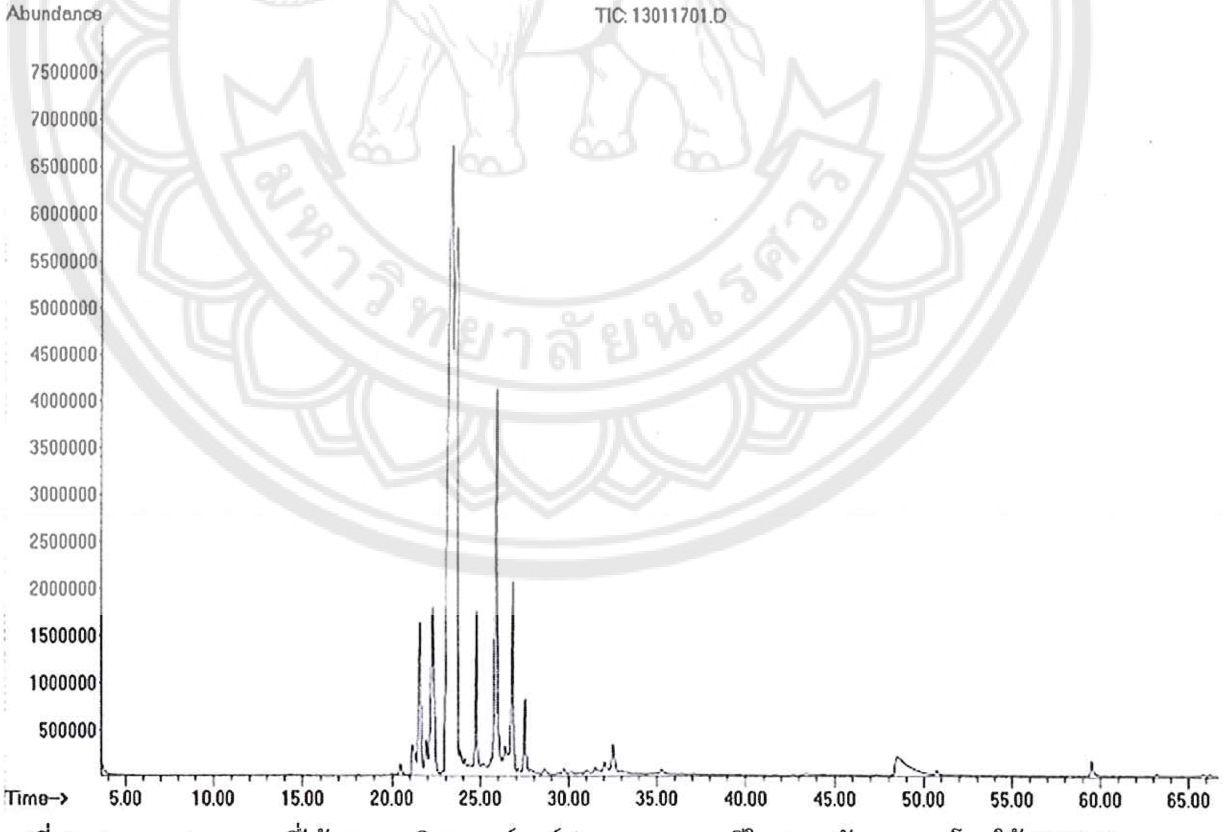
1. ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด

สารสกัดที่ได้จากการกลั่นด้วยนำมีลักษณะเป็นน้ำมันใส สีเหลืองอ่อน และมีกลิ่นเฉพาะตัว

2. เอกลักษณ์ทางเคมี

chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดโดยใช้ GC/MS แสดงในรูปที่ 4 และตารางสรุปองค์ประกอบของสารสกัดแสดงในตารางที่ 1

การบ่งชี้องค์ประกอบในน้ำมันแต่ละชนิดทำโดยเปรียบเทียบ chromatogram ที่ได้กับ chromatogram ที่ปรากฏอยู่ใน library ของระบบ GC/MS (Wiley Mass Spectra library) ร่วมกับผลที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Viyoch et al., 2006) ผลที่ได้พบว่ามีความแตกต่างกันในแง่ชนิดและสัดส่วนของสารประกอบ ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของแหล่งที่มาและฤดูที่ใช้เก็บ อย่างไรก็ตามสิ่งที่เหมือนกันคือพบสาร methyl eugenol และ caryophyllene เป็นองค์ประกอบหลัก (มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์)



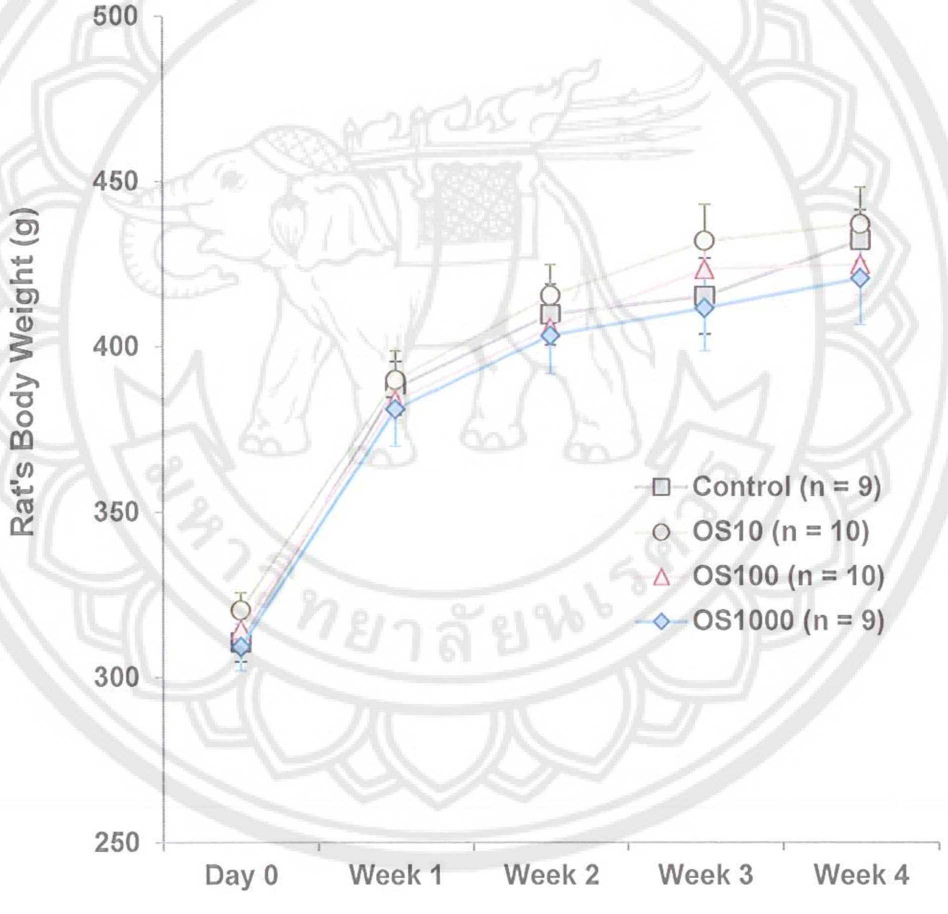
รูปที่ 4 chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดกะเพราโดยใช้ GC/MS

