บทที่ 3

การทดลอง

สารเคมี

ใบ, ดอกขี้เหล็ก (จังหวัดปราจีนบุรี, ประเทศไทย)
สารมาตรฐานแอนไฮโดรบาราคอล (สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม)
ผงโกโก้ (Holland)
น้ำตาลทราย (sucrose ; บริษัท น้ำตาลมิตรสยาม จำกัด จังหวัดกำแพงเพชร)
ลิควิดกลูโคส (liquid glucose ; Sanguanchai Chemical Import, Thailand)
กลีเซอรีน (glycerine ; cusson, ประเทศไทย)
ซอรบิทอล (sorbitol ; บริษัท ประเสริฐชัย ประเทศไทย)
เกลือแกง (sodium chloride ; Merck, Germany)
โซเดียม เบนโซเอต (sodium benzoate ; วิทยาศรม ประเทศไทย)
โซเดียม ซิเตรท (sodium citrate ; Wendt chemical, Germany)
ซิตริก แอซิด (citric acid ; Gadot biochemical industries, Israel)
โซเดียม เมทาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite ; BASF, Germany)
โพรพิล แกลเลท (propyl gallate ; Merck, Germany)
บิวทิเลทเทด ไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene ; Japan)
เอทิลแอลกอฮอล์ 95% โดยปริมาตร (95% v/v ethanol ; โรงงานสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัดฉะเชิงเทรา, ประเทศไทย)
เมทิลแอลกอฮอล์ เกรด AR (methanol, AR grade ; Labscan LTD, Ireland)
เมทิลแอลกอฮอล์ เกรด HPLC (methanol, HPLC grade ; Farmitalia Carlo Erba, Italy)
โซเดียม อะซีเตท (sodium acetate ; Farmitalia Carlo Erba, Italy)

สารที่ใช้ในการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ (Dafco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.)

- บัฟเฟอร์ ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 7.2 (Dihydrogen phosphate buffer pH 7.2)
- อาการ์ (Agar)
- ทริปทิค ซอย อาการ์ (Tryptic soy agar)
- ทริปทิค ซอย บรอท (Tryptic soy broth)
- ซาโบโรด์ เดคโตรส อาการ์ (Sabouraud dextrose agar)
- ตัวกลางเซทริไมด์ อาการ์ (Cetrimide agar medium)
- ตัวกลางเกลือแมนนิทอล อาการ์ (Mannital salt agar medium)
- เอ็น-เอ็น-ไดเมทิล พารา-ฟีนิลีนไดเอมีน-ไดไฮโดรคลอไรด์ (N, N-Dimethyl-para-phenilinediamine-dihydrochloride)
- แลคโตส บรอท (Lactose broth)
- แมคคอนกีย์ อาการ์ (Macconkey agar)
- เซเลไนท์ บรอท (Selenite broth)
- บริลลิแอนท์ กรีน อาการ์ (Brilliant green agar)

เครื่องมือ

- เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Analytical Balance ; Type AT 200, Mettler, Switzerland)
- เครื่องปั่นแยก (Centrifuge ; Model H-103 N series, Kokusan Enshinki, Japan)
- ตู้อบ (Hot Air Oven ; Memmert, West Germany)
- ไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ประกอบด้วย
  - Controller Spectra System SN 4000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
  - Pump Spectra System P1000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)

- Autosampler Spectra System AS3000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
- Detector Spectra System UV 1000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
- Partisil Column 10 μm x 25 cm.

- ถังหมัก (Percolator)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter ; pH 3000, Germany)
- ตู้เย็น (Sanyo, Japan)
- เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) (Buchi, Switzerland)
- ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ และความชื้น (Stability Chamber ; Model PSC 019. XHX.C, Sanyo Gallenkamp PLC, England)
- อัลตราโซนิกบาธ (Ultrasonic Bath ; Model FS 400B, Decon Laboratories Ltd., England)
- เครื่องบดฟิทซ์ (Fitz's mill ; Thai Pradist Engineering Factory, Thailand)

วิธีการทดลอง

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดจากใบขี้เหล็ก โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)
   1.1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ แอนไฮโดรบาราคอล
      1.1.1) ชั่งแอนไฮโดรบาราคอล 5 มิลลิกรัม ใส่ฟลาส์กปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร จนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์กปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติม เมทิลแอลกอฮอล์ จนครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร

