



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดต่าง ๆ และน้ำมัน
หอมระเหยที่สกัดจากใบกะเพราต่อระดับไขมันและน้ำตาลใน
เลือด และฤทธิ์ในการปกป้องอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนี่ยวนำให้
เป็นเบาหวานและหนูที่เหนี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

โดย รศ.ดร. ธมลวรรณ ส่วนอรุณสวัสดิ์
หมวดวิชาสรีรวิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
หัวหน้าโครงการวิจัย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดต่าง ๆ และน้ำมัน
หอมระเหยที่สกัดจากใบกะเพราต่อระดับไขมันและน้ำตาลใน
เลือด และฤทธิ์ในการปกป้องอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนียวน้ำให้
เป็นเบาหวานและหนูที่เหนียวน้ำให้มีไขมันในเลือดสูง

รศ.ดร. ธมลวรรณ ส่วนอรุณสวัสดิ์
หมวดวิชาสรีรวิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
หัวหน้าโครงการวิจัย

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
Executive summary	7
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	10
วัตถุประสงค์ของโครงการ	11
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง	13
- การสกัดแยกสิ่งสกปรกด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และ แยกกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา	14
- การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสิ่งสกปรกจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลาย ชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูเบาหวาน	15
- การศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกปรกจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหย ในการลดไขมันในเลือดในหนูที่เหนียวน้ำหนักไขมันในเลือดสูง	24
- การศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกปรกจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราในการป้องกันการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนียวน้ำหนักไขมันในเลือดสูง	32
- การศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกปรกจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราในการป้องกันการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูเบาหวาน	44
- การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสิ่งสกปรกจากใบกะเพราด้วยตัว ทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหย ในการลดไขมันในเลือดในหนูเบาหวาน และหนูที่เหนียวน้ำหนักไขมันในเลือดสูง	56
- การวิเคราะห์องค์ประกอบของของสิ่งสกปรกจากใบกะเพราด้วยตัว ทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา ที่ให้ผลในการลดไขมันในเลือด และการป้องกันการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนียวน้ำหนักไขมันในเลือดสูง และ หนูที่เหนียวน้ำหนักไขมันในเลือดสูง	70
อภิปรายผลการทดลอง	79
เอกสารอ้างอิง	93
Output ที่ได้จากโครงการ	101
ภาคผนวก	

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือจากทีมวิจัยทุกท่าน ได้แก่ รศ.ดร. ธมลวรรณ ส่วนอรุณสวัสดิ์ รศ.ดร. สุวรรณ วีระวรพันธุ์ ผศ. ดร.ธนภัทร ทรงศักดิ์ และ ดร.วัชรภรณ์ เทวกุล ณ อยู่ธยา นอกจากนี้ยังมีผู้ช่วยวิจัยคือ คุณชัยชาญ ศรีโพธิ์ ซึ่งเป็นบุคลากรของภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ช่วยในเรื่องการเลี้ยงดูแลหนุทดลองและช่วยป้อนสารต่างๆ แก่หนุทดลองด้วย นอกจากนี้ทีมวิจัยต้องขอขอบคุณ ผศ.ดร. สมลักษณ์ พวงชมพู จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยในเรื่องการตัดชิ้นเนื้อเยื่อของหนุทดลองและอ่านผลทางพยาธิวิทยาให้ด้วย

ทีมวิจัยทุกท่านขอขอบคุณ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต และ คณะการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่กรุณาเอื้อเฟื้อ เครื่องมือต่างๆ และสถานที่สำหรับการทำวิจัย

สุดท้ายคือ งานวิจัยจะไม่สามารถทำได้ถ้าปราศจากทุนที่จะใช้ในการทำวิจัย ทีมวิจัยทุกท่านขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

ทีมวิจัยทุกท่านหวังว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้อ่านที่จะนำไปประยุกต์ใช้ หรือนำไปศึกษาต่อเพิ่มเติม

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง การสกัดน้ำมันหอมระเหยจะใช้วิธี hydrodistillation method การสกัดสารจากใบกะเพราจะใช้วิธีสกัดแบบ sequential maceration โดยใช้ตัวทำละลายตามลำดับการมีขั้วคือ hexane, ethyl acetate, ethanol, 70% ethanol และน้ำ หนูจะถูกเหนียวทำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด streptozotocin จากนั้นจะป้อนน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ นาน 3 สัปดาห์ ส่วนการเหนียวทำให้หนูมีไขมันในเลือดสูงจะให้กินอาหารที่มี 2.5% cholesterol นาน 7 สัปดาห์ โดย 3 สัปดาห์สุดท้ายจะให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ผลการทดลอง พบว่า สิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับก่อนการให้สิ่งสกัดกะเพรา สิ่งสกัดกะเพราและน้ำมันหอมระเหย สามารถลด serum cholesterol ในหนูเบาหวาน ส่วน serum triglyceride จะลดในหนูที่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane หรือ ethyl acetate โดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ให้ผลลด cholesterol และ triglyceride ได้มากที่สุด โดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะเพิ่มปริมาณไขมัน และ bile acid ในอุจจาระ และเพิ่ม HMG-CoA reductase activity ในตับสู่ภาวะปกติ รวมทั้งเพิ่ม plasma lipoprotein lipase activity (LPL) หนูเบาหวานมีระดับ serum enzymes ต่างๆ คือ AST, ALT, LDH, CK-MB, creatinine และ BUN สูงขึ้น รวมทั้ง MDA ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจเพิ่มขึ้นขณะที่ GPx, CAT และ SOD ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ลดลง เฉพาะสารสกัดกะเพราด้วยน้ำเท่านั้นที่มีผลลด serum enzymes ต่างๆ เหล่านี้ได้ รวมทั้งลด MDA และเพิ่ม GPx, CAT, SOD ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ สำหรับหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงจะมีระดับ cholesterol และ triglyceride ใน serum เพิ่ม HDL-C ลดลง น้ำมันหอมระเหย และสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ลด cholesterol ได้ แต่สิ่งสกัด hexane และน้ำมันหอมระเหยช่วยลด triglyceride โดยสิ่งสกัด hexane ให้ผลลด cholesterol และ triglyceride มากที่สุด โดยการลดไขมันที่สูงในตับ และลด HMG-CoA reductase ในตับ รวมทั้งเพิ่ม LPL ส่วนระดับไขมันและ bile acid ในอุจจาระไม่แตกต่างจากหนูที่มีไขมันในเลือดสูงที่ไม่ได้กะเพรา เฉพาะสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำเท่านั้นที่สามารถลดระดับที่สูงของ serum AST, ALT, LDH และ CK-MB ในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง รวมทั้งลด MDA และเพิ่ม GPx, CAT, SOD ในหัวใจและตับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยสามารถลด serum LDH และ CK-MB ลด MDA และเพิ่ม GPx, CAT, SOD ในหัวใจ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย พบว่ามี phenyl propanoid compound เป็นองค์ประกอบหลัก (65%) โดยมี methyl eugenol และ eugenol เป็นส่วนประกอบสำคัญ ส่วนองค์ประกอบหลักในสิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane คือ fatty acid โดย linolenic acid และ linoleic acid เป็นส่วนประกอบสำคัญ

สำหรับองค์ประกอบในสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำพบบ phenolic compound แต่ไม่พบ ursolic acid และ apigenin จากการวิจัยสามารถสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานเมื่อเทียบกับก่อนการให้สิ่งสกัดเหล่านี้ สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ให้ผลลดระดับไขมันในเลือดมากที่สุดทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โดยกลไกผ่านการเพิ่มการขับทิ้งไขมันในอุจจาระ และเพิ่ม LPL สำหรับหนูเบาหวาน และกลไกผ่านทางลดการสร้างไขมันในตับและเพิ่ม LPL สำหรับหนูที่มีไขมันในเลือดสูง linolenic acid และ linoleic acid ในสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane น่าจะเป็นองค์ประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดของหนูเบาหวานและหนูที่มีไขมันในเลือดสูง สิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำให้ผลในการปกป้องอวัยวะสำคัญของหนูทั้ง 2 ประเภท โดยกลไกผ่านการลดการเกิด lipid peroxidation และเพิ่ม anti-oxidant enzyme activity ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจ ส่วนน้ำมันหอมระเหยช่วยปกป้องหัวใจในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โดยกลไกผ่านทางลดการเกิด lipid peroxidation และเพิ่ม anti-oxidant enzyme activity ของหัวใจ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยน่าจะเป็นองค์ประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดและปกป้องหัวใจในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง

ABSTRACT

The present study was conducted to elucidate the effect and the mechanisms of actions of essential oils and various crude extracts of *Ocimum sanctum* Linn. (OS) leaves on blood glucose and serum lipids in diabetic rats and rats fed with high cholesterol (HC) diet. Its organ protective effects was also evaluated. Essential oils (EO) was extracted by hydrodistillation method. Various crude extract of OS were extracted by sequential maceration using hexane, ethyl acetate, ethanol, 70% ethanol and water. Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. EO or various crude extracts of OS were fed orally for 3 weeks after diabetic induction. Rats were fed with 2.5% cholesterol in the diet for 7 weeks to induce hyperlipidemia. EO or various crude extracts of OS were fed during the last 3 weeks. The results show that neither EO nor various crude extracts of OS decreased blood glucose in diabetic rats comparing to before OS administration. EO and all crude extracts of OS decreased serum cholesterol in diabetic rats. EO, hexane and ethyl acetate extracts decreased serum triglyceride in diabetic rats. Among various crude extracts of OS, hexane extract had the most lipid-lowering effect in diabetic rats. Hexane extract of OS raised the low levels of liver HMG-CoA reductase activity in diabetic rats. Plasma lipoprotein lipase activity (LPL) and fecal lipids excretion were also increased in diabetic rats treated with hexane extract. Diabetic rats had high serum levels of AST, ALT, LDH, CK-MB, creatinine and BUN. MDA level was increased whereas GPx, CAT and SOD were decreased in liver, heart and kidney of diabetic rats. Only aqueous extract of OS decreased all these high serum enzymes in diabetic rats. It also depressed the high level of MDA whereas it raised GPx, SOD, CAT in liver, kidney and heart. For rats fed HC diet, EO and all crude extracts of OS decreased high serum level of cholesterol. EO and hexane extract decreased serum triglyceride in HC rats. Only hexane extract had the most lipid-lowering effect in HC rats. Hexane extract of OS decreased high level of liver lipid content, and suppressed liver HMG CoA reductase activity whereas it raised LPL activity in HC rats. No significant differences of fecal lipid and bile acid excretion in HC rats treated with or without hexane extract. Serum levels of AST, ALT, LDH and CK-MB were significantly increased whereas LPL decreased in HC rats. Only aqueous extract significantly decreased the high serum levels of these enzymes. EO decreased only serum levels of LDH and CK-MB without any effect on high levels of AST and ALT. EO decreased the high level of cardiac MDA, and increased cardiac GPx, CAT and SOD. Aqueous extract decreased

the high level of MDA whereas it raised GPx, CAT and SOD in both liver and cardiac tissues. Phenyl propanoid compounds including methyl eugenol and eugenol were the primary chemical constituents containing in EO. Hexane extract mostly contained of fatty acid in which linolenic acid and linoleic acid were the primary constituents. Phenolic compounds were found in aqueous extract without ursolic and apigenin. It can be concluded that EO and various crude extracts of OS leaves have no hypoglycemic effect in diabetic rats. Hexane extract has the most hypolipidemic effect in both diabetic and HC rats. An augmentation of fecal lipid excretion and plasma LPL are the significant mechanism of lipid-lowering action of hexane extract in diabetic rats. In contrast, its lipid-lowering action in HC rats is mainly due to the depression of liver lipid synthesis and increasing LPL activity. Only aqueous extract of OS plays an important role to protect the vital organs in both diabetic and HC rats by decreasing tissue lipid peroxidation and increasing tissue anti-oxidant enzyme activity. Eugenol in EO may be the possible chemical ingredient to lower serum lipid profile and protect heart against hypercholesterolemia. Linolenic acid and linoleic acid might be the significant chemical ingredient in hexane extract to lower high serum lipid profile in both diabetic and HC rats. Neither ursolic acid nor apigenin is the possible chemical composition in aqueous extract to protect vital organs of diabetic and HC rats.

EXECUTIVE SUMMARY

ปัจจุบันมีประชาชนที่เป็นเบาหวานและไขมันในเลือดสูงเพิ่มขึ้นทุกปีอย่างต่อเนื่อง การรักษาจะใช้วิธีควบคุมอาหาร ออกกำลังกายและที่สำคัญคือการใช้ยา สำหรับประเทศไทยยาเหล่านี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณของประเทศ นอกจากนี้ยามีผลข้างเคียงสำคัญ เช่น ยาลดไขมัน เมื่อรับประทานติดต่อกันนานจะส่งผลทำลายตับ หรือยาลดน้ำตาลในเลือดก็ส่งผลให้เกิดอาการ hypoglycemic shock ได้ จากปัจจัยทั้งราคาและผลข้างเคียงดังกล่าวจึงทำให้มีความสนใจในการนำสมุนไพรจากธรรมชาติมาใช้เพื่อรักษามากขึ้น ในบรรดาสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศไทยนั้น กะเพราเป็นพืชสมุนไพรที่มีการปลูกแพร่หลาย ราคาถูก ดังนั้นการศึกษาวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง รวมทั้งวิเคราะห์หาองค์ประกอบหลักในสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายที่ออกฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจะใช้วิธี hydrodistillation method ส่วนการสกัดสารจากใบกะเพราจะใช้วิธีสกัดแบบ sequential maceration โดยใช้ตัวทำละลายตามลำดับการมีขั้ว คือ hexane, ethyl acetate, ethanol, 70% ethanol และน้ำ หนูถูกเหนียวทำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด streptozotocin เข้าทางหน้าท้อง จากนั้นจะป้อนน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ นาน 3 สัปดาห์ ส่วนการเหนียวหนูให้มีไขมันในเลือดสูงจะให้หนูกินอาหารที่มี 2.5% cholesterol นาน 7 สัปดาห์ โดย 3 สัปดาห์สุดท้ายจะให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าน้ำหนักตัวของหนูเบาหวานเพิ่มไม่มากเท่าหนูปกติแต่ปริมาณอาหารที่กินมากกว่าหนูปกติประมาณ 2 เท่า ระดับน้ำตาลในเลือดหนูเบาหวานเพิ่มอย่างต่อเนื่องตลอด 3 สัปดาห์ สิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับก่อนการให้สิ่งสกัดกะเพรา หนูเบาหวานมีระดับไขมันในเลือดสูงขึ้นทั้ง serum cholesterol และ serum triglyceride สิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ และน้ำมันหอมระเหย สามารถลด serum cholesterol ในหนูเบาหวาน ส่วน serum triglyceride จะลดได้ในหนูที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราที่เป็นพวกน้ำมัน ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane หรือ ethyl acetate โดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ให้ผลลด cholesterol และ triglyceride ได้มากที่สุด จึงถูกนำมาใช้ศึกษากลไกการลดไขมันในเลือดของหนูเบาหวาน พบว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane เพิ่มปริมาณไขมัน และ bile acid ในอุจจาระ และเพิ่ม HMG-CoA reductase activity ในตับที่ต่ำในหนูเบาหวานให้กลับสู่ภาวะปกติ รวมทั้งเพิ่ม plasma lipoprotein lipase activity (LPL) ที่ต่ำในหนูเบาหวาน หนูเบาหวานมีระดับ serum enzymes ต่างๆ คือ AST, ALT LDH, CK-MB, creatinine และ BUN สูงขึ้น แสดงว่ามีการทำลายหน้าที่ของ ตับ ไต และ หัวใจของหนูเบาหวาน ซึ่งจะเห็นมีการทำลายเนื้อเยื่อเหล่านี้ได้ชัดเจนเมื่อตรวจลักษณะทางพยาธิวิทยา นอกจากนี้ MDA ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจ

เพิ่มขึ้น ขณะที่ GPx, CAT และ SOD ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ลดลง พบว่าเฉพาะสารสกัดกะเพราด้วยน้ำเท่านั้นที่มีผลลด serum enzymes ต่างๆ เหล่านี้ได้ รวมทั้งลด MDA และเพิ่ม GPx, CAT, SOD ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ และเมื่อตรวจลักษณะทางพยาธิวิทยา ก็พบว่า เนื้อเยื่อเหล่านี้มีลักษณะดีขึ้นใกล้เคียงหนูปกติ

สำหรับหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงจะมีระดับ cholesterol และ triglyceride ใน serum เพิ่ม HDL-cholesterol ลดลง น้ำมันหอมระเหย และสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ลด cholesterol ได้ แต่สิ่งสกัด hexane และน้ำมันหอมระเหยเท่านั้นที่ช่วยลด serum triglyceride โดยสิ่งสกัด hexane ให้ผลลด serum cholesterol และ triglyceride มากที่สุด โดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะลดระดับไขมันในตับที่สูงของหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง และลด HMG-CoA reductase ในตับด้วย รวมทั้งเพิ่ม LPL โดยที่ระดับไขมันและ bile acid ในอุจจาระยังคงไม่แตกต่างจากหนูที่มีไขมันในเลือดสูงแต่ไม่ได้กะเพรา หนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงจะมีระดับ serum AST, ALT, LDH และ CK-MB สูงกว่าหนูปกติ รวมทั้งมีระดับ MDA เพิ่ม แต่ GPx, CAT, SOD ลดลงในหัวใจและตับ แสดงว่ามีการทำลายหน้าที่ของตับและหัวใจเกิดขึ้น เฉพาะสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำเท่านั้นที่สามารถลดระดับ serum enzyme ที่สูงเหล่านี้ รวมทั้งลด MDA และเพิ่ม GPx, CAT, SOD ในหัวใจและตับด้วย และช่วยฟื้นฟูสภาพเนื้อเยื่อของหัวใจและตับให้คืนสู่ภาวะใกล้เคียงกับหนูปกติ ส่วนน้ำมันหอมระเหยสามารถลด serum LDH และ CK-MB ในหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง รวมทั้งลด MDA และเพิ่ม GPx, CAT, SOD ในหัวใจและฟื้นฟูสภาพเนื้อเยื่อของหัวใจของหนูที่มีไขมันในเลือดสูงได้ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย พบว่ามี phenyl propanoid compound เป็นองค์ประกอบหลัก (65%) โดยมี methyl eugenol และ eugenol เป็นส่วนประกอบสำคัญ ส่วนองค์ประกอบหลักในสิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane คือ fatty acid โดยมี linolenic acid และ linoleic acid เป็น fatty acid หลัก สำหรับองค์ประกอบในสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำพบ phenolic compound แต่ไม่พบ ursolic acid และ apigenin

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานเมื่อเทียบกับก่อนการให้สิ่งสกัดเหล่านี้ สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ให้ผลลดระดับไขมันในเลือดมากที่สุดทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โดยกลไกที่สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ให้ผลลดระดับไขมันในเลือดของหนูเบาหวาน จะผ่านทางเพิ่มการขับทิ้งไขมันในอุจจาระ และเพิ่ม LPL แต่กลไกที่สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ให้ผลลดระดับไขมันในเลือดของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง จะผ่านทางลดการสร้างไขมันในตับและเพิ่ม LPL linolenic acid และ linoleic acid ในสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane น่าจะเป็นองค์ประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดของหนูเบาหวานและหนูที่มีไขมันในเลือดสูง เฉพาะสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำให้ผลในการปกป้องอวัยวะสำคัญของหนูเบาหวานและหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โดยกลไกผ่านการลดการเกิด lipid peroxidation และเพิ่ม anti-oxidant enzyme activity ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจ ส่วนน้ำมัน

หอมระเหยช่วยปกป้องหัวใจในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โดยกลไกผ่านทางลดการเกิด lipid peroxidation และเพิ่ม anti-oxidant enzyme activity eugenol ในน้ำมันหอมระเหยน่าจะเป็นองค์ประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดและปกป้องหัวใจในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เบาหวานและไขมันในเลือดสูงจัดเป็นภาวะความผิดปกติในกลุ่มโรคที่เรียกว่า metabolic syndrome ปัจจุบันมีประชากรโลกเป็นโรคเบาหวานและไขมันในเลือดสูงเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง และนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่างๆที่สำคัญหลายอย่าง เช่น โรคหัวใจ ความดันเลือดสูง ไตวาย เป็นต้น (1,2) จึงทำให้ผู้เป็นโรคในกลุ่มนี้มักจะมีอัตราการตายสูง ประเทศไทยมีผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานและไขมันในเลือดสูงค่อนข้างมาก และส่วนมากเกิดกับคนในวัยทำงานตั้งแต่อายุ 30 ปีขึ้นไป ปัจจัยที่ทำให้มีจำนวนคนเป็นโรคเบาหวานและไขมันในเลือดสูงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ มาจากการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมกรรมการกินอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะคนไทยที่ใช้ชีวิตที่รีบเร่ง ไม่มีเวลาปรุงอาหารทานเอง นอกจากนั้นชีวิตประจำวันที่เร่งรีบและการใช้เวลาในการทำงานมาก ทำให้คนไทยหันไปนิยมบริโภคอาหารประเภทที่เรียกว่า fast food ซึ่งมักจะเป็นอาหารจานเดียวประเภทที่มีส่วนผสมของน้ำมันมาก ประกอบกับเวลาในการออกกำลังกายมีน้อย จึงทำให้โอกาสเกิดโรคไขมันในเลือดสูงและเบาหวานได้ง่ายขึ้น ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการศึกษาพบว่าจำนวนผู้ที่เป็นเบาหวานโดยเฉพาะประเภทไม่พึ่งพาอินซูลิน และโรคไขมันในเลือดสูงมีมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง (3,4) องค์การอนามัยโรคคาดว่าในปี 2010 จะมีจำนวนผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกถึง 240 ล้านคน โดยเฉพาะในแถบเอเชีย และแอฟริกา(5) ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานและไขมันในเลือดสูงจะใช้วิธีควบคุมอาหาร ออกกำลังกายและที่สำคัญคือการฉีดยา ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้จำนวนมากต้องฉีดยารักษาตลอดชีวิต ซึ่งจะทำให้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างมาก สำหรับประเทศไทยเหล่านี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งยาบางตัวโดยเฉพาะยาลดไขมันในเลือดจะมีราคาแพงมาก ทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณรายจ่ายของประเทศ นอกจากนั้นยาสังเคราะห์เหล่านี้จะมีผลข้างเคียงสำคัญที่ต้องระมัดระวัง เช่น ยาลดไขมัน เมื่อรับประทานติดต่อกันนานจะส่งผลทำลายตับ หรือยาลดน้ำตาลในเลือดก็ส่งผลให้เกิดอาการ hypoglycemic shock ได้ จากปัจจัยทั้งราคาและผลข้างเคียงดังกล่าวจึงทำให้ในปัจจุบันมีความสนใจในการนำสมุนไพรจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษามากขึ้น โดยเฉพาะองค์การอนามัยโลกได้ให้ความสำคัญและพยายามแนะนำให้หลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนาหันมาให้ความสนใจศึกษาประสิทธิภาพความปลอดภัยและผลในการใช้สมุนไพรรักษาโรค (6) สำหรับประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ และคนไทยก็มีความตื่นตัวหันมานิยมใช้สมุนไพรเพื่อการป้องกันและรักษาโรคมากขึ้น เนื่องจากสมุนไพรเป็นพืชจากธรรมชาติมีความปลอดภัยกว่าสารเคมีสังเคราะห์ อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่จะใช้ประโยชน์จากสมุนไพรในประเทศยังมีน้อย โดยเฉพาะงานวิจัยเพื่อหาองค์ประกอบหลักหรือสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรในการรักษาโรค เพื่อจะนำมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ขึ้นอีกทั้งปริมาณผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานหรือไขมันในเลือดสูงในคนไทยก็มีมากขึ้น และโรคทั้งสองนี้ก็เป็นโรคเรื้อรัง ผู้ป่วยต้องได้รับยาอย่างต่อเนื่อง ทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณชาติ และอาจได้รับผลกระทบจากผลข้างเคียงของยา ดังนั้นหากสามารถพัฒนางานงานวิจัย โดยเฉพาะการศึกษาหาองค์ประกอบหลักในสมุนไพรที่ออกฤทธิ์เพื่อใช้ทดแทนยาที่สังเคราะห์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ จะเป็นการช่วยลดงบประมาณของประเทศได้มาก อีกทั้งจะเป็นการสร้าง

องค์ความรู้และกระตุ้นงานวิจัยที่จะนำไปใช้เพื่อพัฒนางานวิจัยอย่างต่อเนื่องในการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรในประเทศเพื่อการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีของคนไทยต่อไป รวมทั้งสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรที่ปลูกพืชสมุนไพรด้วย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อศึกษาว่าสิ่งสำคัญสำคัญของใบกะเพราส่วนใดที่ออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด ในหนูที่เหนียวทำให้เป็นเบาหวาน และหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง

2.2 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสิ่งสำคัญของใบกะเพราในการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูที่เหนียวทำให้เป็นเบาหวานและหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง

2.3 ศึกษาว่าสิ่งสำคัญของใบกะเพราส่วนใดที่ออกฤทธิ์ในการปกป้องการทำงานของอวัยวะสำคัญ ในหนูเบาหวาน และหนูที่มีไขมันในเลือดสูง

3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในบรรดาสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศไทยนั้น กะเพราเป็นพืชสมุนไพรที่มีการปลูกแพร่หลาย ราคาถูกมีใช้ในการประกอบอาหาร และใช้ในทางยา ชื่อทางวิทยาศาสตร์ของกะเพรา คือ *Ocimum sanctum* Linn. ชื่อภาษาอังกฤษคือ Holy basil หรือ Sacred basil อยู่ในวงศ์ Labiatae มีชื่อตามท้องถิ่นของไทยหลายชื่อ ได้แก่ กอมก้อดง กอมก้อ กะเพราขาว กะเพราแดง ห่อกวอซู ห่อตูปลู อิมคิมหล่า เป็นต้น กะเพรา มี 3 สายพันธุ์ คือ กะเพราแดง กะเพราขาว และกะเพราลูกผสม ปลูกมากในประเทศไทยโดยนำมาใช้ประกอบอาหาร รูปที่ 1 แสดงลักษณะต้นกะเพรา เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูง 30-60 เซนติเมตร ทุกส่วนของกิ่งและใบมีขน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบเดี่ยว ลักษณะใบเป็นรูปไข่หรือไข่แกมรี หนา กว้าง 0.9-4.3 เซนติเมตร ยาว 1.5- 8.3 เซนติเมตร ปลายใบแหลมหรือมน โคนใบมีลักษณะสอบหรือมน ขอบใบเกือบเรียบถึงจักห่าง ๆ แผ่นใบด้านบนมีสีเขียวอ่อนถึงม่วงแดงทั้งใบ ส่วนด้านล่างมีเฉพาะสีเขียวหรือแดง ที่เส้นใบมีขน ขอบใบเป็นลอนคลื่น ดอกช่อออกที่ยอดหรือปลายกิ่ง บนช่อมีดอกเรียงเป็นชั้นๆคล้ายฉัตร ยาว 2.5-12 เซนติเมตร มีสีเขียว, สีเขียวแกมม่วงถึงม่วงทั้งช่อ กลีบเลี้ยง มี 5 กลีบ โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นหลอด มีขน กลีบด้านบนเป็นแผ่น คล้ายใบมี 1 หยัก ด้านล่าง มี 4 หยักแหลม กลีบดอก มี 5 กลีบ สีขาวถึงขาวแกมชมพูม่วง โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ส่วนปลายหลอดแยกเป็นปากบนและล่าง กลีบบนปลายแยกหยัก ปลายกลีบมน ส่วนกลีบปากล่างมีหยัก รูปคล้ายช้อนยาว ปลายมน หยักเล็กน้อย เกสรเพศผู้ มี 2 คู่ ยาวไม่เท่ากัน ก้านเกสรมีขนสีขาวที่โคน อับเรณูมีสีเหลือง เกสรเพศเมียมี 1 อัน ยอดเกสรปลายแยกสองแฉก รังไข่มี 4 อันติดกัน มีเกสรเพศเมียอยู่ตรงกลาง ผล มี 4 เมล็ด มีกลีบเลี้ยงแห้งหุ้ม เมล็ดมีขนาดเล็ก ยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร รูปกลมหรือแกมรี ผิวสีน้ำตาล มีรอยย่น



รูปที่ 1 แสดงภาพของต้นและใบกะเพรา

มีรายงานการศึกษาหลายฉบับพบว่ากะเพรามีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด และไขมันในเลือด เช่น การให้หนูเบาหวานกินอาหารผสมใบกะเพราผงแห้งเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลง รวมทั้งระดับไขมันต่างๆในเลือด ในตับ และไตก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (7) เช่นเดียวกัน สารสกัดจากกะเพราก็สามารถลดระดับน้ำตาลทั้งในหนูปกติและหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน (8-11) ทำนองเดียวกันการให้ใบกะเพราสดบดผสมอาหารแก่กระต่ายเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถลดระดับไขมันในเลือดได้ (12) และจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยเองก็พบว่า การให้ผงใบกะเพราแห้งผสมอาหารไม่ว่าจะให้ก่อนเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานหรือหลังจากเป็นเบาหวานแล้วก็ตาม สามารถช่วยให้ไขมันในเลือดชนิดต่างๆกลับเข้าสู่ภาวะปกติได้โดยระดับน้ำตาลในเลือดเปลี่ยนแปลงไม่มาก และยังช่วยลดความเสียหายของตับและไตในหนูเบาหวานทั้ง 2 ระยะดังกล่าวด้วย (13) งานวิจัยเมื่อเร็วๆนี้ยังพบด้วยว่าการให้สารสกัดจากกะเพราช่วยปกป้องการทำลายของตับจากการได้รับสารปรอทในหนู (14) หรือจากการทำลายโดยยาพาราเซตามอล (15) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากกะเพราหรือใบกะเพรา บดป้อนให้หนูทดลองมีฤทธิ์เพิ่มเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และลด lipid peroxidation ในหนูเบาหวานได้ (10,16-17).

จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่า กะเพราและสารสกัดจากกะเพรามีผลลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด รวมทั้งมีฤทธิ์ในการปกป้องการทำลาย ตับ หัวใจในภาวะต่างๆ อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเป็นการศึกษาจากในกะเพราสดผสมอาหารหรือสารสกัดจากกะเพราด้วยแอลกอฮอล์ โดยปกติในใบกะเพราจะมีองค์ประกอบทางเคมีหลายอย่าง การสกัดด้วยแอลกอฮอล์จะสกัดนำองค์ประกอบทางเคมีของกะเพราหลายๆองค์ประกอบออกมาโดยไม่ได้แยกเป็นกลุ่มของสาร และการสกัดด้วยแอลกอฮอล์จะได้สารในปริมาณแตกต่างกันไป โดยปกติในใบกะเพราจะมีองค์ประกอบทางเคมีหลายอย่าง การสกัดกะเพราด้วยแอลกอฮอล์ซึ่งได้องค์ประกอบทางเคมีออกมาหลายตัวทำให้ไม่ทราบว่าองค์ประกอบทางเคมีใดของใบกะเพราที่ออกฤทธิ์ในการลดน้ำตาลและไขมันในเลือด รวมทั้งยังไม่ทราบว่าองค์ประกอบใดออกฤทธิ์ในการปกป้องอวัยวะที่สำคัญ จึงน่าจะมีการศึกษาวิจัยขั้นต้นว่าองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มใดที่ออกฤทธิ์ในการลดน้ำตาลและไขมันในเลือดและปกป้องอวัยวะที่สำคัญในภาวะเบาหวานและภาวะมีไขมันในเลือดสูง เพื่อนำความรู้ที่ได้เป็นพื้นฐานที่จะไปสกัดแยกสารสำคัญในแต่ละกลุ่มในการทดสอบการออกฤทธิ์ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดต่อไป นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานผลการวิจัยการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ต่อการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด จึงน่าจะได้มีการศึกษากลไกเหล่านี้ด้วย

4. ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

การวิจัยจะแบ่งเป็น 7 ขั้นตอนดังนี้

- 4.1 การสกัดใบกะเพราเพื่อแยกสิ่งสกัดหยาบ (crude extract) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และแยกสกัดน้ำมันหอมระเหย จากนั้นจึงนำไปทดสอบฤทธิ์
- 4.2 การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูเบาหวาน
- 4.3 การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยต่อระดับไขมันในเลือดในหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง
- 4.4 การศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราในการปกป้องการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง
- 4.5 การศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราในการปกป้องการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูเบาหวาน
- 4.6 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหย ในการลดไขมันในเลือดในหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง
- 4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา ที่ให้ผลในการลดไขมันในเลือด และการปกป้องการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนียวให้เป็นเบาหวาน และหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง

4.1 การสกัดแยกสิ่งสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และแยกกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา

ใบกะเพราจะได้จากศูนย์สมุนไพรกระทรวงสาธารณสุข จากนั้นนำมาสกัดแยก โดยแบ่งการสกัดออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่

ก. การกลั่นน้ำมันหอมระเหย

นำใบกะเพราสด (*Ocimum sanctum* Linn.) ซึ่งน้ำหนักและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปกลั่นน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี hydrodistillation method คำนวณหาปริมาณร้อยละปริมาตรของน้ำมันต่อปริมาณตัวอย่าง (v/w) วิเคราะห์และหาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโดยฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) และนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

ข. การเตรียมสิ่งสกัดหยาบจากกะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.)

