

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของยาดำและยาดำสะตุต่อไรทะเล  
Acute toxicity testing of YA-DAM and YA-DAN-SA-TU by using Brine shrimp lethality assay

ศรายุทธ สถานอุ้น<sup>1</sup>

Email: sarayut@acttm.ac.th

สุจิตา โอภาณี, ภาณุมาศ สมสกุล, ปิยวรรณ สุภาเวหา, ภาวิณี ยืนตน, เยี่ยมยุทธ ยั่งยืน, ธัญญารัตน์ บุญสอน, พัชรี อาจใจ, วีรพันธ์ เจือจันทร์, เสาวนีย์ จงจันทร์ศรี, อรรษรัตน์ แสงคำ, อัญญา คำเพราะ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี

### บทคัดย่อ

ยาดำเป็นพืชมหัศจรรย์ที่ได้จากพืชจำพวกว่านหางจระเข้ นำมาแทรกเป็นยาถ่ายในตำรับยาไทยหลายตำรับ ก่อนนำมาใช้ตำราเภสัชกรรมแผนไทยระบุไว้ว่าจะต้องผ่านกระบวนการสะตุเพื่อลดความเป็นพิษของตัวยาก่อน การสะตุยาดำเป็นการนำยาดำมาผ่านความร้อน มีวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ 1) การสะตุด้วยน้ำเปล่า 2) การสะตุด้วยการห่อใบชา และ 3) การสะตุด้วยน้ำมะกรูด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Lethality concentration; LC50) ของยาดำและยาดำสะตุโดยใช้ Brine shrimp lethality assay และเปรียบเทียบความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC50) ของยาดำที่ผ่านการสะตุแล้วทั้ง 3 วิธี โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 10, 100, 1000 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณค่า LC50 โดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรง เปรียบเทียบค่า LC50 ของสารละลายยาดำและยาดำสะตุ ทั้ง 3 วิธี โดยใช้ สถิติ one-wayanova ผลการวิจัยพบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงสารละลายยาดำมีค่า LC50 เท่ากับ  $4.61 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยาดำที่สะตุด้วยน้ำเปล่าใบชาและน้ำมะกรูดมีค่า LC50 เท่ากับ  $4.73 \times 10^4$   $4.81 \times 10^4$  และ  $4.78 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง สารละลายยาดำมีค่า LC50 เท่ากับ  $4.19 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยาดำที่สะตุด้วยน้ำเปล่าใบชาและน้ำมะกรูดมีค่า LC50 เท่ากับ  $4.41 \times 10^4$  และ  $4.33 \times 10^4$   $4.34 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สรุปผลการวิจัย: สารละลายยาดำที่สะตุด้วยใบชามีค่า LC50 มากที่สุดแสดงว่ามีค่าความเป็นพิษเฉียบพลันต่อไรทะเลน้อยที่สุดส่วนสารละลายยาดำที่ยังไม่ผ่านการสะตุมีค่า LC50 น้อยที่สุดแสดงว่ามีพิษเฉียบพลันต่อไรทะเลมากที่สุดและยาดำหลังสะตุแล้วสามารถลดความเป็นพิษของยาลงได้จริง ( $p = 0.023$ )

**คำสำคัญ:** ความเป็นพิษเฉียบพลัน, ยาดำ, สะตุ

### Abstract

Ya-Dam is a herbal drug, which derived from aloe vera latex, was widely used in Thai Traditional recipes as a strong laxative drug. According to Thai traditional pharmacy, Ya-Dam should pass Sa-Tu process, which applied heat to herbal drug for detoxification before using. There are 3 different methods which are 1) using water 2) wrapping with galangal leaves and 3) using Kaffir lime juice. In this study was investigating the cytotoxicity of Ya-Dam by using Brine Shrimp Lethality Testing, also compared with the result of before and after passed Sa-Tu process, and compared with the result of 3 methods at concentration 10, 100,