T.18607925

1.1.2) ปิเปตสารละลาย ครั้งละ 1, 2, 3, 4, 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในฟลาส์กปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน ซึ่งมีความเข้มข้น 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

1.2) HPLC conditions ที่ใช้ในการวิเคราะห์แอนไฮโดรแอนไฮโดรบาราคอล

Column	:	Partisil, 10 ไมโครเมตร x 25 เซนติเมตร
Mobile phase	:	เมทิลแอลกอฮอล์ : 0.05 M โซเดียมอะซิเตท (50:50)
Flow rate	:	1.2 มิลลิลิตร / นาที
Injection volume	:	20 ไมโครลิตร
Detector	:	uv 242 นาโนเมตร
Solvent	:	เมทิลแอลกอฮอล์

2. การหาเปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์ ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมสารสกัดจากใบขี้เหล็ก

2.1) นำใบขี้เหล็กไปอบแห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดฟิทซ์ โดยใช้แร่งเบอร์ 1.5

2.2) ชั่งใบขี้เหล็กที่บดแล้ว 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง (ชนิดที่มีฝาเกลียวปิด)

2.3) เตรียมเอทิลแอลกอฮอล์ เปอร์เซนต์ต่าง ๆ ดังนี้ 0%, 7%, 15%, 50%, 70%, 95% โดยปริมาตร แล้วเติมเอทิลแอลกอฮอล์ เปอร์เซนต์ต่าง ๆ นี้ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ชั่งใบขี้เหล็ก 0.1 กรัมไว้แล้ว

2.4) นำไปใส่เครื่องโซนิกบาธ เป็นเวลา 15 นาที และจากนั้นนำไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแยกส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล

2.5) เปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เปอร์เซนต์ ต่าง ๆ โดยสถิติที่ใช้วิเคราะห์ คือ Analysis of Variance (ANOVA)

2.6) เลือกเปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์ ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดจากใบแก่, ใบอ่อน, ดอกขี้เหล็ก

3.1) นำใบแก่, ใบอ่อน, ดอกขี้เหล็กไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดฟิทซ์ โดยใช้แร่งเบอร์ 1.5

3.2) ชั่งใบแก่, ใบอ่อน และดอกขี้เหล็กอย่างละ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง (ชนิดที่มีฝาเกลียวปิด) แล้วเติมเอทิลแอลกอฮอล์ หลอดละ 10 มิลลิลิตร (โดยใช้เปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์ ที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 2.)

3.3) นำไปใส่ในเครื่องโซนิกบาธ เป็นเวลา 15 นาที และจากนั้นนำไปปั่นแยก โดยใช้ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแยกส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล

3.4) เปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่วิเคราะห์ได้จาก ใบแก่, ใบอ่อน, ดอก โดยสถิติที่ใช้วิเคราะห์ คือ Analysis of Variance (ANOVA)

4. การเตรียมสารสกัดจากใบขี้เหล็กโดยวิธีเปอร์โคเลชันเพื่อนำไปใช้ในการตั้งสูตรตำรับ (ภาพที่ 5)

4.1) การเตรียมใบขี้เหล็กสำหรับทำเปอร์โคเลชัน

4.1.1) นำใบขี้เหล็กไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดฟิทซ์ โดยใช้แร่งเบอร์ 1.5 แล้วชั่งใบขี้เหล็กที่บดแล้ว 1000 กรัม ใส่บีกเกอร์

4.1.2) ทำให้ผงใบขี้เหล็กชื้นด้วยน้ำยาสกัด เพื่อให้เกิดการพองตัวก่อนนำไปบรรจุในถังหมัก โดยเติมน้ำยาสกัดลงไป 3,000 มิลลิลิตร คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปิดฝาภาชนะตั้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง

4.2) การบรรจุลงในถังหมัก

4.2.1) เปิดรูส่วนล่างออก เพื่อเป็นทางออกของอากาศในระหว่างการบรรจุ

4.2.2) ใช่แผ่นสำลีขนาดพอเหมาะ (ซึ่งทำให้เปียกด้วยน้ำยาสกัดก่อน) ปิดคลุมรูออกหลวม ๆ พอที่น้ำยาสกัดไหลผ่านได้ และหนาพอที่ผงใบขี้เหล็กไม่รั่วออกมาอุดรูออก

4.2.3) บรรจุผงใบขี้เหล็กที่ทำให้ชื้นแล้วลงทีละส่วน โดยใช้เครื่องช่วยบรรจุทำด้วยจุกคอร์กเสียบไว้ที่ปลายแท่งแก้วคน ช่วยในการจัดตัว ปรับระดับและทำให้แน่นพอเหมาะ โดยใช้แรงกดในการบรรจุให้เท่ากันในแต่ละชั้น เพื่อให้ผงใบขี้เหล็ก จัดเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งถังหมัก

4.2.4) วางกระดาษกรองขนาดเท่ากับเส้นรอบวงของถังหมักไว้ส่วนบนของผงใบขี้เหล็กที่เกลี่ยผิวหน้าให้เรียบแล้ว

4.2.5) เติมน้ำยาสกัดลงไปในถังหมัก โดยเปิดรูออกของถังหมักไว้ก่อน จนกว่าน้ำยาสกัดส่วนแรกจะไหลออกมาทางรูเปิดได้ 2-3 หยด จึงปิดรูออก

4.2.6) ปิดส่วนบนของถังหมักให้สนิทเพื่อมิให้น้ำยาสกัดระเหย

4.3) ระยะเวลาการหมัก

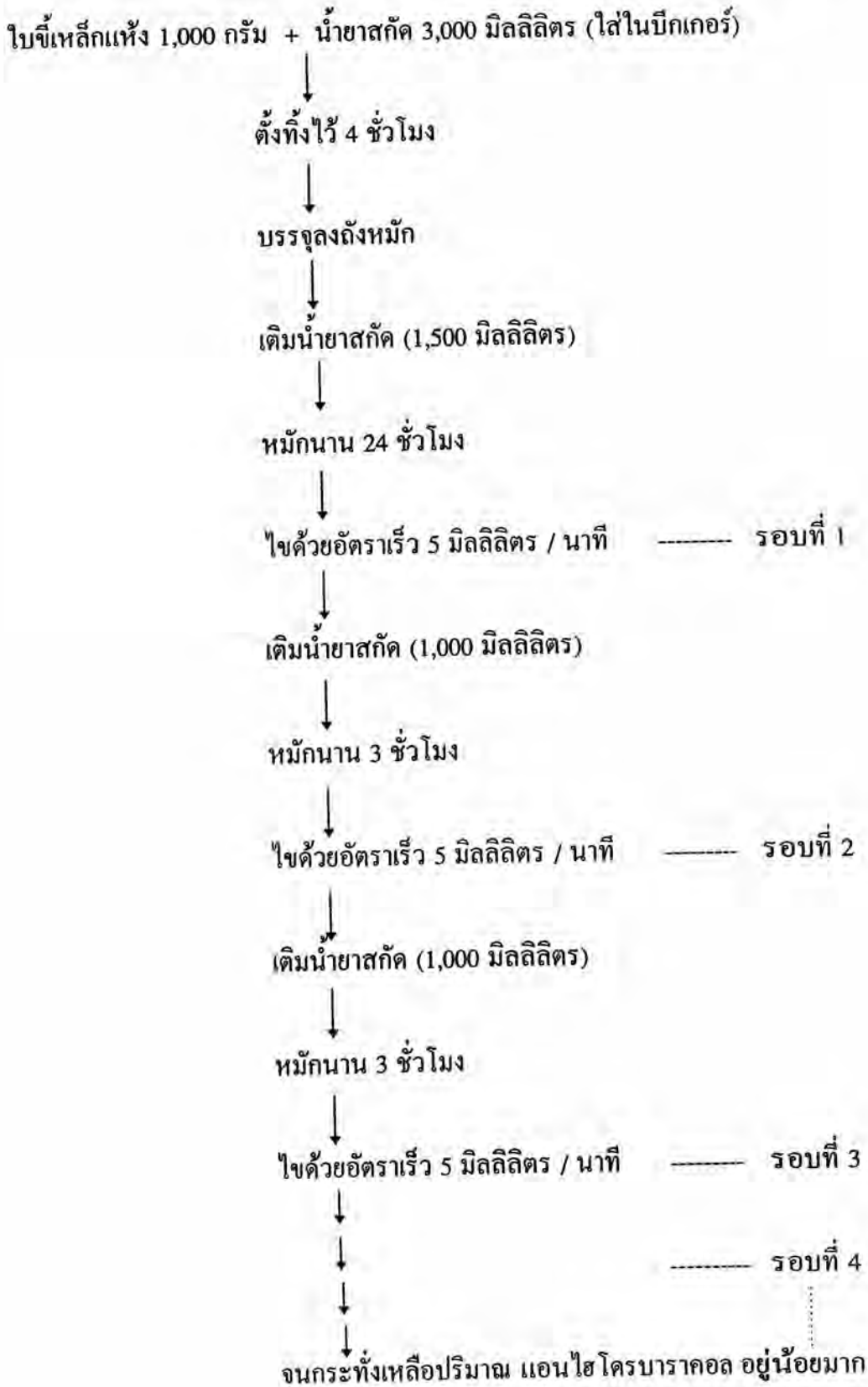
แช่ผงใบขี้เหล็กไว้ในน้ำยาสกัด 1,500 มิลลิลิตร นานประมาณ 24 ชั่วโมง