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดกะเพราที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ GC/MS

No.	RT	Compound Name	Relative area (%)
1	20.44	α-Cubebene	0.33
2	21.14	Eugenol	1.09
3	21.53	α-Copaene	4.28
4	21.89	β-Bourbonene	1.44
5	22.26	β-Elemene	6.46
6	23.36	Methyl eugenol	38.20
7	23.61	trans-Caryophyllene	18.97
8	24.09	1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)	0.52
9	24.76	α-Humulene	3.44
10	25.9	Germacrene-D	11.52
11	26.80	Germacrene-A	4.89
12	27.50	δ-Cadinene	1.82
13	27.82	Naphthalene	0.28
14	28.61	Elemol	0.21
15	32.01	Cadinol	0.42
16	32.49	t-Muurolol	0.94
17	48.51	trans-Phytol	2.76
18	50.73	Neophytadiene	0.14
19	59.49	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	
relative area (%) ที่เหลือคือสาร unknown			

1. ผลต่อน้ำหนักตัว

หนูที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 10, 100 หรือ 1000 มก./กก. วันละครั้ง ติดต่อกันนาน 30 วัน แสดงการเจริญเติบโตตามปกติ โดยไม่พบว่ามีหนูทดลองตัวใดแสดงความผิดปกติทางร่างกายและพฤติกรรม อย่างไรก็ตามมีหนูในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับใบกระเพราขนาด 1000 มก/กก เนื่องจากสำลักในระหว่างทำการป้อน จำนวนหนูใน 2 กลุ่มนี้จึงมีเท่ากับ 9 ตัว ซึ่งจากผลการชั่งน้ำหนักตัวในทุกสัปดาห์ ตั้งแต่วันแรกที่เริ่มป้อน (Day 0) จนถึงสัปดาห์สุดท้ายที่ยุติการทดลอง (Week 4) สรุปผลในกราฟรูปที่ 5 นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติก็ไม่พบว่าหนูที่ได้รับใบกะเพราสดแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างของน้ำหนักตัวในแต่ละช่วงสัปดาห์ที่ทำการวัดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (vehicle control) ที่ได้รับเฉพาะน้ำกรอง ชนิด reverse osmosis (RO) ทั้งนี้หนูทุกกลุ่มได้รับอาหารเม็ดอย่างบริบูรณ์ตลอดการทดลอง ($p > 0.05$, one-way ANOVA)



รูปที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวหนูแต่ละกลุ่มที่ชั่งในวันแรก (Day 0) และในทุกๆ สัปดาห์ (Week 1-4)

2. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดและน้ำหนักอวัยภายใน

จากผลการชั่งน้ำหนักของอวัยวะภายในต่อน้ำหนักตัว 100 ก. ของหนูแต่ละกลุ่มได้สรุปในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าการที่หนูได้รับใบกะเพราสดทางปากในขนาด 10-1000 มก./กก. ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของอวัยวะภายใน เช่น สมอง หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ต่อมหมวกไต ไต และกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เช่น ลูกอัณฑะ และ ต่อมลูกหมาก ก็ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับผลของหนูกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$; Student's unpaired t-test)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูเพศผู้กลุ่มควบคุม (Control) กับกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 10 (OS10), 100 (OS100) และ 1000 (OS1000) มก./กก.น้ำหนักตัว

Tissue (/100g body weight)	Control (n = 9)	OS10 (n = 10)	OS100 (n = 10)	OS1000 (n = 9)
Brain	0.42 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.04
Heart	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.04
Lungs	0.41 ± 0.07	0.39 ± 0.09	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.05
Liver	3.05 ± 0.22	3.13 ± 0.35	3.17 ± 0.20	2.95 ± 0.49
Spleen	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.01
Adrenal glands	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.01
Kidneys	0.49 ± 0.04	0.53 ± 0.07	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.08
Stomach	0.48 ± 0.05	0.49 ± 0.05	0.49 ± 0.07	0.54 ± 0.08
Testes	0.87 ± 0.09	0.87 ± 0.04	0.85 ± 0.06	0.80 ± 0.13
Caudal epididymis	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.13	0.12 ± 0.03
Vas deferens	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Prostate gland	0.54 ± 0.05	0.58 ± 0.10	0.54 ± 0.06	0.52 ± 0.18

3. ผลการตรวจระดับฮอร์โมนเพศในพลาสมา

ค่าเฉลี่ยระดับฮอร์โมนเพศ ในพลาสมาของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 1000 มก./กก. เท่านั้นที่มีการลดลงของระดับ luteinizing hormone (LH) ต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$; Student's unpaired t-test) และสำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 10 และ 100 มก./กก. มีการลดลงของระดับ testosterone (T)

ในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.004$; Student's unpaired t-test) แต่สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 1000 มก./กก. มีการลดลงของระดับ testosterone ในพลาสมาเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากข้อมูลมีการกระจายค่อนข้างมาก ทำให้ผลการทดสอบทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของหนูกลุ่มควบคุม ($p = 0.154$; Student's unpaired t-test)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (± s.d.) ของระดับฮอร์โมน FSH, LH และ T ในพลาสมาของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กับกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 10 (OS10), 100 (OS100) และ 1000 (OS1000) มก./กก.น้ำหนักตัว