นำใบกะเพรามาอบให้แห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 เซลเซียสแล้วนำไปบดละเอียด จากนั้นชั่งน้ำหนักและนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้วิธี Sequential maceration โดยเลือกใช้ตัวทำ

ละลายที่มีระดับความเป็นขั้ว (polarity) ต่างกันจากน้อยไปหามาก เริ่มจาก hexane , ethyl acetate, ethanol, 70% ethanol และ น้ำ ตามลำดับความเป็นขั้วที่เพิ่มสูงขึ้น โดยทำการแช่หมัก ผงพืชเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นแยกตัวทำละลายออกจากผงพืช และทำการแช่หมักผงพืชต่อจน สกัดได้หมดจด แล้วนำไปผ่านกระบวนการการระเหยให้แห้งต่อไป

กากผงพืชที่เหลือจากการแช่หมักด้วย hexane นำมาผึ่งให้แห้งจนปราศจากตัวทำละลาย ก่อนที่จะนำไปทำการหมักต่อด้วยตัวทำละลายอื่นๆต่อ ได้แก่ ethyl acetate, ethanol, 70% ethanol และ น้ำ ตามลำดับความเป็นขั้วที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งก็จะทำให้ได้ crude extract จากตัวทำละลายต่างๆ

ก่อนจะนำไปป้อนหนูทดลองจะต้องนำสิ่งสกัดต่างๆเหล่านี้ไปทำให้อยู่ในรูปแบบยาเตรียม ชนิด suspension โดยใช้ tragacanth ยกเว้น สิ่งสกัดด้วยน้ำ ที่สามารถใช้น้ำละลายได้

ค. ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัยในขั้นแรกคือการสกัดน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดต่างๆจากตัวทำละลายต่างๆ ได้ปริมาณสารสกัดต่างๆโดยคำนวณจากใบกะเพราแห้ง 100 กรัม ดังนี้

น้ำมันหอมระเหย	1.83	มิลลิลิตร
สิ่งสกัดที่ได้จาก hexane	1.86	กรัม
สิ่งสกัดที่ได้จาก ethyl acetate	4.597	กรัม
สิ่งสกัดด้วย ethanol	7.21	กรัม
สิ่งสกัดด้วย 70 % ethanol	9.35	กรัม
สิ่งสกัดด้วยน้ำ	14.39	กรัม

4.2 การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูเบาหวาน

ก. การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูสายพันธุ์ Wistar เพศผู้จากสำนักสัตว์ทดลอง ต.ศ.ลาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล ให้อาหารและน้ำตามปกติ เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 มีแสงสว่างและความมืด 12 ชั่วโมงสลับกัน หนูจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน โดยนำหนูทดลอง น้ำหนัก 200-240 กรัม ฉีดด้วยยา streptozotocin (STZ) เข้าทางหน้าท้องในปริมาณ 70 mg/KgBW หลังจากฉีด STZ 2 วันแล้วถ้าระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร 1 คืนมากกว่า 200 mg/dl จึงจะนำมาทำการทดลองต่อไปโดยให้หรือไม่ให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพรา

ข. การทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 9 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 : หนูปกติที่มีอายุเท่ากับหนูเบาหวาน

- กลุ่มที่ 2 : หนูเบาหวานปกติที่ไม่ได้ให้กะเพรา แต่ให้สารละลาย tragacanth แทน นาน 3 สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมของหนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพรา
- กลุ่มที่ 3 : หนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกะเพรา
- กลุ่มที่ 4: หนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วย hexane
- กลุ่มที่ 5: หนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วย ethyl acetate
- กลุ่มที่ 6: หนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วย ethanol
- กลุ่มที่ 7: หนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วย 70% ethanol
- กลุ่มที่ 8: หนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ (aqueous extract)
- กลุ่มที่ 9 : หนูเบาหวานที่ได้รับ tolbutamide เพื่อเป็น positive control เปรียบเทียบ

ปริมาณสิ่งสกัดจากกะเพราที่ให้ในแต่ละกลุ่มจะคำนวณจากปริมาณสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆเทียบกับปริมาณที่ผู้วิจัยเคยศึกษาพบว่าสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้ (13) โดยจะให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ 3 สัปดาห์

ปริมาณน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพราที่ใช้ป้อนหนูเบาหวานมีปริมาณดังนี้

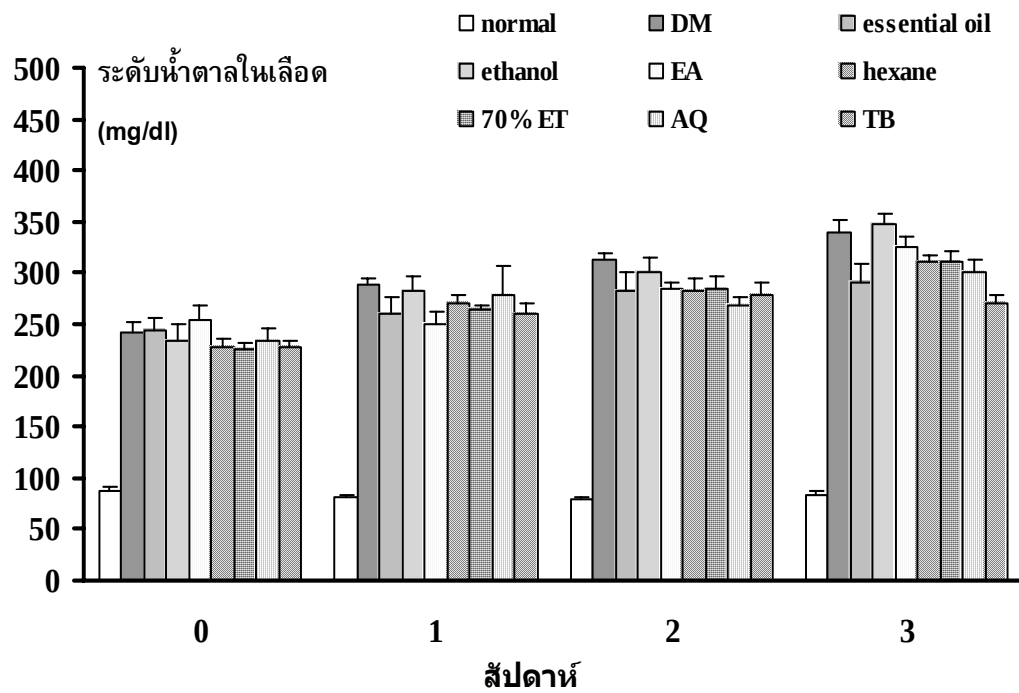
น้ำมันหอมระเหยป้อนปริมาณ	80	ml/Kg BW/day
สิ่งสกัดจาก hexane ป้อนปริมาณ	82.8	mg/Kg BW/day
สิ่งสกัดจาก ethyl acetate ป้อนปริมาณ	204.6	mg/Kg BW/day
สิ่งสกัดจาก ethanol ป้อนปริมาณ	362	mg/Kg BW/day
สิ่งสกัดจาก 70 % ethanol ป้อนปริมาณ	416	mg/Kg BW/day
สิ่งสกัดจาก น้ำ ป้อนปริมาณ	641	mg/Kg BW/day

ทุกสัปดาห์จะชั่งน้ำหนักหนู ปริมาณอาหาร และวัดระดับน้ำตาลในเลือด (fasting blood glucose, FBG) และเมื่อครบ 3 สัปดาห์ของการให้กะเพรา จะนำหนูทดลองมางดอาหาร 1 คืน จากนั้นสลบหนูด้วยการฉีดยาสลบ xylazine + zoltilil เปิดหน้าท้องเก็บเลือดจาก abdominal aorta นำไปปั่นแยกเอา serum เพื่อวิเคราะห์หาค่าไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol โดยใช้ชุดตรวจวัด (Kit) รวมทั้งศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการปกป้องอวัยวะต่างๆ โดยวิเคราะห์หาค่า serum aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) เพื่อวิเคราะห์หน้าที่ตับ และวิเคราะห์หาความเข้มข้น creatinine , BUN ใน serum เพื่อประเมินหน้าที่ของไต ตัดแยกตับ ไต หัวใจ ชั่งน้ำหนักด้วย

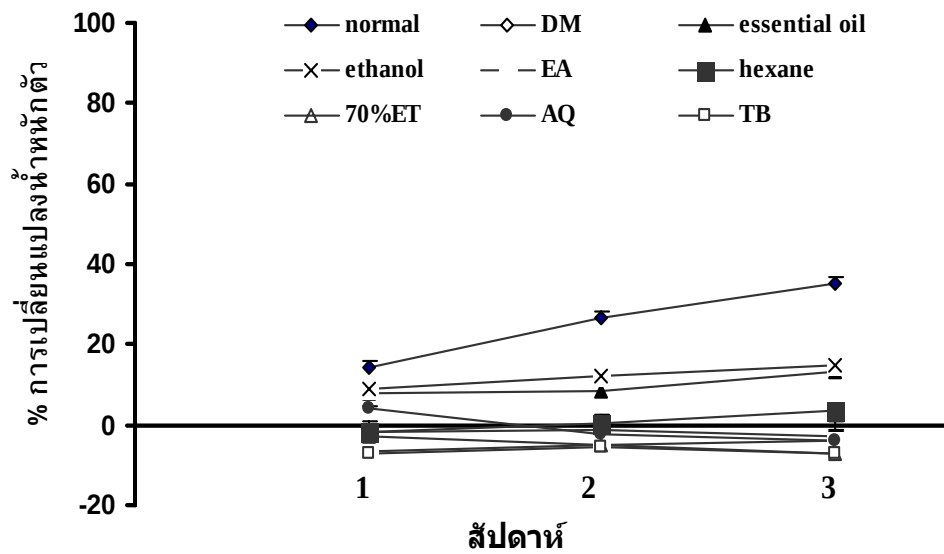
ค. ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า ระดับน้ำตาลในเลือด ในหนูเบาหวานจะสูงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอด 3 สัปดาห์ (รูปที่ 2) อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3) เมื่อให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพรา รวมทั้ง tolbutamide แก่หนูเบาหวาน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดไม่ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนให้สารสกัดต่างๆ หรือ tolbutamide (รูปที่ 2) แต่ถ้าเทียบระดับน้ำตาลในเลือดระหว่างหนูเบาหวานที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดกะเพราหรือ tolbutamide ในสัปดาห์เดียวกัน จะพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่ให้ tolbutamide หรือสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ หรือ 70% ethanol จะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารสกัดจากกะเพราอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 น้ำหนักตับ ไต ของหนูเบาหวานมีค่ามากกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ส่วนน้ำหนักหัวใจในหนูเบาหวานเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูปกติ ไม่มีความแตกต่างของน้ำหนักหัวใจหนูเบาหวานปกติและหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพรา ส่วนน้ำหนักตับ ไต ของหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพรายังคงสูงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับหนูปกติ

ตารางที่ 2 แสดงระดับไขมันในเลือด จะพบว่าทั้ง total cholesterol, LDL-cholesterol และ triglyceride สูงขึ้นขณะที่ HDL-cholesterol ลดลงในหนูเบาหวาน น้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพราสามารถลดระดับ total cholesterol และ LDL-cholesterol ส่วน HDL-cholesterol เพิ่มขึ้นในหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพรา ยกเว้นหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดใบกะเพราที่สกัดด้วยน้ำและ 70% ethanol สำหรับระดับ triglyceride ที่สูงในหนูเบาหวานสามารถลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในหนูเบาหวานที่ป้อนด้วยน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดใบกะเพราที่สกัดจาก hexane หรือ ethyl acetate จากผลการศึกษาจะเห็นว่าสิ่งสกัดใบกะเพราที่สกัดจาก hexane จะมีผลในการลดไขมันที่สูงในเลือดของหนูเบาหวานได้มากที่สุดทั้ง total cholesterol และ triglyceride และเพิ่ม HDL-cholesterol และได้ผลดีกว่า tolbutamide



รูปที่ 2 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือด ในหนูปกติและหนูเบาหวาน ที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพราหรือ tolbutamide นาน 3 สัปดาห์ (EA =ethyl acetate, 70% ET = 70% ethanol, AQ= aqueous หรือสารสกัดด้วยน้ำ, TB= tolbutamide)



รูปที่ 3 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ในหนูปกติและหนูเบาหวานที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพราหรือ tolbutamide นาน 3 สัปดาห์

(EA =ethyl acetate, 70% ET = 70% ethanol, AQ= aqueous หรือสารสกัดด้วยน้ำ, TB= tolbutamide)

ตารางที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักตับ ไต และหัวใจ ในหนูปกติและหนูเบาหวานที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในสัปดาห์สุดท้าย

กลุ่ม	น้ำหนักตัว (กรัม)	น้ำหนักตับ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)	น้ำหนักไต (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)	น้ำหนักหัวใจ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)
กลุ่มปกติ	318 ± 4	30 ± 0.8	6.37 ± 0.09	3.98 ± 0.09
กลุ่มเบาหวาน	205 ± 8***	48 ± 0.9***	12.4 ± 0.9***	3.96 ± 0.08
น้ำมันหอมระเหย	194 ± 6	49 ± 0.6	11.9 ± 0.3	3.97 ± 0.12
สารสกัดด้วย hexane	200 ± 6	48 ± 0.6	12.0 ± 0.3	4.2 ± 0.15
สารสกัดด้วย ethyl acetate	191 ± 11	48 ± 1.6	12.8 ± 0.5	4.16 ± 0.18
สารสกัดด้วย ethanol	217 ± 6	48 ± 1.5	11.9 ± 0.3	3.96 ± 0.07
สารสกัด 70% ethanol	199 ± 6	48 ± 1	11.9 ± 0.4	3.68 ± 0.12
สารสกัดด้วยน้ำ	184 ± 6	50 ± 1	12.2 ± 0.4	3.72 ± 0.09
Tolbutamide	193 ± 5	49 ± 1.3	11.8 ± 0.4	3.83 ± 0.07

*** P< 0.001 เทียบกับหนูปกติ

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือดในหนูเบาหวานที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

กลุ่ม	Total cholesterol	Triglyceride	HDL-C	LDL-C
กลุ่มปกติ	49 ± 1	47 ± 4	35 ± 2	4.2 ± 2.7
กลุ่มเบาหวาน	168 ± 17***	305 ± 47***	21 ± 1***	86 ± 10***
น้ำมันหอมระเหย	75 ± 5 ^{###}	139 ± 25 ^{##}	28 ± 2 [#]	19 ± 5 ^{###}
สารสกัดด้วย hexane	62 ± 5.6 ^{###}	82 ± 10 ^{###}	30 ± 2 [#]	16 ± 4 ^{###}
สารสกัดด้วย ethyl acetate	80 ± 4 ^{###}	153 ± 14 [#]	30 ± 2 [#]	20 ± 3 ^{###}
สารสกัดด้วย ethanol	79 ± 5.5 ^{###}	199 ± 21	33 ± 2 ^{##}	5 ± 2 ^{###}
สารสกัด 70% ethanol	113 ± 5.5 ^{###}	300 ± 44	34 ± 2	18 ± 5 ^{###}
สารสกัดด้วยน้ำ	80 ± 5 ^{###}	234 ± 48	25 ± 2	8 ± 6 ^{###}
Tolbutamide	88 ± 6 ^{###}	199 ± 24	32 ± 2 ^{##}	16 ± 5 ^{###}

*** P< 0.001 เทียบกับหนูปกติ

#, ##, ### P< 0.05, 0.01 และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูเบาหวานปกติ

เมื่อศึกษาผลกระทบของภาวะเบาหวานต่อการทำงานของอวัยวะทั้ง 3 ชนิด โดยวัดค่า enzyme ต่างๆ ใน serum จากการวัดค่า serum AST และ ALT เพื่อประเมินการทำงานของตับ พบว่าหนูเบาหวานมีค่าระดับเอนไซม์ทั้งสองตัวสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) จาก ระดับ 23 ± 2 และ 13 ± 1 U/L เป็น 154 ± 12 ($P < 0.001$) และ 57 ± 6 U/L ($P < 0.01$) ตามลำดับ แสดงว่ามีการทำลายหน้าที่ของตับในหนูเบาหวาน ผลการทดลองพบว่าเฉพาะสารสกัดกะเพรา ด้วยน้ำเท่านั้นที่สามารถลดระดับของเอนไซม์ทั้งสองลงมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังมีค่า สูงกว่าหนูปกติ สำหรับค่า serum creatinine และ BUN พบว่าทั้งสองค่าในหนูเบาหวานสูงกว่า หนูปกติอย่างมีนัยสำคัญแสดงว่ามีการทำลายหน้าที่ของไตในหนูเบาหวานด้วย แต่เมื่อให้สารสกัด กะเพราด้วย hexane หรือ ethanol หรือน้ำ พบว่าสามารถลดระดับสารทั้งสองตัวได้อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ส่วน tolbutamide สามารถลดระดับ creatinine ได้แต่ไม่มีผลลดระดับ BUN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองเบื้องต้นนี้เกี่ยวกับฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดที่สกัดจาก กะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ จะพบว่าไม่มีสิ่งสกัดใดที่ลดระดับน้ำตาลในหนูเบาหวานได้เมื่อเทียบ กับก่อนให้สิ่งสกัดที่สกัดจากกะเพรา ส่วนระดับไขมันในเลือดพบว่าสารสกัดกะเพราประเภทน้ำมัน เช่น น้ำมันหอมระเหย สารสกัดกะเพราด้วย hexane หรือ ethyl acetate จะลดไขมันทั้ง total cholesterol และ triglyceride และ LDL-cholesterol ได้ดีกว่าสารสกัดกะเพราจากตัวทำละลายอื่นๆ โดยสารสกัดจาก hexane จะให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหย ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ ให้ผลในการปกป้องการทำงานของตับและไตในหนูเบาหวานได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะนำ เฉพาะสารสกัดด้วย hexane ไปศึกษาต่อเกี่ยวกับกลไกการลดไขมันในเลือด และสารสกัดด้วยน้ำไป ศึกษาต่อเกี่ยวกับกลไกการปกป้องตับและไตต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine และ BUN ใน serum ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

กลุ่ม	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)
กลุ่มปกติ	23 ± 2	13 ± 1	0.92 ± 0.07	14.5 ± 0.5
กลุ่มเบาหวาน	154 ± 12***	57 ± 6**	2.18 ± 0.22***	25.2 ± 0.5***
น้ำมันหอมระเหย	142 ± 22	50 ± 10	1.61 ± 0.14	22.9 ± 1
สารสกัดด้วย hexane	103 ± 9	37 ± 3	1.27 ± 0.18 ^{##}	21.7 ± 1.2 [#]
สารสกัดด้วย ethyl acetate	122 ± 20	51 ± 6	1.39 ± 0.11 ^{##}	26.1 ± 0.9
สารสกัดด้วย ethanol	108 ± 13	36 ± 3	1.34 ± 0.12 ^{##}	20.1 ± 1.3 ^{##}
สารสกัด 70% ethanol	117 ± 13	62 ± 14	1.73 ± 0.17	26.4 ± 0.8
สารสกัดด้วยน้ำ	95 ± 13 [#]	30 ± 3 [#]	1.52 ± 0.11 [#]	21.0 ± 0.7 [#]
Tolbutamide	85 ± 11 [#]	35 ± 5	1.54 ± 0.14 [#]	22.7 ± 1.1

*** P< 0.001 เทียบกับหนูปกติ

#, ##, ### P< 0.05, 0.01 และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูเบาหวานปกติ

4.3 การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหย ในการลดไขมันในเลือดในหนูที่เหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

ก. การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 90-120 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลอง ต.ศาลายมหาวิทยาลัยมหิดล ให้อาหารและน้ำตามปกติ เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 มีแสงสว่างและความมืด 12 ชั่วโมงสลับกัน หนูจะถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงโดยการให้กินอาหารผสม 2.5 g% cholesterol เป็นเวลา 7 สัปดาห์ โดยใน 3 สัปดาห์สุดท้ายจะให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพราในปริมาณเช่นเดียวกับหนูเบาหวาน

ข. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 9 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 : หนูปกติที่มีอายุเท่ากับหนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

กลุ่มที่ 2 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ไม่ได้ให้กะเพรา เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมของหนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพรา

กลุ่มที่ 3 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกะเพรา

กลุ่มที่ 4: หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วย hexane

กลุ่มที่ 5: หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วย ethyl acetate

กลุ่มที่ 6: หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วย ethanol

กลุ่มที่ 7: หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วย 70% ethanol

กลุ่มที่ 8: หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดหยาบจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ (aqueous extract)

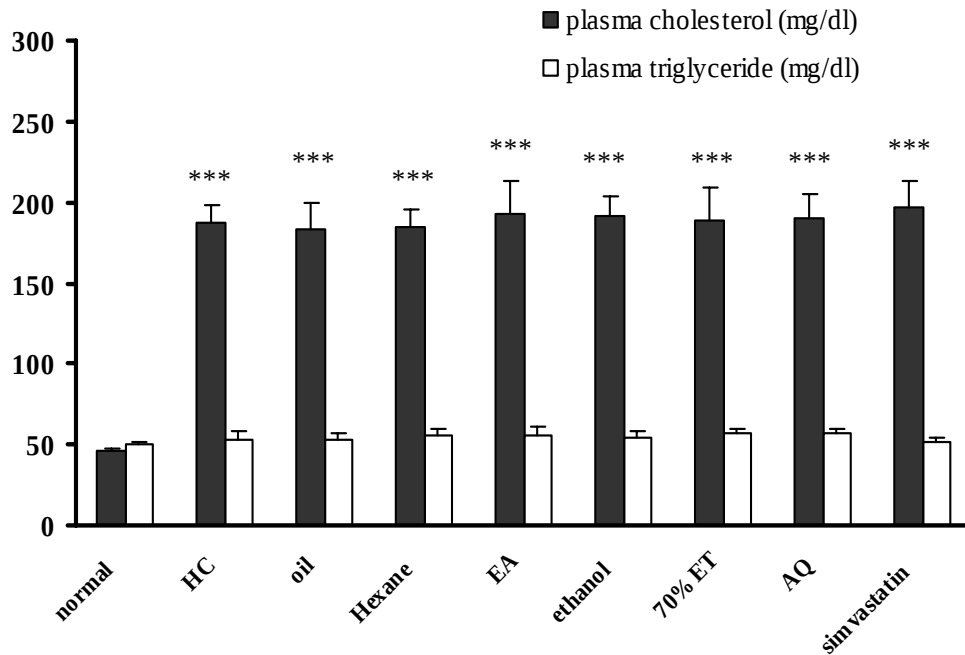
กลุ่มที่ 9 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับ simvastatin 40 mg/kgBW เพื่อเป็น positive control เปรียบเทียบ

ใน 4 สัปดาห์แรกหลังจากให้อาหารไขมันสูงจะทำการตรวจวิเคราะห์ไขมันในเลือด ได้แก่ triglyceride และ total cholesterol โดยใช้ชุดตรวจวัด (Kit) เพื่อการยืนยันว่าหนูทุกตัวมีไขมันใน

เลือดสูงแล้วก่อนการให้สิ่งสกัดกะเพรา หลังจากนั้นจึงให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพรานั้น 3 สัปดาห์ ตลอด 7 สัปดาห์จะชั่งน้ำหนักหนูและปริมาณอาหารที่กิน เมื่อครบ 3 สัปดาห์ของการให้กะเพรา จะนำหนูทดลองมางดอาหาร 1 คืน จากนั้นสลับหนูด้วยการฉีดยาสลับเปิดหน้าท้องเก็บเลือดจาก abdominal aorta นำไปปั่นแยกเอา serum เพื่อวิเคราะห์หาค่าไขมันในเลือด ได้แก่ triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol และ หาค่า atherogenic index รวมทั้งตัดแยกเอาหัวใจและตับ มาล้าง ซับให้แห้งและชั่งน้ำหนัก รวมทั้งดูผลเบื้องต้นว่าสารสกัดใดมีฤทธิ์การปกป้องอวัยวะสำคัญ ได้แก่ ตับและหัวใจ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกเฉพาะสารสกัดที่มีฤทธิ์ช่วยปกป้องหน้าที่การทำงานของอวัยวะดังกล่าวนำไปศึกษากลไกการช่วยปกป้องหน้าที่การทำงานของอวัยวะเหล่านั้นต่อไป โดยการทดลองจะวิเคราะห์หาค่า serum aspartate aminotransferase (AST) และ serum alanine aminotransferase (ALT) เพื่อวิเคราะห์หน้าที่ตับ และวิเคราะห์หาค่า creatine kinase MB sumunit (CK-MB) และ lactate dehydrogenase (LDH) ใน serum เพื่อประเมินการทำงานของหัวใจ

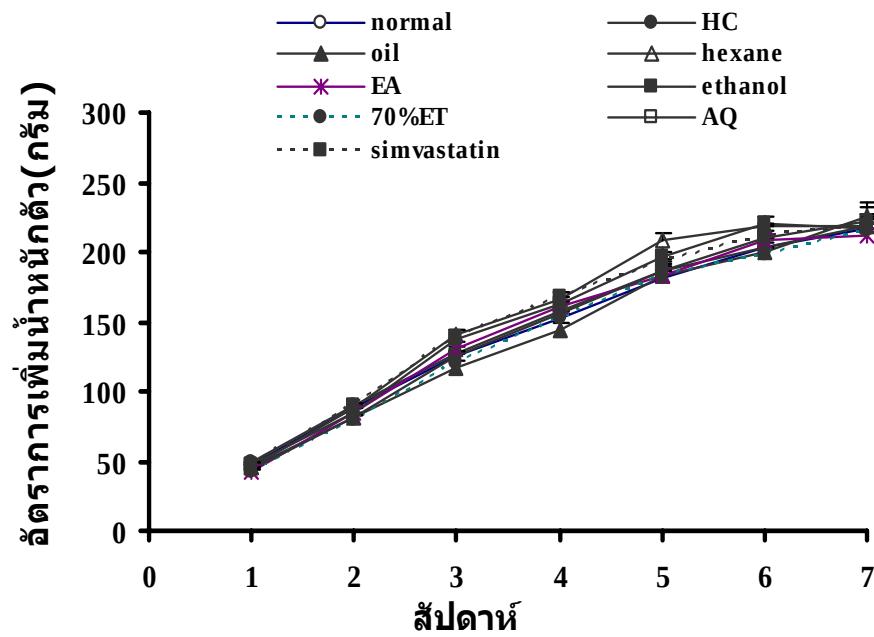
ค. ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า ใน 4 สัปดาห์แรกหลังจากให้อาหารไขมันสูง ระดับไขมันในเลือด ทั้ง triglyceride และ total cholesterol สูงขึ้นในหนูทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูง (รูปที่ 4) อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินในหนูทั้ง 9 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5 และ 6) เมื่อครบ 7 สัปดาห์พบว่า น้ำหนักตัวหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ระดับน้ำตาลในเลือดหนูเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จาก 69.00 ± 2.62 ในหนูปกติ เป็น 82.7 ± 3.52 ($P < 0.05$) ในหนูที่เหี่ยวนำไปมีไขมันในเลือดสูง ระดับน้ำตาลในเลือดยังคงไม่เปลี่ยนแปลงในหนูที่เหี่ยวนำไปมีไขมันในเลือดสูงและได้รับน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพรา น้ำหนักตับ ไต และ หัวใจในหนูทั้ง 9 กลุ่มแสดงในตารางที่ 4 พบว่าน้ำหนักตับของหนูที่เหี่ยวนำไปมีไขมันในเลือดสูงมีค่ามากกว่าหนูปกติประมาณ 2 เท่า ขณะที่น้ำหนักไตและหัวใจไม่มีความแตกต่างกัน การให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพราไม่มีผลต่อค่าน้ำหนักของอวัยวะทั้งสามในหนูที่เหี่ยวนำไปมีไขมันในเลือดสูง



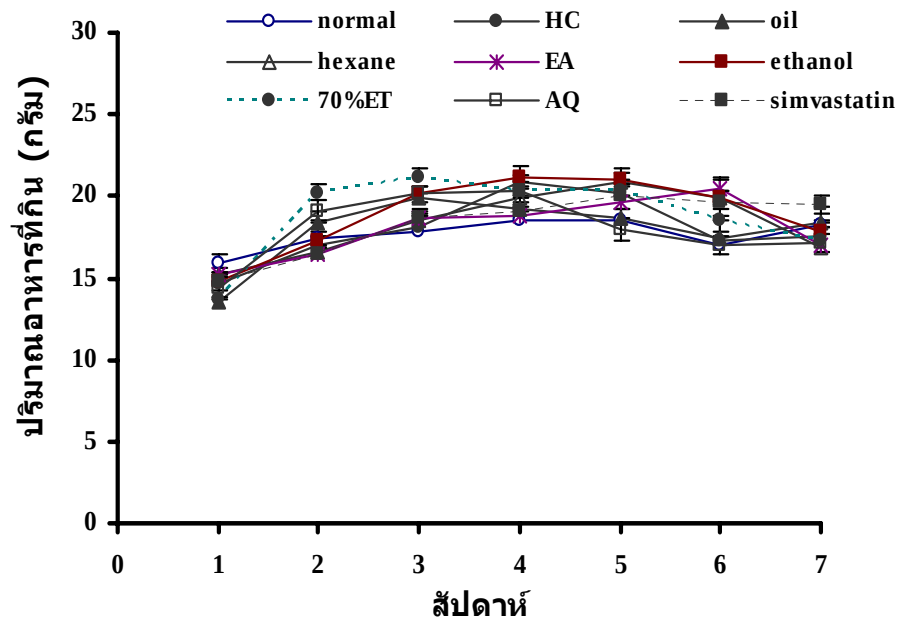
รูปที่ 4 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ total cholesterol และ triglyceride ใน plasma ของหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนได้รับสิ่งสกัดต่างๆจากใบกะเพรา หรือ simvastatin

*** $P < 0.001$ แสดงความแตกต่างเมื่อเทียบกับหนูปกติ (HC = high cholesterol หรือหนูที่ให้อาหารไขมันสูง, oil = essential oil, EA = ethyl acetate, 70% ET = 70% ethanol, AQ = aqueous หรือสารสกัดด้วยน้ำ)



รูปที่ 5 กราฟแสดงการเพิ่มของน้ำหนักตัวของหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงตลอด 7 สัปดาห์ โดยได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดต่างๆ จากใบกะเพราหรือ simvastatin

(HC = high cholesterol หรือหนูที่ให้อาหารไขมันสูง, oil = essential oil, EA =ethyl acetate, 70% ET = 70% ethanol, AQ= aqueous หรือสารสกัดด้วยน้ำ)



รูปที่ 6 กราฟแสดงปริมาณอาหารที่กินของหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงตลอด 7 สัปดาห์ โดยได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดต่างๆ จากใบกะเพราหรือ simvastatin

(HC = high cholesterol หรือหนูที่ให้อาหารไขมันสูง, oil = essential oil, EA =ethyl acetate, 70% ET = 70% ethanol, AQ= aqueous หรือสารสกัดด้วยน้ำ)

ตารางที่ 4. แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักตับ ไขมัน และหัวใจ ในหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ หรือ simvastatin เมื่อครบ 7 สัปดาห์

