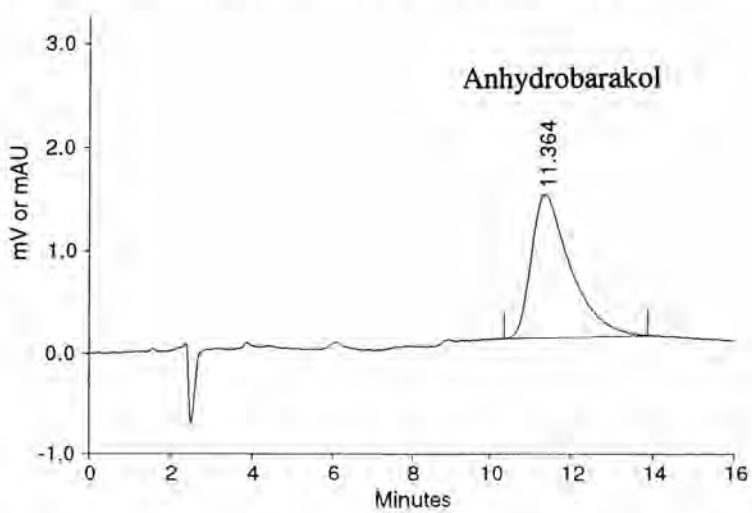
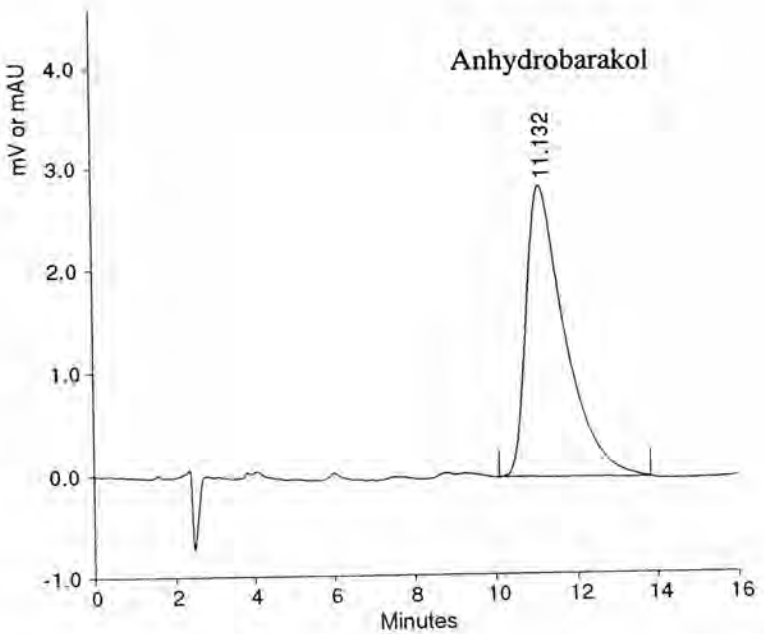
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

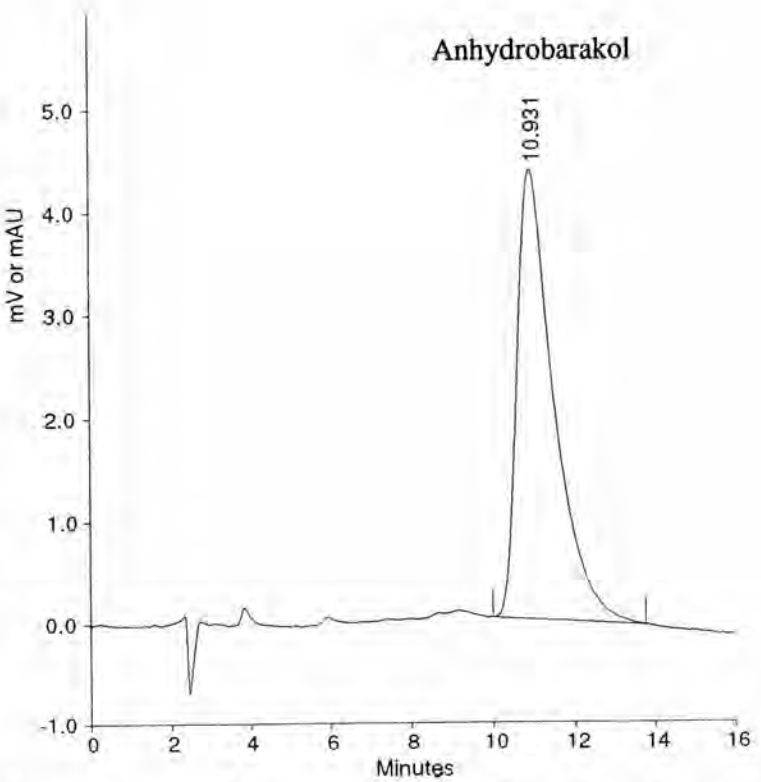
1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากใบขี้เหล็ก ซึ่งคือแอนไฮโดรบาราคอล โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (HPLC) ตัวอย่างโครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงในภาพที่ 6-10 ซึ่งมีระยะเวลาการคงไว้ (Retention time) ประมาณ 11 นาที ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร แสดงในภาพที่ 11 ซึ่งกราฟนี้ผ่านศูนย์ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation coefficient) ของกราฟเส้นนี้มีค่า 1.0000 จากกราฟมาตรฐานนี้ แสดงว่าที่ความเข้มข้นของแอนไฮโดรบาราคอลในช่วง 0.001-0.005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นั้น ความเข้มข้นจะเป็นสัดส่วน โดยตรงกับพื้นที่ใต้กราฟ ดังนั้นถ้าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.001-0.005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก็สามารถใช้วิธีวิเคราะห์นี้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลได้



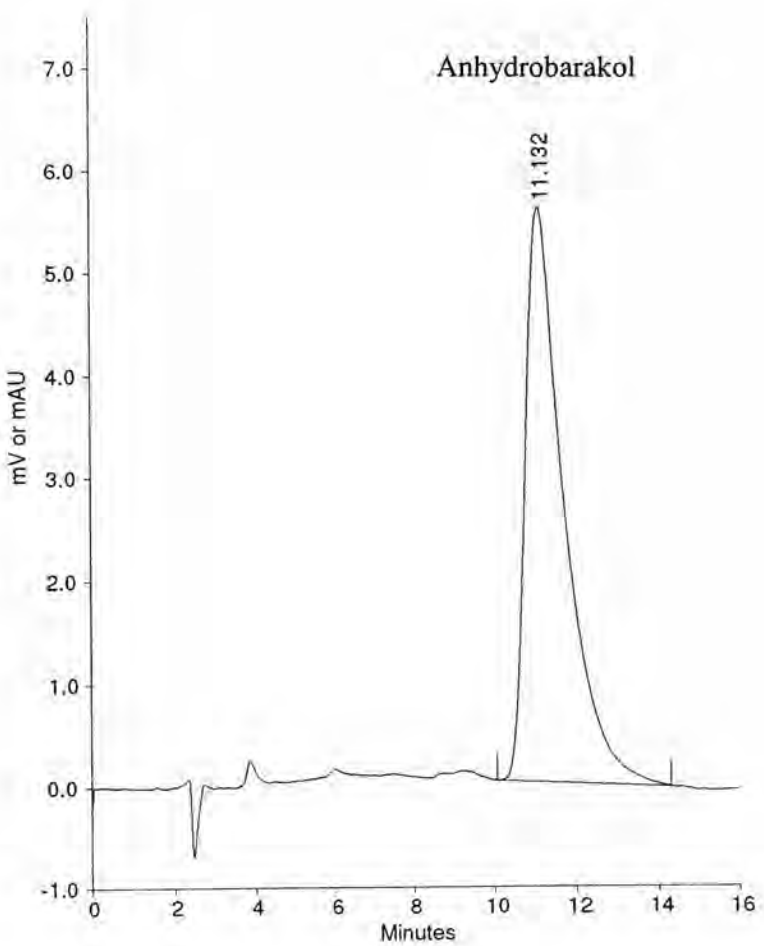
ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร ที่มีความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



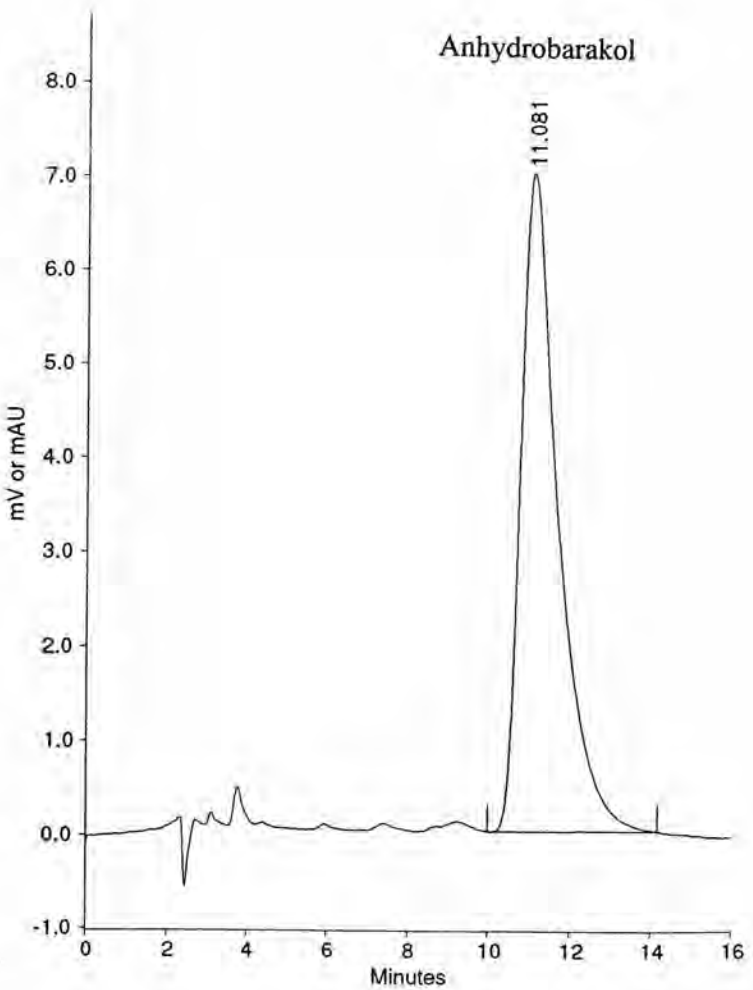
ภาพที่ 7 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร ที่มีความเข้มข้น 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร ที่มีความเข้มข้น 0.003 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



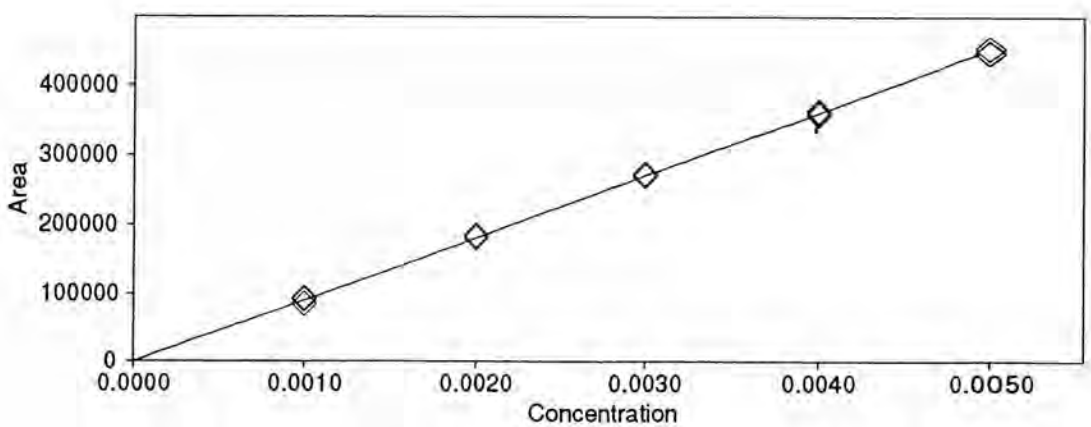
ภาพที่ 9 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร ที่มีความเข้มข้น 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร ที่มีความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 : แสดงพื้นที่ใต้กราฟของแอนไฮโดรบาราคอล ที่ความเข้มข้น 0.001-0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.001	90031