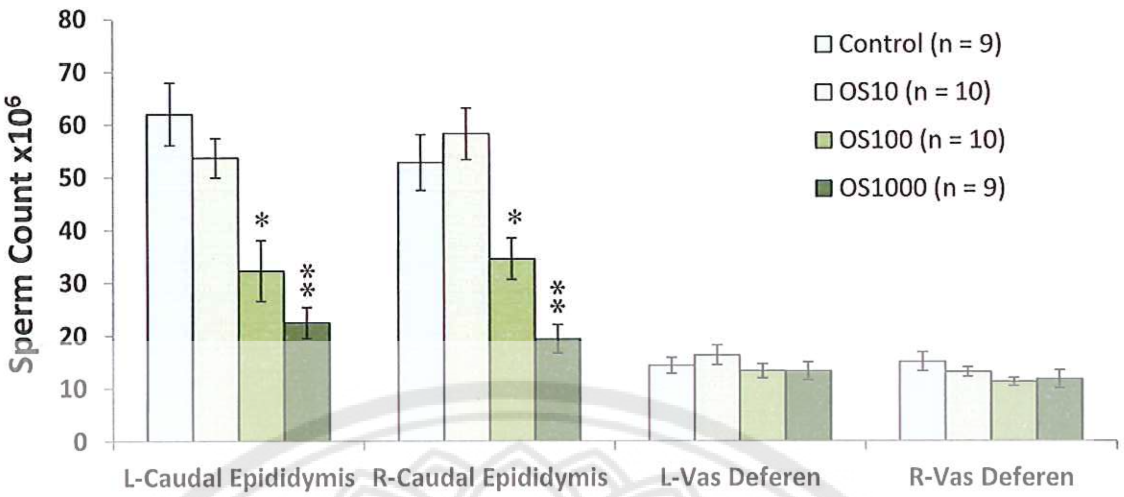
Hormone	Control (n = 9)	OS10 (n = 10)	OS100 (n = 10)	OS1000 (n = 9)
FSH (μIU/ml)	0.18 ± 0.06	0.17 ± 0.06	0.21 ± 0.04	0.14 ± 0.05
LH (μIU/ml)	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.01**
T (ng/ml)	7.92 ± 4.98	3.05 ± 1.53*	2.93 ± 0.38*	5.50 ± 4.79

หมายเหตุ * = $p < 0.005$, Student's unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของหนูกลุ่มควบคุม

4. ผลการนับจำนวนตัวอสุจิ

ข้อมูลเปรียบเทียบจำนวนตัวอสุจิจาก caudal epididymis และ vas deferens แต่ละข้างแสดงในรูปที่ 6 จากผลการนับจำนวนตัวอสุจิของหนูกลุ่มควบคุมพบว่า ในท่อส่วน caudal epididymis มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของตัวอสุจิมากกว่าในส่วน vas deferens ประมาณ 5 เท่า ค่าเฉลี่ยตัวอสุจิที่ caudal epididymis ข้างซ้ายและขวาเท่ากับ $62.0 \pm 5.9 \times 10^6$ และ $52.8 \pm 5.3 \times 10^6$ ตัว ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอสุจิในแต่ละข้างแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 10 มก./กก. ค่าเฉลี่ยตัวอสุจิที่ caudal epididymis ข้างซ้ายและขวาเท่ากับ $53.7 \pm 3.7 \times 10^6$ และ $58.2 \pm 4.9 \times 10^6$ ตัว ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$, one-way ANOVA) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวอสุจิที่ caudal epididymis ข้างซ้ายและขวาของหนูที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 100 มก./กก. พบว่ามีค่าต่ำกว่าของหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$, one-way ANOVA) คือเท่ากับ $32.2 \pm 5.8 \times 10^6$ และ $34.5 \pm 3.9 \times 10^6$ ตัว ตามลำดับ นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้พบการลดลงอย่างมากขึ้นและมีนัยสำคัญทางสถิติ ของจำนวนตัวอสุจิใน caudal epididymis ของหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 1000 มก./กก. คือข้างซ้ายและขวานับได้เพียง $22.4 \pm 3.0 \times 10^6$ และ $19.3 \pm 2.7 \times 10^6$ ตัว ตามลำดับ ($p < 0.0001$, one-way ANOVA)



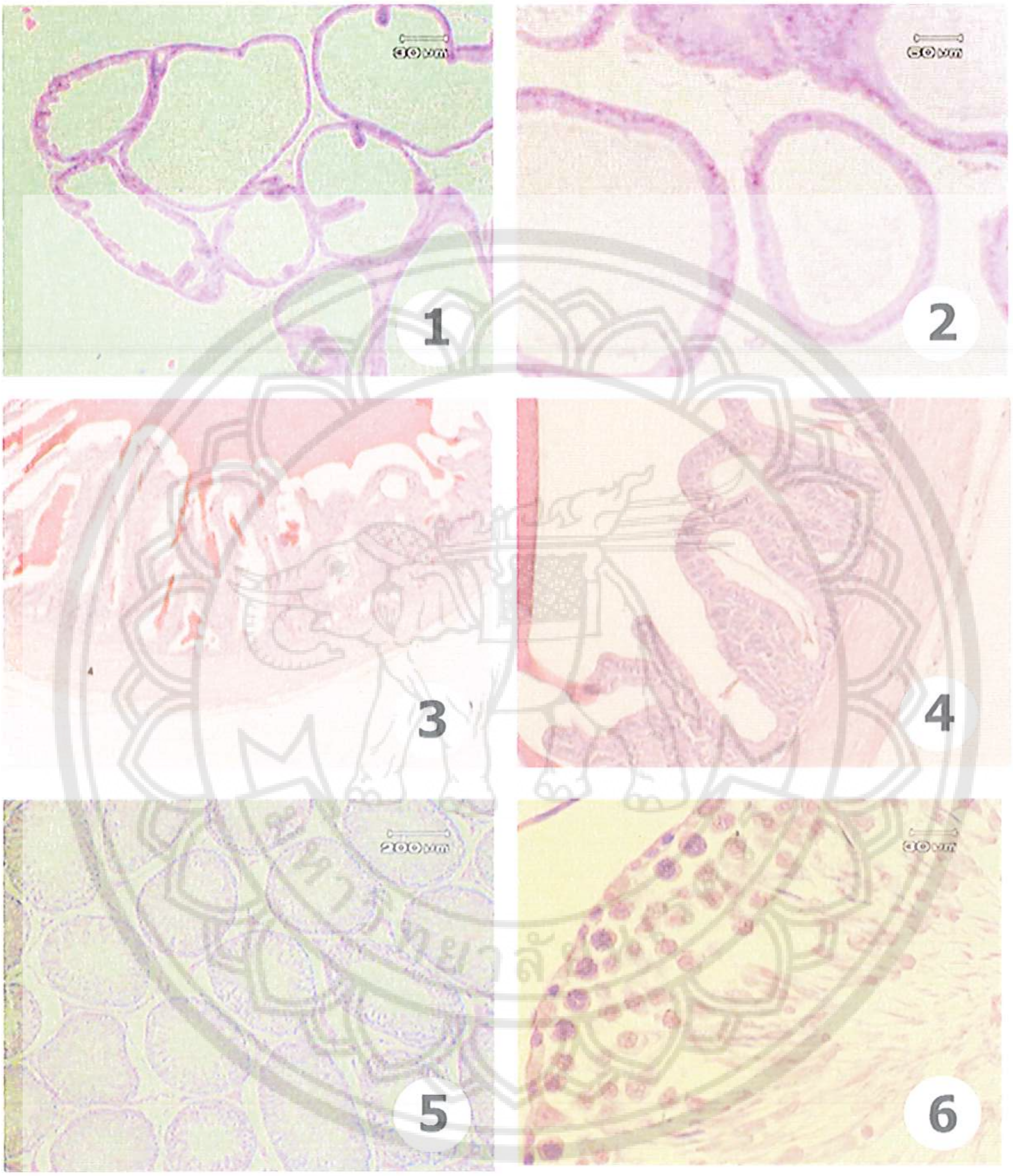
รูปที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนตัวอสุจิจาก caudal epididymis และ vas deferens แต่ละข้างในหนูกลุ่มควบคุม (Control) กับกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราสดขนาด 10 (OS10), 100 (OS100) และ 1000 (OS1000) มก./กก.น้ำหนักตัว (หมายเหตุ * = $p < 0.005$, one-way ANOVA; ** = $p < 0.0001$, one-way ANOVA)

4. ผลการตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์

ตัวอย่างภาพถ่ายจากสไลด์ของเนื้อเยื่อ หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ต่อมลูกหมาก seminal vesicle และอัณฑะในหนูเพศผู้ ของกลุ่มควบคุม (vehicle control) ที่ได้รับเฉพาะน้ำกรองป้อนทางปากนาน 30 วัน แสดงในรูปที่ 7-8 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราสด (OS) ขนาด 10 (รูปที่ 9-10), 100 (รูปที่ 11-12) และ 1000 (รูปที่ 13-14) มก./กก. น้ำหนักตัว ป้อนทางปากติดต่อกันทุกวันนาน 30 วัน ซึ่งหลังจากได้ทำการวิเคราะห์เบื้องต้นแล้วไม่พบความผิดปกติของรูปร่างของเซลล์ใดๆ ของเนื้อเยื่อดังกล่าว ทั้งในตัวอย่างเนื้อเยื่อของหนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราทั้งสามขนาด

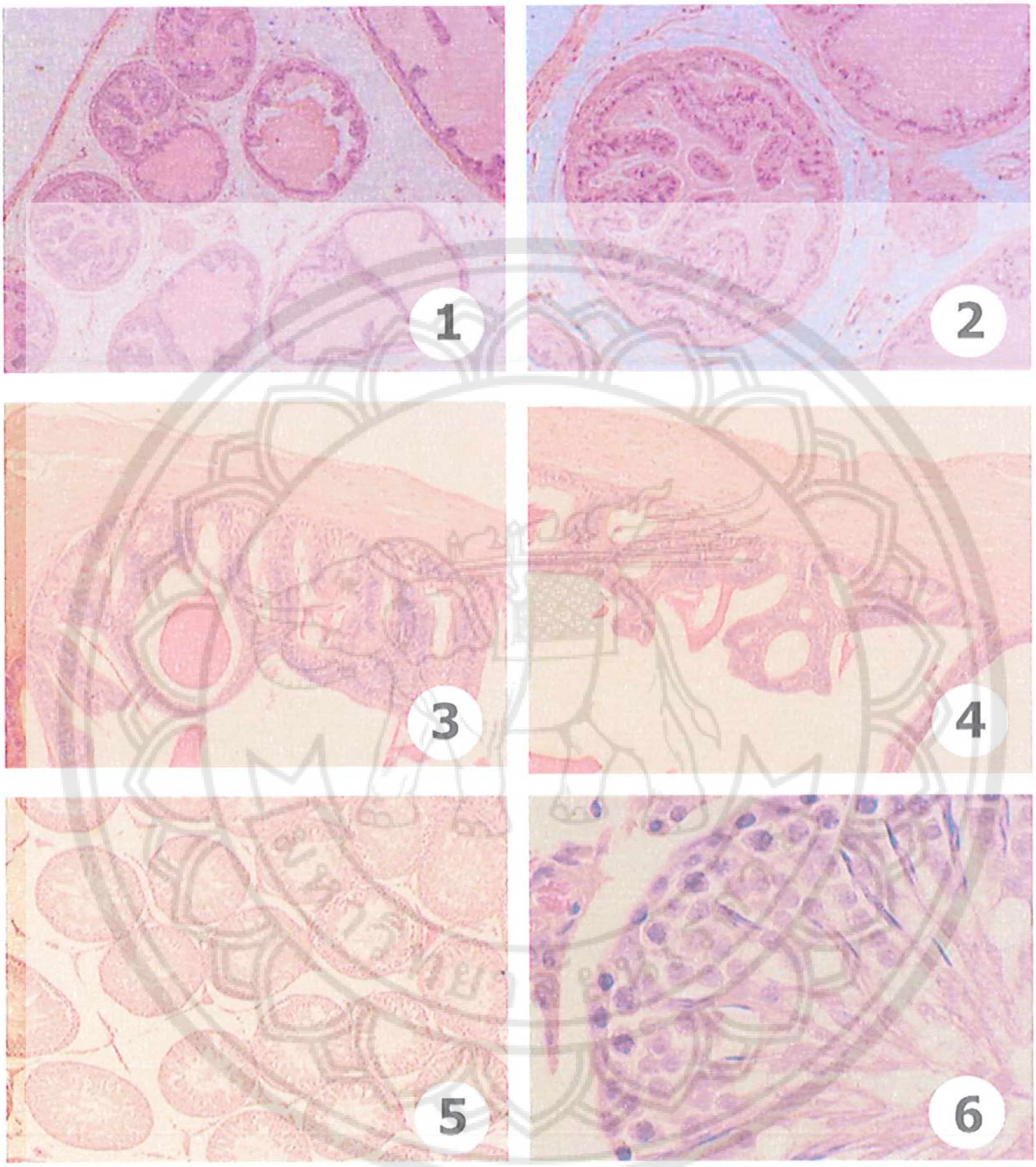
รูปที่ 7 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วน หัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) กระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มควบคุม (Vehicle Control) ที่ได้รับน้ำกรอง 0.4 มล. ป้อนทางปากติดต่อกันทุกวันนาน 30 วัน

รูปที่ 8 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มควบคุม (Vehicle Control) ที่ได้รับน้ำกรอง 0.4 มล. ป้อนทางปากติดต่อกันทุกวันนาน 30 วัน



รูปที่ 9 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วน หัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) และกระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 10 มก./กก. โดยป้อนทางปากติดต่อกันนาน 30 วัน