1000 1,000 µg/ml . LC50 were determined by using linear regression equation and were compared by using one-way anova statistic. The results shown that at 6-hour LC50 of YA-Dam solution =  $4.61 \times 10^4$  µg/ml and Ya-Dam Sa-Tu with water, Ya-Dam Sa-Tu with galangal leaves, and Ya-Dam Sa-Tu with Kaffir lime juice indicated  $4.73 \times 10^4$ ,  $4.81 \times 10^4$ ,  $4.78 \times 10^4$  µg/ml respectively. At 12-hour LC50 of YA-Dam solution =  $4.19 \times 10^4$  µg/ml and Ya-Dam Sa-Tu with water, Ya-Dam Sa-Tu with galangal leaves, and Ya-Dam Sa-Tu with Kaffir lime juice indicated  $4.41 \times 10^4$ ,  $4.33 \times 10^4$ ,  $4.34 \times 10^4$  µg/ml respectively. In conclusion, Sa-Tu process decreases the toxicity of Ya-dam. Besides, Sa-Tu by wrapping with galangal leaves shown the highest efficacy. (p= 0.023)

**Keywords:** Lethality concentration50, aloe vera latex, SA-TU

## บทนำ

ยาดำ เป็นพฤษภวัตถุมีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีดำ ได้มาจากพืชจำพวกว่านหางจระเข้คือ *Aloe barbadensis* Miller, *Aloe ferox* Miller และ *Aloe perryi* Baker ส่วนใบของว่านหางจระเข้เมื่อตัดจะให้ส่วนที่เป็นวุ้นและส่วนที่เป็นน้ำยางสีน้ำตาลอมเหลือง ยาดำคือพฤษภวัตถุที่ได้จากส่วนที่เป็นน้ำยางสีน้ำตาลอมเหลืองนำมาเคี้ยวบนไฟจนข้นเหนียวแล้วผึ่งแดดให้แห้ง มีสรรพคุณเป็นยาระบาย ถ่ายลมเบี่ยงสูงให้ลงต่ำ (ชยันต์ พิเชียรสุนทรและคณะ, 2558) พบสารสำคัญกลุ่มแอนทราควิโนนที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายได้แก่ barbaloin และ isobarbaloin (Smith T&Smith H, 1851) ยาดำใช้แทรกเป็นส่วนประกอบในตำรับยาไทยหลายตำรับ ยกตัวอย่าง ตำรับยาทิพภาค ตำรับยาทาพระเส้น (ชยันต์ พิเชียรสุนทรและคณะ, 2558) ตำรับยาดีเกลือฝรั่ง ตำรับยาธรณีสันตะฆาต ตำรับยามหาจักรใหญ่ ตำรับยาเบญจอมฤต เป็นต้น (มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิมฯและโรงเรียนอายุรเวทธารัง, 2552)

ตำราเภสัชกรรมไทยกล่าวว่า ยาดำเป็นตัวยาคือจะต้องผ่านกระบวนการสะตุก่อนนำมาใช้ เพื่อให้ตัวยามีฤทธิ์อ่อนลง หรือทำให้พิษของตัวยาน้อยลง หรือทำให้ตัวยานั้นสะอาดขึ้น (เครือข่ายสถาบันวิชาการสาธารณสุขและเทคโนโลยีทางการแพทย์, 2557) การสะตุเพื่อลดพิษของยาดำโดยใช้ความร้อนในตำราเภสัชกรรมไทยพบระบุขั้นตอนวิธีในการสะตุแตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ สะตุโดยการเติมน้ำเล็กน้อย สะตุโดยใส่น้ำมะกรูด และสะตุโดยนำใบชาห่อยาดำแล้วนำไปปิ้งไฟ (ชยันต์พิเชียรสุนทร, 2557) จากการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องยังไม่พบเอกสารใดที่ยืนยันว่าการสะตุยาดำโดยใช้ความร้อนทั้ง 3 วิธีนั้นจะสามารถลดความเป็นพิษของยาดำได้จริงและยังไม่มีการระบุว่าแต่ละวิธีสามารถลดความเป็นพิษของยาดำได้มากน้อยเพียงใด