กลุ่ม	น้ำหนักตัว (กรัม)	น้ำหนักตับ (กรัม/กก.น้ำหนัก)	น้ำหนักไต (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)	น้ำหนักหัวใจ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)
กลุ่มปกติ	327 ± 8	29 ± 1	3.08 ± 0.05	6.18 ± 0.13
กลุ่มให้อาหารไขมันสูง	331 ± 7	59 ± 1***	3.44 ± 0.22	6.68 ± 0.15
น้ำมันหอมระเหย	327 ± 10	63 ± 1	3.13 ± 0.08	6.61 ± 0.09
สารสกัดด้วย hexane	338 ± 8	57 ± 1	3.17 ± 0.05	6.66 ± 0.16
สารสกัดด้วย ethyl acetate	321 ± 6	60 ± 2	3.17 ± 0.04	7.16 ± 0.18
สารสกัดด้วย ethanol	340 ± 7	57 ± 2	3.09 ± 0.07	6.69 ± 0.13
สารสกัด 70% ethanol	314 ± 4	60 ± 2	3.28 ± 0.06	6.82 ± 0.12
สารสกัดด้วยน้ำ	332 ± 9	59 ± 1	3.21 ± 0.04	6.63 ± 0.13
simvastatin	330 ± 9	60 ± 2	3.16 ± 0.06	6.98 ± 0.21

*** P< 0.001 เทียบกับหนูปกติ

สำหรับระดับไขมันใน serum ทั้ง total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol และ LDL-cholesterol แสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่า ระดับ total cholesterol ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง มีค่าเพิ่มขึ้นจากหนูปกติประมาณ 3 เท่า จากระดับ 42 ± 2 เป็น 136 ± 12 ($P < 0.001$) ระดับ total cholesterol ที่สูงนี้สามารถลดลงได้ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงที่ให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ยกเว้นสิ่งสกัดจากกะเพราด้วย ethyl acetate และ ethanol ที่ลดระดับ cholesterol ได้แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane นั้น พบว่าสามารถลดระดับ total cholesterol ได้มากเท่าเทียมกับความสามารถของ simvastatin ส่วนน้ำมันหอมระเหยนั้นให้ผลดีในระดับรองลงมาจากสิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane สำหรับระดับ triglyceride ใน serum ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีค่ามากกว่าหนูปกติเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) พบว่าเฉพาะส่วนสกัดจากกะเพราด้วย hexane เท่านั้นที่สามารถลดระดับ triglyceride ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (จาก 52 ± 4 เป็น 27 ± 2 mg/dl, $P < 0.01$) ส่วนน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจาก ethanol แม้จะลด triglyceride ได้แต่ระดับไม่แตกต่างจากหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (36 ± 3 และ 35 ± 3 mg/dl ตามลำดับ) ที่น่าสนใจคือ simvastatin ซึ่งเป็น positive control ในการทดลองสามารถลด total cholesterol แต่ไม่มีผลในการลด triglyceride

สำหรับ HDL-cholesterol ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง มีค่าต่ำกว่าหนูปกติแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (26 ± 0.6 และ 18 ± 0.9 mg/dl) น้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไม่มีผลต่อระดับ HDL-cholesterol ส่วน LDL-cholesterol พบว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีค่าสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากกะเพราให้ผลลดระดับ LDL-cholesterol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นสิ่งสกัดด้วย ethanol ที่ค่า LDL-Cholesterol ลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่า atherogenic index (AI) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงอัตราเสี่ยงในการเกิดภาวะแข็งตัวของหลอดเลือดพบว่าค่า AI สูงขึ้นจากหนูปกติ 0.63 ± 0.07 เป็น 6.54 ± 0.86 ($P < 0.001$) ค่า AI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ยกเว้นสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย ethanol ที่ค่า AI ลดแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าสังเกตคือ สิ่งสกัดใบกะเพราจาก hexane ให้ผลลดไขมันทั้ง cholesterol, triglyceride และ LDL-cholesterol รวมทั้ง AI ในขณะที่ simvastatin ไม่มีผลในการลด triglyceride นอกจากนั้นน้ำมันหอมระเหยยังให้ผลในลักษณะคล้ายกับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane แต่ฤทธิ์น้อยกว่าของสิ่งสกัดใบกะเพราจาก hexane ดังนั้นจึงจะได้มีการนำสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane ไปศึกษากลไกการลดไขมันในเลือดในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือดในหนูปกติและหนูที่ให้อาหารไขมันสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

กลุ่ม	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	AI
กลุ่มปกติ	42 ± 2	46 ± 4	26 ± 0.6	7.04 ± 1.40	0.63 ± 0.07
กลุ่มให้อาหารไขมันสูง	136 ± 12***	52 ± 4	18 ± 0.9	107 ± 10.1***	6.54 ± 0.86***
น้ำมันหอมระเหย	94 ± 3 [#]	36 ± 3	22 ± 1.7	65.1 ± 3.9 ^{###}	3.48 ± 0.35 ^{###}
สารสกัดด้วย hexane	90 ± 7 ^{###}	27 ± 2 ^{##}	20 ± 1.7	65.1 ± 5.8 ^{###}	3.65 ± 0.35 ^{##}
สารสกัดด้วย ethyl acetate	111 ± 7	42 ± 3	26 ± 3.3	76.9 ± 6.3 [#]	3.69 ± 0.51 ^{##}
สารสกัดด้วย ethanol	112 ± 6	35 ± 3	20 ± 1.4	85.5 ± 5.1	4.78 ± 0.25
สารสกัด 70% ethanol	107 ± 6 [#]	53 ± 6	25 ± 2.8	71.4 ± 5.7 ^{##}	3.65 ± 0.47 ^{##}
สารสกัดด้วยน้ำ	93 ± 4 ^{##}	49 ± 7	18 ± 1.7	64.9 ± 4.1 ^{###}	4.33 ± 0.48 ^{##}
simvastatin	90 ± 6 ^{###}	49 ± 6	23 ± 1.5	57.4 ± 4.2 ^{###}	2.93 ± 0.21 ^{###}

*** P< 0.001 เทียบกับหนูปกติ

#, ##, ### P< 0.05, 0.01 และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูที่ให้อาหารไขมันสูง

AI, atherogenic index

นอกจากศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหย และสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยตัวทำลายต่าง ๆ ต่อระดับไขมันในเลือดในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงแล้ว ยังศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการปกป้องตับ และหัวใจ เนื่องจากอวัยวะทั้งสองมีความเสี่ยงสูงที่จะถูกทำลายในภาวะไขมันในเลือดสูง จากการทดลองพบว่าค่า ALT และ AST ใน serum ซึ่งบ่งบอกการทำลายตับนั้น ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีค่าทั้งสองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จาก 43 ± 4 เป็น 131 ± 12 U/L ($P < 0.01$) และ 63 ± 5 เป็น 162 ± 8 U/L ($P < 0.01$) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เฉพาะสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำเท่านั้นที่สามารถลดระดับ serum AST และ ALT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (66 ± 12 และ 96 ± 12 U/L, $P < 0.05$) ส่วนสิ่งสกัดกะเพราด้วย 70% ethanol ลดค่า serum AST และ ALT ได้บ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า serum LDH และ CK-MB ซึ่งบ่งบอกการทำลายของหัวใจนั้นมีค่าสูงจากระดับ 559 ± 66 และ 527 ± 31 U/L ในหนูปกติเป็นระดับ 1151 ± 139 และ 726 ± 36 U/L ตามลำดับ ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำให้ผลลดเอ็นไซม์ทั้งสองตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ simvastatin ไม่มีผลลด serum AST, ALT, LDH และ CK-MB ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรามีฤทธิ์ช่วยปกป้องหัวใจ ในขณะที่สิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการปกป้องตับและหัวใจในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง จึงจะได้ศึกษากลไกการปกป้องตับ และหัวใจในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงต่อไป โดยจะศึกษาเฉพาะน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำ

4.4 การศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราในการปกป้องการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง

จากผลการทดลองในข้อ 4.3 พบว่าสิ่งสกัดจากใบกะเพราที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ช่วยลดการทำลายตับและหัวใจ ส่วนน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ช่วยลดการทำลายหัวใจในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง ทีมวิจัยจึงเลือกทำการศึกษากลไกที่สิ่งสกัดจากใบกะเพราที่สกัดด้วยน้ำและน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ช่วยลดการทำลายตับและหัวใจ โดยวิเคราะห์หาค่าไขมันในเลือด และวิเคราะห์หาค่า serum AST, ALT, CK-MB และ LDH เพื่อประเมินการทำงานของตับและหัวใจก่อน และหาค่า lipid peroxide รวมทั้ง anti-oxidant enzyme ต่าง ๆ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPT) ในตับและหัวใจ

ก. การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 90-120 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลอง ต.สาละยวมหาวิทยาลัยมหิดล ให้อาหารและน้ำตามปกติ หนูจะถูกเหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงโดยการให้กินอาหารผสม 2.5 g% cholesterol เป็นเวลา 7 สัปดาห์ โดยใน 3

ตารางที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase MB subunit (CK-MB) ใน serum ในหนูปกติและหนูที่ให้อาหารไขมันสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสกัดกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

กลุ่ม	ALT	AST	LDH	CK-MB
กลุ่มปกติ	43 ± 4	63 ± 5	559 ± 66	527 ± 31
กลุ่มให้อาหารไขมันสูง	131 ± 12**	162 ± 8**	1151 ± 139*	726 ± 36*
น้ำมันหอมระเหย	124 ± 8	180 ± 19	508 ± 46 [#]	527 ± 28 [#]
สารสกัดด้วย hexane	123 ± 27	185 ± 26	894 ± 106	847 ± 57
สารสกัดด้วย ethyl acetate	98 ± 15	141 ± 12	994 ± 124	773 ± 71
สารสกัดด้วย ethanol	98 ± 19	96 ± 20	694 ± 69	719 ± 67
สารสกัด 70% ethanol	71 ± 16	108 ± 15	845 ± 90	763 ± 61
สารสกัดด้วยน้ำ	66 ± 12 [#]	96 ± 12 [#]	576 ± 59 ^{##}	497 ± 46 [#]
simvastatin	101 ± 11	121 ± 15	478 ± 42 ^{##}	530 ± 41

* P< 0.05 ** P< 0.01 เทียบกับหนูปกติ

#, ## P< 0.05 และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูที่ให้อาหารไขมันสูง

สัปดาห์สุดท้ายจะให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ ในปริมาณเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.3

ข. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 : หนูปกติที่มีอายุเท่ากับหนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

กลุ่มที่ 2 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ไม่ได้ให้กะเพรา

กลุ่มที่ 3 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกะเพรานั้น 3 สัปดาห์

กลุ่มที่ 4: หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ นาน 3 สัปดาห์

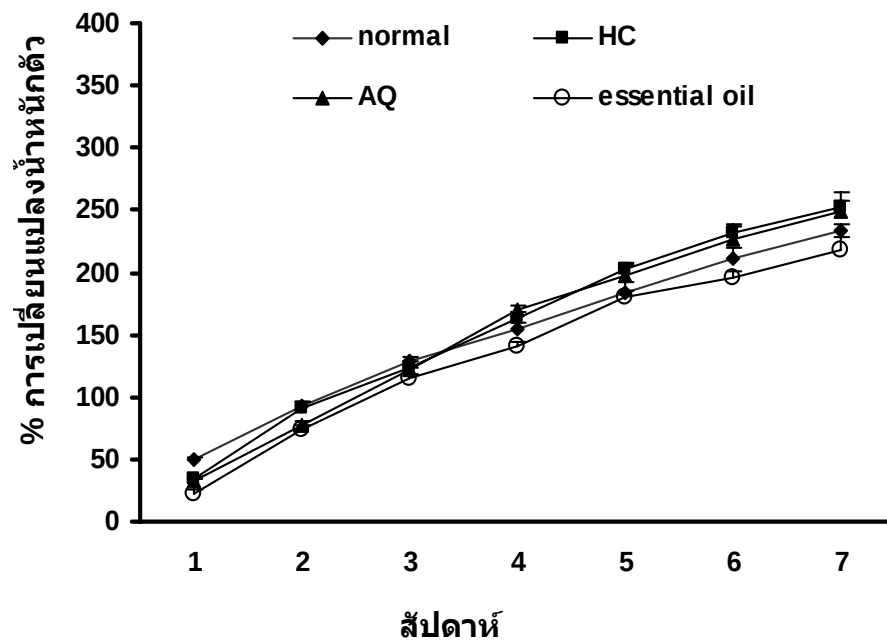
ตลอด 7 สัปดาห์จะชั่งน้ำหนักหนูและปริมาณอาหารที่กิน เมื่อครบ 3 สัปดาห์ของการให้กะเพรา จะนำหนูทดลองมางดอาหาร 1 คืน จากนั้นสลบหนูด้วยการฉีดยาสลบแล้วจึง canulate jugular vein และเปิดหน้าท้องเก็บเลือดจาก abdominal vein นำไปปั่นแยกเอา serum เพื่อวิเคราะห์หาค่าไขมันในเลือด ได้แก่ triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol และ หาค่า atherogenic index (AI) รวมทั้งวิเคราะห์หาค่า serum aspartate aminotransferase (AST) และ serum alanine aminotransferase (ALT) เพื่อวิเคราะห์การปกป้องหน้าที่ตับ และวิเคราะห์หาค่า creatine kinase MB subunit (CK-MB) และ lactate dehydrogenase (LDH) ใน serum เพื่อประเมินการปกป้องการทำงานของหัวใจ หลังจากการเก็บเลือดแล้วจะ infuse น้ำเกลือ 0.9 % NaCl ผ่านเข้า jugular vein เข้าสู่ตัวหนูทดลอง โดยให้เลือดไหลออกผ่านทาง abdominal vein การ infuse น้ำเกลือ 0.9 % NaCl จะทำต่อเนื่องจนกระทั่งอวัยวะต่างๆ ของหนูทดลองมีสีซีดจางหยุด จากนั้นตัดแยกเอาหัวใจและตับมาล้าง ซับให้แห้งและชั่งน้ำหนัก แล้วจึงนำตับและหัวใจไปบด ด้วย phosphate buffer pH 7.4 หาค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในรูปของ malondialdehyde (MDA) โดยวิธีของ Ohgawa และคณะ (18) เพื่อประเมินการเกิด lipid peroxidation นอกจากนั้นนำตับและหัวใจไปบดใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 แล้วนำไป centrifuged 3,000 rpm, 4°C นาน 10 นาที นำ supernatant ไป centrifuged ต่อที่ 7,800 g, 4°C นาน 30 นาที นำ supernatant ไป centrifuged ต่อที่ 136,000 g , 4°C 60 นาที นำ supernatant ไปวิเคราะห์ และหาค่า antioxidant enzyme activity ได้แก่ glutathione peroxidase (GPx) โดยวิธีของ Tappel (19), superoxide dismutase (SOD) โดยวิธีของ Winterbourn และคณะ (20) และ catalase (CAT) โดยวิธีของ Luck (21) วิเคราะห์หา protein โดยวิธี Lowry (22) นอกจากนั้นยังนำเนื้อเยื่อทั้งตับและหัวใจไปตรวจดูพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อทั้งสองด้วย โดยหลังจากล้าง ตับ และ ไตแล้ว ซับให้

แห้ง นำชิ้นเนื้อแช่ใน 10% phosphate formalin ก่อนจะนำไปทำกระบวนการตัดและย้อมชิ้นเนื้อต่อไป (23)

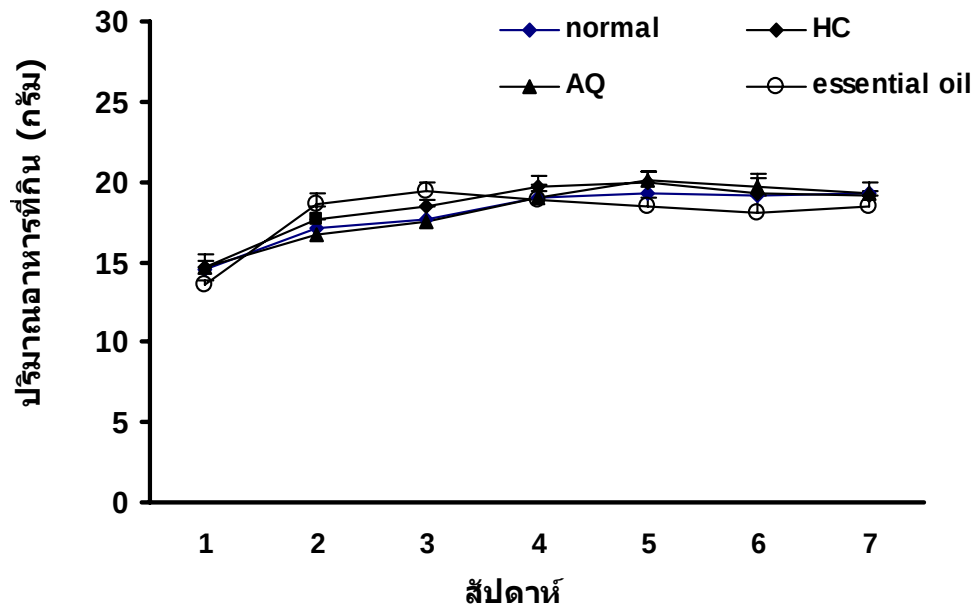
ค. ผลการทดลอง

รูปที่ 7 และ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวหนูที่เพิ่มขึ้นและปริมาณอาหารที่กินตลอด 7 สัปดาห์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างในหนูทั้ง 4 กลุ่ม น้ำหนักตัวในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 32.5 ± 0.6 เป็น 62.2 ± 1.5 g/kg BW ($P < 0.001$) (ตารางที่ 7) สารสกัดกะเพราด้วยน้ำ และน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลช่วยลดน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ส่วนน้ำหนักหัวใจในหนูทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ระดับไขมันในเลือดของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง total cholesterol, triglyceride และ LDL-cholesterol และค่า AI แต่ลด HDL-cholesterol (ตารางที่ 7) สารสกัดกะเพราด้วยน้ำ และน้ำมันหอมระเหยสามารถลดระดับ total cholesterol, triglyceride และ LDL-cholesterol ใน serum และช่วยลดค่า AI ด้วย

เมื่อพิจารณาค่า serum ALT และ AST เพื่อประเมินการทำงานของตับ (ตารางที่ 8) พบว่าเฉพาะสารสกัดใบกะเพราด้วยน้ำสามารถลดระดับเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงได้ ส่วน LDH และ CK-MB ที่สูงใน serum ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงสามารถลดลงได้เมื่อได้รับสารสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ หรือน้ำมันหอมระเหย สำหรับการทดลองในส่วนของการเกิด lipid peroxidation และ antioxidant enzyme activity ในเนื้อเยื่อทั้งตับและหัวใจ (ตารางที่ 9) จะพบว่าค่า MDA ในตับและหัวใจของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพิ่มขึ้นอย่างมาก จากระดับ 0.88 ± 0.06 เป็น 1.38 ± 0.04 nmole/mg protein ($P < 0.001$) และจากระดับ 1.0 ± 0.05 เป็น 1.83 ± 0.06 nmole/mg protein ตามลำดับ ($P < 0.001$) แสดงว่าเกิด lipid peroxidation มากขึ้นทั้งในตับและหัวใจของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง สำหรับระดับ antioxidant enzyme activity (ตารางที่ 9) พบว่ามีการลดลงของทั้ง GPx, CAT และ SOD ในตับ จากระดับ 1.3 ± 0.06 เป็น 0.97 ± 0.02 μ mole /min/mg protein ($P < 0.05$) จากระดับ 360 ± 16.6 เป็น 275 ± 18 μ mole /min/mg protein ($P < 0.05$) และจากระดับ 103 ± 13.9 เป็น 40.1 ± 3.3 unit/mg protein ($P < 0.001$) ตามลำดับ เฉพาะสารสกัดกะเพราด้วยน้ำเท่านั้นที่สามารถเพิ่ม GPx และ CAT ส่วน SOD ยังคงอยู่ในระดับต่ำไม่ต่างจากหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงที่ไม่ได้รับใบกะเพรา ที่น่าสนใจคือในหัวใจนั้นทั้ง GPx, CAT และ SOD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับน้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดกะเพราด้วยน้ำ ซึ่งผลการทดลองในส่วนของการเกิด lipid peroxidation และ antioxidant enzyme activity สอดคล้องกับผลการทดลองเกี่ยวกับค่า serum AST, ALT, LDH และ CK-MB



รูปที่ 7 รูปแสดงการเพิ่มของน้ำหนักตัวของหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงตลอด 7 สัปดาห์ โดยได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัด จากใบกะเพราด้วยน้ำ (HC = high cholesterol หรือหนูที่ให้อาหารไขมันสูง, oil = essential oil, AQ= aqueous หรือสารสกัดใบกะเพราด้วยน้ำ)



รูปที่ 8 รูปแสดงปริมาณอาหารที่กินของหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงตลอด 7 สัปดาห์ โดยได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ (HC = high cholesterol หรือหนูที่ให้อาหารไขมันสูง, oil = essential oil, AQ= aqueous หรือสารสกัดใบกะเพราด้วยน้ำ)

ตารางที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก ตับ และหัวใจ และระดับไขมันในเลือดในหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัดกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ

	กลุ่ม			
	กลุ่มปกติ	กลุ่มให้อาหารไขมันสูง	สารสกัดด้วยน้ำ	น้ำมันหอมระเหย
น้ำหนักอวัยวะ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)				
ตับ	32.5 ± 0.6	62.2 ± 1.5***	63.1 ± 1.7	65.8 ± 1.5
หัวใจ	3.53 ± 0.1	3.33 ± 0.09	3.46 ± 0.12	3.30 ± 0.08
ไขมันในเลือด (mg/dl)				
Total cholesterol	38 ± 2	133 ± 5***	96 ± 9 ^{###}	112 ± 3 [#]
Triglyceride	25 ± 1	50 ± 7**	26 ± 4 ^{##}	26 ± 3 ^{##}
HDL-C	20 ± 0	17 ± 1	20 ± 1	22 ± 2 [#]
LDL-C	13 ± 1	105 ± 6***	71 ± 9 ^{##}	85 ± 2 ^{##}
AI	0.9 ± 0.1	6.9 ± 0.8***	4.0 ± 0.6 ^{##}	4.4 ± 0.4 ^{##}

**P<0.01, ** *P<0.001 เทียบกับหนูปกติ

#, ##, ### P< 0.05, 0.01 และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูที่ให้อาหารไขมันสูง

ตารางที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase MB subunit (CK-MB) ใน serum หนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือ สิ่งสกัดกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ

	กลุ่ม			
	กลุ่มปกติ	กลุ่มให้อาหารไขมันสูง	สารสกัดด้วยน้ำ	น้ำมันหอมระเหย
ALT (U/L)	25 ± 1	118 ± 17 **	61 ± 8 [#]	119 ± 36
AST (U/L)	67 ± 3	166 ± 14***	103 ± 5 [#]	183 ± 22
LDH (U/L)	530 ± 78	825 ± 86 *	380 ± 62 ^{##}	487 ± 51 [#]
CK-MB(U/L)	499 ± 56	685 ± 35*	421 ± 39 ^{##}	514 ± 40 [#]

*P<0.05, **P<0.01,***P<0.001 เทียบกับหนูปกติ

#, ## P< 0.05 และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูที่ให้อาหารไขมันสูง

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงระดับ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), และ superoxide dismutase (SOD). ในตับ และหัวใจของหนูปกติและหนูให้อาหารไขมันสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย หรือสิ่งสกัด เพราะที่สกัดด้วยน้ำ

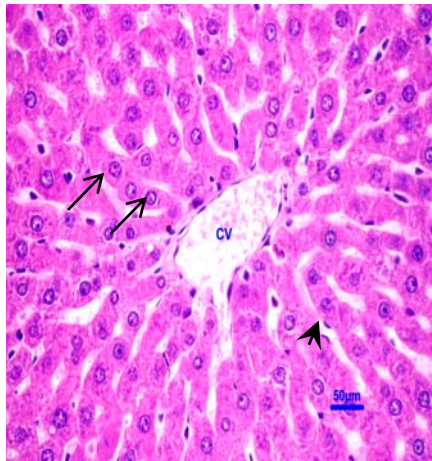
	กลุ่ม			
	กลุ่มปกติ	กลุ่มให้อาหารไขมันสูง	สารสกัดด้วยน้ำ	น้ำมันหอมระเหย
ตับ				
TBARS(nmole MDA/mg protein)	0.88 ± 0.06	1.38 ± 0.04***	0.59 ± 0.05 ###	0.67 ± 0.06 ###
GPx (μmole /min/mg protein)	1.3 ± 0.06	0.97 ± 0.02 *	1.19 ± 0.03 #	1.07 ± 0.09
CAT (μmole /min / mg protein)	360 ± 16.6	275 ± 18 *	340 ± 28 #	242 ± 15
SOD (unit /mg protein)	103 ± 13.9	40.1 ± 3.3***	54.4 ± 2.32	47.1 ± 5.17
หัวใจ				
TBARS(nmole MDA/mg protein)	1.0 ± 0.05	1.83 ± 0.05***	0.61 ± 0.07 ###	0.35 ± 0.03 ###
GPx (μmole /mg protein)	0.28 ± 0.02	0.20 ± 0.02*	0.30 ± 0.02 #	0.27 ± 0.03 #
CAT (μmole /min / mg protein)	6.95 ± 0.38	5.82 ± 0.31	7.33 ± 0.47 #	6.80 ± 0.49 #
SOD (unit /mg protein)	25.3 ± 2.1	14.3 ± 1.2*	82.8 ± 11.7 ###	61.4 ± 5.4 ###

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 เทียบกับหนูปกติ

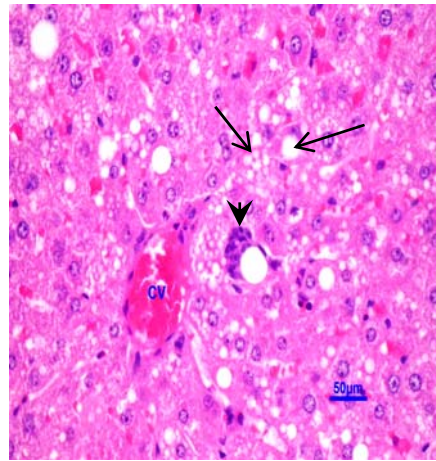
#, ##, ### P< 0.05 , 0.01 และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูที่ให้อาหารไขมันสูง

จากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อตับและหัวใจ เพื่อตรวจจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อทั้งสองในหนูที่ได้อาหารไขมันสูง แสดงในรูปที่ 9 และ 10 จะพบว่า hepatocyte ของหนูปกติจะมี nucleus กลมปกติดี endothelial cell รูปร่างปกติอยู่รอบ central vein (รูป 9A) สำหรับ hepatocyte ของหนูที่ได้อาหารไขมันสูง จะเห็นการทำลายทั่วไปมี vacuole กระจายไปทั่ว (รูป 9B) ส่วน hepatocyte ของหนูที่ได้อาหารไขมันสูงที่ได้รับสารสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ จะพบว่ามี การลดการทำลาย hepatocyte และมี vacuole น้อยลงอย่างมาก ลักษณะทั่วไปของเซลล์มีลักษณะใกล้เคียงกับของหนูปกติ (รูป 9C) ส่วน hepatocyte ของหนูที่ได้อาหารไขมันสูงที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยนั้น ยังคงมีลักษณะการทำลายคล้ายกับของหนูที่ได้อาหารไขมันสูง (รูป 9D) มี vacuole มี necrosis ของ cells ยังคงอยู่ ต่างจาก hepatocyte ของหนูที่ได้อาหารไขมันสูงที่ได้รับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำจะพบมีลักษณะใกล้เคียงกับของหนูปกติ ส่วนลักษณะของเนื้อเยื่อหัวใจแสดงในรูปที่ 10 จะเห็นว่า myocardial cells ของหนูปกติมี nucleus ลักษณะกลมหรืออยู่ตรงกลาง cells และ cytoplasm มีลักษณะ homogenous ส่วน myocardial cells ของหนูที่ได้อาหารไขมันสูงมีลักษณะถูกทำลายมี necrosis และทำลาย nucleus รวมทั้งเกิด apoptosis ของ myocardiocytes (รูป 10B) ส่วน myocardial cells ของหนูที่ได้อาหารไขมันสูงที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำจะมีลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกับหนูปกติ (รูป 10 C,D)

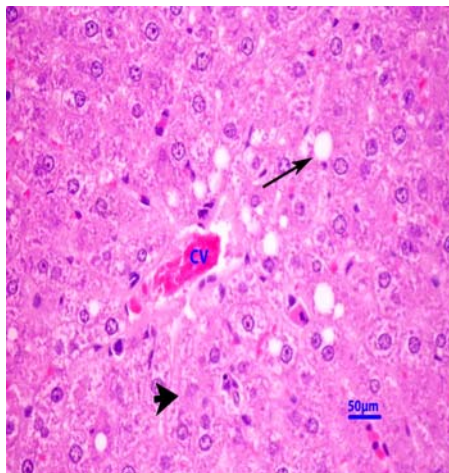
สรุปการทดลองในหัวข้อนี้คือ สารสกัดกะเพราด้วยน้ำ สามารถลดระดับไขมันในเลือดและอัตราเสี่ยงในการเกิดหลอดเลือดแข็ง และช่วยป้องกันการทำลายตับและหัวใจในหนูที่ได้อาหารไขมันสูงได้ โดยกลไกในการปกป้องตับและหัวใจนั้นจะผ่านการลดกระบวนการ lipid peroxidation และเพิ่ม antioxidant enzyme activity ต่างๆ ในอวัยวะทั้งสอง ส่วนน้ำมันหอมระเหยให้หนูที่ได้อาหารไขมันสูงจะลดระดับไขมันในเลือดและอัตราเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดแข็งตัวได้เช่นกัน ส่วนการป้องกันตับและหัวใจนั้น น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ป้องกันหัวใจเช่นเดียวกับสารสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการป้องกันตับในหนูที่ได้อาหารไขมันสูง



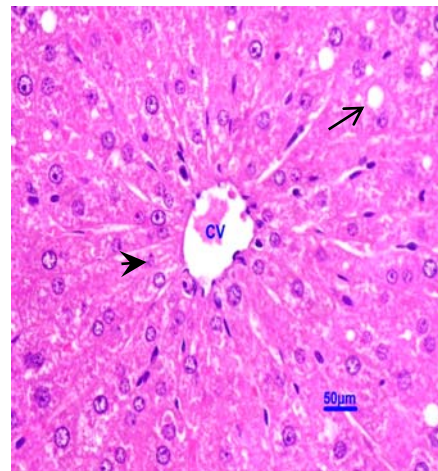
A



B

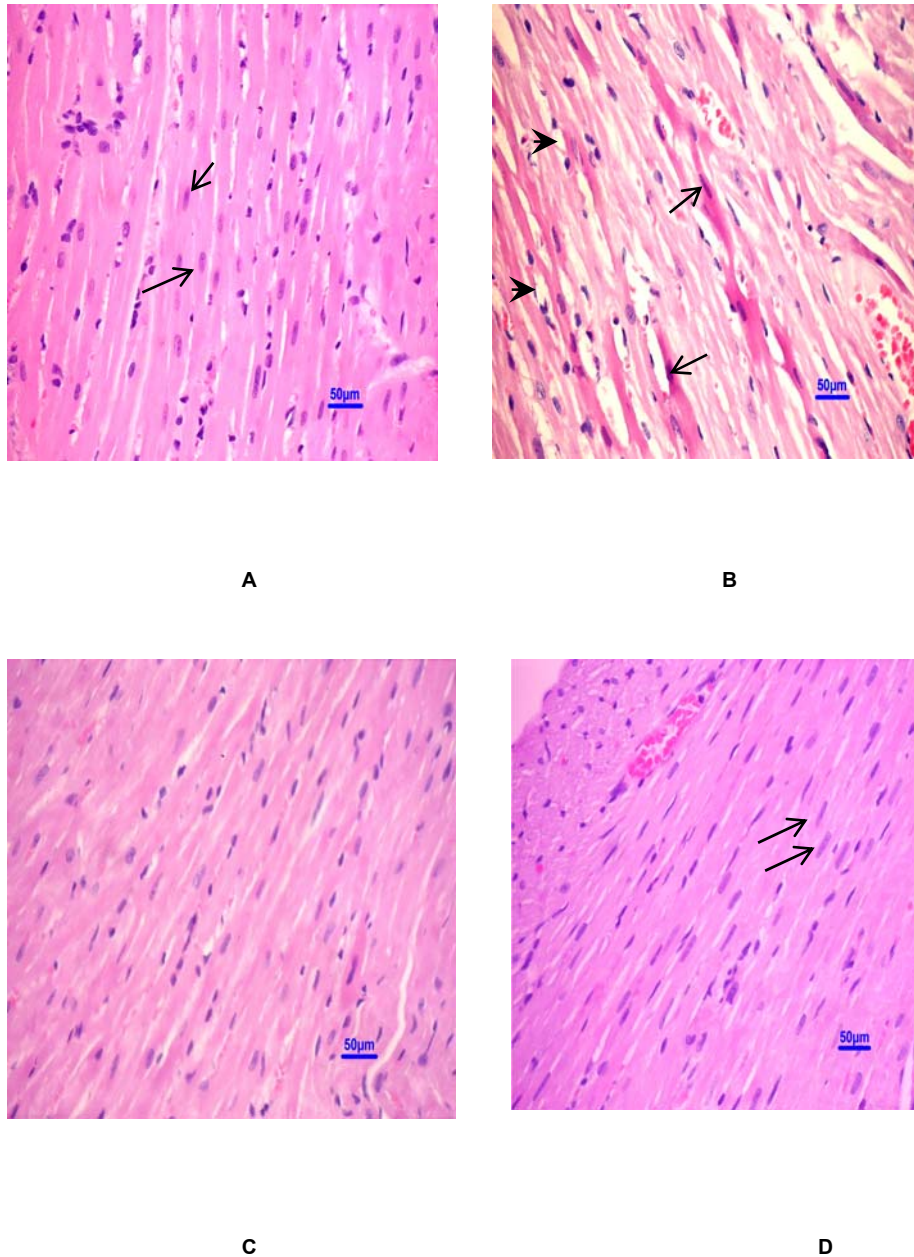


C



D

รูปที่ 9 แสดงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับหนู (H&Ex400) ของหนูปกติ (A) จะเห็น nucleus กลมตรงกลางของเซลล์ตับ (ลูกศร) และพบ flat endothelial cells เรียงตัวรอบๆ central vein (หัวลูกศร) เนื้อเยื่อตับหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง (B) จะพบการตายของเซลล์ตับและ fat vacuole (ลูกศร) และมี fibrosis เกิดเป็นจุดๆ (หัวลูกศร) ส่วนเนื้อเยื่อตับหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบกะเพรา (C) ยังพบ fat vacuole (ลูกศร) กระจายอยู่ และยังมีการการทำลายเซลล์ตับอยู่บ้างรอบๆ central vein (หัวลูกศร) สำหรับเนื้อเยื่อตับหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ (D) จะพบ fat vacuole (ลูกศร) น้อยลง มีการทำลายเซลล์ตับอยู่บ้างแต่น้อยกว่าเนื้อเยื่อตับหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงแต่ไม่ได้กะเพรา