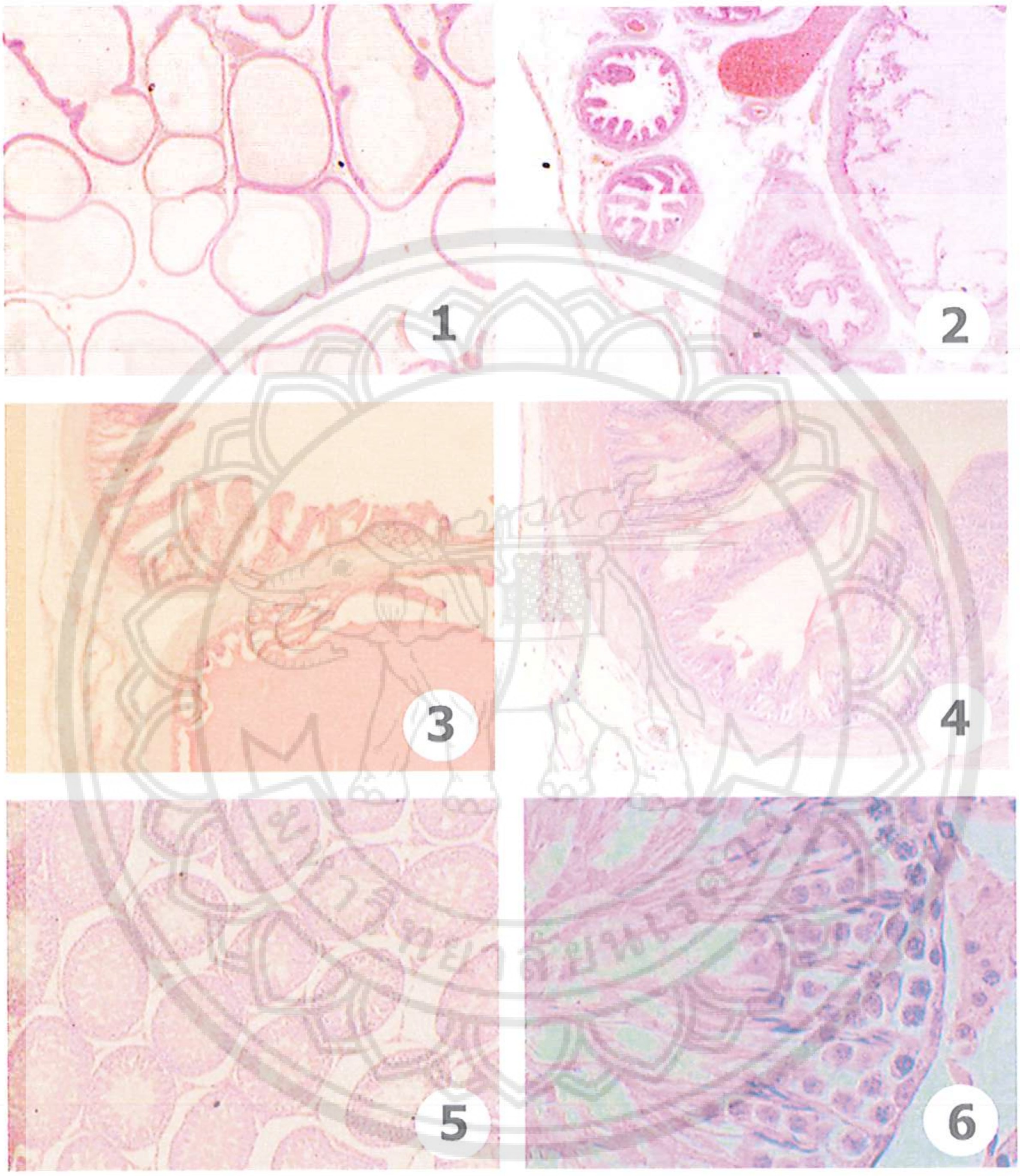
รูปที่ 10 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 10 มก./กก. โดยป้อนทางปากติดต่อกันนาน 30 วัน



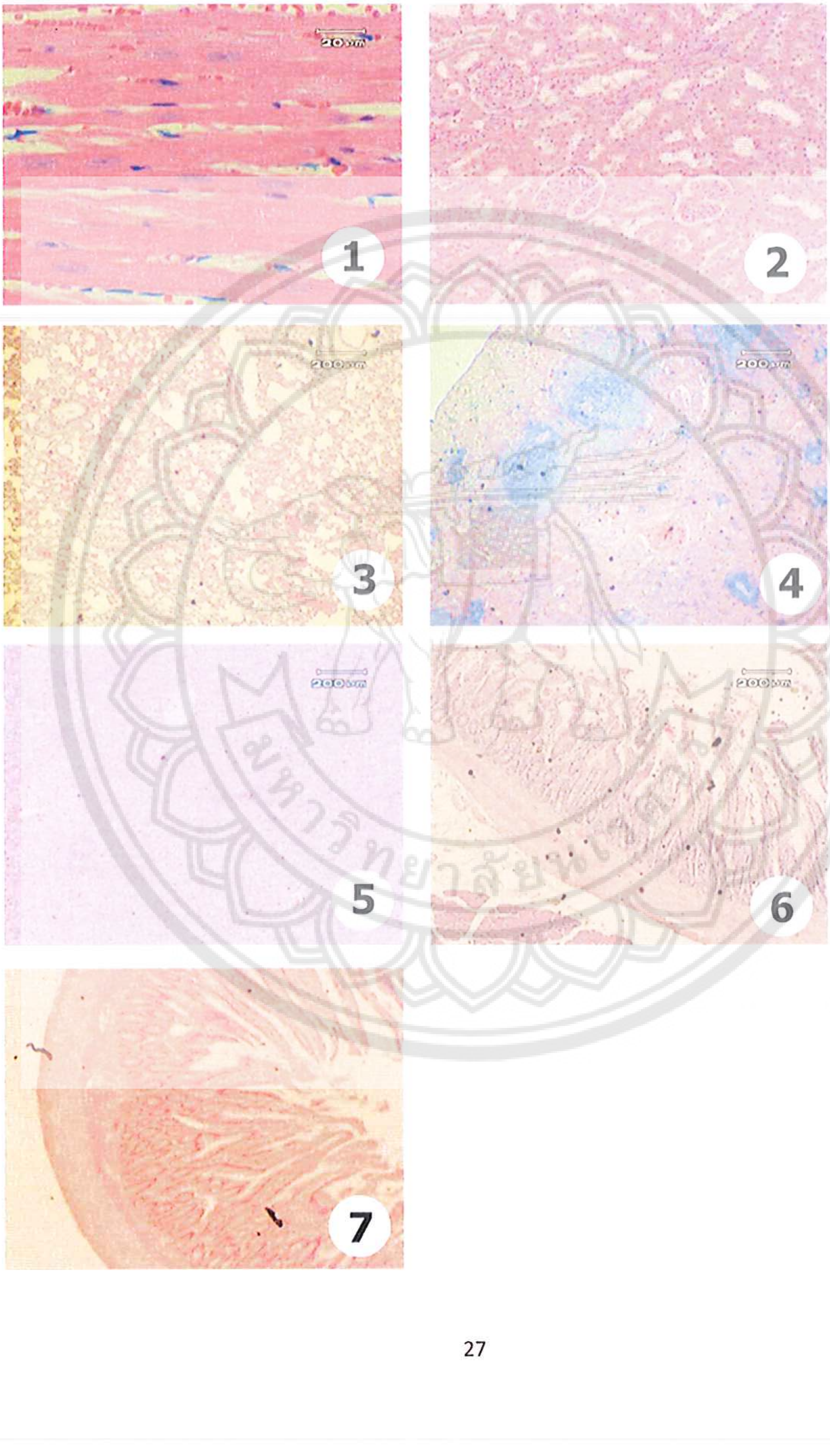
i 6833243x
15 ก.ย. 2558
สำนักหอสมุด
QK 495 .L25 ท124ร 2556