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของยาดำก่อนสะตุและยาดำที่ผ่านการสะตุแล้วทั้ง 3 วิธีโดยใช้ Brine shrimp lethality assay ซึ่ง Brine shrimp lethality assay เป็นวิธีการทดสอบทางชีวภาพเบื้องต้นที่สามารถใช้ในการหาค่า LC50 ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาบสมุนไพรมีวิธีที่ไม่ซับซ้อนรวดเร็วประหยัดและน่าเชื่อถือ (Meyer et al., 1982) และเปรียบเทียบค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (Lethality concentration 50: LC50) ของการสะตุยาดำทั้ง 3 วิธี สารสกัดหยาบที่มีค่า LC50 มากกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะถูกพิจารณาว่าไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันและสารสกัดหยาบที่มีค่า LC50 น้อยกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะต้องมีการทดสอบในระดับต่อไป(ศรีศักดิ์ สุนทรไชย, 2558) ดังนั้นการศึกษานี้จะสามารถยืนยันได้ในเบื้องต้นว่า การสะตุ สามารถลดความเป็นพิษหรือทำให้ยาดำมีฤทธิ์อ่อนลงได้รวมถึงวิธีที่เหมาะสมในการสะตุยาดำเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาไทยต่อไป

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC50) ของยาดำและยาดำสะอาด โดยใช้ Brine shrimp lethality assay
2. เพื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC50) ของยาดำที่ผ่านการสะอาด 3 วิธีคือสะอาดด้วยน้ำสะอาดด้วยใบชาและสะอาดด้วยน้ำมะกรูด

## ขอบเขตการวิจัย

1. ขอบเขตประชากร  
โรททะเลที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร อายุ 16-18 ชั่วโมง ขนาดของกลุ่มตัวอย่างคือ 10 ตัวต่อ 1หลอดทดลอง
2. ขอบเขตตัวแปร  
ตัวแปรต้น คือ สารละลายยาดำ และสารละลายยาดำสะอาด ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ สะอาดด้วยน้ำสะอาดด้วยใบชาและสะอาดด้วยน้ำมะกรูด  
ตัวแปรตาม คือ ค่า LC50
3. ขอบเขตเวลาเริ่มดำเนินการตั้งแต่เดือนมกราคม – พฤษภาคม 2562

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยแบบทดลองดำเนินการหาค่า LC50 ของสารละลายยาดำ และสารละลายยาดำสะอาด ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ สะอาดด้วยน้ำ สะอาดด้วยใบชา และสะอาดด้วยน้ำมะกรูด โดยใช้ Brine shrimp lethality assay จากนั้นนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล

### 2. ขั้นตอนการวิจัย

- 2.1 ทบทวนวรรณกรรมและรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้อง
- 2.2 ดำเนินการทดลอง

#### การเตรียมยาดำ

ยาดำได้รับจากคลินิกแพทย์แผนไทยประยุกต์ วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร บดเป็นผงแบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 2 กรัม ส่วนที่1 ไม่ผ่านการสะอาด ส่วนที่2 สะอาดด้วยน้ำเปล่า นำยาดำใส่ในหม้อดินเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ตั้งบนเครื่องให้ความร้อนอุณหภูมิ 100 เซลเซียส รอจนน้ำแห้งและยาดำกรอบ บดเป็นผงโดยใช้โกร่งบดยา ส่วนที่3 สะอาดด้วยใบชา นำยาดำห่อใบชา 7 ชั้น วางบนเครื่องให้ความร้อนอุณหภูมิ 100 เซลเซียสจนใบชาชั้นนอกสุดแห้งกรอบแล้วแกะทิ้ง ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนครบทั้ง 7 ชั้น บดเป็นผงโดยใช้โกร่งบดยา ส่วนที่4 สะอาดด้วยน้ำมะกรูด นำยาดำใส่ในหม้อดิน เติมน้ำมะกรูด 10 มิลลิลิตร ตั้งบนเครื่องให้ความร้อนอุณหภูมิ 100 เซลเซียส รอจนกระทั่งน้ำมะกรูดแห้งและยาดำกรอบขึ้นเงา บดเป็นผงโดยใช้โกร่งบดยา นำยาดำที่ได้ทั้ง 4 ส่วนมาส่วนละ 1 กรัม เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำทะเลสังเคราะห์เป็นตัวทำละลาย กรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 และเตรียม serial dilution ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### การเตรียมไรทะเล