รูปที่ 10 แสดงพยาธิสภาพของ myocardial cells (H&Ex400) ในหนูปกติ (A) จะเห็น nucleus รูปไข่ตรงกลางของเซลล์และ homogeneous cytoplasm (ลูกศร) ส่วน myocardial cells ของหนูที่เหนี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง (B) จะพบการตายของ myocardial cells (ลูกศร) และมี vacuole หลายแห่ง (หัวลูกศร) สำหรับ myocardial cells ของหนูที่เหนี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบกะเพรา (C) และ myocardial cells ของหนูที่เหนี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพรากับน้ำ (D) จะพบ ลักษณะทั่วไปของ myocardial cells ปกติ พบ nucleus รูปไข่ตรงกลางของเซลล์และ homogeneous cytoplasm (ลูกศร)

4.5 การศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราในการปกป้องการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูเบาหวาน

จากผลการทดลองเบื้องต้นในข้อ 4.2 พบว่าสิ่งสกัดจากใบกะเพราที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ช่วยลดการทำลายตับ และ ไต ในหนูเบาหวาน ดังนั้นจึงเลือกทำการศึกษากลไกที่สิ่งสกัดจากใบกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ ในการช่วยลดการทำลายตับ และ ไต และทำการศึกษาเพิ่มเติมว่ามีการทำลายหัวใจด้วยหรือไม่ในหนูเบาหวาน และเนื่องจากการที่หนูถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ในการทดลองข้อ 4.2 โดยการฉีด streptozotocin (STZ) เข้าทางหน้าท้องในปริมาณ 70 mg/KgBW อาจจะเป็นปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นปริมาณ β -cell ที่เหลือจากการทำลายโดย STZ อาจจะมีไม่มากพอที่จะผลิตอินซูลินในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ อีกทั้งแม้ว่าสิ่งสกัดจากใบกะเพราที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ช่วยปกป้องตับ และ ไต ในหนูเบาหวานได้ แต่ประสิทธิภาพก็ไม่มากนัก (จากผลการทดลองในข้อ 4.2) ดังนั้นจึงได้มีการลด ปริมาณ STZ ลงเหลือ 65 mg/KgBW ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในงานวิจัยต่างๆ เหตุผลที่ในช่วงแรกของการวิจัยใช้ STZ ในปริมาณสูงก็เพื่อต้องการเหนี่ยวนำหนูให้มีระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงคล้ายกับในคน เนื่องจากโดยส่วนมากนั้นกว่าคนเราจะรู้ว่าเป็นเบาหวานก็เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงมาก

ก. การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200-240 กรัม ฉีดด้วยยา streptozotocin (STZ) เข้าทางหน้าท้องในปริมาณ 65 mg/KgBW หลังจากฉีด STZ แล้วใน 1 สัปดาห์ ถ้าระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร 1 คืนมากกว่า 200 mg/dl จึงจะนำมาทำการทดลองต่อไป

ข. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 : หนูปกติที่มีอายุเท่ากับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

กลุ่มที่ 2 : หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและไม่ได้ให้กะเพรา เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับการป้องกันสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำ

กลุ่มที่ 3 : หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับการป้องกันสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ นาน 3 สัปดาห์

ตลอด 3 สัปดาห์จะชั่งน้ำหนักหนูและปริมาณอาหารที่กิน และวัดระดับน้ำตาลในเลือด (fasting blood glucose, FBG) เมื่อครบ 3 สัปดาห์ของการให้กะเพรา จะนำหนูทดลองมาอดอาหาร 1 คืน จากนั้นสลบหนูด้วยการฉีดยาสลบแล้ว canulate jugular vein และเปิดหน้าท้องเก็บเลือดจาก abdominal vein นำไปปั่นแยกเอา serum เพื่อวิเคราะห์หาค่าระดับน้ำตาลในเลือด และไขมันในเลือด ได้แก่ triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol รวมทั้ง

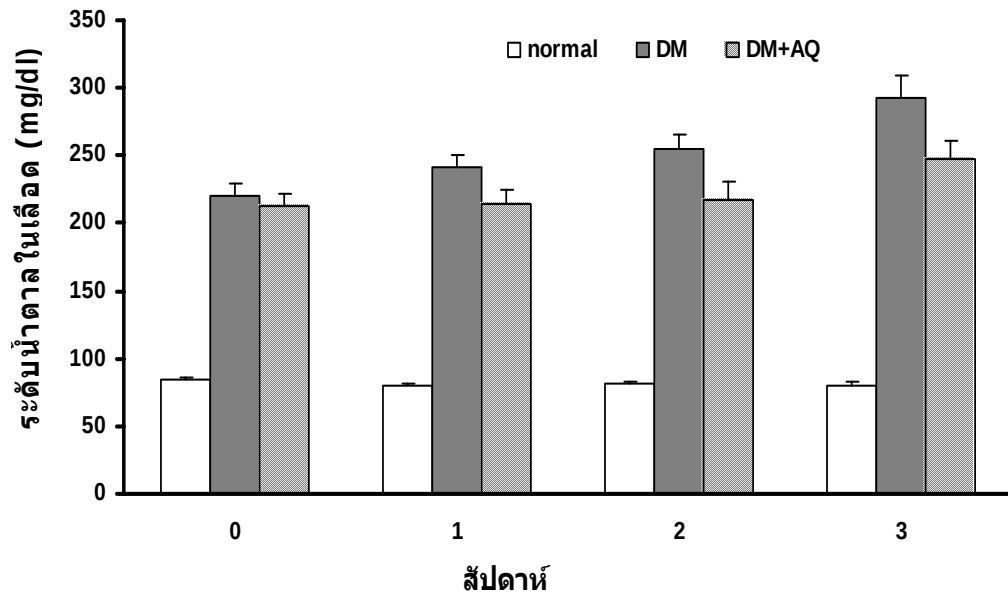
วิเคราะห์หาค่า serum aspartate aminotransferase (AST) และ serum alanine aminotransferase (ALT) เพื่อวิเคราะห์การปกป้องหน้าที่ตับ และวิเคราะห์หาค่า creatinine และ blood urea nitrogen (BUN) เพื่อประเมินการปกป้องการทำงานของไต และวัดค่า creatine kinase MB sumunit (CK-MB) และ lactate dehydrogenase (LDH) ใน serum เพื่อประเมินการปกป้องการทำงานของหัวใจ หลังจากการเก็บเลือดแล้วจะ infuse น้ำเกลือ 0.9 % NaCl ผ่านเข้า jugular vein เข้าสู่ตัวหนูทดลอง โดยให้เลือดไหลออกผ่านทาง abdominal vein การ infuse น้ำเกลือ 0.9 % NaCl จะทำต่อเนื่องจนกระทั่งอวัยวะต่างๆ ของหนูทดลองมีสีซีดจางหยุด จากนั้นตัดแยกเอาหัวใจและตับมาล้าง ซับให้แห้งและชั่งน้ำหนัก แล้วจึงนำตับ ไต และหัวใจ เพื่อวิเคราะห์หาค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในรูปของ malondialdehyde (MDA) เพื่อประเมินการเกิด lipid peroxidation และหาค่า antioxidant enzyme activity ได้แก่ glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) นอกจากนั้นยังนำเนื้อเยื่อทั้งตับ ไต และหัวใจไปตรวจดูพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อทั้งสามด้วย

ค. ผลการทดลอง

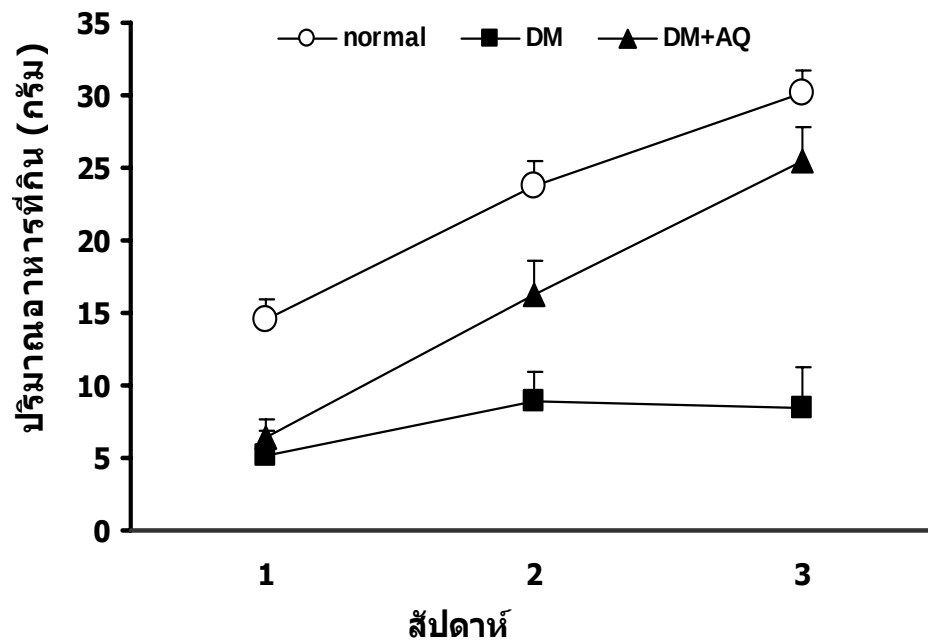
รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำ จะพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มอย่างต่อเนื่องตลอด 3 สัปดาห์ สิ่งสกัดจากกะเพราจากน้ำไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับก่อนให้สิ่งสกัดกะเพรา (สัปดาห์ 0) แต่ถ้าเทียบกับหนูเบาหวานในสัปดาห์เดียวกันจะพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราจะต่ำกว่าหนูเบาหวานปกติเล็กน้อย สำหรับอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวพบว่าหนูเบาหวานมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูปกติ แต่หนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำ พบว่ามีอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวมากกว่าหนูเบาหวานปกติอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 12) แต่ยังไม่พอกว่าหนูปกติ

น้ำหนักตับ และ ไต จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราจากน้ำ (ตารางที่ 10) เมื่อเทียบกับหนูปกติ ส่วนน้ำหนักหัวใจหนูเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูปกติและสามารถลดลงมาได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ จากข้อมูลในตารางที่ 10 จะเห็นว่าน้ำหนักตับและไตที่เพิ่มขึ้นของหนูเบาหวานสามารถลดลงมาได้เล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับสิ่งสกัดด้วยน้ำ

แม้ระดับน้ำตาลในเลือดหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำจะไม่ค่อยลดลงเมื่อเทียบกับก่อนให้สิ่งสกัดกะเพรา แต่ระดับไขมันในเลือดที่สูงสามารถลดลงได้ทั้ง total cholesterol, triglyceride และ LDL- cholesterol (ตารางที่ 11)



รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดหนูปกติ หนูเบาหวานที่ได้รับและไม่ได้รับ สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ (DM = diabetes mellitus หรือหนูเบาหวาน, AQ = aqueous หรือสารสกัดใบกะเพราด้วยน้ำ)



รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนูปกติ หนูเบาหวาน ที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ (DM = diabetes mellitus หรือหนูเบาหวาน, AQ = aqueous หรือสารสกัดใบกะเพราด้วยน้ำ)

ตารางที่ 10 น้ำหนักตับ ไต และหัวใจ ในหนูปกติ หนูเบาหวานและหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ

กลุ่ม	น้ำหนักตับ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)	น้ำหนักไต (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)	น้ำหนักหัวใจ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)
หนูปกติ	36.1 ± 1.3^a	6.5 ± 0.1^a	3.6 ± 0.2^a
หนูเบาหวาน	54.8 ± 2.5^b	14.3 ± 1.2^b	4.4 ± 0.2^b
หนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ	50.8 ± 1.9^b	11.9 ± 0.5^b	4.0 ± 0.1^a

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 11 แสดงระดับไขมันในเลือด (mg/dl) ในหนูปกติ หนูเบาหวานและหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ

กลุ่ม	Cholesterol	Triglyceride	HDL-C	LDL-C
หนูปกติ	52.7 ± 3.8 ^a	60.4 ± 6.5 ^a	18.7 ± 1.4 ^a	21.9 ± 2.4 ^a
หนูเบาหวาน	107.7 ± 9.5 ^b	215 ± 31 ^b	19.9 ± 1.8 ^a	44.8 ± 9.3 ^b
หนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ	71.1 ± 6.9 ^a	118.7 ± 19.5 ^a	21.2 ± 2.1 ^a	26.2 ± 3.7 ^a

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาว่าสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำสามารถช่วยปกป้องหรือลดการทำลาย ตับ ไต และหัวใจหรือไม่ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 12 จะเห็นว่าระดับ AST, ALT, LDH, CK-MB, creatinine และ BUN ใน serum ของหนูเบาหวานสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำสามารถช่วยลดระดับ enzyme ต่างๆดังกล่าวที่สูงในเลือดหนูเบาหวาน และเมื่อดูการเกิด lipid peroxidation และระดับ antioxidant enzyme activity ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจ จะพบว่าระดับของ MDA ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจของหนูเบาหวานสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13) จากระดับ 0.97 ± 0.04 เป็นระดับ 1.30 ± 0.05 ในตับ และจากระดับ 0.96 ± 0.02 เป็นระดับ 1.16 ± 0.03 ในไต และจากระดับ 0.70 ± 0.02 เป็นระดับ 0.96 ± 0.03 nmole /mg protein ในหัวใจ การให้สิ่งสกัดด้วยน้ำแก่หนูเบาหวานสามารถช่วยลดระดับ MDA ในเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับ GPx ในตับและไตลดลงขณะที่ในหัวใจไม่เปลี่ยนแปลงในหนูเบาหวาน สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำสามารถช่วยเพิ่ม GPx ในตับและไตสู่ภาวะปกติได้ ส่วน CAT ในตับหนูเบาหวานลดลงขณะที่ในไตไม่เปลี่ยนแปลง แต่ในหัวใจกลับมีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูปกติ สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำช่วยเพิ่ม CAT ในตับสู่ระดับปกติได้ แต่ไม่มีผลต่อ CAT ในไตและหัวใจ ระดับ SOD ในตับและไตลดลงในหนูเบาหวาน สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำไม่มีผลเปลี่ยนแปลง SOD ในตับและไตของหนูเบาหวาน ส่วน SOD ในหัวใจสามารถเพิ่มขึ้นได้อย่างมากในหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำ

เมื่อดูลักษณะภายนอกของ ตับ ไต และหัวใจ ของหนูเบาหวานจะพบว่าขนาดของตับและไต ใหญ่กว่าของหนูปกติ ผลการตรวจพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ตับ ไต และหัวใจ ของหนูเบาหวานที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำ แสดงในรูปที่ 13-15 จะพบว่าเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจ ของหนูเบาหวานจะมีลักษณะบวม มีร่องรอย hypertrophy ของเนื้อเยื่อหัวใจ ไตจะมีลักษณะ distal tubule degeneration โดยทั่วไปของเนื้อเยื่อของหนูเบาหวานยังไม่แสดง apoptosis ส่วนลักษณะเนื้อเยื่อของหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำโดยทั่วไปมีลักษณะปกติใกล้เคียงกับของหนูปกติ

จากการทดลองในรูปที่ 4.5 นี้สามารถสรุปได้ว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ 3 สัปดาห์ไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูเบาหวานได้ แต่สามารถลดไขมันในเลือดและช่วยป้องกันการทำลายของ ตับ ไต และหัวใจของหนูเบาหวานได้

ตารางที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase MB subunit (CK-MB), creatinine, BUN ใน serum ในหนูปกติ หนูเบาหวานและหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ

กลุ่ม	AST	ALT	LDH	CK-MB	creatinine	BUN
หนูปกติ	68±4 ^a	25±1 ^a	165±29 ^a	343±33 ^a	0.59±0.03 ^a	8.47±0.58 ^a
หนูเบาหวาน	155±34 ^b	77±14 ^b	361±49 ^b	495±36 ^b	0.86±0.08 ^b	15.57±0.88 ^b
หนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ	67±7 ^a	37±4 ^a	274±21 ^a	367±26 ^a	0.51±0.04 ^a	12.55±0.55 ^c

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

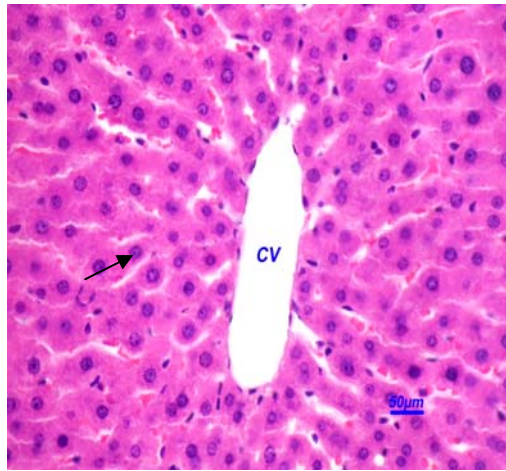
สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, nmole MDA/mg protein), glutathione peroxidase (GPx, μ mole/min/mg protein) และ superoxide dismutase (SOD, units/mg protein) ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจในหนูปกติ หนูเบาหวานและหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ

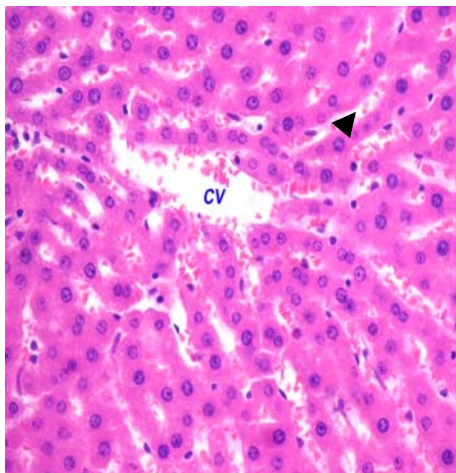
กลุ่ม	TBARS	GPx	CAT	SOD
<u>ตับ</u>				
หนูปกติ	0.97 ± 0.04^a	1.03 ± 0.06^a	$258 \pm 2a^a$	125 ± 17^a
หนูเบาหวาน	1.30 ± 0.05^b	0.64 ± 0.07^b	127 ± 15^b	48.6 ± 7.6^b
หนูเบาหวานที่ได้รับ สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ	1.10 ± 0.01^c	0.98 ± 0.03^a	227 ± 22^a	54.2 ± 7.5^b
<u>ไต</u>				
หนูปกติ	0.96 ± 0.02^a	1.03 ± 0.02^a	4.87 ± 0.42^a	58.8 ± 4.6^a
หนูเบาหวาน	1.16 ± 0.03^b	0.82 ± 0.07^b	4.60 ± 0.45^a	29.3 ± 4.7^b
หนูเบาหวานที่ได้รับ สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ	0.92 ± 0.04^a	1.11 ± 0.04^a	6.07 ± 0.89^a	27.4 ± 1.5^b
<u>หัวใจ</u>				
หนูปกติ	0.70 ± 0.02^a	0.28 ± 0.02^a	8.71 ± 0.95^a	36.9 ± 6.5^a
หนูเบาหวาน	0.96 ± 0.03^b	0.26 ± 0.01^a	21.2 ± 3.6^b	37.9 ± 4.7^a
หนูเบาหวานที่ได้รับ OS	0.85 ± 0.02^c	0.30 ± 0.02^a	20.2 ± 1.4^b	60.5 ± 5.6^c
สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ				

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

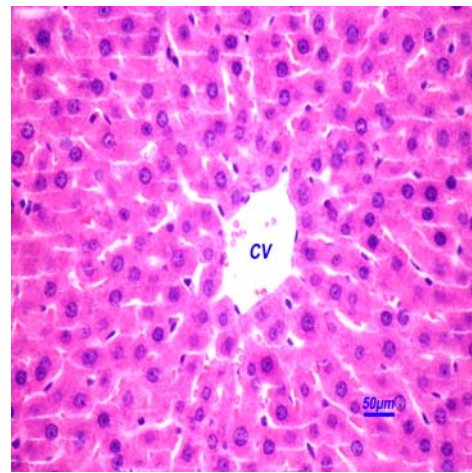
สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ



A

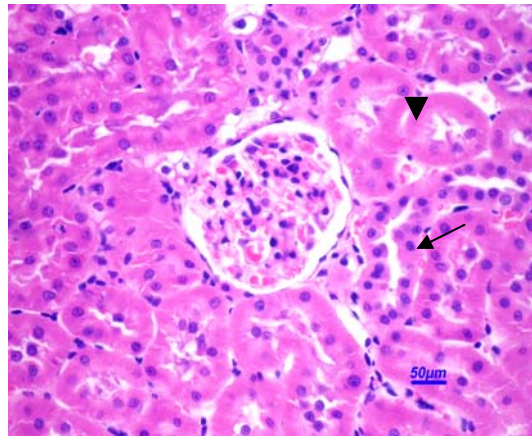


B

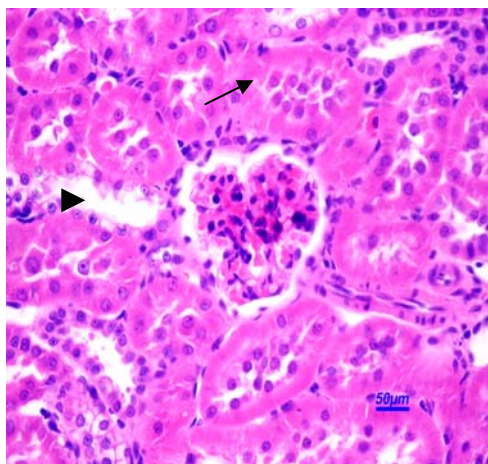


C

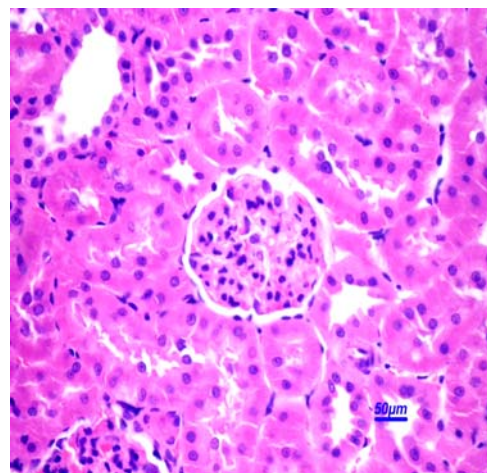
รูปที่ 13 แสดงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับหนู (H&Ex400) ของหนูปกติ จะเห็น nucleus กลมตรงกลางของเซลล์ตับ (ลูกศร) (A) เนื้อเยื่อตับหนูที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวาน ลักษณะของเนื้อเยื่อตับมี sinusoid dilate (หัวลูกศร) แต่ไม่มี apoptosis (B) เนื้อเยื่อตับหนูที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวานและได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ (C) มีลักษณะทั่วไปใกล้เคียงกับหนูปกติ



A

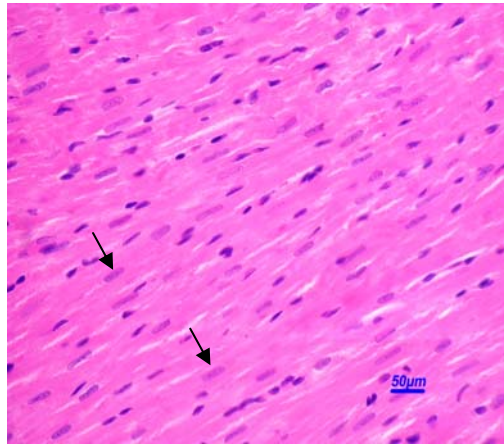


B

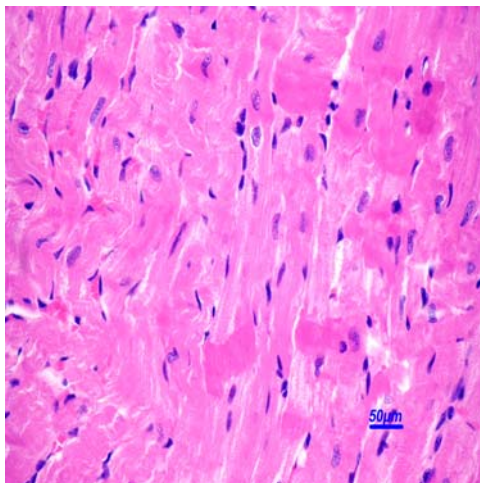


C

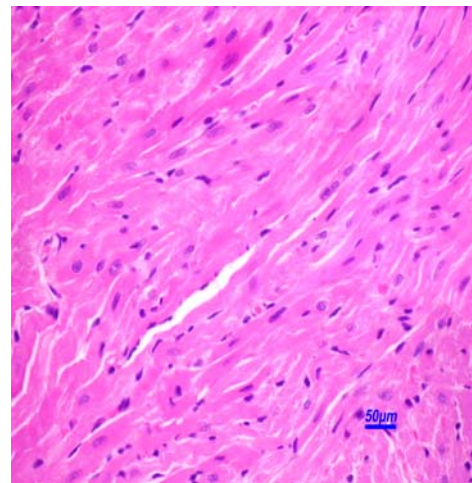
รูปที่ 14 แสดงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต (H&Ex400) ของหนูปกติ จะเห็นลักษณะของ proximal tubule (หัวลูกศร) และ distal convoluted tubule (ลูกศร) ปกติ (A) เนื้อเยื่อไตหนูที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวาน (B) ลักษณะคล้ายมี distal tubule degeneration (หัวลูกศร) ส่วนเนื้อเยื่อไตหนูที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวานและได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ (C) จะมีลักษณะทั่วไปใกล้เคียงกับหนูปกติ



A



B



C

รูปที่ 15 แสดงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อหัวใจ (H&Ex400) ของหนูปกติ จะพบ nucleus รูปไข่ ตรงกลางเซลล์ (A) ส่วนเนื้อเยื่อหัวใจของหนูที่เหนียวทำให้เป็นเบาหวาน จะพบลักษณะ hypertrophy (B) เนื้อเยื่อหัวใจหนูที่เหนียวทำให้เป็นเบาหวานและได้รับสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำ (C) จะมีลักษณะใกล้เคียงกับหนูปกติ

4.6 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหย ในการลดไขมันในเลือดในหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

ก. การเตรียมสัตว์ทดลอง

จะทำเหมือนในการทดลอง 4.2 ยกเว้นว่าการเหนียวนำให้หนูเป็นเบาหวานจะลด ปริมาณ STZ ลงเหลือ 65 mg/KgBW เช่นเดียวกับการทดลอง 4.5

ข. วิธีการทดลอง

เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาในข้อ 4.2 และ 4.3 ที่พบว่าสิ่งสกัดใบกะเพราด้วย hexane มีผลลดไขมันในเลือดได้ทั้ง total cholesterol และ triglyceride ดีที่สุด ทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง ดังนั้นที่มิวิจัยจึงเลือกเฉพาะสิ่งสกัดใบกะเพราด้วย hexane มาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด โดยการป้อนสิ่งสกัดใบกะเพราด้วย hexane และจะทำเหมือนในการทดลอง 4.2 และ 4.3

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 : หนูปกติที่มีอายุเท่ากับหนูที่ถูกเหนียวนำให้เป็นเบาหวาน

กลุ่มที่ 2 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้เป็นเบาหวานและไม่ได้ให้กะเพรา เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมของหนูที่ถูกเหนียวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพรา

กลุ่มที่ 3 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วย hexane นาน 3 สัปดาห์

กลุ่มที่ 4 : หนูปกติที่มีอายุเท่ากับหนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

กลุ่มที่ 5 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงและไม่ได้ให้กะเพรา เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมของหนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพรา

กลุ่มที่ 6 : หนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วย hexane

ทุกสัปดาห์จะชั่งน้ำหนักหนูและปริมาณอาหารที่กิน และวัดระดับน้ำตาลในเลือด (fasting blood glucose, FBG) สำหรับหนูเบาหวาน เมื่อครบ 3 สัปดาห์ของการให้กะเพรา จะนำหนูทดลองมาดอาหาร 1 คีน จากนั้นสลับหนูด้วยการฉีดยาสลับและทำการทดลอง ส่วนหนูที่ถูกเหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงนาน 7 สัปดาห์ โดยจะได้รับการป้อนสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วย hexane ในช่วง 3 สัปดาห์สุดท้าย

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด ถ้าหากกะเพราลดไขมันในเลือดได้ อาจจะมาจากการหลายกลไก เช่น มีการลดการสร้างไขมันในตับ เนื่องจากตับเป็นอวัยวะสำคัญในการสร้างไขมันเข้าสู่กระแสเลือดไปยังเนื้อเยื่อต่างๆเพื่อนำไปใช้ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงไขมันในเลือดและในตับจึงมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกัน หรือการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ lipoprotein lipase activity ในพลาสมา ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะสลาย triglyceride ใน chylomicron ในเลือด ให้ free fatty

acid เพื่อนำไปใช้สร้าง triglyceride ใน adipose tissue รวมทั้งการขับทิ้งไขมันในอุจจาระโดยตรงหรือขับทิ้งในรูป bile acids เป็นต้น ดังนั้นการศึกษากลไกการลดไขมันในเลือดจะแบ่งขั้นตอนเป็น 5 ข้อหลักๆ คือ

1 การวิเคราะห์หาค่า cholesterol และ triglyceride ในตับ โดยภายหลังสิ้นสุดการป้อนสิ่งสกัดใบกะเพราด้วย hexane ครบ 3 สัปดาห์แล้ว จะนำหนูทดลองมางดอาหาร 1 คืน จากนั้นสลับหนูด้วยการฉีดยาสลับ เปิดหน้าท้องเก็บเลือดจาก abdominal aorta นำไปปั่นแยกเอา serum เพื่อวิเคราะห์หาค่าระดับไขมันในเลือด ได้แก่ triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol จากนั้นแยกตับออกมาล้างซ้ำให้แห้ง แบ่งเนื้อตับมา 2 กรัมมาทำการสกัดไขมันจากตับโดยวิธีของ Folch และคณะ (24) โดย homogenize ตับ แล้วสกัดไขมันจากตับด้วยสารละลาย chloroform : methanol (2:1 V/V) จะมีการแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนของชั้นบนออก นำส่วนของสารละลายชั้นล่างซึ่งมีไขมันมาทำให้แห้งโดย evaporator สารที่เหลือที่ได้นำมาละลายด้วย isopropanol นำไปวิเคราะห์ค่า total cholesterol และ triglyceride ในตับต่อไปโดยใช้ชุดตรวจวัด (kit)

2 การวิเคราะห์หาค่า cholesterol และ triglyceride ในอุจจาระ โดยในสัปดาห์สุดท้ายจะเก็บอุจจาระหนู 2 วัน จากนั้นนำไปทำให้แห้ง แล้วนำไปสกัดแยกเอาไขมัน ทั้ง cholesterol และ triglyceride ในอุจจาระโดยใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์หาค่า cholesterol และ triglyceride ในตับ