0.002	182429
0.003	271150
0.004	360782
0.005	448615



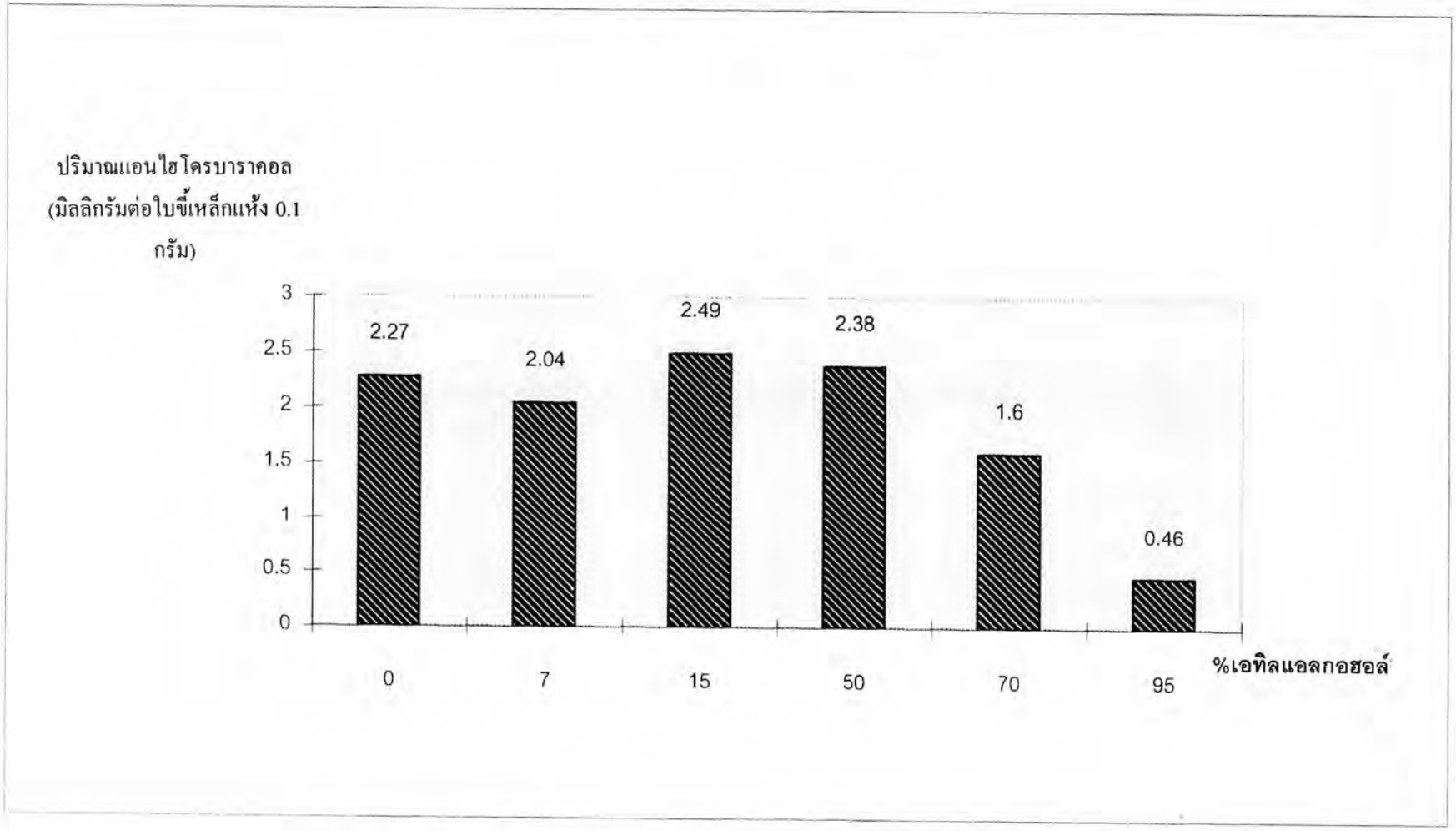
ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานของแอนไฮโดรบาราคอล ในเมทิลแอลกอฮอล์ 50% โดยปริมาตร ที่มีความเข้มข้น 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดจากใบขี้เหล็กแห้ง โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ เปอร์เซนต์ต่าง ๆ กัน แสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 12 ดังนี้

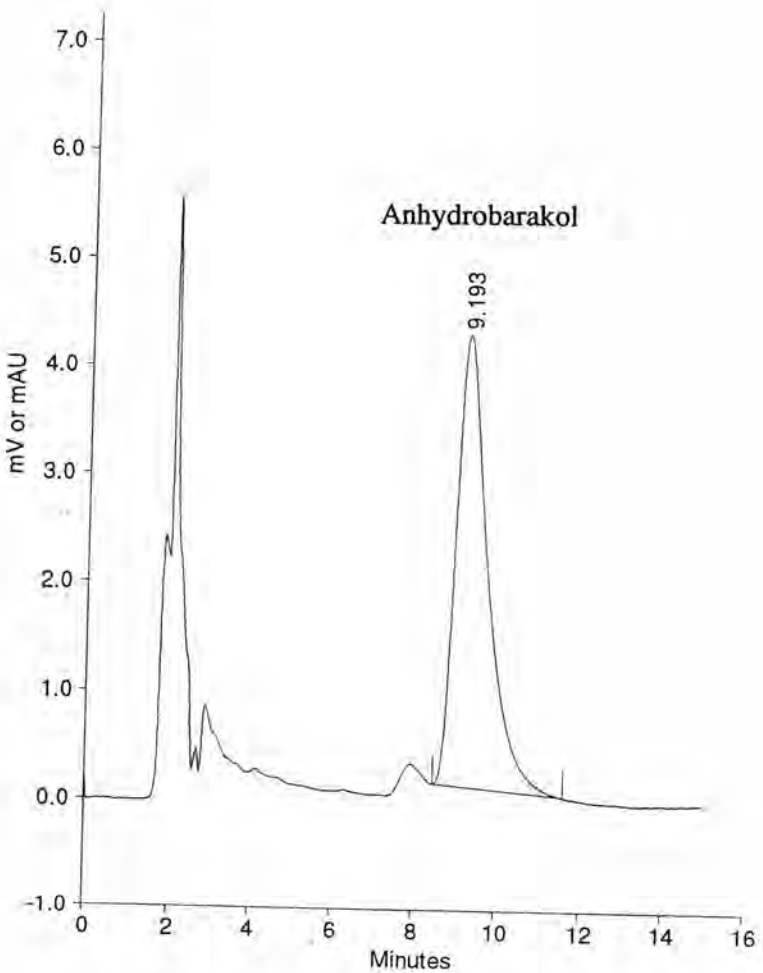
ตารางที่ 4 : การเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดจากใบขี้เหล็กแห้ง ซึ่งสกัดโดยใช้น้ำกลั่น, เอทิลแอลกอฮอล์ 7%, 15%, 50%, 70%, 95% โดยปริมาตร

% เอทิลแอลกอฮอล์ (โดยปริมาตร)	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในใบขี้เหล็กแห้ง (มิลลิกรัม ต่อ ใบขี้เหล็กแห้ง 0.1 กรัม)
0 (น้ำกลั่น)	1	2.28
	2	2.26
	3	2.28
	$\bar{x}$ ± SD	2.27 ± 0.01