4.4) เปอร์โคเลชันและการเก็บเปอร์โคเลต (percolate)

หลังจากที่หมักไว้ครบ 24 ชั่วโมง ก็เริ่มทำการไขเอาเปอร์โคเลตที่สกัดได้ออกจากถังหมัก โดยปรับอัตราการไหลออกของเปอร์โคเลต เป็น 5 มิลลิลิตร/นาที ปล่อยให้เปอร์โคเลตไหลออกมาจนหมด แล้วจึงเติมน้ำยาสกัดเข้าไปใหม่อีก 1,000 มิลลิลิตร และแช่ไว้ประมาณ 3 ชั่วโมง จึงไขออกโดยปรับอัตราการไหลเป็น 5 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการสกัดซ้ำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งสามารถสกัดสารสำคัญในใบขี้เหล็ก (แอนไฮโดรบาราคอล) ออกมาจนหมดหรือเหลือสารสำคัญประมาณ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงหยุดทำการสกัด

4.5) การปรับความเข้มข้นของเปอร์โคเลต
นำสารสกัดที่เตรียมได้ทั้งหมด มาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยระเหยไล่น้ำยาสกัดออกไปด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ ซึ่งใช้อุณหภูมิในการระเหยไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากสารสำคัญในใบขี้เหล็ก (แอนไฮโดรบาราคอล) เป็นสารซึ่งถูกทำลายโดยความร้อนสูง จากนั้นนำสารสกัดเข้มข้นนี้ไปทำการตกตะกอน โดยใช้เครื่องปั่นแยกเพื่อแยกเอาตะกอนออกแล้วเก็บส่วนใสไว้

4.6) รวบรวมสารสกัดเข้มข้น เพื่อนำไปใช้ในการตั้งสูตรตำรับ
โดยรวบรวมจากการเตรียมสารสกัดด้วยวิธีเปอร์โคเลชัน ดังในข้อ 4.1) - 4.4) หลาย ๆ ครั้ง แล้วทำให้เข้มข้นและแยกเอาตะกอนออกดังในข้อ 4.5) แล้วรวบรวมเอาเฉพาะส่วนใส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้นในหน่วยของ มิลลิกรัมต่อกรัม เพื่อนำไปใช้ในการตั้งสูตรตำรับต่อไป



ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากใบขี้เหล็กโดยวิธีเปอร์โคเลชัน 1 ครั้ง

5. การตั้งสูตรตำรับ

5.1) นำสารสกัดเข้มข้นที่เตรียมได้ และทราบความเข้มข้นของแอนไฮโดรบาราคอล แล้วจากข้อ 4.6) มาคำนวณเพื่อหาว่าควรใช้ปริมาณสารสกัดเข้มข้นนี้เท่าใดในสูตรตำรับ จึงจะมีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลประมาณ 2.5 มิลลิกรัม ต่อตำรับ 1 กรัม