3 เอนไซม์ HMG-CoA reductase ในตับ ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่จะนำไปใช้สร้าง cholesterol หลังจากหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวนำไปให้ไขมันในเลือดสูงได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ครบ 3 สัปดาห์แล้ว จะงดอาหารหนู 1 คืน นำหนูมาสลับเปิดหน้าท้อง แยกตับออกมาล้างและซับให้แห้ง นำตับมา 2 กรัมใส่ใน cold buffer ที่มี 0.1 M triethanolamine, 0.02 M EDTA และ 2 mM dithiothreitol pH 7.4 บดแล้วนำไป centrifuge 12,000 g นาน 10 นาที จากนั้นนำ supernatant ไป centrifuge ที่ 60,000 g นาน 60 นาที pellet ที่ได้สุดท้ายคือ liver microsome นำไปวิเคราะห์หา HMG-CoA reductase ต่อโดยวิธีของ Hulcher and Oleson (25)

4 Plasma Lipoprotein lipase (LPL) โดยหลังจากหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวนำไปให้ไขมันในเลือดสูงได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ครบ 3 สัปดาห์แล้ว ทำการสลับหนูทดลอง แล้วฉีด Heparin 1,000 unit/Kg BW เข้าทางหลอดเลือดดำ เก็บเลือดแล้วนำไปปั่นแยก plasma ออกมา นำไปวิเคราะห์ค่า LPL โดยวิธีของ Xie และคณะ (26) วิธีการคือ นำ 0.1 ml plasma, 0.01ml lipid emulsion, 1 ml ของ 0.1M Tris buffer pH 8.2, 0.79 ml ของ distilled water (ในกรณีวิเคราะห์ total lipase activity) หรือ high concentration ของ NaCl (ในกรณีวิเคราะห์ hepatic lipase) นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 60 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หา free fatty acid ที่เกิดในปฏิกิริยาโดยวิธีของ Linnikov และ Boonstra (27)

5 การวิเคราะห์หาค่า bile acid excretion ในอุจจาระหนู โดยหนูทุกกลุ่มในสัปดาห์สุดท้ายจะเก็บอุจจาระเป็นเวลา 3 วัน นำอุจจาระทั้งหมดมาทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่า bile acid 2 ตัว คือ cholic acid และ deoxycholic acid โดยวิธีของ Masbach และ

คณะ (28) และ Rizvi และคณะ (29) กล่าวคือ นำอุจจาระ 5 กรัมมาชะด้วย absolute ethanol แล้วนำมากรอง จากนั้น hydrolyzed ด้วย 10 ml 5% NaOH วางใน autoclave ความดัน 15 ปอนด์ นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไป neutralized ด้วย HCl สกัดด้วย ether จากนั้นนำไป evaporate ให้แห้ง ส่วนที่เหลือนำไปละลายด้วย acetone แล้ว centrifuge supernatant ที่ได้ไปทำให้แห้ง จากนั้นเติม 65% H_2SO_4 , incubate ใน water bath $60^{\circ}C$ นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่า cholic acid และ deoxycholic acid ต่อไป

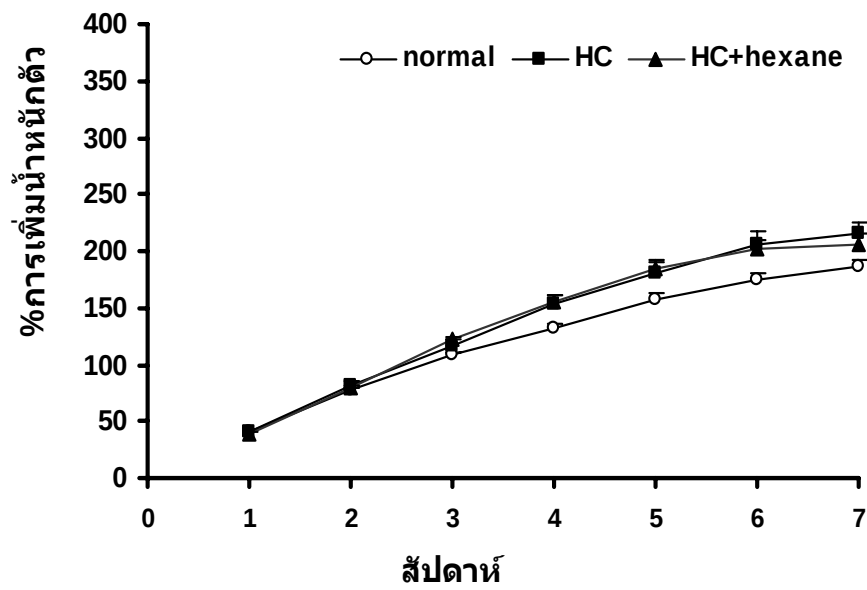
ค. ผลการทดลอง

ผลและกลไกของสิ่งสกัดกะเพราด้วย Hexane ต่อระดับไขมันในหนูเหี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

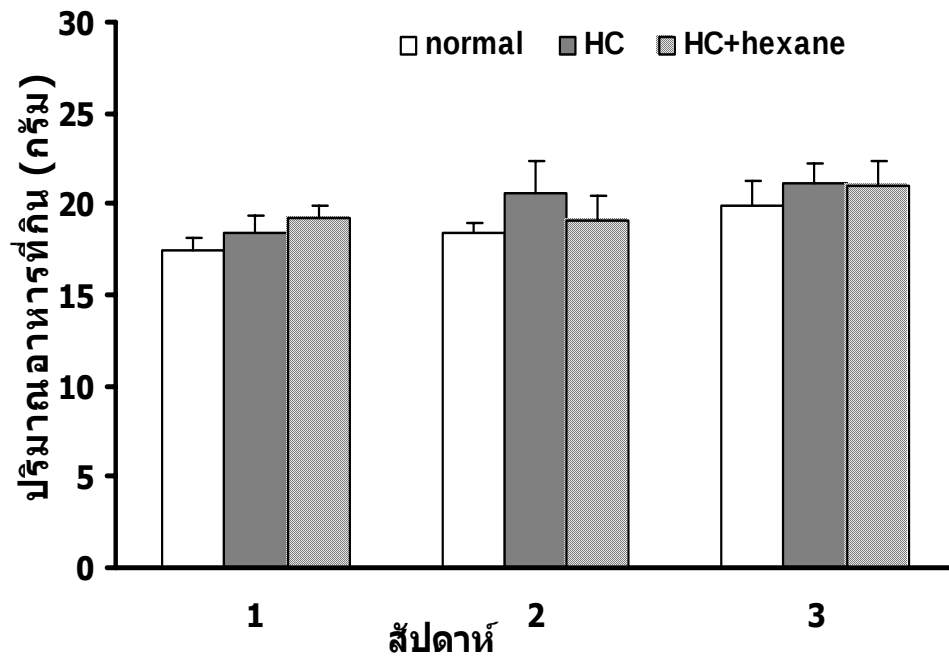
รูปที่ 16 แสดงเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มจะเห็นว่าหนูที่เหี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะมีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวในช่วง 4 สัปดาห์สุดท้ายมากกว่าหนูปกติเล็กน้อย อย่างไรก็ตามปริมาณอาหารที่กินใน 3 สัปดาห์ในหนูทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 17)

น้ำหนักตับ ไต และหัวใจของหนูที่เหี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง แสดงในตารางที่ 14 หนูที่เหี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูงจะมีน้ำหนักตับมากกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่น้ำหนักหัวใจยังคงไม่แตกต่างจากหนูปกติ สิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตับ และหัวใจของหนูที่เหี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

ตารางที่ 15 แสดงระดับไขมันในเลือดในหนู จะพบว่าไขมันในเลือดเพิ่มขึ้นทั้ง total cholesterol, triglyceride และ LDL- cholesterol ในหนูที่เหี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง และระดับ AI ก็เพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 1.01 ± 0.14 เป็น 10.33 ± 1.01 สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ที่ให้แก่หนูที่เหี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง สามารถลดไขมันในเลือดและเพิ่ม HDL- cholesterol รวมทั้งลดระดับ AI สู่ระดับ 5.28 ± 0.37



รูปที่ 16 แสดงเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูปกติ หนูที่เหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกักตะเพราด้วย hexane (HC = high cholesterol หรือหนูที่เหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง)



รูปที่ 17 แสดงเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูปกติ หนูที่เหนียวนำไปมีไขมันในเลือดสูงที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane (HC = high cholesterol หรือหนูที่เหนียวนำไปมีไขมันในเลือดสูง)

ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตับ และหัวใจ ในหนูที่เหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง ซึ่งได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane

กลุ่ม	น้ำหนักตับ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)	น้ำหนักหัวใจ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว)
หนูปกติ	29.5 ± 0.6 ^a	2.99 ± 0.04 ^a
หนูให้อาหารไขมันสูง	59.1 ± 1.9 ^b	2.86 ± 0.08 ^a
หนูให้อาหารไขมันสูงได้สิ่งสกัด	58.7 ± 1.6 ^b	2.84 ± 0.09 ^a
กะเพราด้วย hexane		

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 15 ผลของสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ต่อระดับไขมันในเลือดและค่า atherogenic index (AI) ในหนูที่เหนียวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

กลุ่ม	Total cholesterol	Triglyceride	HDL-C	LDL-C	AI
หนูปกติ	42 ± 3 ^a	48 ± 3 ^a	21 ± 3 ^a	12 ± 3 ^a	1.01 ± 0.14 ^a
หนูให้อาหารไขมันในสูง	153 ± 9 ^b	61 ± 5 ^b	14 ± 1 ^b	127 ± 8 ^b	10.33 ± 1.01 ^b
หนูให้อาหารไขมันในสูง ได้สิ่งสกัดด้วย hexane	112 ± 6 ^c	43 ± 5 ^a	18 ± 0.7 ^c	85 ± 6 ^c	5.28 ± 0.37 ^c

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

จากการวิเคราะห์ไขมันในตับและอุจจาระพบว่า cholesterol และ triglyceride ในตับหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 16) จากระดับ 2.8 ± 0.06 เป็น 70.2 ± 4.5 และจากระดับ 9.9 ± 0.9 สู่ระดับ 16.5 ± 0.9 mg/g liver ตามลำดับ การให้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane สามารถลดไขมันตับทั้ง 2 อย่างลงสู่ระดับ 55.3 ± 3.1 และ 13.3 ± 0.9 mg/g liver ตามลำดับ การขับทั้ง cholesterol และ triglyceride ในอุจจาระก็เพิ่มขึ้นในหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงเมื่อเทียบกับหนูปกติ ปริมาณ cholesterol ในอุจจาระของหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane เพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงปกติ (ตารางที่ 16) ส่วน triglyceride ในอุจจาระของหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะไม่ต่างจากหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงปกติ สำหรับการขับทั้ง bile acid ในรูป cholic acid และ deoxycholic acid แสดงในตารางที่ 17 จะพบว่าทั้ง cholic acid และ deoxycholic ในอุจจาระของหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงเพิ่มขึ้นมากกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากระดับ 0.71 ± 0.09 เป็น 2.16 ± 0.21 mg/day และจากระดับ 0.23 ± 0.03 เป็น 1.16 ± 0.12 mg/day ตามลำดับ การขับทั้ง cholic acid และ deoxycholic ในหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ยังคงอยู่ในระดับสูงและไม่แตกต่างจากหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงปกติ

ระดับ enzyme lipoprotein lipase activity (LPL) ใน plasma พบว่ามีค่าลดลงในหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูปกติ (90 ± 8 และ 70 ± 7 μ mole fatty acids/hr) ระดับ LPL ในหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane เพิ่มขึ้นสู่ระดับ 84 ± 5 μ mole fatty acids/hr. และเมื่อดูค่า HMG-CoA reductase ในตับ พบว่าหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงจะมีระดับ HMG-CoA reductase ในตับไม่แตกต่างจากหนูปกติ แต่ค่า HMG-CoA reductase ลดลงได้ในตับหนูที่เหี่ยวงาให้มีไขมันในเลือดสูงและได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane

ตารางที่ 16 ผลของสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane ต่อระดับไขมันในตับ และขับทั้งทางอุจจาระในหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง

กลุ่ม	Cholesterol (mg/g liver)	Triglyceride (mg/g liver)	Cholesterolใน อุจจาระ (mg/d)	Triglyceride ใน อุจจาระ (mg/day)
หนูปกติ	2.8 ± 0.06 ^a	9.9 ± 0.9 ^a	11.9 ± 1.1 ^a	4.23 ± 0.25 ^a
หนูให้อาหารไขมันในสูง	70.2 ± 4.5 ^b	16.5 ± 0.9 ^b	145 ± 11 ^b	6.27 ± 0.63 ^{ab}
หนูให้อาหารไขมันในสูง ได้สิ่งสกัดด้วย hexane	55.3 ± 3.1 ^c	13.3 ± 0.9 ^c	164 ± 18 ^b	7.03 ± 0.37 ^b

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 17 ผลของสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane ต่อระดับ lipoprotein lipase (LPL), HMG-CoA reductase ในตับ การขับทั้ง cholic acid และ deoxycholic acid ในอุจจาระในหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูง

กลุ่ม	LPL (μmole fatty acid/hr)	HMG CoA (nmol/min/mg protein)	Cholic acid ในอุจจาระ (mg/ day)	Deoxycholic acid ในอุจจาระ (mg/ day)
หนูปกติ	90 ± 8 ^a	0.69 ± 0.04 ^a	0.71 ± 0.09 ^a	0.23 ± 0.03 ^a
หนูให้อาหารไขมันในสูง	70 ± 7 ^b	0.66 ± 0.04 ^a	2.16 ± 0.21 ^b	1.16 ± 0.12 ^b
หนูให้อาหารไขมันในสูง ได้สิ่งสกัดด้วย hexane	84 ± 5 ^c	0.42 ± 0.02 ^b	1.90 ± 0.23 ^b	1.04 ± 0.18 ^b

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ผลและกลไกของสิ่งสกัดกะเพราด้วย Hexane ต่อระดับไขมันในหนูเบาหวาน

สำหรับหนูเบาหวานจะพบว่าอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งกลุ่มที่ได้และไม่ได้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 18) แม้อัตราการเพิ่มน้ำหนักของหนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะเพิ่มกว่าหนูเบาหวานปกติเล็กน้อย อย่างไรก็ตามอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่มยังต่ำกว่าหนูปกติ แม้อัตราเพิ่มน้ำหนักตัวหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่มจะไม่มากเท่าหนูปกติแต่ปริมาณอาหารที่กินกลับมากกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 19)

3 สัปดาห์ที่หนูเป็นเบาหวาน ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับหนูปกติ (รูปที่ 20) ระดับน้ำตาลในเลือดยังคงสูงอยู่ในหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราและระดับไม่แตกต่างจากหนูเบาหวานปกติ

น้ำหนัก ตับ ไต และหัวใจของหนูเบาหวาน แสดงในตารางที่ 18 สำหรับหนูเบาหวานจะพบว่า น้ำหนักตับ ไต และหัวใจเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูปกติ สิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก ตับ ไต และหัวใจของหนูเบาหวาน

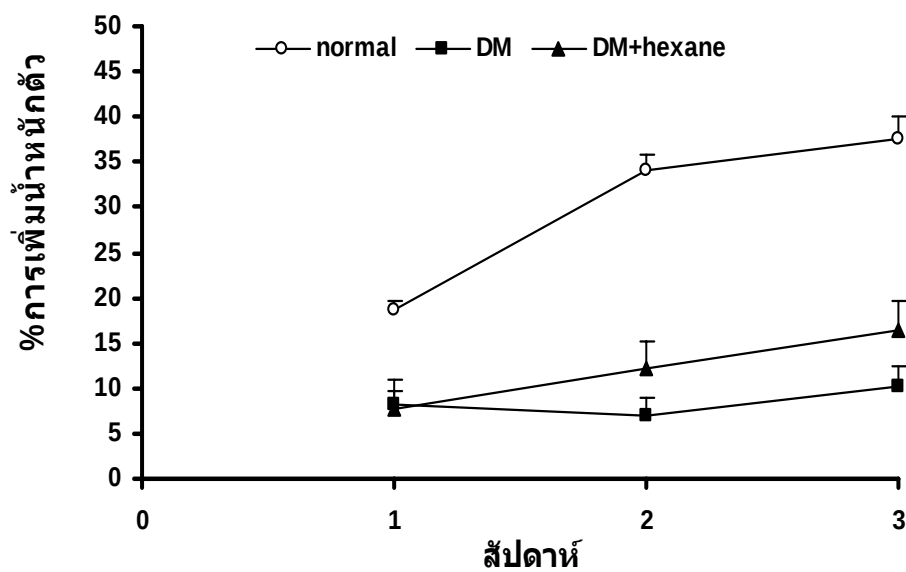
หนูเบาหวานมีระดับไขมันในเลือดสูงขึ้นทั้ง total cholesterol, triglyceride และ LDL-cholesterol รวมทั้งค่า AI (ตารางที่ 19) ขณะที่ HDL-cholesterol ลดลง สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane สามารถลดระดับ total cholesterol จากระดับ 99 ± 7 สู่ระดับ 73 ± 5 mg/dl และลด triglyceride จากระดับ 80 ± 9 สู่ระดับ 45 ± 8 mg/dl และลด LDL-cholesterol จากระดับ 57 ± 5 สู่ระดับ 41 ± 3 mg/dl

ผลการทดลองสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ต่อระดับไขมันในตับและอุจจาระพบว่า cholesterol และ triglyceride ในตับหนูเบาหวานลดลงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 20) สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะเพิ่ม cholesterol ในตับสู่ระดับปกติ ขณะที่ triglyceride ในตับเพิ่มขึ้นมาแต่ระดับยังต่ำกว่าในหนูปกติ ปริมาณ cholesterol และ triglyceride ในอุจจาระของหนูเบาหวานจะมากกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ ระดับไขมันในอุจจาระทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane จากระดับ 20.7 ± 1.5 เป็นระดับ 29.1 ± 4.3 mg/day และจากระดับ 10.9 ± 0.4 เป็นระดับ 14.3 ± 1.4 mg/day ตามลำดับ

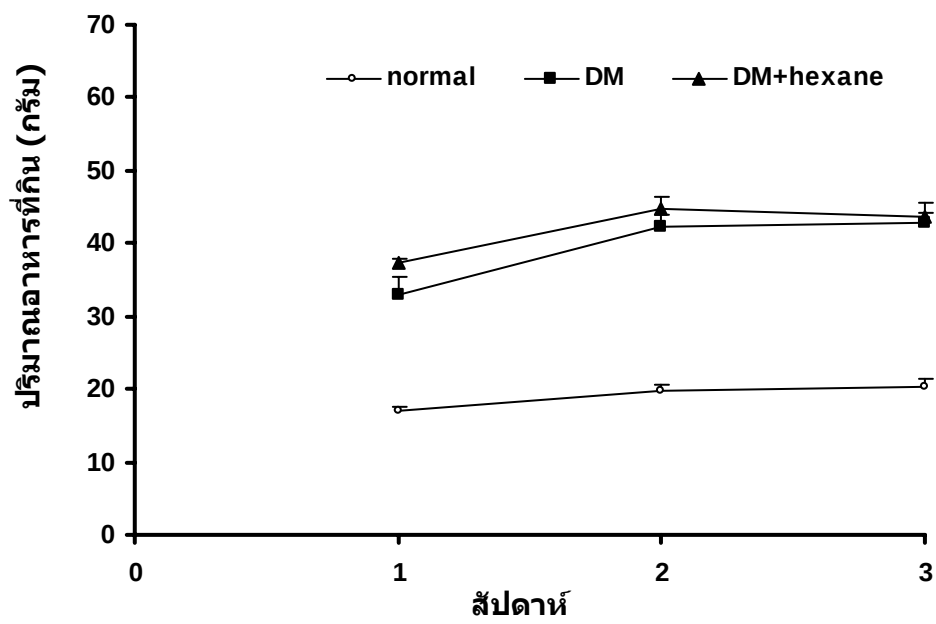
ค่าของ bile acid ในอุจจาระทั้ง cholic acid และ deoxycholic acid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเบาหวานจากระดับ 0.53 ± 0.04 เป็นระดับ 2.15 ± 0.35 mg/day และจากระดับ 0.23 ± 0.02 สู่ระดับ 0.85 ± 0.09 mg/day ตามลำดับ การขับทั้ง bile acid ทั้ง 2 ชนิดจะลดลงสู่ระดับ 1.16 ± 0.19 และ 0.54 ± 0.09 mg/day ตามลำดับในหนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane

ผลการทดลองของสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ต่อ enzyme lipoprotein lipase (LPL) และ HMG-CoA reductase ในตับแสดงในตารางที่ 21 LPL ในตับหนูเบาหวานมีค่าต่ำกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (77 ± 5 และ 35 ± 3 μ mole fatty acids/hr) ค่า LPL เพิ่มขึ้นสู่

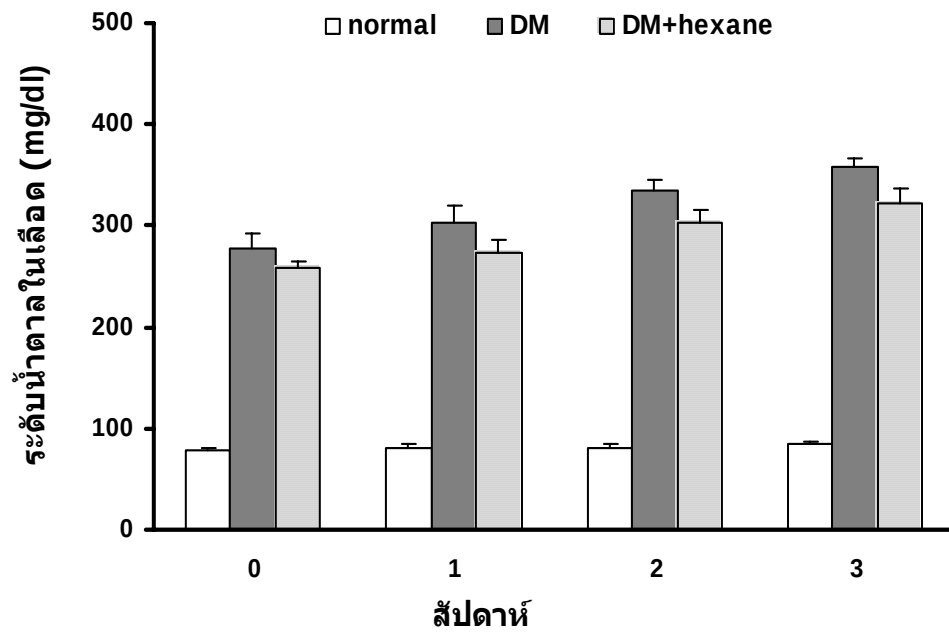
ระดับ 57 ± 8 ในหนูเบาหวานที่ให้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ส่วนค่า HMG-CoA reductase ในตับของหนูเบาหวานมีค่าต่ำกว่าหนูปกติ และเพิ่มขึ้นมาได้ในหนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนูปกติ หนูเบาหวาน ที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane (DM = diabetes mellitus หรือหนูเบาหวาน)



รูปที่ 19 การปริมาณอาหารที่กินในหนูปกติ หนูเบาหวานที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัด
กะเพราด้วย hexane (DM = diabetes mellitus หรือหนูเบาหวาน)



รูปที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ หนูเบาหวานที่ได้รับ หรือไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ก่อนและหลังได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane (DM = diabetes mellitus หรือหนูเบาหวาน)

ตารางที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตับ ไขมันหัวใจ (กรัม/กก.น้ำหนักตัว) ในหนูเบาหวาน ซึ่งได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane

กลุ่ม	น้ำหนักตับ	น้ำหนักไต	น้ำหนักหัวใจ
หนูปกติ	30.0 ± 0.5 ^a	6.41 ± 0.22 ^a	3.14 ± 0.08 ^a
หนูเบาหวาน	45.8 ± 0.9 ^b	12.23 ± 0.22 ^b	3.5 ± 0.07 ^b
หนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัด	47.5 ± 1.2 ^b	12.12 ± 0.49 ^b	3.63 ± 0.08 ^b
กะเพราด้วย hexane			

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 19 ผลของสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ต่อระดับไขมันในเลือดและค่า atherogenic index (AI) ในหนูเบาหวาน

กลุ่ม	Total cholesterol	Triglyceride	HDL-C	LDL-C	AI
หนูปกติ	49 ± 1 ^a	55 ± 3 ^a	26 ± 1 ^a	11 ± 1 ^a	0.88 ± 0.06 ^a
หนูเบาหวาน	99 ± 7 ^b	80 ± 9 ^b	20 ± 1 ^b	57 ± 5 ^b	3.70 ± 0.34 ^b
หนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัด	73 ± 5 ^c	45 ± 8 ^{ba}	23 ± 2 ^b	41 ± 3 ^c	2.28 ± 0.1 ^c
ด้วย hexane					

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 20 ผลของสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane ต่อระดับไขมันในตับ และขับทั้งทางอุจจาระในหนูเบาหวาน

กลุ่ม	Cholesterol (mg/g liver)	Triglyceride (mg/g liver)	Cholesterolใน อุจจาระ (mg/d)	Triglyceride ใน อุจจาระ (mg/day)
หนูปกติ	2.47 ± 0.13 ^a	11.6 ± 0.5 ^a	10.7 ± 1.03 ^a	5.6 ± 0.5 ^a
หนูเบาหวาน	1.98 ± 0.08 ^b	4.3 ± 0.4 ^b	20.7 ± 1.5 ^b	10.9 ± 0.4 ^b
หนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัด ด้วย hexane	2.47 ± 0.7 ^a	7.1 ± 0.9 ^c	29.1 ± 4.3 ^c	14.3 ± 1.4 ^c

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 21 ผลของสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane ต่อระดับ lipoprotein lipase (LPL), HMG-CoA reductase ในตับ การขับทั้ง cholic acid และ deoxycholic acid ในอุจจาระในหนูเบาหวาน

กลุ่ม	LPL (μmole fatty acid/hr)	HMG CoA (nmol/min/mg protein)	Cholic acid ในอุจจาระ (mg/ day)	Deoxycholic acid ในอุจจาระ (mg/ day)
หนูปกติ	77 ± 5 ^a	0.06 ± 0.02 ^a	0.53 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.03 ^a
หนูเบาหวาน	35 ± 3 ^b	0.47 ± 0.04 ^b	2.15 ± 0.35 ^b	0.85 ± 0.09 ^b
หนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัด ด้วย hexane	57 ± 8 ^c	0.58 ± 0.04 ^a	1.16 ± 19 ^c	0.54 ± 0.09 ^c

สัญลักษณ์ a,b,c แสดงความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม

สัญลักษณ์ต่างกันแสดงการมีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ

4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของของสิ่งสกัดหยาบจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา ที่ให้ผลในการลดไขมันในเลือด และการป้องกันการทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่เหนียวทำให้เป็นเบาหวาน และหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง

ก. วิธีทดลอง

เนื่องจากผลการทดลองที่ผ่านมาในข้อ 4.2-4.6 จะพบว่าในบรรดาสีสกัดที่ได้จากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ นั้น ให้ผลแตกต่างกัน กล่าวคือน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบกะเพราไม่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด แต่สามารถลดไขมันในเลือดทั้ง total cholesterol, triglyceride และ LDL-cholesterol ทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวให้มีไขมันในเลือดสูง รวมทั้งยังมีฤทธิ์ในการปกป้องหัวใจในหนูที่ให้อาหารไขมันสูง ส่วนสิ่งสกัดจากกะเพราด้วย hexane ให้ผลลดไขมันในเลือดคล้ายคลึงกับน้ำมันหอมระเหย แต่จะให้ผลดีมากที่สุดในการลดไขมันในเลือดทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่ให้อาหารไขมันสูง ส่วนสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำสามารถลดไขมันได้เฉพาะ cholesterol แต่ไม่มีผลหรือมีผลน้อยต่อการลด triglyceride ทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่ให้อาหารไขมันสูง แต่สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำจะให้ผลดีมากในการปกป้องอวัยวะสำคัญทั้ง ตับ ไต หัวใจในหนูเบาหวานและปกป้องตับและหัวใจในหนูที่ให้อาหารไขมันสูง ดังนั้นทีมวิจัยจึงเลือกเฉพาะสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ สิ่งสกัดกะเพราด้วยตัว hexane และน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกะเพรามาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยมีขั้นตอนดังนี้

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

นำใบกะเพราสดมาล้างให้สะอาดในน้ำเปล่า จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมากลั่นเอาน้ำมันหอมระเหยออกมาด้วยวิธี hydrodistillation ตามวิธีของ Association of official Analytical (method 962.17, AOAC, 1990) ภายหลังกลั่นได้น้ำมันหอมระเหยจะพบว่าปริมาณที่ได้คือ 1.82 ml/100g ใบกะเพราสด นำน้ำมันที่ได้แช่ตู้เย็น 4°C เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ขั้นตอนคือ นำน้ำมันหอมระเหยมาทำให้เจือจางด้วย methanol ในอัตราส่วน 1:100 จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง GC-MS โดยใช้ column คือ DB-5 fused silica capillary column 30 m (0.25 mm i.d, 0.25 μ m film thickness) oven temperature คือ 50-240°C ที่ระดับ 3°C/min. injector และ detector temperature คือ 240°C ปริมาตรที่ฉีดคือ 1 μ L, split ratio คือ 100:1 carrier gas คือ helium การวิเคราะห์องค์ประกอบจะดูที่ค่า retention time และนำมาเปรียบเทียบกับ standard โดยใช้ electron impact-mass spectra (EI-MS) data และใช้ computer matching โดย NIST library (NIST=NIST.Mass Spectral Library, The National Institute of Standards and Technology, UK, 1998)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดใบกะเพราด้วย hexane

นำใบกะเพราสดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่น จากนั้นสกัดด้วย hexane โดยใช้ Soxhlet extractor ตามวิธีของ AOAC, method 992.23, 1995 พบว่าเมื่อสกัดด้วย hexane แล้วจะได้สิ่งสกัดเป็นน้ำมันสีน้ำตาลขุ่นๆ ใสๆ จากนั้นนำสิ่งสกัดที่ได้ไปแช่ตู้เย็น 4°C ก่อนวิเคราะห์หาองค์ประกอบ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเนื่องจากสิ่งสกัดที่ได้จาก hexane ส่วนมากจะเป็น fatty acid ดังนั้นเราจะทำการวิเคราะห์หา fatty acid ที่อยู่ในสิ่งสกัดว่ามีชนิดใดบ้าง ปริมาณเท่าใด โดย fatty acid ในสิ่งสกัดจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป fatty acid methyl ester (FAMES) ด้วยวิธีทาง ISO procedure (ISO, method 5509, 1978) FAMES จะถูกวิเคราะห์โดยใช้ GC-MS (Hewlett-Packard-5840A) ใช้ flame ionization detector (Electron-Impact mass spectrometry) นำ $1.5\ \mu\text{L}$ ของ FAMES ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS โดยใช้ capillary column DB-23 column, 30m, 0.25 mm i.d, 0.25 μm film thickness) carrier gas คือ helium ที่ความดัน 19 psi, split ratio 50:1 over temperature เริ่มที่ 80°C แล้วเพิ่มจนถึง 180°C ที่อัตรา $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ แล้วคงระดับอุณหภูมิไว้ที่ 220°C นาน 7 นาที อุณหภูมิ injector port และ detector อยู่ที่ 300°C ชนิดและปริมาณ fatty acid จะดูจากค่า retention time เทียบกับของ standard ปริมาณ fatty acid แต่ละตัวจะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ total fatty acid

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ

นำใบกะเพราสดมาล้างน้ำเปล่าให้สะอาด แล้วนำไปตากให้แห้งด้วยอุณหภูมิห้อง นำใบกะเพราแห้งไปบดให้เป็นผงแล้วจึงสกัดด้วยน้ำ สิ่งสกัดที่ได้จะนำไปทำให้แห้งโดยใช้ freeze dried ได้สิ่งสกัดด้วยน้ำเป็นผงสีน้ำตาล นำไปแช่ตู้เย็นที่ 4°C เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่อไป เนื่องจากมีงานวิจัยพบว่าในกะเพรามีองค์ประกอบทางเคมีหลายอย่าง โดยเฉพาะ phenolic compound เช่น ursolic acid และสาร flavonoids เช่น apigenin, orientin และ vicenin เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีรายงานวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และการป้องกันหรือลดการทำลายเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ได้ (30-34) ดังนั้นทีมวิจัยจึงนำสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำไปวิเคราะห์หา total phenolic compound และหาองค์ประกอบอื่นเพิ่มเติม เช่น ursolic acid, apigenin, vicenin, orientin แต่เนื่องจากในบรรดาสารสกัดเหล่านี้ที่ทีมวิจัยสามารถหา standard ได้เฉพาะ ursolic acid และ apigenin ส่วน vicenin และ orientin ไม่มีบริษัทใดขายและไม่มีผู้วิจัยท่านใด (เท่าที่สอบถาม) มีในครอบครอง ดังนั้นทีมวิจัยจึงวิเคราะห์หาเฉพาะ ursolic acid และ apigenin