เพาะไขไรทะเล ใช้กล่องใสขนาด 22x32x12 เซนติเมตร เติมน้ำทะเลสังเคราะห์ 1 ลิตร ใช้แผ่นอลูมิเนียมที่เจาะรูขนาด 2 มิลลิเมตร และระยะห่างแต่ละรู 1 เซนติเมตร แบ่งกล่องออกเป็น 2 ส่วนอย่าง ไม่เท่ากัน โดยกล่องด้านที่มีปริมาตรมากกว่าปิดให้มีดด้วยพลาสติกสีดำและใส่ไขไรทะเล 0.1 กรัม ด้านที่มี ปริมาตรน้อยกว่าส่องด้วยหลอดไฟขนาด 60 วัตต์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บ ตัวอ่อนไรทะเลที่ได้จากกล่องด้านสว่างพักไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 15 – 18 ชั่วโมง

### การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยใช้ Brine shrimp lethality assay

นำไรทะเล จำนวน 10 ตัว ใส่ในหลอดทดลองของ serial dilution ที่เตรียมไว้ และหลอด ทดลองควบคุมที่มีน้ำทะเลสังเคราะห์

### 3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

นับจำนวนไรทะเลที่ตายที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงบันทึกผล ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณค่า LC50 โดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรง เปรียบเทียบความแตกต่างค่า LC50 ของยาดำที่ผ่านการสะตุทั้ง 3 วิธีโดยใช้สถิติ one-way anova

### ผลการวิจัย

ลักษณะทางกายภาพของยาดำที่ไม่ผ่านการสะตุเมื่อนำมาบดเป็นผงจะได้ผงสีเหลือง(รูป ก) มีกลิ่นฉุน เติร์ยมเป็นสารละลายจะได้สารละลายสีเหลืองใส ยาดำที่สะตุด้วยน้ำเปล่า ใช้เวลาในการสะตุเฉลี่ย 20 นาที จึงจะจับตัวเป็นก้อนแข็ง เมื่อนำมาบดเป็นผงจะได้ผงสีน้ำตาลอมดำ(รูป ข) มีกลิ่นฉุน เติร์ยมเป็นสารละลาย จะได้สารละลายสีน้ำตาลใส ยาดำที่สะตุด้วยใบชาจะจับตัวเป็นก้อนแข็งเมื่อแกะใบชาชั้นนอกสุดออกถึงใบ ที่ 6 ใช้เวลาในการสะตุเฉลี่ย 25 นาที จึงจะจับตัวเป็นก้อนแข็ง เมื่อนำมาบดเป็นผงจะได้ผงสีน้ำตาลอมดำเงา (รูป ค) มีกลิ่นฉุน เติร์ยมเป็นสารละลายจะได้สารละลายสีน้ำตาลใส ยาดำที่ด้วยน้ำมะกรูด ใช้เวลาในการ สะตุเฉลี่ย 20 นาที จึงจะจับตัวเป็นก้อนแข็ง เมื่อนำมาบดเป็นผงจะได้ผงสีน้ำตาลอมดำเงา(รูปง) มีกลิ่นฉุน เติร์ยมเป็นสารละลายจะได้สารละลายสีน้ำตาลใส