รูปที่ 11 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนหัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) กระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 100 มก./กก. โดยป้อนทางปากติดต่อกันนาน 30 วัน

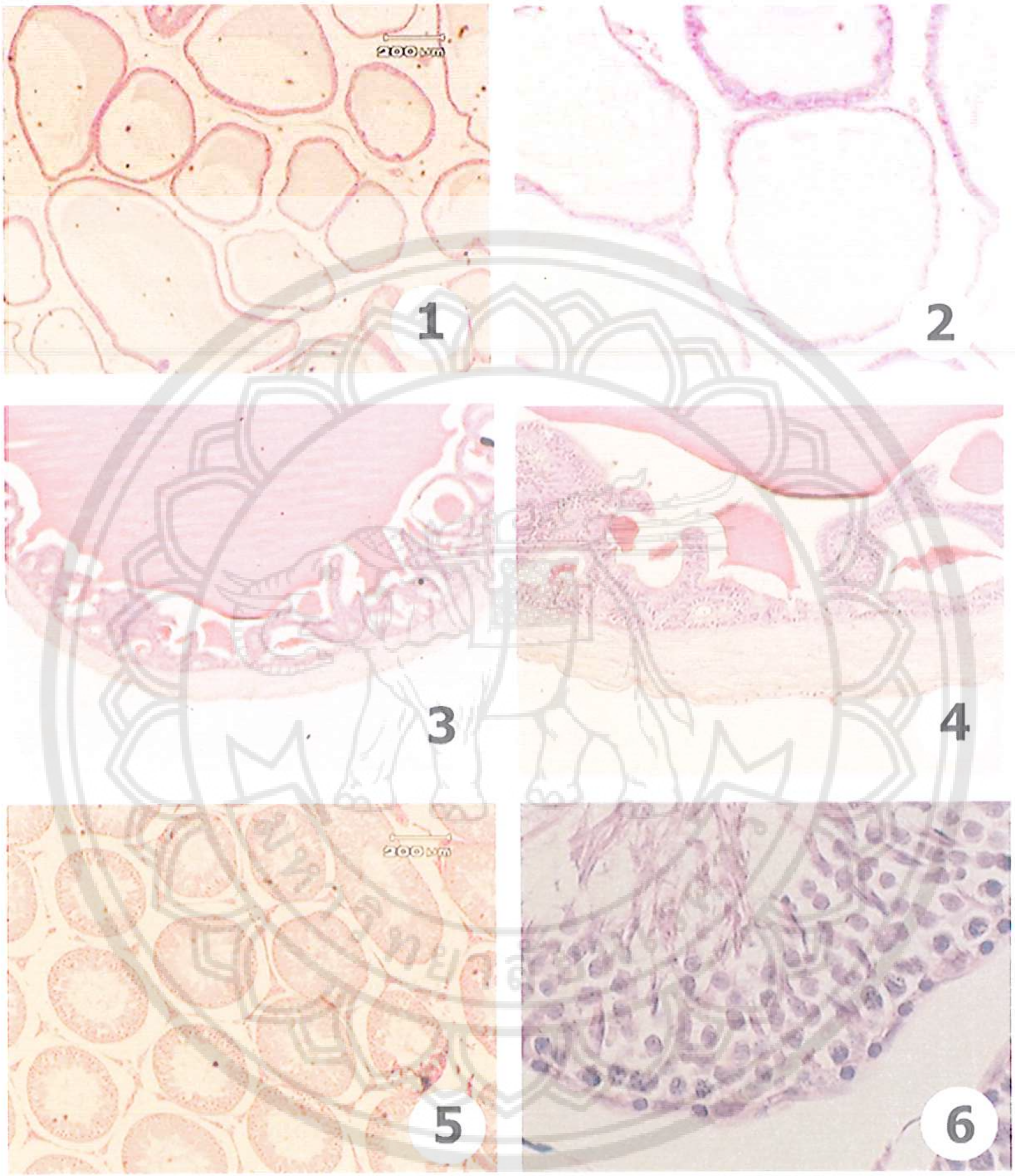
รูปที่ 12 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 100 มก./กก. โดยป้อนทางปากติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 13 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนหัวใจ (1) ปอด (2) ตับ (3) ไต (4) ม้าม (5) กระเพาะอาหาร (6) และลำไส้เล็ก (7) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 1000 มก./กก. โดยป้อนทางปากติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 14 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมลูกหมาก (1-2) seminal vesicle (3-4) และลูกอัณฑะ (5-6) ในหนูกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราขนาด 1000 มก./กก. โดยป้อนทางปากติดต่อกันนาน 30 วัน



สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบและยืนยันผลของใบกะเพราต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศชายโดยเฉพาะผลในการลดจำนวนของตัวอสุจิและระดับฮอร์โมนเพศ ตามที่ได้มีการบันทึกในตำราอายุรเวชของประเทศอินเดีย ว่าใบกะเพรามีฤทธิ์ในการคุมกำเนิด ซึ่งบรรพบุรุษของชาวอินเดียได้ใช้สืบต่อกันมาจวบจนปัจจุบันก็ยังคงมีใช้อยู่ โดยเฉพาะชาวบ้านและหมออายุรเวชที่อาศัยอยู่ในแถบชนบทนอกเมือง (Verma et al., 2010)