7	1	2.04
	2	2.03
	3	2.09
	$\bar{x}$ ± SD	2.04 ± 0.01
15	1	2.40
	2	2.58
	3	2.49
	$\bar{x}$ ± SD	2.49 ± 0.13
50	1	2.52
	2	2.24
	3	2.25
	$\bar{x}$ ± SD	2.38 ± 0.20
70	1	1.45
	2	1.74
	3	1.45
	$\bar{x}$ ± SD	1.60 ± 0.21
95	1	0.42
	2	0.49
	3	0.40
	$\bar{x}$ ± SD	0.46 ± 0.05

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนไธโดรบาราคอลซึ่งสกัดจากใบขี้เหล็กแห้ง 0.1 กรัม โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ เปอร์เซนต์ต่าง ๆ กัน พบว่าเอทิลแอลกอฮอล์ เปอร์เซนต์ที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการสกัด แอนไธโดรบาราคอลออกจากใบขี้เหล็กแห้ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาคผนวก ข) และพบว่าการสกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร สามารถสกัดแอนไธโดรบาราคอลออกจากใบขี้เหล็กได้มากที่สุด คือ 2.49 มิลลิกรัม ต่อใบขี้เหล็กแห้ง 0.1 กรัม รองลงมาคือ การสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50%, 0%, 7%, 