5.2) เตรียมสูตรตำรับยาน้ำเชื่อม โดยทำการปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณโดยใช้น้ำเชื่อมรสต่าง ๆ ได้แก่ รสส้ม รสองุ่น รสราสเบอรี และรสโกโก้ จนได้สูตรตำรับที่มีรสชาติดี ซึ่งสูตรที่มีรสชาติดีที่เลือกใช้นี้มีน้ำเชื่อมโกโก้เป็นสารกลบรสขม และได้นำมาปรับปริมาณของน้ำเชื่อมโกโก้และสารแต่งรสหวานจากสูตรพื้นฐาน เพื่อให้สามารถกลบรสขมของสารสกัดขี้เหล็กได้ดียิ่งขึ้น

<u>สูตรพื้นฐาน</u>

	% (โดยน้ำหนัก)
สารสกัดขี้เหล็กเข้มข้น	qs
น้ำเชื่อมโกโก้	40
ซอร์บิทอล	10
กลีเซอรีน	5
โซเดียม เบนโซเอต	0.1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปรับเป็น	100

5.3) ทดสอบรสชาติของตำรับ โดยใช้การทดสอบแบบอธิบาย (Descriptive Test) ซึ่งใช้อาสาสมัครในการทดสอบ 15 คน และประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับที่เตรียมตามตารางที่ 2) แล้วเลือกตำรับที่มีรสชาติ และลักษณะทางกายภาพดี ไปทำการหาวิธี วิเคราะห์และศึกษาความคงตัวต่อไปในข้อ 6, 7 ตามลำดับ

ปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณสารแต่งรสในสูตรตำรับ แสดงในตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 2 : การปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณสารแต่งรส ในสูตรตำรับที่ 1-19

ตำรับที่ / สารในตำรับ (กรัม)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
สารสกัดขี้เหล็กเข้มข้น	←									7	→								
น้ำเชื่อมโกโก้	40	40	40	40	40	40	50	50	50	50	50	50	60	60	60	60	60	65	65
ซอร์บิทอล	10	10	20	20	30	30	10	10	20	20	30	30	10	10	20	20	30	10	10
กลีเซอรีน	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	-	5	10
โซเดียม เบนโซเอต	←									0.1	→								
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปรับเป็น	←									100	→								

6. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่มีอยู่ในสูตรตำรับ

6.1) การหาปริมาตรที่เหมาะสมของเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในการสกัดแยกแอนไฮโดรบาราคอล ออกจากตำรับในข้อ 5.3) ทำดังนี้

6.1.1) ชั่งตำรับ 6 กรัม ใส่ในฟลาส์กปริมาตร ขนาด 100 และ 200 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร

6.1.2) นำไปใส่ในเครื่องโซนิคบาธ เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับปริมาตรจนครบตามต้องการด้วย เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร

6.1.3) แบ่งใส่หลอดทดลองแล้วนำไปปั่นแยก โดยใช้ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงแยกเอาส่วนใสไป วิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล

6.1.4) เปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่แยกได้จากตำรับ 6 กรัม ซึ่งสกัดด้วย เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในปริมาตร 100 และ 200 มิลลิลิตร โดยสถิติที่ใช้วิเคราะห์คือ Independent t-test

6.1.5) เลือกปริมาตรเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ที่สามารถสกัดแยกแอนไฮโดรบาราคอล ออกจากตำรับได้มากที่สุด ไปใช้ในการทดลอง ข้อ 6.2) ต่อไป

6.2) การหาร้อยละการกลับคืน (percent recovery) และความเที่ยง (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ ทำดังนี้

6.2.1) ชั่งตำรับ 6 กรัม ใส่ในฟลาส์กปริมาตรที่เหมาะสม 6 ขวด

6.1.2) ทำการสกัดแยกแอนไฮโดรบาราคอลจากตำรับ โดยใช้วิธีการสกัดและปริมาตร เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตรที่เหมาะสม เช่นเดียวกับในข้อ 6.1) และทำซ้ำกันเช่นนี้ 6 ครั้ง