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้สามารถยืนยันได้ว่าการบริโภคใบกะเพราในปริมาณสูงมากก็ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายหรืออวัยภายในแต่อย่างใด ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มีใบกะเพราเป็นส่วนประกอบในปริมาณที่เล็กน้อยกว่าขนาดที่ใช้ในการทดลองนี้หลายเท่าย่อมไม่ก่อให้เกิดผลเสียใดๆ ต่อร่างกาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันโดย Sadashiv ที่ใช้แนวทางของ OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 420) ได้ทดสอบในหนูเมาส์ สายพันธุ์ Albino Swiss ทั้งสองเพศ เมื่อใช้ผงกะเพรา (ลำต้น ใบ และดอก) ผสมกับน้ำกลั่น ป้อนให้ทางปากด้วยขนาดสูงถึง 3, 5 และ 7 ก./กก. นน.ตัว พบว่าไม่ได้ทำให้หนูทดลองตายหรือแสดงอาการผิดปกติอย่างใด แต่ผู้วิจัยไม่ได้ทำการผ่าตัดชันสูตรหนูเพื่อศึกษาความผิดปกติต่ออวัยวะภายในที่สำคัญ (Sadashiv, 2010) และเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีรายงานผลการทดสอบศักยภาพในการทำให้ยีนกลายพันธุ์และความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันโดย Chandrasekaran และคณะได้ทำการทดสอบตามแนวทาง OECD Guideline No. 420 เช่นกัน แต่ทำการทดสอบในหนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Wistar ที่ป้อนสารสกัดกะเพรา (OciBest™) ทางปากขนาด 5 ก./กก.นน.ตัว (Chandrasekaran et al., 2013) ซึ่งพบว่าสารสกัดกะเพราไม่ส่งผลใดๆ ต่อทำให้ยีนของ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TAMix แสดงการกลายพันธุ์ และผลการทดสอบในหนูแรทเพศเมียก็ไม่ทำให้หนูตายหรือเกิดความผิดปกติใดๆ เช่นกัน ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าผลเสียที่อาจเกิดขึ้นต่อสุขภาพของผู้บริโภคใบกะเพราไม่ได้เกิดจากสารที่อยู่ในใบไม้แต่น่าจะเป็นสารแปลกปลอมอื่น (เช่น ยาฆ่าแมลง ฯลฯ) หรืออาจเป็นผลจากแมลงหรือสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ที่อาศัยอยู่ตามใบของกะเพรา

มีรายงานวิจัยที่ระบุว่าสารสกัดกะเพรานอกจากจะไม่มีพิษต่อร่างกายแล้วยังพบว่ามีส่วนช่วยปกป้องตับจากการถูกทำลายโดยยาพาราเซตามอลที่ป้อนให้หนูทดลองในขนาด 2 ก./กก.นน.ตัว/วัน (Lahon and Das, 2011) และยา p-hydroxybenzoic acid (butylparaben) ที่ป้อนให้หนูทดลองในขนาด 1.32 ก./กก.นน.ตัว/วัน (Shah and Verma, 2012) สารสกัดกะเพรานี้เมื่อให้แก่หนูในขนาด 50 มก./กก.นน.ตัว ยังสามารถช่วยปกป้องร่างกายจากผลของการฉายรังสีแกมม่า (Devi and Ganasoundari, 1995) และช่วยบรรเทาผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด (Prakash and Gupta, 2000, Prakash and Gupta, 2005) ได้เป็นอย่างดี

ผลที่น่าสนใจอีกประเด็นหนึ่งที่ได้จากงานวิจัยนี้คือใบกะเพราสดปั่นเมื่อป้อนให้หนูทดลองขนาด 100 หรือ 1000 มก./กก.นน.ตัว ส่งผลลดจำนวนตัวอสุจิที่บริเวณ caudal epididymis ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัย

ที่ผ่านมาของ นักวิจัยชาวอินเดียหลายกลุ่ม ที่ตีพิมพ์ผลงานวิจัยตั้งแต่ปี 1969 ถึงปี 1986 (Vohora et al., 1969, Batta and Santhakumari, 1971, Kasinathan et al., 1972, Seth et al., 1981, Khanna et al., 1986, Ahmed et al., 2002) อย่างไรก็ตาม ผลของใบกะเพราที่ให้แก่หนูทดลองในการทดลองนี้ไม่มีผลลดขนาดของลูกอัณฑะหรือต่อมลูกหมาก ที่พบในหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดหยาบของใบกะเพรา (benzene crude extract) ในขนาด 200 หรือ 400 มก./กก.นน.ตัว (Khanna et al., 1986) นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยโดย Ahmed และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ซึ่งได้ป้อนสารสกัดหยาบของใบกะเพราให้แก่หนูแรกขนาด 250 มก./กก. นน.ตัว นาน 48 วัน มีผลลดจำนวนการสร้าง ลดความเร็วในการว่าย และเพิ่มเปอร์เซนต์ความผิดปกติของตัวอสุจิ ซึ่งผลนี้สามารถกลับคืนสู่ภาวะปกติได้ภายในเวลา 2 สัปดาห์หลังการหยุดป้อนสารสกัด (Ahmed et al., 2002) ทำให้เมื่อเร็วๆ นี้ Sethi และคณะ (2010) ได้ศึกษาวิจัยฤทธิ์หรือสรรพคุณของใบกะเพราในการเป็น anti-fertility หรือมีฤทธิ์ contraceptive effect ในสัตว์ทดลอง โดยพบว่ากระต่ายที่กินใบกะเพราสดวันละ 2 กรัมทุกวันเป็นเวลา 30 วัน มีจำนวนตัวอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกระต่ายที่กินอาหารปกติ (ซึ่งไม่มีใบกะเพรา) นอกจากนี้ พวกเขายังพบว่า กระต่ายที่ได้รับใบกะเพรามีระดับฮอร์โมน Testosterone มีค่ามากขึ้น สวนทางกับระดับของฮอร์โมน Lutenizing hormone และ Follicle stimulating hormone ที่มีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกระต่ายที่กินอาหารปกติ (Sethi et al., 2010) อย่างไรก็ตาม รายงานวิจัยดังกล่าวมาแล้วไม่ได้ระบุว่าผลสารสกัดใบกะเพราต่อขนาดของลูกอัณฑะ (น้ำหนักอวัยวะ/100 กรัม นน.ตัว) และส่งผลอย่างไรต่อพฤติกรรมการสืบพันธุ์ในหนูทดลอง ซึ่งอาจใช้ข้อมูลเหล่านี้เป็นประโยชน์สำหรับการนำไปพัฒนาต่อเป็นสารสกัดสมุนไพรที่ช่วยลดจำนวนตัวอสุจิหรือทำให้เกิดภาวะการเป็นหมันแบบชั่วคราวในผู้ชายที่ไม่ต้องการทำหมันแบบถาวร

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการที่หนูทดลองได้รับใบกะเพราสด แม้ว่าจะได้รับในปริมาณมากถึง 1 ก. ต่อ กก.น้ำหนักตัว ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายและอวัยวะภายใน เมื่อได้รับวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 30 วัน และเมื่อป้อนให้หนูด้วยขนาด 100 หรือ 1000 มก./กก.นน.ตัว สามารถลดจำนวนตัวอสุจิที่บริเวณ caudal epididymis