70%, 95% โดยปริมาตร ตามลำดับ เนื่องจากแอนไธโดรบาราคอลมีสูตรโครงสร้างจัดเป็นพวกเบนโซไพแรน (Benzopyran) ซึ่งมีส่วนที่ละลายในน้ำได้น้อยกว่าในไขมันดังนั้นการใช้น้ำอย่างเดียวจึงน่าจะสกัดแอนไธโดรบาราคอลได้น้อย แต่เนื่องจากผลการทดลองนี้การใช้น้ำสามารถสกัดแอนไธโดรบาราคอลออกมาได้มาก อาจเนื่องจากในน้ำ แอนไธโดรบาราคอลจะเปลี่ยนเป็นบาราคอล (ดังภาพที่ 12) ทำให้บางส่วนละลายออกมาได้ในน้ำ แต่เมื่อเพิ่มความแรงของเอทิลแอลกอฮอล์เป็น 7% จะทำให้บาราคอลกลับมาอยู่ในรูปของแอนไธโดรบาราคอล ซึ่งละลายอยู่ในสารสกัด และเมื่อเพิ่มความแรงของเอทิลแอลกอฮอล์ขึ้นไปอีก พบว่าความแรงของเอทิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมคือ 15% แต่ถ้าเพิ่มมากไปกว่านี้จะสกัดได้น้อยลง อาจเนื่องจากแอนไธโดรบาราคอลมีค่าคงที่ไดอิเลกตริก (dielectric constant) ใกล้เคียงกับค่าคงที่ไดอิเลกตริกของเอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 70.38 ส่วนค่าคงที่ไดอิเลกตริกของเอทิลแอลกอฮอล์ 7%, 50%, 70% และ 