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของผงยาดำ

จากการทดลอง นำตัวอ่อนไรทะเลใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายยาดำและสารละลายยาดำสะตุ ทั้ง 3 วิธี ที่ความเข้มข้น 10 100 1,000 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สารละลายยาดำมีจำนวนไรทะเลตายเฉลี่ย 1.33 2.66 8.66 10.00 ตัวตามลำดับ สารละลายยาดำสะตุด้วย น้ำเปล่า มีจำนวนไรทะเลตายเฉลี่ย 2.33 3.66 2.66 8.33 ตัวตามลำดับ สารละลายยาดำสะตุด้วยใบชา มี จำนวนไรทะเลตายเฉลี่ย 0.00 1.33 5.00 4.66 ตัวตามลำดับ สารละลายยาดำสะตุด้วยน้ำมะกรูด มีจำนวนไร ทะเลตายเฉลี่ย 0.66 1.66 5.33 9.66 ตัวตามลำดับ และหลอดทดลองควบคุมที่มีน้ำทะเลสังเคราะห์ มีจำนวน

โรหะเลตายเฉลี่ย 0.33 ตัว เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง สารละลายยาค่า มีจำนวนโรหะเลตายเฉลี่ย 7.00 8.00 9.66 10.00 ตัวตามลำดับ สารละลายยาค่าสะตุด้วยน้ำเปล่า มีจำนวนโรหะเลตายเฉลี่ย 5.33 6.00 7.00 9.66 ตัวตามลำดับ สารละลายยาค่าสะตุด้วยใบชา มีจำนวนโรหะเลตายเฉลี่ย 5.00 6.33 9.33 8.66 ตัวตามลำดับ สารละลายยาค่าสะตุด้วยน้ำมะกรูด มีจำนวนโรหะเลตายเฉลี่ย 6.66 7.00 6.33 10.00 ตัวตามลำดับ และหลอดทดลองควบคุมที่มีน้ำทะเลสังเคราะห์ มีจำนวนโรหะเลตายเฉลี่ย 0.33 ตัวดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนของโรหะเลที่ตายเมื่อเวลาผ่านไป 6 และ 12 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (µg/ml)	10					100					1,000					10,000					น้ำทะเลสังเคราะห์
ชนิดสารละลาย	ยาค่า	ยาค่าสะตุ น้ำเปล่า	ยาค่าสะตุใบชา	ยาค่าสะตุน้ำมะกรูด	ม.กรรต	ยาค่า	ยาค่าสะตุ น้ำเปล่า	ยาค่าสะตุใบชา	ยาค่าสะตุน้ำมะกรูด	ม.กรรต	ยาค่า	ยาค่าสะตุ น้ำเปล่า	ยาค่าสะตุใบชา	ยาค่าสะตุน้ำมะกรูด	ม.กรรต	ยาค่า	ยาค่าสะตุ น้ำเปล่า	ยาค่าสะตุใบชา	ยาค่าสะตุน้ำมะกรูด	ม.กรรต	
จำนวนโรหะเลที่ตาย ณ เวลา 6 ชั่วโมง																					
ครั้งที่ 1	1	3	0	1	2	3	1	1	9	2	5	4	10	8	3	9	0				
ครั้งที่ 2	2	2	0	0	3	4	2	2	9	3	6	7	10	9	7	10	1				
ครั้งที่ 3	1	2	0	1	3	4	1	2	8	3	4	5	10	8	4	10	0				
เฉลี่ย	1.3	2.3	0.0	0.6	2.6	3.6	1.3	1.	8.6	2.	5.0	5.3	10.	8.3	4.6	9.6	0.3				
	3	3	0	6	6	6	3	66	6	66	0	3	00	3	6	6	3				
SD.	0.5	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.	0.5	0.	1.0	1.5	0.0	0.5	2.0	0.5	0.5				
	8	8	0	8	8	8	8	58	8	58	0	3	0	8	8	8	8				
จำนวนโรหะเลที่ตาย ณ เวลา 12 ชั่วโมง																					
ครั้งที่ 1	6	5	4	6	8	6	6	7	9	6	10	6	10	9	7	10	0				
ครั้งที่ 2	8	6	6	7	9	7	7	7	10	8	9	7	10	10	10	10	1				
ครั้งที่ 3	7	5	5	7	7	5	6	7	9	7	9	6	10	10	9	10	0				
เฉลี่ย	7.0	5.3	5.0	6.6	8.0	6.0	6.3	7.	9.6	7.	9.3	6.3	10.	9.6	8.6	10.	0.3				
	0	3	0	6	0	0	3	00	6	00	3	3	00	6	6	00	3				
SD.	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	0.5	0.	0.5	1.	0.5	0.5	0.0	0.5	2.0	0.0	0.5				
	0	8	0	8	0	0	8	00	8	00	8	8	0	8	8	0	8				

จากการวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรงโดยใช้โปรแกรม SPSS และแทนค่า coefficient ที่ได้ในสมการ  $y = a + bx$  และกำหนดค่า  $y = 50$  เพื่อคำนวณค่า LC50 พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง ในสารละลายยาค่า สารละลายยาค่าสะตุด้วยน้ำเปล่า สารละลายยาค่าสะตุด้วยใบชา และสารละลายยาค่าสะตุด้วยน้ำมะกรูด ค่าความเข้มข้นของสารละลายและจำนวนโรหะเลที่ตายมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์  $p=0.02$   $0.029$   $0.04$  และ  $0.08$  ตามลำดับสารละลายยาค่ามีค่า coefficient  $a = 3.84b = 0.001$  คำนวณค่า LC50 =  $4.61 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายยาค่าสะตุด้วยน้ำเปล่า มีค่า coefficient  $a = 2.69$   $b = 0.001$  คำนวณค่า LC50 =  $4.73 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายยาค่า

สะตูด้วยใบชา มีค่า coefficient a = 1.908 b = 0.001 คำนวณค่า LC50 =  $4.81 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายยาดำสะตูด้วยน้ำมะกรูดมีค่า coefficient a = 2.189 b = 0.001 คำนวณค่า LC50 =  $4.78 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าเฉลี่ยความเป็นพิษเฉียบพลัน(LC50) ทั้ง 4 ค่ามาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ one-way anova พบว่าความเป็นพิษเฉียบพลัน(LC50) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.002) ส่วนที่เวลา 12 ชั่วโมง ในสารละลายยาดำ สารละลายยาดำสะตูด้วยน้ำเปล่า สารละลายยาดำสะตูด้วยใบชา และสารละลายยาดำสะตูด้วยน้ำมะกรูด ค่าความเข้มข้นของสารละลายและจำนวนไร่น้ำที่ตายมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ p = 0.030 0.04 0.04 และ 0.03 ตามลำดับ สารละลายยาดำมีค่า coefficient a = 8.10 b = 0.001 คำนวณค่า LC50 =  $4.19 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายยาดำสะตูด้วยน้ำเปล่า มีค่า coefficient a = 5.95 b = 0.001 คำนวณค่า LC50 =  $4.41 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายยาดำสะตูด้วยใบชา มีค่า coefficient a = 6.73 b = 0.001 คำนวณค่า LC50 =  $4.33 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายยาดำสะตูด้วยน้ำมะกรูดมีค่า coefficient a = 6.56 b = 0.001 คำนวณค่า LC50 =  $4.34 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 นำค่าเฉลี่ยความเป็นพิษเฉียบพลัน(LC50) ทั้ง 4 ค่ามาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ one-way anova พบว่าความเป็นพิษเฉียบพลัน(LC50) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.023) และในหลอดทดลองควบคุมจำนวนไร่น้ำก่อนการทดลองและหลังการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสองช่วงเวลา(p = 0.42)