การวิเคราะห์ total phenolic content ในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำใช้วิธี Folic-Ciocalteu method โดยนำ $0.1\ \text{ml}$ ของ $10\ \text{mg}/\text{ml}$ ของสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำผสมใน $1\ \text{ml}$ ของ 7%

Na_2CO_3 จากนั้นนำ 0.1 ml Folic-Ciocalteu reagent ผสมลงไปแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 2.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratory, UK) total phenolic content ในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำจะคำนวณจาก standard curve ของ gallic acid คำนวณออกมาเป็น mg gallic acid/g dry weight ของกะเพราแห้ง

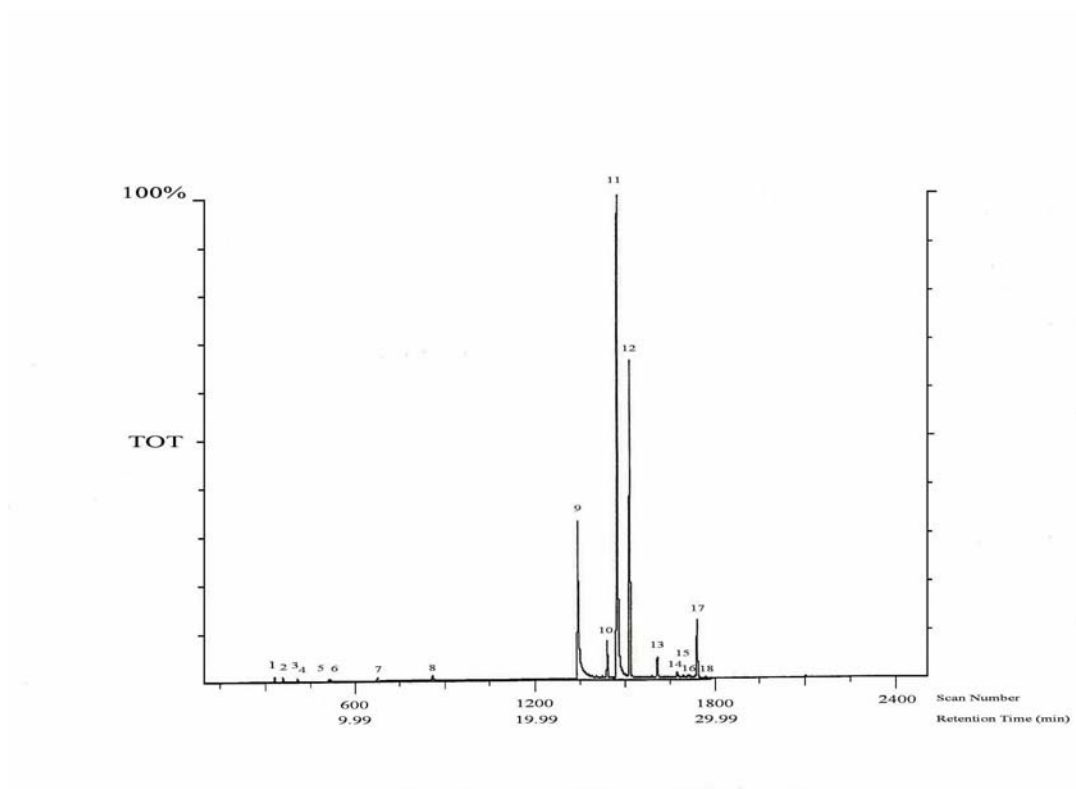
การวิเคราะห์หา ursolic acid และ apigenin ในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำจะใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยเครื่อง Agilent 1100 HPLC system ซึ่งมี photodiode array detector column ที่ใช้คือ Thermo- C_{18} column 4.6x250 mm, 5 μm . สำหรับ condition ที่ใช้วิเคราะห์ ursolic acid คือ : mobile phase ใช้ acetonitrile : water (80:20), injection volume = 20 μL , flow rate 1 ml/min, detector คือ photodiode array 210 nm ส่วน condition ที่ใช้วิเคราะห์ apigenin คือ : mobile phase ใช้ methanol : 0.2% phosphoric acid (60:40), injection volume คือ 20 μL , flow rate 1 ml/min, detector คือ photodiode array 350 nm. การวิเคราะห์หาสารทั้ง 2 ตัวเทียบกราฟ retention time กับ standard ของสารทั้ง 2 ตัว

ข. ผลการทดลอง

รูปที่ 21 แสดง chromatogram ขององค์ประกอบของสารต่างๆ จากการวิเคราะห์ในน้ำมันหอมระเหย ส่วนตารางที่ 22 แสดงสารต่างๆ ที่วิเคราะห์ได้จากน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา จะเห็นว่าองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำมันหอมระเหยนั้นจะพบสารประเภท phenyl propanoid มากที่สุด โดยจะพบ methyl eugenol 47.06% รองลงมาคือ eugenol 18.25% ส่วนสารที่มีมากอันดับรองมาคือสารพวก sesquiterpene โดยมี caryophyllene 23.68% เป็นสารหลักของ sesquiterpene นอกจากจะมีสารพวก phenyl propanoid และ sesquiterpene แล้วยังพบสารอื่นๆ อีกเล็กน้อย ได้แก่ monoterpene และ oxygenated monoterpene

สำหรับองค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้จากสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane แสดงอยู่ใน chromatogram ในรูป 22 ซึ่งพบ fatty acid หลายชนิด โดยปริมาณของ fatty acid แต่ละตัวแสดงในตารางที่ 23 พบว่า fatty acid ที่พบมากที่สุดคือ α -linolenic acid 60.6% รองลงมาคือ linoleic acid 17.86% และ palmitic acid 15.65% นอกจากนั้นพบ fatty acid อื่นๆ เล็กน้อย เช่น steric acid 3.08% , Olic acid 2.81%

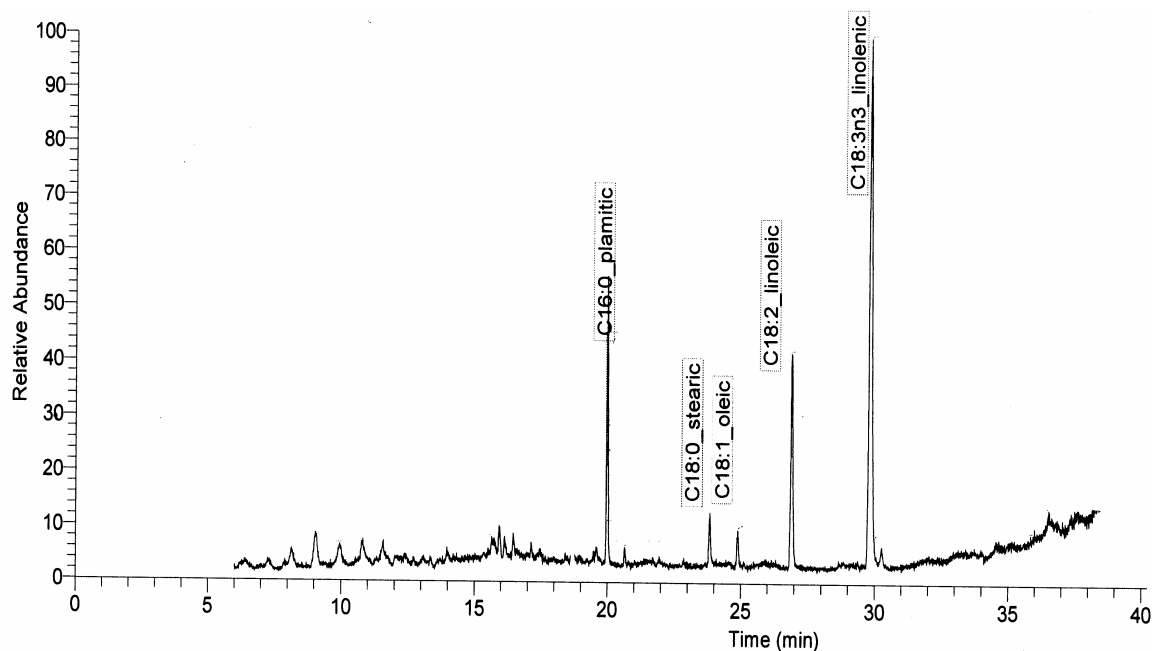
รูปที่ 23 แสดง standard curve total phenolic content ของสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ พบว่าในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำมีปริมาณ total phenolic content 0.904 ± 0.045 mg gallic acid/10mg ของสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ เมื่อวิเคราะห์หา apigenin และ ursolic acid ในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ แสดงอยู่ในรูปที่ 24 และ 25 พบว่าไม่พบสารทั้ง 2 ชนิดในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ



รูปที่ 21 แสดง chromatogram ขององค์ประกอบของสารต่างๆ จากการวิเคราะห์ในน้ำมันหอมระเหยด้วย GC-MS

ตารางที่ 22 แสดงองค์ประกอบของสารต่างๆที่วิเคราะห์ได้จากน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา

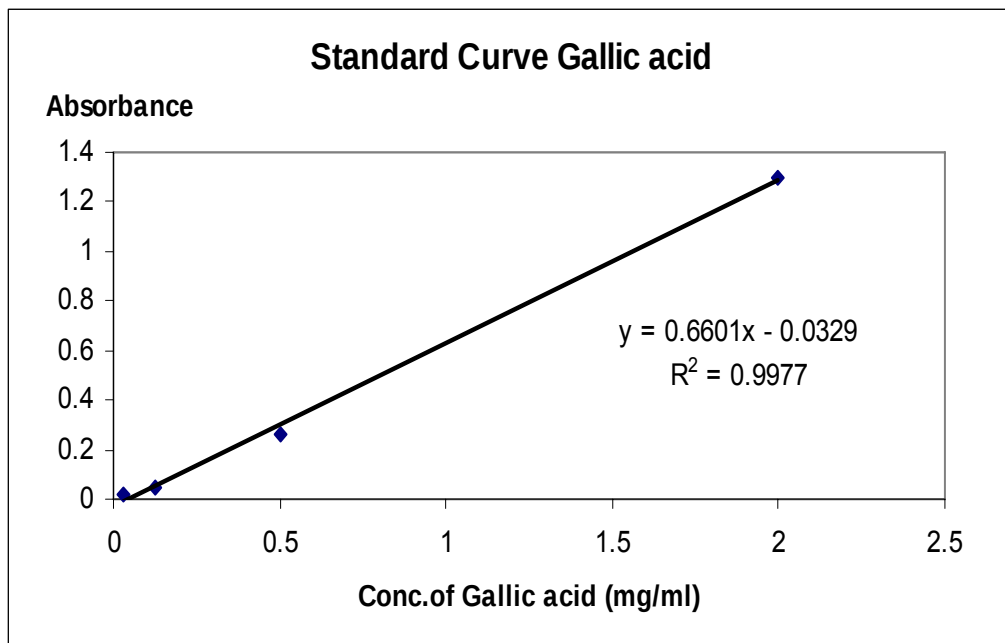
Number of peak	Chemical compounds and structures	Retention time (min)	% Area	Molecular formula	Molar mass (g/mol)
mm	Monoterpene				
1	α -thujene	5.48	0.19	C ₁₀ H ₁₆	136.23
2	camphene	5.62	0.21	C ₁₀ H ₁₆	136.24
3	sabinene	6.33	t	C ₁₀ H ₁₆	136.23
4	β -pinene	6.39	0.13	C ₁₀ H ₁₆	136.24
5	limonene	7.96	0.08	C ₁₀ H ₁₆	136.24
	Oxygenated monoterpene				
6	1,8-cineole	8.11	0.06	C ₁₀ H ₁₈ O	154.249
7	linalool	10.59	0.30	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
8	borneol	13.59	0.54	C ₁₀ H ₁₈ O	154.249
	Sesquiterpene				
10	β -elemene	23.07	2.64	C ₁₅ H ₂₄	204.35
12	9-epi (<i>E</i>)-caryophyllene	25.41	23.68	C ₁₅ H ₂₄	204.36
13	α -humulene	25.80	1.50	C ₁₅ H ₂₄	204.36
14	γ -muurolene	26.39	0.40	C ₁₅ H ₂₄	204.35
15	β -selinene	26.78	0.11	C ₁₅ H ₂₄	204.35
16	α -selinene	27.16	0.11	C ₁₅ H ₂₄	204.35
17	α -bulnesene	27.48	4.60	C ₁₅ H ₂₄	204.35
18	δ -cadinene	29.01	0.10	C ₁₅ H ₂₄	204.35
	Phenyl propanoid				
9	eugenol	21.26	18.25	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.20
11	methyl eugenol	23.61	47.06	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178.23



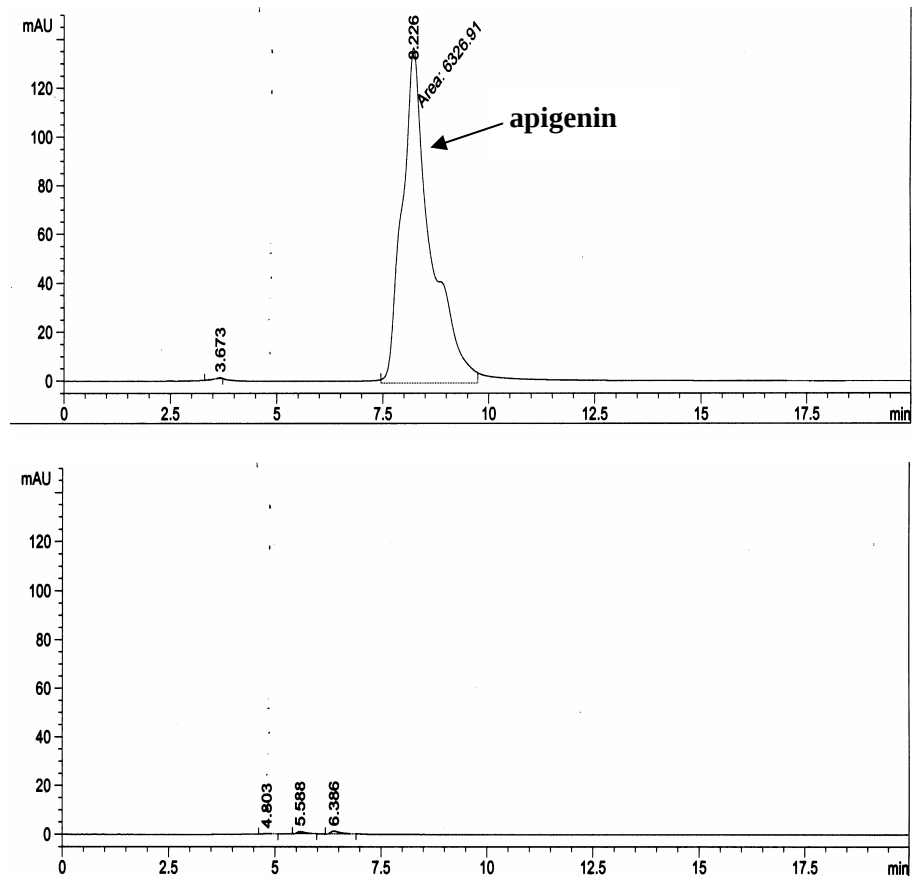
รูปที่ 22 แสดง chromatogram ของ fatty acid ชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ได้จากสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane

ตารางที่ 23 แสดงชนิดและปริมาณของ fatty acid แต่ละตัวที่วิเคราะห์ได้จากสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane

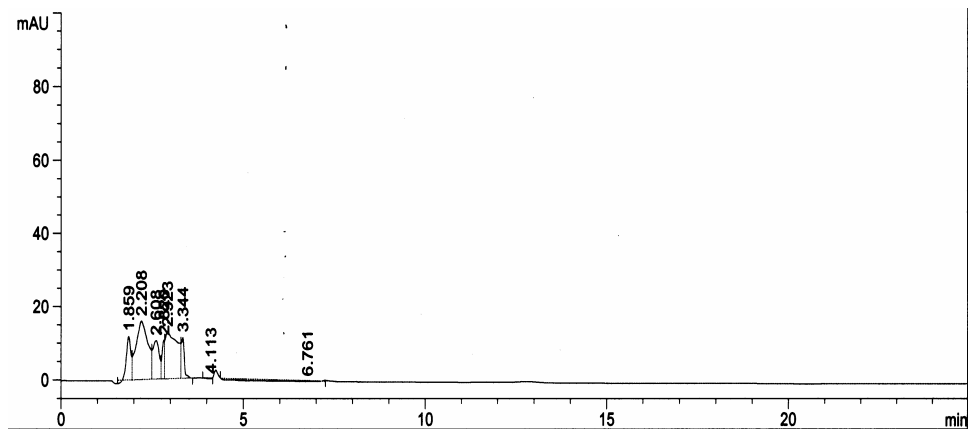
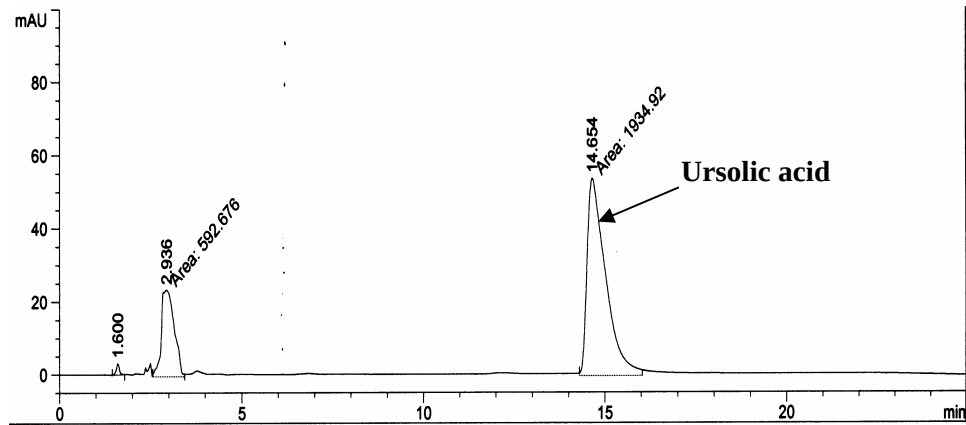
Fatty acid	Molecular formula	%
Palmitic acid	C 16:0	15.65
Stearic acid	C 18:0	3.08
Oleic acid	C 18:1 n-9 cis	2.81
Linoleic acid	C 18:2 n-6 cis	17.86
α -Linolenic acid	C 18:3 n-3	60.60



รูปที่ 23 แสดง standard curve total phenolic content ของสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ



รูปที่ 24 แสดง chromatogram ของ การวิเคราะห์หา apigenin ในสิ่งสกัดกะเพราด้วย
น้ำโดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



รูปที่ 25 แสดง chromatogram ของ การวิเคราะห์หา ursolic acid ในสิ่งสกัดกะเพราด้วย
น้ำ โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5. อภิปรายผลการทดลอง

เป็นที่ทราบดีว่าภาวะเบาหวานและไขมันในเลือดสูงก่อให้เกิดผลกระทบต่อการทำงานของร่างกาย เช่นโรคหัวใจ ไตวาย ความดันเลือดสูง เป็นต้น (2) ปัจจุบันการดำรงชีวิตที่เร่งรีบการแข่งขันที่สูง ทำให้ประชาชนต้องทำงานมากขึ้น ไม่ค่อยมีเวลาสนใจสุขภาพมากนัก โดยเฉพาะผู้ที่อยู่ในวัยทำงาน มักจะละเลยเรื่องคุณภาพอาหารและการออกกำลังกาย ดังนั้นการดำเนินชีวิตประจำวันจึงมักจะบริโภคอาหารอาหารที่สำเร็จรูปมากกว่าจะทำเอง ซึ่งส่วนมากอาหารเหล่านี้มักเป็นประเภททอดหรือผัดที่จะมีไขมันเป็นส่วนผสมอย่างมาก ประกอบเวลาที่จะออกกำลังกายมีจำกัดจึงทำให้เกิดการสะสมไขมันในร่างกายต่อเนื่อง และนำมาสู่ภาวะไขมันในเลือดสูงหรือเบาหวาน ปัจจุบันพบว่าประชากรที่เป็นโรคไขมันในเลือดสูงและเบาหวานมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การรักษาที่ยังคงทำอยู่คือการใช้ยา เช่น insulin สำหรับลดระดับน้ำตาลในเลือด ยาประเภท statin สำหรับลดระดับไขมันในเลือด อย่างไรก็ตามยาลำเภอนี้จะต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณของประเทศ อีกทั้งยาลำเภอนี้ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น shock จากน้ำตาลในเลือดต่ำจากการใช้ insulin หรือการทำลายตับจากการใช้ยาพวก statin เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามจากนักวิจัยที่จะศึกษาและนำสารจากสมุนไพร ที่มีมากมายในธรรมชาติมาใช้ทดแทนการใช้ยา อย่างไรก็ตามประเทศไทยจะมีสมุนไพรหลากหลายชนิดแต่ยังมีงานวิจัยน้อยที่จะศึกษาวิจัยการนำประโยชน์มาใช้ในภาวะเบาหวานและไขมันในเลือดสูงในประเทศ

ในบรรดาสมุนไพรต่างๆที่มีในประเทศไทยนั้น กะเพราเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถปลูกได้ทั่วประเทศ ราคาถูก และนิยมนำมาใช้ปรุงอาหาร และใช้เป็นยามาเป็นเวลานาน มีรายงานวิจัยที่ผ่านมามีพบว่าการสกัดกะเพราหรือใบสดผสมในอาหารสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ในหนูเบาหวาน (7-9) และยังสามารถปกป้องอวัยวะสำคัญในหนูเบาหวานด้วย (10,13) นอกจากนั้นใบกะเพรายังสามารถลดไขมันในเลือดทั้งในภาวะปกติและเบาหวาน (7,12) และยังมีพบว่าการสกัดจากกะเพรามีฤทธิ์ปกป้องอวัยวะสำคัญในหลายๆภาวะ เช่น ปกป้องตับหนูจากการได้รับสารปรอท(14) หรือปกป้องตับหนูจากการทำลายโดยยา paracetamol (15) รวมทั้งฤทธิ์ในการเพิ่ม antioxidant enzyme และลด lipid peroxidation ในหนูเบาหวาน (10,16,17) ดังนั้นจะเห็นว่าใบกะเพรามีฤทธิ์ในการลดน้ำตาล ไขมันในเลือดและปกป้องอวัยวะสำคัญในภาวะต่างๆ อย่างไรก็ตามงานวิจัยต่างๆที่ได้ทำมาส่วนมากจะนำมาสกัดด้วย alcohol แต่ในความเป็นจริงใบกะเพรามีองค์ประกอบสารต่างๆหลายตัว ซึ่งการสกัดด้วย alcohol อาจจะได้สารบางตัวในปริมาณน้อยหรือไม่ได้เลย หรืออาจได้สารบางตัวในปริมาณออก จึงอาจจะทำให้ไม่ทราบว่าฤทธิ์ต่างๆที่แสดงออกมานั้นเกิดจากองค์ประกอบของสารใดในกะเพรา อีกทั้งบางงานวิจัยก็ใช้ใบแห้งป้อนแก่สัตว์ทดลองโดยตรงหรือผสมอาหารจะทำให้ยากต่อการสรุปได้ว่า สารหรือองค์ประกอบใดในกะเพราที่เป็นตัวออกฤทธิ์ในการลดน้ำตาล ลดไขมัน หรือปกป้องอวัยวะต่างๆ จึงทำให้ทีมวิจัยสนใจจะศึกษาในเบื้องต้นว่าองค์ประกอบสารในกลุ่มใดของกะเพราที่เป็นตัวออก

ฤทธิ์เพื่อจะได้นำไปวิเคราะห์ต่อทั้งในแง่กลไกการออกฤทธิ์
นำไปใช้ในการสกัดแยกสารสำคัญเพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อไป

รวมทั้งเป็นความรู้พื้นฐานที่จะ

ผลของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ต่อระดับ ระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูเบาหวานและหนูที่เหนี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

ในการทดลองเบื้องต้นเพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกะเพราด้วย
ตัวทำละลายต่าง ๆ ต่อระดับระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในหนูเบาหวานนั้น พบว่าหนู
เบาหวานปกติมีระดับระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอด 3 สัปดาห์ (รูปที่ 2) ปริมาณ
อาหารที่กินในหนูเบาหวานมีค่ามากกว่าหนูปกติประมาณ 2 เท่า ในขณะที่อัตราการเพิ่มของ
น้ำหนักตัวต่ำกว่าหนูปกติ (รูปที่ 3) เมื่อให้น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดต่าง ๆ จากใบกะเพรา
รวมทั้ง tolbutamide แก่หนูเบาหวานพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดไม่ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนให้สาร
สกัดต่าง ๆ หรือ tolbutamide (รูปที่ 2) เป็นที่น่าสังเกตว่า tolbutamide ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็น
positive control ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด แต่กลับไม่สามารถลดน้ำตาลในเลือดได้ในการ
วิจัยครั้งนี้ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ STZ ใน
ปริมาณที่สูง คือ 70 mg/KgBW ต่างจากการศึกษาวิจัยอื่นๆที่ใช้ STZ เพียง 50-65 mg/KgBW
ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าปริมาณ β -cell ที่เหลือจากการทำลายโดย STZ อาจจะมีไม่มากพอที่จะ
ผลิตอินซูลินในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ การที่ทีมวิจัยใช้ STZ ในปริมาณมากเพื่อ
เหนี่ยวนำให้หนูมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงมาก เพื่อเลียนแบบสภาวะการเป็นเบาหวานในคน ซึ่ง
โดยส่วนมากจะรู้ตัวว่าเป็นเบาหวานก็เมื่อมีระดับน้ำตาลในเลือดค่อนข้างสูงมากแล้ว แม้ว่า
tolbutamide หรือสิ่งสกัดต่าง ๆ จากใบกะเพราจะไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับ
สัปดาห์ก่อนให้สารต่าง ๆ เหล่านี้ก็ตาม แต่ถ้าเทียบระดับน้ำตาลในเลือดระหว่างหนูเบาหวานที่
ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดกะเพราหรือ tolbutamide ในสัปดาห์เดียวกัน จะพบว่าระดับน้ำตาลใน
เลือดในหนูที่ให้ tolbutamide หรือสิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำ หรือ 70% ethanol จะมีระดับ
ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารสกัดจากกะเพรา ในสัปดาห์ที่ 3 จากผล
การทดลองน่าจะเป็นไปได้ว่าการให้ tolbutamide หรือสารสกัดกะเพราที่สกัดจากน้ำ หรือ 70 %
ethanol น่าจะมีฤทธิ์ในการป้องกันไม่ให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเหมือนอย่างใน
กับหนูเบาหวานปกติ มีงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการให้ STZ เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน
จะมีผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งเกิดควบคู่กับระดับ
อินซูลินที่ลดลงด้วย จึงเป็นไปได้ว่าการให้ tolbutamide หรือสารสกัดกะเพราจะช่วยยับยั้งไม่ให้
มีการทำลาย β -cells เพิ่มขึ้น จึงไม่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่สูงเพิ่มขึ้น
ต่อไปอีก อย่างไรก็ตามทีมวิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่าถ้าหากลด dose ของ STZ ลงมาเหลือ 65
mg/KgBW เพื่อลดการทำลาย β -cells แล้วให้ สิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำจะช่วยลดระดับ
น้ำตาลได้หรือไม่ ผลการทดลองพบว่า สิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำมีผลในลักษณะเหมือน
การทดลองที่ผ่านมา คือ ไม่ลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับก่อนให้สารสกัดกะเพรา (สัปดาห์

0) (รูปที่ 11) แต่ถ้าเทียบระดับน้ำตาลในเลือดในสัปดาห์เดียวกัน ระหว่างหนูเบาหวานที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดกะเพราด้วยน้ำ จะพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่ให้สิ่งสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยน้ำจะมีระดับระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารสกัดจากกะเพรา อีกทั้งระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจะมากกว่ากรณีที่ใช้ dose ของ STZ 70 mg/KgBW (รูปที่ 2) การที่น้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำในการทดลองนี้ไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับก่อนให้สิ่งสกัดกะเพรา (สัปดาห์ที่ 0) แต่ให้ผลในลักษณะบรรเทาไม่ให้น้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในหนูเบาหวานปกติ จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำนั้นช่วยรักษาไม่ให้ β -cell ถูกทำลายอย่างต่อเนื่องในหนูเบาหวาน เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของสิ่งสกัดใบกะเพราด้วยน้ำจะพบว่ามีสารพวก phenolic compound อยู่ (รูปที่ 23) มีงานวิจัยพบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็น antioxidant โดยเฉพาะ flavonoid จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในใบกะเพรามีองค์ประกอบสารหลายตัว เช่น phenolic compound เช่น ursolic acid และ flavonoid เช่น apigenin, vicenin, orientin เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีงานวิจัยพบว่ามีฤทธิ์เป็น antioxidant (31,32, 34) ซึ่งอาจจะช่วยในการป้องกันไม่ให้ β -cell ถูกทำลายอย่างต่อเนื่องในหนูเบาหวาน

แม้สิ่งสกัดกะเพราต่างๆ จะไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในหนูเบาหวาน แต่พบว่ามีผลในการลดไขมันในเลือดได้ (ตารางที่ 2) โดยน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยตัวทำละลายทุกชนิดสามารถลด cholesterol และ LDL-cholesterol ในเลือดได้ในหนูเบาหวาน แต่เฉพาะสิ่งสกัดจากใบกะเพราที่มีลักษณะเป็นน้ำมันเท่านั้นที่จะให้ผลลดทั้ง cholesterol และ triglyceride ในเลือดได้ เช่น น้ำมันหอมระเหย สิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane ทำนองเดียวกันเมื่อดูผลการทดลองในหนูที่ได้อาหารไขมันสูง พบว่าน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายเกือบทั้งหมดให้ผลลด total cholesterol และ LDL-cholesterol ในเลือดและค่า AI ของหนูที่ได้อาหารไขมันสูง (ตารางที่ 5) แต่สำหรับการลด triglyceride ในเลือดของหนูที่ได้อาหารไขมันสูงนั้น เฉพาะสิ่งสกัดจาก hexane ให้ผลลด triglyceride อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำมันหอมระเหยลด triglyceride ในเลือดของหนูที่ได้อาหารไขมันสูงได้เช่นกันแต่ฤทธิ์อ่อนกว่าสิ่งสกัดจาก hexane จากการทดลองทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่ได้อาหารไขมันสูงจะเห็นว่า เฉพาะสิ่งสกัดจากกะเพราที่มีลักษณะน้ำมันให้ผลในการลดไขมันในเลือดได้ดีทั้ง cholesterol และ triglyceride โดยเฉพาะสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane นั้นจะให้ผลลดไขมันในเลือดทั้ง 2 ชนิดทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่ได้อาหารไขมันสูง ดังนั้นงานวิจัยต่อไปที่จะศึกษากลไกการลดไขมันในเลือดจึงเลือกเฉพาะสิ่งสกัดใบกะเพราด้วย hexane มาศึกษา

การศึกษาวิจัยได้ศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในการปกป้องอวัยวะสำคัญในหนูเบาหวานและหนูที่ได้อาหารไขมันสูง สำหรับหนูเบาหวานนั้นอวัยวะที่จะถูกกระทบมากที่สุดคือ ตับและไต จากผลการทดลองจะพบว่า ค่า serum AST และ ALT ซึ่งแสดงการทำลายหน้าที่ตับ และค่า serum creatinine และ BUN ซึ่งแสดงการทำลายหน้าที่ไต ในหนูเบาหวานมีค่าสูงขึ้นกว่าหนูปกติ (ตารางที่ 3) แสดงว่ามีการทำลายหน้าที่ของตับและไตในหนูเบาหวานแล้ว จากการทดลองจะพบว่าสิ่งสกัดจากใบกะเพรา