บรรณานุกรม

1. Ahmed M, Ahamed RN, Aladakatti RH, Ghosesawar MG (2002) Reversible anti-fertility effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on sperm parameters and fructose content in rats. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology 13:51-59.
2. Ahmed M, Nazeer Ahamed R, Aladakatti RH (2009) Effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on cauda epididymis of albino rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol 20:29-41.
3. Batta SK, Santhakumari G (1971) The antifertility effect of *ocimum sanctum* and hibiscus rosa sinensis. Indian J Med Res 59:777-781.
4. Chandrasekaran CV, Srikanth HS, Anand MS, Allan JJ, Viji MM, Amit A (2013) Evaluation of the mutagenic potential and acute oral toxicity of standardized extract of *Ocimum sanctum* (OciBest). Hum Exp Toxicol 32:992-1004.
5. Devi PU, Ganasoundari A (1995) Radioprotective effect of leaf extract of Indian medicinal plant Ocimum sanctum. Indian J Exp Biol 33:205-208.
6. Farnsworth NR, Waller DP (1982) Current status of plant products reported to inhibit sperm. Res Front Fertil Regul 2:1-16.
7. Giridharan VV, Thandavarayan RA, Mani V, Ashok Dundapa T, Watanabe K, Konishi T (2011) *Ocimum sanctum* Linn. leaf extracts inhibit acetylcholinesterase and improve cognition in rats with experimentally induced dementia. Journal of medicinal food 14:912-919.
8. Gupta SK, Prakash J, Srivastava S (2002) Validation of traditional claim of Tulsi, *Ocimum sanctum* Linn. as a medicinal plant. Indian journal of experimental biology 40:765-773.
9. Joshi H, Parle M (2006) Evaluation of nootropic potential of *Ocimum sanctum* Linn. in mice. Indian journal of experimental biology 44:133-136.
10. Kasinathan S, Ramakrishnan S, Basu SL (1972) Antifertility effect of *Ocimum sanctum* L. Indian J Exp Biol 10:23-25.
11. Khanna S, Gupta SR, Grover JK (1986) Effect of long term feeding of tulsi (*Ocimum sanctum* Linn) on reproductive performance of adult albino rats. Indian J Exp Biol 24:302-304.

12. Khopfa (2010) “ผักไทยในเดนมาร์กขาดตลาด” จากเว็ปไซต์ http://www.thaitangdaen-news.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=1835:2010-11-26-07-04-45&catid=167:2009-10-27-07-21-41&Itemid=467 วันที่ลงบทความ 26 พฤศจิกายน 2010
13. Khopfa (2011) “จุดจบอาหารไทยในต่างแดน” จากเว็ปไซต์ http://www.thaitangdaen-news.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=1945:2011-04-12-16-20-05&catid=101:2009-06-10-22-29-22&Itemid=389 วันที่ลงบทความ 12 เมษายน 2011.
14. Lahon K, Das S (2011) Hepatoprotective activity of Ocimum sanctum alcoholic leaf extract against paracetamol-induced liver damage in Albino rats. Pharmacognosy Res 3:13-18.
15. Pattanayak P, Behera P, Das D, Panda SK (2010) Ocimum sanctum Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: An overview. Pharmacogn Rev 4:95-105.
16. Prakash J, Gupta SK (2000) Chemopreventive activity of Ocimum sanctum seed oil. J Ethnopharmacol 72:29-34.
17. Prakash P, Gupta N (2005) Therapeutic uses of Ocimum sanctum Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. Indian J Physiol Pharmacol 49:125-131.
18. Prakash P, Gupta N (2005) Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. Indian journal of physiology and pharmacology 49:125-131.
19. Sadashiv PS (2010) ACUTE TOXICITY STUDY OF OCIMUM SANCTUM. Int Res J Pharm 1:409-413.
20. Seth SD, Johri N, Sundaram KR (1981) Antispermatogenic effect of Ocimum sanctum. Indian J Exp Biol 19:975-976.
21. Sethi J, Yadav M, Sood S, Dahiya K, Singh V (2010) Effect of tulsi (*Ocimum Sanctum* Linn.) on sperm count and reproductive hormones in male albino rabbits. International journal of Ayurveda research 1:208-210.
22. Shah K, Verma RJ (2012) Protection against butyl p-hydroxybenzoic acid induced oxidative stress by Ocimum sanctum extract in mice liver. Acta Pol Pharm 69:865-870.
23. Verma A, Singhal A, Singh D (2010) Local health wisdom of rural women using medicinal plants. Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK) 9:289-293.

24. Viyoch, J., Pisutthanan, N., Faikreua, A., Nupangta, K., Wangtorpol, K., Ngokkuen, J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against Propionibacterium acnes. Int. J. Cosmet. Sci. 28, 125-133 (2006).
25. Vohora SB, Garg SK, Chaudhury RR (1969) Antifertility screening of plants. 3. Effect of six indigenous plants on early pregnancy in albino rats. Indian J Med Res 57:893-899.

เอกสารรับรองโครงการ

คณะกรรมการกำกับการเลี้ยงและการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ	การศึกษาผลของใบกะเพราต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในหนูแรท Effect of *Ocinum sanctum* on reproductive function in rats
เลขที่โครงการ	NU-AE550522
เลขที่เอกสารรับรอง	55 04 0024
ประเภทการรับรอง	เต็มรูปแบบ
ชื่อหัวหน้าโครงการ/ผู้ยื่นขอฯ	ดร.พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์
สังกัดหน่วยงาน /คณะ	สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย
วันที่รับรอง	วันที่ 15 มิถุนายน 2555

ขอรับรองว่าโครงการวิจัยนี้ ได้รับการรับรองด้านจรรยาบรรณการใช้สัตว์
จากคณะกรรมการกำกับการเลี้ยงและการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตติมา จีนาพงษา)

ประธานคณะกรรมการกำกับการเลี้ยงและการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เลขทะเบียน 58

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการบนเว็บไซต์
ฐานข้อมูล NU Digital Repository (http://obj.lib.nu.ac.th/media/)
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ข้าพเจ้า ดร.พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์ (ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์) ได้ส่งผลงานทางวิชาการการรายงานการวิจัย (เรื่อง) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการการตรวจสอบความเป็นพิษและผลของใบกะเพราต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในหนูทดลอง

ปีที่พิมพ์ 2556

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานทางวิชาการเป็นลิขสิทธิ์ของข้าพเจ้า ดร.พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์ เป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน จึงอนุญาตให้เผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- [x] อนุญาตให้เผยแพร่
- [ ] ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ เนื่องจาก..........

ลงชื่อ พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์
(พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์)
วันที่ ๑ พย 58

หมายเหตุ ลิขสิทธิ์ใดๆ ที่ปรากฏอยู่ในผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของเจ้าของผลงาน ไม่ใช่ของสำนักหอสมุด