ตารางที่ 2 แสดงค่า LC50 ของสารละลายยาดำและสารละลายยาดำสะตูด

สารละลาย	ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของตัวแปร(p-value)	coefficient		LC50(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
		a	b	
<b>เวลา 6 ชั่วโมง</b>				
ยาดำ	0.26	3.84	0.001	$4.61 \times 10^4$
ยาดำสะตูด้วยน้ำเปล่า	0.29	4.73	0.001	$4.73 \times 10^4$
ยาดำสะตูด้วยใบชา	0.40	1.91	0.001	$4.81 \times 10^4$
ยาดำสะตูด้วยน้ำมะกรูด	0.08	2.19	0.001	$4.78 \times 10^4$
<b>เวลา 12 ชั่วโมง</b>				
ยาดำ	0.30	8.10	0.001	$4.19 \times 10^4$
ยาดำสะตูด้วยน้ำเปล่า	0.04	5.95	0.001	$4.41 \times 10^4$
ยาดำสะตูด้วยใบชา	0.48	6.73	0.001	$4.33 \times 10^4$
ยาดำสะตูด้วยน้ำมะกรูด	0.03	6.56	0.001	$4.34 \times 10^4$

### อภิปรายผลการวิจัย

ในตำราเภสัชกรรมไทยบันทึกไว้ว่าลักษณะของยาดำที่สะตูดักต้องตามเภสัชกรรมไทยจะสุกพอดี มีลักษณะแห้งกรอบ สีแดงอมน้ำตาล จนถึงดำ เป็นของแข็ง เปราะ ผิวน้ำมัน กลิ่นและรสขมเหม็นเบื่อ ส่วนการสะตูดำที่ยังไม่สุกดีจะมีลักษณะเหนียวจับกันเป็นก้อนดำ(เครือข่ายสถาบันวิชาการสาธารณสุขและเทคโนโลยีทางการแพทย์, 2557) ซึ่งยาดำที่สะตูด้วยใบชาและน้ำมะกรูด ให้ลักษณะที่ตรงกับตำราเภสัชกรรมไทย คือได้เป็นของแข็งสีน้ำตาลอมดำมีลักษณะเป็นมันเงา ส่วนยาดำที่ผ่านการสะตูด้วยน้ำให้ของแข็งสีน้ำตาลอมดำแต่ไม่เงา และยาดำไม่ผ่านการสะตูดจะได้ของแข็งสีน้ำตาลอ่อนเมื่อบดเป็นผงจะได้สีเหลือง อย่างไรก็ตาม

การสะดุดดำด้วยใบชา จะต้องรอจนกว่าใบชาที่ใช้ห่อใหม่จนถึงใบที่ 6 หากปล่อยให้ใบชาใหม่ถึงแค่ชั้นที่ 5 หรือน้อยกว่า จะได้ยาดำที่มีลักษณะเหนียวติดใบชา ไม่จับตัวเป็นก้อนแข็ง