6.1.3) คำนวณหาร้อยละการกลับคืน และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่สกัดแยกได้จากตำรับ} \times 100}{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในสารสกัดซึ่งเติมลงไปในตำรับ}}$$

$$\text{สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

7. การศึกษาความคงตัวทางกายภาพ, เคมี และการปนเปื้อนของเชื้อของยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับที่ผ่านการทดสอบรสชาติแล้วจากข้อ 5.3)

7.1) ศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของตำรับที่ผ่านการทดสอบรสชาติแล้วจากข้อ 5.3) โดย

7.1.1) นำตำรับมาปรับ pH เป็น 5 และ 5.5 โดยใช้โซเดียม ซิเตรท

7.1.2) บันทึกลักษณะทางกายภาพ (สี, กลิ่น, รสชาติ, pH, ตะกอน) และวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่เวลาเริ่มต้น

7.1.3) นำตำรับเก็บไว้ในขวดสีชาปิดสนิท แล้วผ่านสภาพเร่ง โดยเก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (6 รอบ) บันทึก

ลักษณะทางกายภาพ และวิเคราะห์หาปริมาณ แอนไฮโดรบาราคอล ของตำรับซึ่งผ่านสภาพเร่งแล้ว

7.1.4) เลือก pH ที่ทำให้ตำรับมีความคงตัวดีที่สุด ไปทำการศึกษาผลของสารต้านออกซิเดชันในข้อ 7.2) ต่อไป โดยสถิติที่ใช้วิเคราะห์คือ Analysis of Variance (ANOVA)

7.2) ศึกษาผลของสารต้านออกซิเดชัน ต่อความคงตัวของตำรับ โดย

7.2.1) นำตำรับจากข้อ 7.1.4) มาเติมสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ โซเดียม เมทาไบซัลไฟต์ 0.025%, โพรพิล แกลเลท 0.1%, บิวทิเลทเทด ไฮดรอกซีโทลูอีน 0.02%

7.2.2) บันทึกลักษณะทางภายภาพ (สี, กลิ่น, รสชาติ, pH, ตะกอน) และวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่เวลาเริ่มต้น

7.2.3) นำตำรับเก็บไว้ในขวดสีชาปิดสนิท แล้วผ่านสภาพเร่ง โดยเก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (6 รอบ) บันทึกลักษณะทางกายภาพ และวิเคราะห์หาปริมาณ แอนไฮโดรบาราคอล ของตำรับซึ่งผ่านสภาพเร่งแล้ว

7.2.4) เลือกตำรับที่มีความคงตัวดีที่สุด ไปทำการศึกษาความคงตัวในข้อ 7.3) ต่อไป โดยสถิติที่ใช้วิเคราะห์คือ Analysis of Variance (ANOVA)

7.3) ศึกษาความคงตัวของตำรับที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 7.2) แล้ว โดย

7.3.1) เตรียมตำรับใส่ในขวดสีชาปิดสนิท บันทึกลักษณะทางกายภาพ (สี, กลิ่น, รสชาติ, pH, ตะกอน) และวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่เวลาเริ่มต้น

7.3.2) นำไปศึกษาหาความคงตัวในสภาพต่าง ๆ ดังนี้

7.3.2.1) ศึกษาความคงตัว เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 4 เดือน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล และบันทึกลักษณะทาง

กายภาพ ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 สัปดาห์

7.3.2.2) ศึกษาความคงตัว เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (ambient temperature) เป็นเวลา 4 เดือน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณ แอนไฮโดรบาราคอล และบันทึกลักษณะทางกายภาพ ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 สัปดาห์

7.3.2.3) ศึกษาความคงตัว เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล และบันทึกลักษณะทางกายภาพ ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 สัปดาห์

7.4) การทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ

เตรียมยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 7.2) เก็บในขวดสีชาปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน เก็บตัวอย่างมาทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ ที่เวลา 0, 2, 4 เดือน วิธีในการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อใช้วิธีที่กำหนดใน Microbial limit test USP XXIII (United States Pharmacopeial, Inc, 1995) ดังแสดงในภาคผนวก ก เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบได้แก่ แบคทีเรีย, ยีสต์, รา, *E. Coli, S. aureus, P. aeruginosa, Salmonella* species.