ด้วย hexane และ ethanol ให้ผลลดระดับ creatinine และ BUN ได้ในหนูเบาหวาน ขณะที่สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำสามารถลดทั้ง AST, ALT, creatinine และ BUN แสดงว่าสิ่งสกัดจากใบกะเพรา มีผลในการปกป้องการทำลายตับ และไตในหนูเบาหวาน ซึ่งคล้ายกับการทดลองที่เคยพบว่าใบกะเพราผสมอาหารในหนูเบาหวานกินนาน 3 สัปดาห์ สามารถช่วยปกป้องการทำลายหน้าที่ของไตให้กลับสู่ปกติ และช่วยบรรเทาการทำลายของหน้าที่ตับ (13) แต่เนื่องจากในใบกะเพรา มีองค์ประกอบของสารหลายชนิดทั้งส่วนที่เป็น phenolic compound, fatty acid และอื่นๆ อีก การที่สิ่งสกัด hexane มีความสามารถปกป้องหน้าที่ไตของหนูเบาหวานได้น่าจะเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบที่สำคัญของสิ่งสกัดที่สกัดจากใบกะเพรา ซึ่งจากผลการวิเคราะห์เบื้องต้นในสิ่งสกัดจากใบกะเพราด้วย hexane พบว่ามี fatty หลายตัว แต่ที่มีมากที่สุด คือ α -linolenic acid (60%) รองลงมาคือ linoleic acid 18% (ตารางที่ 23) มีการศึกษาวิจัยพบว่าในหนูเบาหวานที่ได้รับ STZ จะมีระดับของ linolenic acid ลดลงในเนื้อเยื่อไต (35) แต่ถ้าหนูเบาหวานได้รับอาหารที่มี linolenic acid และ linoleic acid เช่น primrose oil จะพบว่าสามารถช่วยลดการทำลายไตได้ทั้งในแง่ลดการเกิด proteinuria, glomerular sclerosis และความผิดปกติของ renal tubule (36) สำหรับสิ่งสกัดจากกะเพราด้วยน้ำนั้นเป็นเพียงสิ่งสกัดเดียวที่ให้ผลในการปกป้องการทำงานของตับและไต ดังนั้นจึงได้เลือกนำมาใช้ในการศึกษากลไกฤทธิ์ในการปกป้องอวัยวะทั้งสองในหนูเบาหวานต่อไป

สำหรับหนูที่ได้อาหารไขมันสูงนาน 7 สัปดาห์นั้น นอกจากสิ่งสกัดจากใบกะเพราจะช่วยลดไขมันในเลือดแล้วยังมีฤทธิ์ปกป้องอวัยวะสำคัญในภาวะไขมันในเลือดสูงด้วยเช่นกัน เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะไขมันในเลือดสูงนั้น มีผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะตับและหัวใจ จากผลการทดลองในตารางที่ 6 จะพบว่าการเพิ่มขึ้นของ serum AST, ALT, LDH และ CK-MB แสดงว่ามีการทำลายหน้าที่ตับและหัวใจในหนูที่ได้อาหารไขมันสูงนาน 7 สัปดาห์ น้ำมันหอมระเหยให้ผลในการลดเฉพาะ serum LDH และ CK-MB แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยให้ผลปกป้องการทำลายหัวใจในหนูได้อาหารไขมันสูง ส่วนสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำให้ผลลด serum enzyme ทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำสามารถให้ผลในการลดการทำลายตับและหัวใจได้ในหนูที่ได้อาหารไขมันสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเฉพาะน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำไปศึกษากลไกการปกป้องหน้าที่ตับ และหัวใจในหนูที่ได้อาหารไขมันสูงต่อไป รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีทั้งในน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ เพื่อใช้ในการอธิบายว่าองค์ประกอบใดที่น่าจะให้ผลดังกล่าว

การศึกษากลไกการปกป้องหน้าที่ของอวัยวะสำคัญของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกระเพราด้วยน้ำในหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงและหนูเบาหวาน

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าภาวะไขมันในเลือดสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิด

cardiovascular disease (37, 38) การเกิดอนุมูลอิสระหรือ reactive oxygen species (ROS) มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) และ coronary artery disease (CAD) (39,40) มีการศึกษาวิจัยพบว่าภาวะมีไขมันในเลือดสูงก่อให้เกิดอนุมูลอิสระปริมาณมากในเนื้อเยื่อหลายชนิดทั้งในตับ ไต และหัวใจ (41) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สิ่งสกัดกระเพราสามารถช่วยลดการทำลายตับจากโลหะหนัก (42) และปกป้องการเกิด myocardial necrosis จากการได้รับ isoproterenol ได้ (43) รวมทั้งกระเพรายังช่วยลดการทำลายตับที่เกิดจากสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ได้ด้วย (44) นอกจากนั้นกระเพราเองมีความปลอดภัยในการบริโภคสูง มีความเป็นพิษน้อย โดยความเป็นพิษจะเกิดได้เมื่อให้ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก มีงานวิจัยพบว่าเมื่อป้อนหรือฉีดสารสกัดกระเพราทั้งต้นด้วย 70% Ethanol ในหนูถีบจักร dose ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD₅₀) มีค่าเท่ากับ 4.5 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวและ 3.24 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ (45) สารสกัดใบกระเพราจากน้ำขนาด 0.5 มิลลิลิตร/จานเพาะเชื้อ ทดสอบใน *Bacillus subtilis* M-45, *B. subtilis* H-17 ไม่พบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (46).

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะพบว่าใบกระเพรามีฤทธิ์ในการปกป้องอวัยวะสำคัญของร่างกายในภาวะต่างๆได้ และไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกายดังกล่าว อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องตับและหัวใจในภาวะไขมันในเลือดสูงรวมทั้งยังไม่ทราบว่ายังมีประเภทยาเคมีใดที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจจะศึกษา และเนื่องจากการวิจัยเบื้องต้นที่ผ่านมาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบกระเพราให้ผลในการปกป้องหัวใจได้ดี ขณะที่สิ่งสกัดกระเพราด้วยน้ำจะให้ผลในการปกป้องการทำลายหัวใจและหน้าที่ตับในหนูที่เหนียวทำให้มีไขมันในเลือดสูงได้ ดังนั้นจึงนำเฉพาะน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกระเพราด้วยน้ำมาศึกษากลไกในการปกป้องอวัยวะทั้ง 2 อย่างจากผลการทดลองในตารางที่ 7 แสดงฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกระเพราด้วยน้ำในการลดไขมันในเลือดและลดอัตราเสี่ยงการเกิดหลอดเลือดแข็งตัวได้ และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถของน้ำมันหอมระเหยในการปกป้องตับและหัวใจ จะพบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถปกป้องหัวใจได้เท่านั้น โดยดูจากค่า LDH และ CK-MB ที่ลดลง (ตารางที่ 8) สำหรับสิ่งสกัดด้วยน้ำให้ผลลดทั้ง AST, ALT, LDH และ CK-MB โดยสามารถลดระดับ LDH และ CK-MB สู่ระดับปกติเช่นเดียวกับน้ำมันหอมระเหย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการช่วยปกป้องหัวใจ ส่วนสิ่งสกัดกระเพราด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการช่วยปกป้องทั้งหัวใจและตับในภาวะมีไขมันในเลือดสูงได้ ในขณะที่ยาลดไขมัน simvastatin ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว (ตารางที่ 6) ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า น้ำมันหอมระเหยและสิ่งสกัดกระเพราด้วยน้ำน่าจะใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดอัตราเสี่ยงการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว ซึ่งจะช่วยลดการเกิด coronary artery disease และปกป้องหัวใจและตับจากการทำลายในภาวะไขมันในเลือดสูงได้

เมื่อศึกษากลไกในการช่วยปกป้องหัวใจและตับ โดยวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation โดยดูจากค่า MDA จะพบว่าระดับ MDA เพิ่มขึ้นทั้งตับและหัวใจของหนูที่เหนียวน้ำให้มีไขมันในเลือดสูง (ตารางที่ 9) แสดงว่ามีการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้นทั้งตับและหัวใจในภาวะไขมันในเลือดสูง นอกจากนั้น antioxidant enzyme activity ต่างๆ เช่น GPx, CAT และ SOD ในตับก็ลดลง รวมทั้ง GPx และ SOD ในหัวใจลดลงเช่นกันในหนูที่เหนียวน้ำให้มีไขมันในเลือดสูง แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารไขมันสูงนาน 7 สัปดาห์ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำให้มีการทำลายตับและหัวใจ ซึ่งสามารถยืนยันได้ชัดเจนยิ่งขึ้นจากภาพถ่ายทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและหัวใจ ในรูปที่ 9 และ 10 น้ำมันหอมระเหยสามารถช่วยปกป้องการทำลายหัวใจในหนูที่เหนียวน้ำให้มีไขมันในเลือดสูงโดยกลไกเกิดจากน้ำมันหอมระเหยลดการสร้างอนุมูลอิสระและเพิ่ม antioxidant enzyme ทั้ง GPx, CAT และ SOD ในเนื้อเยื่อหัวใจ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่น่าจะออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดและปกป้องหัวใจ จะพบว่าในบรรดาองค์ประกอบเคมีทั้งหมดที่พบในน้ำมันหอมระเหยนั้น (ตารางที่ 22) เฉพาะ eugenol เท่านั้นที่มีรายงานวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด (47) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) จากการศึกษาด้วยวิธี DPPH assay (48) นอกจากนั้น eugenol ยังช่วยลดอัตราการตายของหัวใจ (cardiac apoptosis) ที่เกิดจากการทำลายของ isoproterenol (49) เป็นที่ทราบดีว่าการเกิด LDL oxidation เป็นตัวปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิด atherosclerosis (50) และพบว่าในภาวะไขมันในเลือดสูงจะมีการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation เพิ่มขึ้น (51) มีรายงานพบว่า eugenol สามารถยับยั้งการเกิด LDL oxidation และลดการเกิด lipid peroxidation (52) กลไกที่คาดว่า eugenol มีฤทธิ์เป็น antioxidant ได้ถูกศึกษาโดย Ito และคณะ (53) ซึ่งพบว่า eugenol ยับยั้งกระบวนการ iron-mediated lipid peroxidation และ copper dependent LDL oxidation แม้ว่าในน้ำมันหอมระเหยจะมี methyl eugenol ในปริมาณมากที่สุด แต่ไม่มีรายงานวิจัยศึกษายืนยันฤทธิ์ของ methyl eugenol ในการลดไขมันในเลือดและฤทธิ์เป็น antioxidant

สำหรับสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำนอกจากจะมีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดในหนูที่เหนียวน้ำให้มีไขมันในเลือดสูงได้แล้ว ยังมีฤทธิ์ในการปกป้องการทำลายตับและช่วยฟื้นตัวของหัวใจจากการทำลายของภาวะไขมันในเลือดสูงได้ด้วย ดังจะเห็นจากการทดลองในตารางที่ 8 และรูปที่ 9 และ 10 โดยกลไกที่สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำสามารถปกป้องอวัยวะทั้ง 2 ในภาวะไขมันในเลือดสูง คล้ายกับกลไกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย กล่าวคือลดการเกิด lipid peroxidation และเพิ่ม antioxidant enzyme activity ทั้งในตับและหัวใจ

สำหรับหนูเบาหวานได้มีการศึกษากลไกการปกป้องหน้าที่ตับ ไต และเพิ่มข้อมูลเกี่ยวกับการปกป้องหัวใจด้วย เนื่องจากมีงานวิจัยพบว่า ในภาวะเบาหวานนั้นไม่เฉพาะตับและไตเท่านั้นที่ถูกทำลาย หัวใจก็ถูกทำลายเช่นกัน (55) และพบว่าการให้ยาลดน้ำตาลในเลือดแก่หนูเบาหวานสามารถช่วยปกป้องหัวใจ และไตจากการถูกทำลายได้ (56) จากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อศึกษาว่าสิ่งสกัดใดของกะเพราที่มีฤทธิ์ปกป้องอวัยวะสำคัญในภาวะเบาหวาน ทีมวิจัยพบว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำมีฤทธิ์ช่วยบรรเทาการทำลายของอวัยวะทั้ง 2 ในภาวะเบาหวาน

ได้ (ตารางที่ 3) จึงได้เลือกเฉพาะสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำมาศึกษากลไกการปกป้องอวัยวะสำคัญ และเพิ่มข้อมูลเกี่ยวกับการปกป้องการทำลายหัวใจด้วย จากการวิจัยพบว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ถ้าเทียบกับก่อนให้สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ (รูปที่ 20) แต่ถ้าเทียบในสัปดาห์เดียวกันระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำจะต่ำกว่าหนูเบาหวานปกติเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำน่าจะมีฤทธิ์ในลักษณะการป้องกันไม่ให้อัตราน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานสูงต่อเนื่อง แต่จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของกะเพราในหนูเบาหวานมาจากวิธีการทดลองที่ต่างกัน เช่น บางการทดลองเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานด้วย STZ ใน dose ที่ทำให้อัตราน้ำตาลในเลือดอยู่ในระดับน้อยกว่า 200 mg/dl (165-170 mg/dl) จากนั้นจึงให้สิ่งสกัดกะเพรา (57) การที่ระดับน้ำตาลสูงไม่ถึง 200 mg/dl แสดงว่าความรุนแรงของการเป็นเบาหวานยังไม่มากนัก อาจจะยังมี β -cell เหลือมากพอที่กระเพาะจะกระตุ้นการหลั่ง insulin เพราะพบว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วย 80% ethanol หรือ ethyl acetate หรือ น้ำ สามารถกระตุ้นการหลั่ง insulin จาก isolated β -cell ได้ (58) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้เป็นการทดลองใน in vitro study แต่ถ้าป้อนสิ่งสกัดกะเพราเข้าหนูทดลอง (in vivo) การตอบสนองอาจจะเหมือนหรือแตกต่างจากนี้ได้ หรือในบางการทดลองจะเป็นการเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดเฉพาะเมื่อสิ้นสุดการทดลองระหว่างหนูเบาหวานที่ได้และไม่ได้สิ่งสกัดกะเพรา (สัปดาห์ที่ 4) (57, 59) โดยไม่ได้นำข้อมูลมาเทียบกับตอนก่อนให้กะเพรา ทำให้ไม่ทราบการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนสัปดาห์สุดท้าย ซึ่งถ้าทำการทดลองเช่นเดียวกับในงานวิจัยครั้งนี้ โดยตรวจระดับน้ำตาลอย่างต่อเนื่องทุกสัปดาห์ ก็ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลอย่างต่อเนื่องได้ ดีกว่าทำตอนสิ้นสุดการทดลองเท่านั้น นอกจากนี้ในการทดลองที่ผ่านมาโดยเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานด้วยการฉีด STZ ก่อนระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นจึงให้กะเพราผสมอาหารกินต่อเนื่อง ก็พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดไม่ลด แต่ถ้าให้กะเพราผสมอาหารก่อนแล้วจึงเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานภายหลังจะพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้กะเพราผสมอาหารทุกสัปดาห์ และระดับ plasma insulin ก็สูงกว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้กะเพรา (13) แสดงว่ากะเพรมีฤทธิ์ในลักษณะปกป้องการทำลาย β -cell จาก STZ ได้

เนื่องจากการศึกษาวิจัยหลายแห่งพบว่า ใบกะเพรมีฤทธิ์เป็น antioxidant ในการปกป้องอวัยวะต่างๆจากการถูกทำลายด้วยสารเคมีหรือในภาวะ stress conditions ต่างๆ เช่น ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายตับและไตจากสาร arsenic ในหนูทดลอง (60) หรือปกป้องตับจากการทำลายโดยยา paracetamol (15) หรือปกป้องหัวใจจากการเหนี่ยวนำให้เกิด myocardial infarction โดย isoproterenol (43) เป็นต้น แม้จะมีงานวิจัยแสดงว่ากะเพรมีฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ในภาวะต่างๆดังที่กล่าวมาแล้ว แต่ยังไม่มียานวิจัยที่แสดงผลและกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องอวัยวะสำคัญในภาวะเบาหวานโดยเฉพาะผลปกป้องหัวใจ รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีที่น่าจะเป็นตัวที่ออกฤทธิ์ก็ยังไม่มีการศึกษา จากการทดลองครั้งนี้พบว่าหนูเบาหวานมีการทำลายหน้าที่ ตับ ไต และหัวใจ โดยดูจากค่า serum enzyme ต่างๆที่เพิ่มขึ้นทุกตัวทั้ง AST,

ALT, LDH, CK-MB, creatinine และ BUN (ตารางที่ 12) ซึ่งตรงกับงานวิจัยอื่นๆ เช่นกัน (10, 56, 61) รวมทั้งพบว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำสามารถลดการสร้าง lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจ (ตารางที่ 13) ของหนูเบาหวาน และสามารถเพิ่ม antioxidant enzyme activity ในเนื้อเยื่อทั้งสามชนิดได้ และสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำยังสามารถบรรเทาความเสียหายของเนื้อเยื่ออวัยวะทั้งสามเมื่อตรวจจากพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของหนูเบาหวาน แสดงให้เห็นว่าสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการปกป้องความเสียหายต่อ ตับ ไต และหัวใจในหนูเบาหวานได้ ดังนั้นจะเห็นว่านอกจากสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำจะช่วยปกป้องการทำลาย ตับและหัวใจในหนูที่เหนียวนาให้มีไขมันในเลือดสูงแล้ว ยังสามารถช่วยปกป้องการทำลาย ตับ ไต และหัวใจในหนูเบาหวานด้วย โดยกลไกการปกป้องอวัยวะสำคัญเหล่านี้ทั้งในหนูที่เหนียวนาให้มีไขมันในเลือดสูงและหนูเบาหวานจะคล้ายคลึงกัน คือ เกิดจากการที่สิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ ลดการสร้างอนุมูลอิสระ และเพิ่ม antioxidant enzyme activity ในเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิด

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำที่อาจจะเป็นตัวออกฤทธิ์ในการลดไขมันและ/หรือปกป้องตับและหัวใจ จากรายงานศึกษาวิจัยต่างๆที่ผ่านมาพบว่าในใบกะเพรามีสารหลายชนิดทั้ง phenolic compound, fatty acid และ flavonoid เช่น ursolic acid, apigenin, vicianin, orientin เป็นต้น (34) จากการศึกษาวิจัยพบว่าในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำมีสารประกอบกลุ่ม phenolic compound ในปริมาณประมาณ 10% ของน้ำหนักสิ่งสกัดทั้งหมด แม้จะมีปริมาณอาจจะไม่มากมาย แต่เป็นที่ทราบดีว่าสารพวก phenolic compound มีฤทธิ์เป็น antioxidant สารกลุ่ม phenolic compound ที่ทีมวิจัยคาดว่าน่าจะเป็นตัวออกฤทธิ์คือ ursolic acid เพราะมีงานวิจัยพบว่าช่วยปกป้องอวัยวะสำคัญในภาวะต่างๆ ได้ (30, 31) อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่พบ ursolic acid ในสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ และเมื่อวิเคราะห์หาสาร flavonoid ที่มีรายงานวิจัยว่ามีฤทธิ์เป็น antioxidant เช่น apigenin, orientin, vicianin และมีงานวิจัยพบว่าในใบกะเพรามีสารสกัดเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ (32, 34) แต่เนื่องจากทีมวิจัยสามารถหาวิเคราะห์เฉพาะ apigenin เท่านั้นส่วน orientin และ vicianin นั้นไม่มี standard ที่จะนำมาใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบได้ เนื่องจากไม่มีบริษัทเคมีภัณฑ์ใดๆจำหน่าย อีกทั้งไม่มีนักวิจัยในประเทศ (เท่าที่สอบถาม) ที่มีสารดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงวิเคราะห์เฉพาะ ursolic acid และ apigenin จากผลการศึกษาที่เช่นเดียวกับ ursolic คือ ไม่พบ apigenin ในสารสกัดกะเพราด้วยน้ำ ดังนั้นฤทธิ์ในการปกป้องตับ ไต และหัวใจของสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำในหนูเบาหวานจึงไม่ใช่เป็นผลจากสารทั้ง 2 อาจเป็นไปได้ที่ฤทธิ์ในการปกป้องตับ ไต หัวใจในหนูเบาหวานและหนูที่เหนียวนาให้มีไขมันในเลือดสูงอาจจะเป็นผลจากสาร orientin, vicianin และ gallic acid เนื่องจากมีรายงานพบสารเหล่านี้ในใบกะเพรา และยังพบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็น antioxidant (32, 62, 63) ในการปกป้องอวัยวะสำคัญในภาวะต่างๆ ซึ่งน่าจะได้รับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบเหล่านี้ต่อไป ถ้าหากสามารถหา standard ของสารเหล่านี้มาใช้ในการวิเคราะห์ได้ ทีมวิจัยจะได้วิเคราะห์หาสารอื่นๆเพิ่มเติมอีกต่อไป

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดในหนูที่เหนี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูงและหนูเบาหวานโดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane

ไขมันจัดเป็นสารอาหารที่จำเป็นอย่างหนึ่งที่ร่างกายต้องการนำไปใช้เป็นสารให้พลังงาน ร่างกายจำเป็นต้องมีไขมันเป็นตัวละลายและช่วยในการดูดซึมวิตามินที่ละลายไขมัน ได้แก่ วิตามิน A,D,E,K ไขมันยังใช้เป็นฉนวนป้องกันความร้อน ช่วยยืดอวัยวะภายใน และป้องกันการกระทบกระเทือน ปกติไขมันมี 3 ชนิด คือ

cholesterol ร่างกายนำมาสร้างน้ำดีเพื่อใช้สำหรับย่อยไขมัน สร้างฮอร์โมนบางชนิดและเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์

triglyceride เป็นไขมันที่ให้พลังงานแก่ร่างกาย และเป็นรูปแบบไขมันที่ร่างกายเก็บสะสมไว้ เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานเมื่อจำเป็น

phospholipids ส่วนมากจะเป็น Phosphatidylcholine หรือ Lecithin หน้าที่ของ lecithin ในร่างกาย เช่น การเป็นสารประกอบของผนังเซลล์ ช่วยในการทำให้ไขมันแตกออกกลายเป็นหยดเล็กๆ และถูกย่อยได้ง่ายขึ้น

ปกติการนำพาหรือเคลื่อนย้ายของไขมันเหล่านี้จากอวัยวะหนึ่งไปยังอวัยวะหนึ่งผ่านทางกระแสเลือด จะต้องรวมอยู่กับโปรตีนเพื่อให้สามารถละลายอยู่ในน้ำเลือดได้ ซึ่งการอยู่รวมกับโปรตีนนี้จะเกิดเป็นสารประกอบที่เรียกว่า lipoprotein ซึ่งมีหลายชนิด สามารถแบ่งเป็นชนิดต่างๆโดยอาศัยความหนาแน่นที่ต่างกันได้เป็น 4 ชนิด คือ 1) chylomicron ทำหน้าที่ขนย้ายไขมัน triglyceride ที่ได้รับจากอาหารไขมันเข้าสู่กระแสเลือด 2) very low density lipoprotein (VLDL) เป็น lipoprotein หลักในการขนย้าย triglyceride ที่ร่างกายสังเคราะห์ไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย 3) low density lipoprotein (LDL) เป็น lipoprotein ที่ใช้ในการขนส่ง cholesterol ไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย (ซึ่งโดยส่วนใหญ่ cholesterol ในกระแสเลือดจะอยู่ในรูปของ LDL-cholesterol) ในกรณีที่มี cholesterol สูงเกินไป ก็อาจจะเกิดการสะสมของไขมันที่ผนังหลอดเลือดได้และเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด 4) high density lipoprotein (HDL) เป็น lipoprotein ที่ใช้ในการขนถ่าย cholesterol ส่วนเกิน จากเนื้อเยื่อรวมทั้งที่ผนังหลอดเลือดส่งกลับมาเผาผลาญที่ตับ ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้ cholesterol เกิดการสะสมที่บริเวณผนังหลอดเลือดได้ จึงจัด HDL เป็นไขมันชนิดดี

เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะไขมันในเลือดสูงเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายต่อชีวิต นั่นคือ ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) และนำมาสู่ภาวะ coronary artery disease (CAD) (1,2) กลุ่มโรคที่เรียกว่า metabolic syndrome เช่น เบาหวาน เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง ในปัจจุบันพบว่าคนไทยเป็นภาวะไขมันในเลือดสูงเพิ่มมากขึ้นทุกปีซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ แต่สาเหตุที่สำคัญเนื่องมาจากการดำเนินชีวิตประจำวันที่ต้องทำงานแข่งกับเวลา ไม่มีเวลาที่จะเลือกรับประทานอาหาร จึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารประเภท fast food เพราะสะดวกและเป็นอาหารที่ให้พลังงานสูง แต่มีไขมันสูงด้วย รวมทั้งไม่ค่อยได้ออกกำลังกาย เหล่านี้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือด

สูง ทำให้มีความเสี่ยงมากขึ้นที่จะเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) โดยเกิดจากการมีไขมันไม่ว่าจะเป็น cholesterol หรือ triglyceride สะสมที่ผนังหลอดเลือด ทำให้ผนังหลอดเลือดหนาขึ้น หลอดเลือดแข็งตัวไม่ยืดหยุ่นและตีบแคบลง ทำให้เลือดไหลผ่านได้น้อยลง ซึ่งจะทำให้หัวใจส่วนนั้นได้รับเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอเกิดเป็นเนื้อตาย เช่น การเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ซึ่งหากเกิดการอุดตันสนิทก็จะทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน หรือหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงสมองอุดตัน ทำให้สมองขาดเลือดเกิดเนื้อสมองตาย ผู้ป่วยมีอาการอัมพาตหรือเสียชีวิตได้ นอกจากนั้นการมีไขมันสูงในเลือดยังส่งผลให้มีการสะสมไขมันในตับและตับเสียการทำงาน มีรายงานวิจัยพบว่า ถ้าสามารถลดไขมันในเลือดได้จะทำให้ลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิด CAD และลดอัตราการตายได้ (64, 65)

วิธีที่ใช้ในการรักษาภาวะไขมันในเลือดสูงนั้นมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การรับประทานอาหารที่มีไขมันน้อย ออกกำลังกายสม่ำเสมอ แต่ถ้าทั้ง 2 วิธี ไม่สามารถลดไขมันในเลือดได้ จะเหลือทางเลือกสุดท้ายคือ การใช้ยา ที่นิยม คือ ยากลุ่ม Statin เป็นยาลด cholesterol แต่ยาเหล่านี้โดยส่วนใหญ่ หรือทุกกลุ่มจะทำให้เกิดผลข้างเคียงที่สำคัญ คือ การทำลายตับ และยาเหล่านี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีค่าการผลิตและการนำเข้าที่ราคาสูง ดังนั้นจึงมีความพยายามศึกษาวิจัยหาสารธรรมชาติที่สามารถลดไขมันในเลือดได้ และปลอดภัยโดยไม่มีผลต่ออวัยวะต่างๆ แม้มีรายงานการวิจัยพบว่าอะพอลิโพรตีนในเลือดได้ แต่ยังไม่ทราบว่ากลไกเป็นอย่างไร

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาในเบื้องต้นพบว่าในบรรดาสังสักรัตต่าง ๆ จากกะเพรานั้นทุกสิ่งสกัดสามารถลด total cholesterol ในเลือดของหนูเบาหวานและหนูที่ให้อาหารไขมันสูง (ตารางที่ 2 และ 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถ้าเปรียบเทียบผลของสังสักรัตกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆต่อระดับไขมันในเลือดทั้ง total cholesterol และ triglyceride ในหนูเบาหวานและหนูที่ให้อาหารไขมันสูง จะพบว่าสังสักรัตจากกะเพราด้วย hexane จะให้ผลในการลดไขมันทั้ง 2 ชนิด มากที่สุด และความสามารถนี้เหนือกว่า simvastatin ที่ลดได้เพียง total cholesterol แต่ไม่สามารถลด triglyceride ในหนูที่ให้อาหารไขมันสูง ดังนั้นทีมนักวิจัยจึงเลือกเฉพาะสังสักรัตกะเพราด้วย hexane มาศึกษาการลดไขมันในเลือดในหนูเบาหวานและหนูที่ให้อาหารไขมันสูง

จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงนาน 7 สัปดาห์มีระดับ total cholesterol, triglyceride และ LDL- cholesterol สูงกว่าหนูปกติ แต่ค่า HDL- cholesterol ต่ำกว่าหนูปกติ (ตารางที่ 15) การเพิ่มขึ้นของไขมันในเลือดส่งผลให้อัตราเสี่ยงของการเกิดหลอดเลือดแข็งตัวมากกว่าปกติด้วยโดยจะพบว่าการเพิ่มของ AI สังสักรัตกะเพราด้วย hexane สามารถลดระดับไขมันในเลือดและอัตราเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดแข็งตัวได้ แสดงว่าสังสักรัตกะเพราด้วย hexane น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ที่จะช่วยลดไขมันในเลือดในภาวะไขมันในเลือดสูงได้ และสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งซึ่งจะนำไปสู่การ

ตายจากโรคต่างๆ เช่น ความดันเลือดสูง CAD เป็นต้น และสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ยังไม่มีผลทำลายตับเพิ่มขึ้นอีกในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (ตารางที่ 6)

เป็นที่ทราบดีว่าระดับไขมันในเลือดขึ้นอยู่กับไขมันที่เข้าสู่กระแสเลือดและไขมันที่ขับทิ้งในอุจจาระหรือนำไปใช้โดยเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อนำไปใช้สร้างสารต่างๆ เช่น hormone ไขมันที่เข้าสู่กระแสเลือดนั้นมาจาก 2 แหล่งใหญ่ คือ อาหาร cholesterol ที่กินเข้าไปสู่ร่างกายว่ามีมากน้อยเพียงใด และจากการสังเคราะห์โดยตับ โดย 80% ของ cholesterol ในร่างกายรวมทั้งในเลือดสร้างมาจากตับ โดย enzyme HMG-CoA reductase เป็น enzyme สำคัญที่สุดในการควบคุมการสร้าง cholesterol ในตับ ส่วนไขมันที่ขับทิ้งในอุจจาระมีทั้งในรูปแบบของกรดน้ำดี (bile acid) และในรูปไขมัน cholesterol และ triglyceride จากการทดลองพบว่า cholesterol ในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง เพิ่มขึ้นกว่าหนูปกติมาก (ตารางที่ 16) โดย HMG-Co A reductase activity ในตับไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 17) รวมทั้งปริมาณอาหารที่หนูปกติและหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงกินก็ไม่แตกต่างกันเช่นกัน แสดงว่าหนูที่ได้รับอาหารที่มี cholesterol สูงนาน 7 สัปดาห์ มีการสะสมของ cholesterol ในตับ ซึ่งน่าจะมาจาก cholesterol ในอาหารที่กินเข้าไปมากกว่ามาจากการสร้างในตับ การวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของผู้อื่นที่พบการเพิ่มของ cholesterol ในตับ (66, 67) นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณขับทิ้งของ cholesterol ในอุจจาระ (ตารางที่ 16) และปริมาณ bile acid ในอุจจาระทั้ง cholic acid และ deoxycholic acid เพิ่มขึ้นด้วยในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (ตารางที่ 17) แสดงให้เห็นว่าหนู ที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีการนำ cholesterol ที่เข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากนำมาขับทิ้งออกเพิ่มขึ้นในรูปของ bile acid และขับทิ้งโดยตรงในอุจจาระด้วย สำหรับหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงและได้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะพบว่าระดับ cholesterol ในตับลดลง ร่วมกับ HMG-Co A reductase activity ในตับก็ลดลงด้วย โดยที่ปริมาณอาหารที่หนูกินไม่แตกต่างกันทั้งในหนูที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ปริมาณการขับทิ้ง cholesterol ในอุจจาระของหนูที่ได้รับหรือไม่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ก็ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการขับทิ้ง bile acid ก็ไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่ากลไกที่สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ช่วยลด cholesterol ในเลือดน่าจะมาจากการลดการทำงานของ HMG-CoA reductase ในตับ ทำให้ตับสร้าง cholesterol ลดลง ไม่ใช่มาจากการเพิ่มการขับทิ้งไขมันในอุจจาระ

นอกจากหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงจะมีระดับ cholesterol ในเลือดในตับ และในอุจจาระเพิ่มขึ้นแล้ว ยังมีระดับ triglyceride ในเลือดในตับ และในอุจจาระเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูปกติ (ตารางที่ 15-16) ปกติกลไกที่ระดับ triglyceride ในเลือดถูกควบคุมคล้ายคลึงกับการควบคุม cholesterol ในเลือด คือ ขึ้นอยู่กับอาหารและการสังเคราะห์จากตับ การดูดซึมจากลำไส้ และจากการทำงานของ lipoprotein lipase (LPL) ที่สลาย triglyceride ใน chylomicron ในกระแสเลือดให้เป็น fatty acid เข้าสู่เซลล์ไขมัน (adipocytes) นอกจากนั้น LPL ยังย่อยสลาย VLDL ให้เป็น lipoprotein ชนิดต่าง ๆ ในเลือด ได้แก่ LDL, HDL เป็นต้น ซึ่ง lipoprotein เหล่านี้จะนำไขมัน

cholesterol และ triglyceride ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ดังนั้น LPL จึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมไขมันในเลือด โดยเฉพาะ triglyceride และ VLDL จากการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีระดับ triglyceride เพิ่มขึ้นในเลือดในตับและในอูจจาระ แต่มี LPL ลดลงเมื่อเทียบกับหนูปกติ ผลการศึกษาวิจัยอื่นก็พบว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงจะมีระดับไขมันในเลือดสูงแต่มีระดับ LPL ลดลง (68,69) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ triglyceride ในเลือดเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง การให้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane แก่หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงสามารถช่วยลดระดับ triglyceride ในเลือดสู่ภาวะปกติพร้อมกับลด triglyceride ในตับ และเพิ่ม LPL โดย triglyceride ในอูจจาระยังคงไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่ากลไกการลดไขมันในเลือดของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงโดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane น่าจะเป็นผลจากการสังเคราะห์ triglyceride ที่ตับและเพิ่มการสลาย triglyceride โดย LPL

สำหรับหนูเบาหวานพบว่านอกจากระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นแล้ว ไขมันในเลือดก็สูงขึ้นด้วย ทั้ง total cholesterol, triglyceride, LDL- cholesterol ซึ่งนำมาสู่ภาวะอันตรายของการเกิดหลอดเลือดแข็งดังจะเห็นได้จากค่า AI ในหนูเบาหวานที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับหนูปกติ (ตารางที่ 19) กลไกที่หนูเบาหวานมีไขมันในเลือดสูงจะเกี่ยวข้องกับระดับ insulin และ insulin action ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่า insulin จะนำ glucose เข้า adipose cells แล้วนำไปสร้าง glycerol phosphate จากนั้นจะไปรวมกับ free fatty acid ซึ่งได้จากการสลาย triglyceride ใน chylomicron โดย LPL เพื่อนำไปใช้สร้าง triglyceride ใน adipose ต่อไป และ insulin ยังมีผลกระตุ้น LPL activity ในการสลาย triglyceride ใน chylomicron ให้ free fatty acid เพื่อนำไปสร้าง triglyceride นอกจากนั้น insulin ยังมีผลในการสร้างไขมันในตับด้วย การเปลี่ยนแปลงไขมัน ในเลือดของหนูเบาหวานอาจจะมาจากหลายสาเหตุ เช่น การสังเคราะห์จากตับ การดูดซึมไขมันจากลำไส้ อาหารที่กินเข้าไป เป็นต้น จากการทดลองพบว่าไขมันในตับทั้ง cholesterol และ triglyceride มีค่าลดลง ขณะที่พบไขมันทั้งสองข้างทั้งในอูจจาระมากขึ้น (ตารางที่ 20) รวมทั้งการขับทั้ง bile acid ในอูจจาระก็เพิ่มขึ้น มีงานวิจัยพบว่าสาเหตุหลักของการมีไขมันในเลือดสูงในหนูเบาหวานเกิดจากการกินอาหารในปริมาณมากกว่าปกติ (70) และพบว่าระดับไขมันที่เพิ่มขึ้นในหนูเบาหวานมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอาหารที่กินเพิ่มขึ้น (71) นอกจากนั้นยังพบว่ามีเพิ่มการสังเคราะห์ไขมันที่ลำไส้ (72) ทำให้เป็นปัจจัยที่เพิ่มไขมันในเลือดของหนูเบาหวาน การที่ปริมาณไขมันในตับของหนูเบาหวานลดลงน่าจะเป็นผลมาจากการสังเคราะห์ cholesterol ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่พบว่า HMG-CoA reductase activity ในตับหนูเบาหวานลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาวิจัยอื่น (73) การลดการสังเคราะห์ไขมันในตับของหนูเบาหวานเพื่อให้เกิดความสมดุลกับไขมันที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทางอาหารที่กินเข้าไปในปริมาณมาก และผลจากการสร้าง cholesterol ในตับที่ลดลง ตับจึงนำ cholesterol ไปสร้างเป็น bile acid ขับทิ้งในอูจจาระ จึงพบการเพิ่มปริมาณขับทิ้งของ bile acid ในหนูเบาหวาน นอกจากนั้นการที่หนูเบาหวานมีไขมันในเลือดสูงจึงต้องกำจัดออกโดยอาจจะผ่านมาทางน้ำดีขับทิ้งในอูจจาระ ทำให้มีไขมันขับทิ้งในอูจจาระเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยพบว่าระดับ cholesterol ที่สูงในเลือดหนูเบาหวาน

อาจจะมาจากการเพิ่มการสร้าง cholic acid ซึ่งเป็น bile acid ทำให้การดูดซึมไขมันที่ลำไส้เล็กเพิ่มมากขึ้น จนเกิดการเพิ่มของ cholesterol ในเลือดหนูเบาหวาน (74) อย่างไรก็ตามการเพิ่มการดูดซึม cholesterol ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ cholesterol ในเลือดหนูเบาหวานสูงขึ้น (75).

การให้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane แก่หนูเบาหวาน 3 สัปดาห์ สามารถลดไขมันในเลือดทั้ง cholesterol และ triglyceride และ LDL-cholesterol ซึ่งส่งผลให้ลดอัตราการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว (ตารางที่ 19) โดยกลไกการลดไขมันในเลือดไม่เกี่ยวกับการลดการสร้างไขมันจากตับ เนื่องจากพบว่าปริมาณ cholesterol ในตับของหนูเบาหวานที่ลดลงสามารถกลับเพิ่มขึ้นมาสู่ระดับปกติได้เมื่อได้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ส่วน triglyceride ในตับที่ลดลงก็เพิ่มกลับมาสู่ระดับใกล้เคียงกับค่าปกติ (ตารางที่ 20) นอกจากนี้พบว่า bile acid ที่ขับทิ้งในอุจจาระของหนูเบาหวานซึ่งมีค่าสูงกว่าหนูปกตินั้นกลับมีค่าลดลงเข้าสู่ระดับใกล้เคียงค่าปกติ (ตารางที่ 21) ขณะที่ปริมาณขับทิ้งของไขมันทั้ง 2 ชนิดในอุจจาระเพิ่มขึ้นกว่าหนูเบาหวานปกติทั้งที่ปริมาณอาหารที่กินไม่ได้แตกต่างจากหนูเบาหวานปกติ แสดงว่าการลดของไขมันในเลือดหนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane เป็นผลจากการดูดกลับของไขมันที่ลำไส้เล็กทำให้ไขมันขับทิ้งในอุจจาระมากขึ้น เมื่อไขมันถูกดูดซึมเข้าร่างกายลดลงจึงทำให้ตับเพิ่มการสร้างไขมันมากกว่าเดิม ดังจะเห็นว่า HMG-CoA reductase ในตับเพิ่มขึ้นใกล้เคียงค่าปกติในหนูเบาหวานที่ได้สิ่งสกัดกะเพราจาก hexane และเมื่อมีการเพิ่มการสร้างไขมันในตับ จึงลดการสร้าง bile acid ทำให้ bile acid ในอุจจาระลดลง bile acid ในอุจจาระที่ลดลงก็อาจเป็นอีกปัจจัยที่ลดการดูดกลับไขมันที่ลำไส้ในหนูเบาหวานที่ได้รับสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane อีกกลไกที่กะเพราช่วยลดไขมันในเลือดคือการเพิ่ม plasma LPL ซึ่งจะสลาย triglyceride ใน chylomicron ให้ free fatty acid เพื่อนำไปสร้าง triglyceride ใน adipose

จากการทดลองจะเห็นว่ากลไกการลดไขมันในเลือดโดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ในหนูที่ได้อาหารไขมันสูงและหนูเบาหวานจะแตกต่างกัน โดยในหนูที่ได้อาหารไขมันสูงนั้น สิ่งสกัดกะเพราจะลดไขมันในเลือดโดยกดการสร้างไขมันในตับ ขณะที่ในหนูเบาหวานการลดไขมันในเลือดเป็นผลมาจากการดูดซึมไขมัน ทำให้เพิ่มการขับทิ้งไขมันทางน้ำดีลงในอุจจาระ

สำหรับองค์ประกอบทางเคมีในกะเพราที่สกัดด้วย hexane ที่ออกฤทธิ์ในการลดไขมันเลือดทั้งหนูเบาหวานและหนูที่ได้อาหารไขมันสูงนั้น น่าจะเกิดจาก fatty acid ในกะเพราที่สกัดด้วย hexane จากผลการวิจัยพบว่า องค์ประกอบทางเคมีหลักในกะเพราที่สกัดด้วย hexane คือ linolenic acid และ linoleic acid ซึ่งเป็น polyunsaturated fatty acid และเป็น fatty acid ที่มีความสำคัญของร่างกาย (essential fatty acid) โดยมีงานวิจัยพบว่ามี polyunsaturated fatty acid หลายตัวที่ส่งผลในการช่วยลดไขมันในเลือด (76) มีรายงานศึกษาพบว่าสัตว์ที่ขาด fatty acid เหล่านี้ก็จะพบมีการเพิ่มของ HMG-CoA reductase activity ในตับ ส่งผลให้เพิ่มการสร้างไขมันในตับ และเมื่อให้ fatty acid เหล่านี้เข้าไปก็พบว่า HMG-CoA reductase ลดลงสู่ภาวะปกติ (77) เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ให้อาหารที่มี linolenic acid แก่หนูที่ได้อาหารไขมันสูง ก็

พบว่าสามารถลด cholesterol ในเลือดหนูได้ (78, 79) โดยกลไกการลดไขมันในเลือดมาจากการลดการทำงานของ HMG-CoA reductase ในตับในหนูที่ได้อาหารไขมันสูง (79) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยในครั้งใหม่ที่พบว่าการลด HMG-CoA reductase ในตับของหนูที่ได้อาหารไขมันสูง นอกจากนั้นยังมีงานวิจัย พบว่า linolenic acid สามารถลดการดูดซึมของไขมันที่ลำไส้เล็กได้ด้วย (80) ซึ่งอาจจะเป็นกลไกสำคัญของการลดไขมันในเลือดในหนูเบาหวาน

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ไม่มีสิ่งกีดขวางด้วยตัวทำละลายใดที่สามารถลดน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานเมื่อเทียบกับก่อนให้สิ่งกีดขวาง ส่วนฤทธิ์ในการปกป้องอวัยวะสำคัญทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่ได้อาหารไขมันสูงมาจากสิ่งสกัดกะเพราด้วยน้ำ โดยน่าจะเป็นผลมาจากสารพวก phenolic compound แต่ไม่ใช่ ursolic acid หรือ apigenin นอกจากนั้นสิ่งกีดขวางด้วยตัวทำละลายต่างๆ ยังมีฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือดทั้ง cholesterol และ triglyceride ทั้งในหนูเบาหวานและหนูที่ได้อาหารไขมันสูง โดยส่วนมากฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือดมาจากสิ่งสกัดกะเพราประเภทน้ำมัน โดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane จะให้ผลมากที่สุด polyunsaturated fatty acid ในกะเพราที่สกัดด้วย hexane คือ linolenic acid และ linoleic acid น่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือด อีกทั้งกลไกในการลดระดับไขมันในเลือดโดยสิ่งสกัดกะเพราด้วย hexane ในหนูเบาหวานและหนูที่ได้อาหารไขมันสูงจะแตกต่างกัน ดังนั้นจะเห็นว่าฤทธิ์ของกะเพราในการลดระดับไขมันในเลือดและการปกป้องอวัยวะสำคัญนั้นจะมาจากองค์ประกอบของสารเคมีของกะเพราที่ต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Barnett A. Management of lipids in patients with diabetes. *Diabetes Obes Metabolism*. 5 (suppl 1) : S 3-S 9,2003.
2. Isomaa B, A Imgren P, Tuomi T. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 24 : 683-689 (2001)
3. Mokdad AH, Serdula MK, Diets WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemic of obesity in the United States. *JAMA*. 284 : 1650-1651, 2000.
4. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025 : prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 21 : 1414-1431, 1998.
5. American Diabetes Association. Clinical practice recommendation. *Diabetes Care* 20 (suppl 1) : S1-S70,1997.
6. Farnsworth NR. The development of pharmacological and chemical research for application of traditional medicine in developing countries *J Ethnopharmacol*. 2 : 173-181,1980.
7. Rai V, Iyer U, Mani UV. Effect of Tulsi (*Ocimum sanctum*) leaf powder supplementation on blood sugar levels, serum lipids and tissue lipids in diabetic rats. *Plant Foods Human Nutrition*. 50 (1) : 9–16,1997.
8. Chattopahyay RR. A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *J Ethnopharmacol* 67 : 367–372,1999.
9. Vats V, Yadav LP, Grover JK. Ethanol extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin–induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J Ethnopharmacol*. 90 : 155–160, 2004.
10. Ali Mahdi A., Chandra A., Kumar Singh R., Shukla S., Mishra L.C., Ahmad S. Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats. *Indian J Clin Biochem*. 18 (2) : 8-15, 2003.
11. Agrawal P, Rai V, Singh RB. Randomized placebo-controlled, single blind trial of holy basil leaves in patient with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34 : 406-9,1996.
12. Sarkas A, Lavania SC, Pandey DN, Pant MC. Changes in the blood lipid profile after administration of *Ocimum Sanctum* (Tulsi) leaves in the normal albino rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol* 38 (4) : 311–312, 1994.

13. Suanarunsawat T and Songsak T . Anti-hyperglycemic and anti-dyslipdeamic effect of dietary supplement of white *Ocimum sanctum* Linn. before and STZ-induced diabetes mellitus. *Int. J. Diabetes Metabolism*. 13 : 18-23, 2005.
14. Sharma MK, Kumar M, Kumar A. *Ocimum sanctum* aqueous leaf extract provides protection against mercury induced toxicity in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol*. 40 : 1079-1082, 2002.
15. Chatopadhyay RR, Sarkar SK, Ganguly S, Medda C, Basu TK. Hepatoprotective activity of *ocimum sanctum* leaf extact against paracetamol induced hepatic damage in rats. *Ind J pharmacol* 24 : 163-165, 1992.
16. Sethi J, Sood S, Seth S, Talwar A. Evaluation of hypoglycemic and antioxidant effect of *Ocimum sanctum*, *Indian. J Clin Biochem* 19 : 152-155, 2004.
17. Geetha, R Kedlaya., D.M. Vasudevan. Inhibition of lipid peroxidation by botanical extracts of *Ocimum sanctum* : In vivo and in vitro studies. *Life Sci*. 76:21-28, 2004.
18. Ohgawa, H., Ohishi, N., and Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by Thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 95 , 351-358, 1979.
19. Tapple A.L. Glutathione peroxidase and hydroperoxidase methods, *in Methods in Enzymology, Vol II*, eds. By Sidney, F., and Lester, P. Academic Press., New York, pp. 506-513, 1978.
20. Winterbourn, CC, Hawkings, RE, Brain, M., Canell, RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*. 85: 337-341,1975.
21. Luck, H. Catalase, *in Method for Enzymatic Analysis, Vol 3*, ed. By Han-Ulrich Bergmeyer, Academic Press., New York and London, pp. 885-888, 1965.
22. Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL., Randall, J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193 : 265-275, 1954.
23. Humanson, GL. Part I Basic procedure, *in Animal tissue technique*, 4th ed, ed. By Freeman W.H. and company, San Francisco, pp 1-129, 1979.
24. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957.
25. Hulcher FH and Oleson WH. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. *J Lipid Res*. 14 : 625-634,1973.

26. Xie W, Wang W, Su H, Xing D, Cai G, Du L. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice : different from fibrates but similar to statin. *J Pharmacol Sci.* 103 : 267-274, 2007.
27. Tinnikov AA and Boonstra R. Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma using microplate reader. *Clin Chim Acta.* 281 : 159-162, 1999.
28. Mosbach EH, Kalinski HJ, Halpern E , Kendall FE. Determination of deoxycholic and cholic acids in bile. *Arch Biochem Biophys.* 51 :402-409,1954.
29. Rizvi F, Puri A, Bhatia G, Khanna AK, Wulff EM, Rastogi AK, Chander R. Antidyslipidemic action of febrate in dyslipidemic-diabetic hamster. *Biochem Biophys Res Commun.* 305 : 215-222, 2003.
30. Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine.* 10 : 115-121, 2003.
31. Saravanan R, Viswanathan P, Pugalendi KV. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats *Life Sci.* 78 : 713-71, 2006.
32. UmaDevi P, Ganasoundari A, Vrinda B, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. Radiation protection by the *Ocimum* flavonoids orientin and vicenin : mechanisms of action. *Radiat Res* 154 : 455-460, 2000.
33. Han LK, Sumiyoshi M, Zheng YN, Okuda H, Kimura Y. Anti-obesity action of *Selix matsudana* leaves (part 2). Isolation of anti-obesity effectors from polyphenol fractions of *Selix matsudana*. *Phytother Res* 17 :1195-1198, 2003
34. Gupta SK, Yadav DK, Siripurapu KB, Palit G, Maurya, R. Constituents of *Ocimum sanctum* with antistress activity. *J Nat Prod.* 70 : 1410-1416, 2007.
35. Kumar G, Banu S, Murugesam AG. Influence of *Helicteres isora* administration for diabetes mellitus : the effect o changes in tissue fatty acid composition. *Food Chem Toxicol.* 47 (8) : 1826-1830, 2009.
36. Barcelli UO, Weiss M, Beach D, Motz A, Thompson B. High linoleic acid diets ameliorate diabetic nephropathy in rats. *Am J Kid Dis.* 16 : 244-251 ,1990.
37. Freedman, JE. High-fat diets and cardiovascular disease. *J Am Col Cardiol.* 41: 1750-1752, 2003.
38. Khoo KL, Tan IT, Liew YM, Deslypere JP, Janus E. Lipids and coronary heart disease in Asia. *Atherosclerosis.* 169, 1-10, 2003.

39. Kwiterovich PO. The effect of dietary fat, antioxidants, and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. J Am Diet Assoc. 97 (suppl), S31- S41, 1997.
40. Tribble DL. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease : emphasis on vitamin C, vitamin E, and β -carotene : A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation. 99 : 591-595, 1999.
41. Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. Antioxidant efficiency of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. Redox. Rep. 9 (2) :105-110, 2004.
42. Sharma, MK, Kumar, M, Kumar A. *Ocimum sanctum* leaves extract provides protection against mercury induced toxicity in Swiss albino mice. Indian J Exp Biol. 40 : 1072-1082, 2002.
43. Sood S, Narang D, Dinda, AK, Maulik, SK. Chronic oral administration of *Ocimum sanctum* Linn. augments cardiac endogenous antioxidants and prevents isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. J Pharma Pharmacol. 57 : 127-133, 2005.
44. Manikadan P, Murugan RS, Abbas H, Abraham SK, Nagini S. *Ocimum sanctum* Linn. (Holi Basil) ethanol leaf extract protects against 7,12-dimethylbenz [a] anthracene-induced genotoxicity , oxidative stress, and imbalance in xenobiotic-metabolizing enzymes. J Med Food 10 : 495-502, 2007.
45. Bhargava KP and Singh N. Anti-stress activity of *Ocimum sanctum* Linn. Indian J Med Res. 73 : 51-443, 1981.
46. Ungsurungsie, M. et. al. Mutagenicity screening of popular Thai spices. Food Chem Toxicol. 20 : 527-30, 1982.
47. Germán C, Leticia G, Adrián S, Fernando L, Maria S, Elizdath M, Francisco D, Joaquin T. Hypolipidemic activity of dimethoxy unconjugated propenyl side-chain analogs of α -asarone in mice. Drug Dev Res. 43 : 105-108, 1998.
48. Teresa, M., Trevison, S., Goretti, M., Silva, V., Pfundstein, B., Spiegelhalder, B., and Owen, R.W. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. J Agric Food Chem. 54 : 4378-4382, 2006.

49. Choudhary R, Mishra KP, Subramanyam C. Interrelations between stress and calcineurin in the attenuation of cardiac apoptosis by eugenol. *Mol Cell Biochem.* 283 : 115-122, 2006.
50. Steinberg, D.: Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis. *Adv Ex Me Biol.* 369 : 39-48, 1995.
51. Özsoy MB, and Pabuçcuoğlu A. The effect of acetaminophen on oxidative modification of low-density lipoproteins in hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Bioche Nutr.* 41 : 27-31, 2007.
52. Teissedre, PL., and Waterhouse, A.L. : Inhibition of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in different essentials varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3801-3805, 2000
53. Ito M, Murakami K, Yoshino M. Antioxidant action of eugenol compounds : role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem Cell Toxicol.* 43 : 461-466, 2005.
54. Senthil S, Chandramohan G, Pigalendi KV. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia. *Int J Cardiol* 119 (1) : 131-133, 2007.
55. Zhao X, Bassirat M, Zeinab K, Helme RD. Effect of diabetes on creatine kinase activity in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Med J (Eng).* 112 (11) : 1028-1031 , 1999.
56. Muruganandan S., Gupta S., Kataria M., Lal J., Gupta PK. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology.* 176 (3) :165-173, 2002.
57. Hassain EHMA, Jamil K Rao M. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of Tulsi (*ocimum sanctum* Linn.) on streptozotocin induced diabetes rats. *Indian J Clin Biochem.* 16 : 190-194 , 2001.
58. Hannan JMA, Marenah L, Ali L, Rokeya B, Flatt PR, Abdel-Wahab YHA. *Ocimum sanctum* leaf extracts stimulate insulin secretion from perfused pancreas, isolated and clonal pancreatic β -cells. *J Endocrinol.* 189 : 127-136, 2006.
59. Narendhirakannan RT, Subramanian S, Kandaswamy M. Biochemical evaluation of antidiabetogenic properties of some commonly used Indian plants on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33 : 1150-1157, 2006.

60. Banu GH, Kumar G, Murugesan AG. Effects of leaves extract of *Ocimum sanctum* L. on arsenic-induced toxicity in Wistar albino rats. *Food Chem Toxicol.* 47 : 490-495 ,2009.
61. Taleb-Senouci D, Ghomari H, Krouf D, Bouderbala S, Prost J, Lacaille-Dubois MA, Bouchenak M. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 16 : 623-631, 2009.
62. Jadon A, Bhadauria M, Shukla S. Protective effect of *Terminalia belerica* Roxb. and gallic acid against carbon tetrachloride induced damage in albino rats. *J Ethnopharmacol.* 109 : 214-218, 2007.
63. Fu XC, Wang X, Zheng H, Ma LP. Protective effects of Orientin on myocardial ischemia and hypoxia in animal models. *Nan Fang Yi Ke. Da Xue Xue Bao.* 27 : 1173-1175, 2007.
64. Levine GN, Keaney JF, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Eng J Med.* 332 : 512-521, 1995.
65. Kwoiterovich PO Jr. The effect of dietary fat, antioxidant and pro-oxidants on blood lipids, lipoprotein and atherosclerosis. *J Am Diet Assoc.* 97 (suppl) : S31–S41,1997.
66. Huang X, Tang J, Zhou Q, Lu Hanping, Wu Y, Wu W. Polysaccharide from Fuzi (FPS) prevents hypercholesterolemia in rats. *Lipids in Healths and Disease* 9 :9, 2010.
67. Cho IJ, Lee C, Ha TY. Hypolipidemic effect of soluble fiber isolated from seeds of *Cassia tora* Linn. In rats fed with high-cholesterol diet. *J Agric Food Chem.* 55 : 1592-1596 , 2007.
68. Jin J, Zhang Y, Hu WX, Zhang ZY, Xu NN, Zhou QL. Effect of Huanglian Jiedu decotion on blood lipid metabolism and its related gene expressions in rats with hyperlipidemia. *Zhong Xi Yi. Jie He Xue. Bao.* 8 : 1275-279, 2010.
69. Chen G, Luo YC, Li BP, Li B, Guo Y, Li Y, Su W, Xiao ZL. Effect of polysaccharide from *Auricularia auricular* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci.* 73 (6) : H103-108, 2008.
70. Young NL, McNamara DJ, Saudek CD, Krasovsky J, Lopez DR, Levy G. Hyperphagia alters cholesterol dynamics in diabetic rats. *Diabetes.* 32 : 811-819, 1983.

71. Young NL, Lopez DR, McNamara DJ, Benavides G. Evalution of the contribution of dietary cholesterol to hypercholesterolemia in diabetic rats and of sitosterol as a recovery standard for cholesterol absorption. *Lipid Res.* 26 : 62-69, 1985.
72. Young NL, Lopez DR, McNamara DJ. Contributions of absorbed dietary cholesterol and cholesterol synthesized in small intestine to hypercholesterolemia in diabetic rats. *Diabetes.* 37 : 1151-1156, 1988.
73. Stanely P, Prince M, Kannan NK. Protective effect of rutin on lipids, lipoproteins, lipid metabolizing enzymes and glycoproteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 58 : 1373-1383, 2006.
74. Uchida K, Satoh T, Takase H, Nomura Y, Takasu N, Kurihara H, Takeuchi N. Altered bile acid metabolism related to atherosclerosis in alloxan diabetic rats. *Theroscler Thromb.* 3 : 52-58, 1996.
75. Das UN. Essential fatty acids as possible mediators of action of statin. *Prostaglandids Leukot Essent Fatty Acids.* 65 : 37-40, 2001.
76. Tanphaichitr V. Pakpeankitvatana R, Leelahagul P. influence of polyunsaturated fatty acids on lipoprotein metabolism In : Shepherd J. Packard CJ. Brownle SM. Eds. *Cardiovascular disease: current perspectives on the Asian—Pacific region.* Macclesfield : Gardiner – Caldwell Communication Ltd. 217 – 21, 1994.
77. Jang A, Srinivasan P, Lee NY, Song HP, Lee JW, Lee M, Jo C : Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acidsilinoic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Sle mice. *Chem Biol Interact* 174 : 109-117, 2008.
78. Vyaimohan, K, Jainu M, Sabitha KE, Subramainiyam S, Anandhan C, Shyamala Devi CS : Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flax seed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sci* 79 : 448-454, 2006.
79. Du c, Sato A, Watanabe S, Wu C, Ikemoto A, Ando K, Kikugawa K, Fujii Y, Okuyama H. Cholesterol synthesis in mice is suppressed but lipofuscin formation is not affected by long-term feeding of n-3 fatty acid-enriched oils compared with lard and n-6 fatty acid-enriched oils. *Biol Pharm Bull* 26 : 766-770, 2003.
80. Lam CK, Chen J, Cao Y, Yang L, Wong YM, Yeung SYV, Yao X, Huang Y, Chen ZY. Conjugated and non-conjugated octadecaenoic acids affect differently intestinal acyl coenzyme A : Cholesterol acyltransferase activity. *Atherosclerosis* 198 : 85-93, 2008.

Output ที่ได้จากโครงการ

ได้นำผลงานงานวิจัยที่ได้ไปใช้ประโยชน์หลายด้าน ได้แก่

1. การเผยแพร่ผลงานวิจัยในลักษณะการตีพิมพ์เผยแพร่

ผลงานวิจัยที่ทำไปแล้ว ได้ส่งตีพิมพ์ 3 เรื่อง โดย 2 เรื่อง ได้รับการตีพิมพ์แล้ว อีก 1 เรื่อง ส่งไปแล้ว และได้รับการตอบรับค่อนข้างดี เพียงแต่ให้เพิ่มข้อมูลบางส่วนแล้วส่งกลับไปอีกครั้ง และอีก 1 เรื่องอยู่ในระหว่างการตรวจทานแก้ไขข้อความก่อนจะส่งในเร็ว ๆ นี้

1.1 Anti-lipidemic actions of Essential oil extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with high cholesterol diet. *J. Appl. Biomed.* 7 : 45-53, 2009.

1.2. Organ Protective and Lipid-lowering Activities of Essential Oils Extracted from *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed with a High Cholesterol Diet. *J. Clin. Biochem. Nutri.* 46 : 52-59ม 2010.

1. 3. Evaluation of Antioxidant and Anti-lipidemic Activity of Aqueous Extracts from *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed with a High Cholesterol Diet (revise เพิ่มข้อมูล และกำลังส่งกลับไปอีกครั้ง)

งานวิจัยที่เขียนเสร็จแล้วรอการตรวจแก้ไข และกำลังจะส่ง submit เร็ว ๆ นี้ อีก 1 เรื่อง

2. รางวัลงานวิจัยของโครงการนี้ที่ให้นักศึกษาทำและได้รับรางวัลงานวิจัย หรือ ได้รับคัดเลือกให้นำเสนอแบบ **oral presentation** ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ได้แก่

2.1 รางวัลวิจัยยอดเยี่ยม นักศึกษาสาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2551

2.2 รางวัลวิจัยยอดเยี่ยม นักศึกษาสาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2552

2.3 นักศึกษาได้รับคัดเลือกให้ได้รับทุนการศึกษาสนับสนุนการวิจัย ในการนำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 38th Annual Meeting of Physiological Society of Thailand. Imperial Phukaew Hill Resort, Phetchabun, Thailand. April 1-3, 2009.

2.4 นักศึกษาได้รับคัดเลือกนำเสนอแบบ oral presentation ในงานประชุมวิชาการ The 4th World Congress on regenerative medicine : Current Regenerative Medicine. จะจัดที่ Bangkok Convention Center, Central World, Bangkok, Thailand Mach,2009.

3. ผลงานวิจัยได้นำเสนอในงานประชุมวิชาการ 10 ครั้ง คือ

3.1 Hypocholesterolemic action of *Ocimum sanctum* Linn. Leaf powder in rats fed with high cholesterol diet. นำเสนอในงานประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 36 สรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ณ โรงแรมวรบุรี จ.พระนครศรีอยุธยา วันที่ 25-27 เมษายน 2550 เป็นงานวิจัยเบื้องต้นเพื่อ

ศึกษาว่าผงใบกะเพราที่มีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดได้หรือไม่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาผลของสารสกัดจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายต่างๆว่ามีสารสกัดใดที่ให้ผลลดระดับไขมันในเลือดในหนูที่เหนี่ยวนำให้มีไขมันในเลือดสูง

3.2 Glycemic and lipideamic effect of various crude extracts and essential oil of *Ocimum sanctum* L. in diabetic rats นำเสนอในงานประชุมวิชาการของ สกว. นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส เมื่อวันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ที่พัทยา จ.ชลบุรี

3.3. Lipid lowering actions of various crude extracts from *Ocimum sanctum* Linn. Leaf powder in rats fed with high cholesterol diet. นำเสนอในงานประชุมวิชาการของ สกว. นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เมื่อวันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 ที่พัทยา จ.ชลบุรี

3.4. Anti-Hyperlipidemic Action of Essential oil from *Ocimum sanctum* Linn. Leaves in Rats Fed with High Cholesterol Diet. นำเสนอในงานประชุมวิชาการของ สกว. นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เมื่อวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ที่พัทยา จ.ชลบุรี

3.5. Anti-Hyperlipidemic Action of Essential oil from *Ocimum sanctum* Linn. Leaves in Rats Fed with High Cholesterol Diet. นำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 37th Annual Meeting of Physiological Society of Thailand ณ. Garden Sea View Resort , Pattaya, Chonburi May 7-9, 2008.

3.6. Anti-lipidemic and Organ Protective Effect of *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. The 4th World Congress on regenerative medicine : Current Regenerative Medicine. จะจัดที่ Bangkok Convention Center, Central World, Bangkok, Thailand Mach, 2009. (poster presentation)

3.7. Anti-lipidemic Effects of Hexane Extract of *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed with High Fat Diet. The 4th World Congress on regenerative medicine : Current Regenerative Medicine. จะจัดที่ Bangkok Convention Center, Central World, Bangkok, Thailand Mach, 2009. (oral presentation)

3.8. Anti-lipidemic Action of *Ocimum sanctum* L. Leaf oil in Rats Fed with High Fat Diet. นำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 38th Annual Meeting of Physiological Society of Thailand. Imperial Phukaew Hill Resort, Phetchabun, Thailand. April 1-3, 2009.

3.9 Anti-lipidemic and Organ Protective Effect of *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. นำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 38th Annual Meeting of Physiological Society of Thailand. Imperial Phukaew Hill Resort, Phetchabun, Thailand. April 1-3, 2009.

3.10 Anti-lipidemic and Organ Protective Effect of *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. Proceedings of The 36th International

Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009). Functional of Life : Elements and Integration. 59 : Supp 1, 2009. July 27th -1August 1th,2009, Kyoto, Japan.