การทดสอบทดสอบ Brine shrimp lethality assay ของสารละลายยาดำและสารละลายยาดำที่ผ่านการสะดุด ทั้ง 3 วิธี มีค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน(LC50) มากกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งถือว่าไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลัน (ศรีศักดิ์ สุนทรไชย,2558) ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงสารละลายยาดำที่ไม่ผ่านการสะดุดมีค่า LC50 น้อยที่สุดจึงมีความเป็นพิษสูงที่สุด และสารละลายที่ผ่านการสะดุดทั้ง 3 วิธี มีค่า LC50 เพิ่มขึ้นจึงมีความเป็นพิษลดลงซึ่งสอดคล้องกับที่ระบุไว้ในตำราเภสัชกรรมไทย ว่าการสะดุดเป็นวิธีการที่ทำให้สมุนไพรมีฤทธิ์อ่อนลง หรือทำให้สมุนไพรที่มีความเป็นพิษลดลง(เครือข่ายสถาบันวิชาการสาธารณสุขและเทคโนโลยีทางการแพทย์, 2557) เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน(LC50) ของสารละลายยาดำผ่านการสะดุดทั้ง 3 วิธี ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p\text{-value} = 0.002$  และ  $0.023$  โดยสารละลายยาดำที่สะดุดด้วยใบชาและน้ำเปล่ามีความเป็นพิษน้อยที่สุดตามลำดับ ทั้งนี้ เป็นไปได้ว่า สาร antraquinone ในยาดำทำปฏิกิริยากับ กรด citric ในน้ำมะกรูดโดยมีความร้อนจากการสะดุดเป็นตัวเร่ง ทำให้สาร antraquinone กลายเป็นสารออกฤทธิ์หรือออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุลและคณะ,2557) หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH หลังการสะดุดด้วยน้ำมะกรูด ทำให้สารละลายที่ได้ไม่เหมาะสมต่อตัวอ่อนไรทะเล แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง จำนวนการตายของไรน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 90-100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ไม่สามารถคำนวณหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน(LC50)ได้ เนื่องจากการเตรียม serial dilution ที่ใช้ค่าความเข้มข้นสูงเกินไป

สรุปได้ว่า ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันได้ในเบื้องต้น ว่าสารละลายยาดำที่ผ่านการสะดุดแล้วมีความเป็นพิษลดลง และยาดำที่ผ่านการสะดุดด้วยการใช้ใบชา ซึ่งต้องใช้ใบชาอย่างน้อย 6 ใบ ให้ยาดำที่มีลักษณะทางกายภาพดีที่สุด และมีความเป็นพิษน้อยที่สุดจากทั้ง 3 วิธี และเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมยาดำเพื่อเป็นส่วนประกอบในตำรับยาต่าง ๆ ซึ่งผลการศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ประกอบวิชาชีพทางเภสัชกรรมไทยในเตรียมยาดำรับจากสมุนไพร และผู้บริโภคจะได้รับยาเตรียมจากสมุนไพรที่มีมาตรฐาน

## ข้อเสนอแนะ

1. Brine shrimp lethality assay เป็นวิธีการทดสอบทางชีวภาพเบื้องต้นและเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนรวดเร็วประหยัดน่าเชื่อถือได้ แต่เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้มีการเตรียม serial dilution ที่ใช้ค่าความเข้มข้นสูงเกินไปทำให้ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC50ที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมงได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

เครือข่ายสถาบันวิชาการสาธารณสุขและเทคโนโลยีทางการแพทย์. (2557). เภสัชกรรมไทยเล่ม2. พิษณุโลก:

พิมพ์ฤกษ์

ชยันต์ พิเชียรสุนทรและคณะ. (2558). คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์ (พิมพ์ครั้งที่ 3).

กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์

มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิมฯและโรงเรียนอายุรเวทธารัง.(2552). ตำราการแพทย์ไทยเดิม

แพทยศาสตร์สงเคราะห์ฉบับอนุรักษ์ เล่มที่1 (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพมหานคร: ศุภวานิชการพิมพ์

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. (2557). เบญจอำมฤต... ตำรับยารักษา มะเร็งตับ?. บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน.

สืบค้นเมื่อ มีนาคม5, 2562, จาก<https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge>

ศรียศศักดิ์ สุนทรไชย.(2558). ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมีตามระบบสากล GHS.ความปลอดภัยและสุขภาพ. 8(30), 39-44

Mary D. Boudreau& Frederick A. Beland. (2007). An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of AloeBarbadensis (Miller), Aloe Vera.Journal of Environmental Scienceand Health, Part C: EnvironmentalCarcinogenesis and EcotoxicologyReviews. 2006(24), 103-154

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., (1982). Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. PlantaMedica. (45), 31-34