95% นั่นมีค่าเท่ากับ 74.71, 51.4, 40.56, 27.02 ตามลำดับ ดังนั้นเอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร จึงเป็นเปอร์เซนต์ที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการสกัดแอนไธโดรบาราคอลจากขี้เหล็กในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถสกัดแอนไธโดรบาราคอลจากใบขี้เหล็กได้มากกว่าเอทิลแอลกอฮอล์เปอร์เซนต์อื่น ๆ และนอกจากนี้เอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร ยังมีฤทธิ์ในการป้องกันการเจริญของเชื้อในสารสกัดได้ อีกทั้งยังเป็นเปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์ที่ไม่สูงเกินไป จึงเป็นการประหยัดเอทิลแอลกอฮอล์อีกด้วย โครมาโทแกรมของแอนไธโดรบาราคอลในสารสกัดจากใบขี้เหล็กแห้ง ซึ่งสกัดโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร แสดงในภาพที่ 13 ซึ่งจากโครมาโทแกรมนี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณแอนไธโดรบาราคอลในสารสกัดได้ ถึงแม้ว่าในสารสกัดจากใบขี้เหล็กจะมีสารอื่น ๆ อยู่ด้วยหลายชนิด



ภาพที่ 12 แสดงปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดจากใบขี้เหล็กแห้ง ซึ่งสกัดด้วย น้ำกลั่น, เอทิลแอลกอฮอล์ 7%, 15%, 50%, 70%, 95% โดยปริมาตร



ภาพที่ 13 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดจากใบขี้เหล็กแห้ง ซึ่งสกัดโดยใช้ เอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร

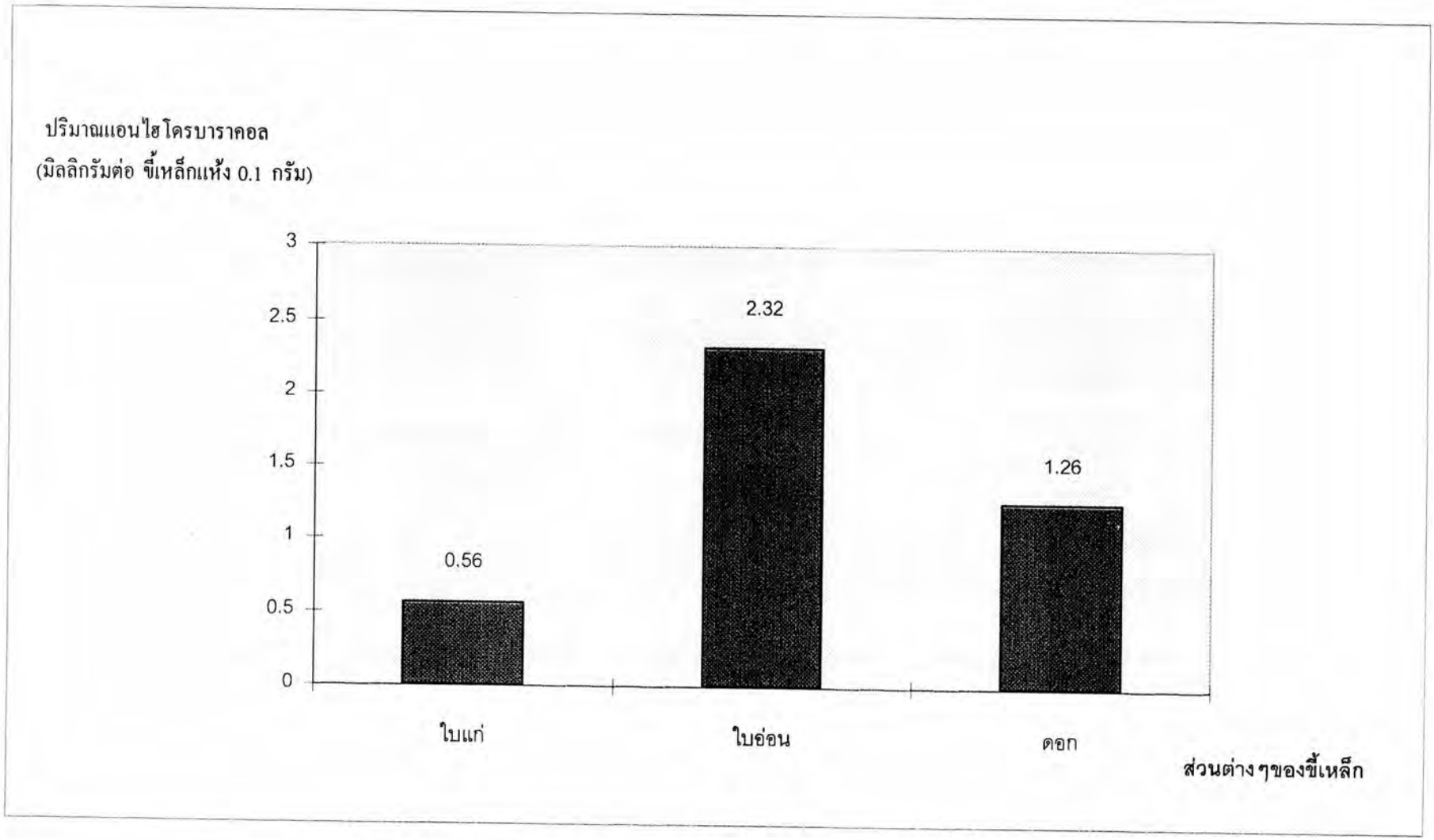
3. ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในใบแก่, ใบอ่อน, ดอกขี้เหล็กแห้ง แสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 14 ดังนี้

ตารางที่ 5 : การเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในใบแก่, ใบอ่อน, ดอกขี้เหล็กแห้ง ซึ่งสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร

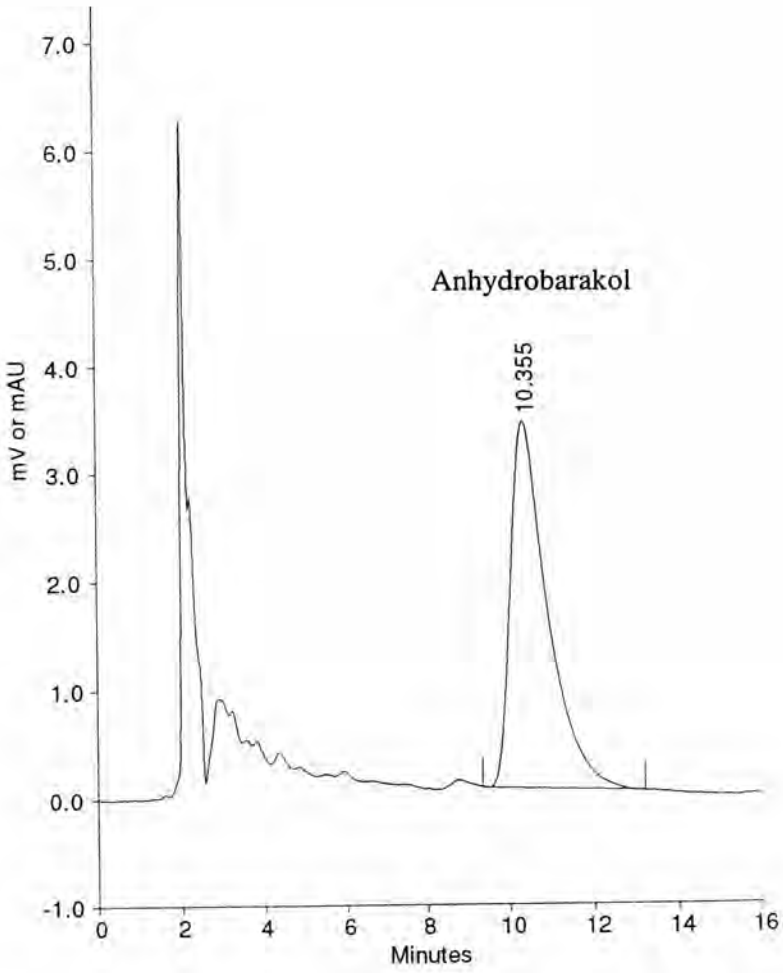
ส่วนของขี้เหล็ก	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 0.1 กรัม)
ใบแก่	1	0.57
	2	0.54
	3	0.52
	$\bar{x}$ ± SD	0.56 ± 0.02
ใบอ่อน	1	2.32
	2	2.31
	3	2.18
	$\bar{x}$ ± SD	2.32 ± 0.01
ดอก	1	1.38
	2	1.14
	3	1.02
	$\bar{x}$ ± SD	1.26 ± 0.17

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดจากใบแก่, ใบอ่อน และดอกเหล็กแห้ง ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร พบว่าปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในใบแก่, ใบอ่อน และดอกขี้เหล็ก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ข) โดยปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่สกัดได้จากใบขี้เหล็กอ่อนนั้นมีปริมาณมากที่สุด คือ 2.32 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 0.1 กรัม รองลงมาคือดอกขี้เหล็ก ซึ่งมีปริมาณ แอนไฮโดรบาราคอล 1.26 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 0.1 กรัม ส่วนใบขี้เหล็กแก่นั้นมีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล น้อยที่สุด คือ 0.56 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 0.1 กรัม จึงอาจสรุปได้ว่าแอนไฮโดรบาราคอล นั้นจะมีปริมาณมากในส่วนที่

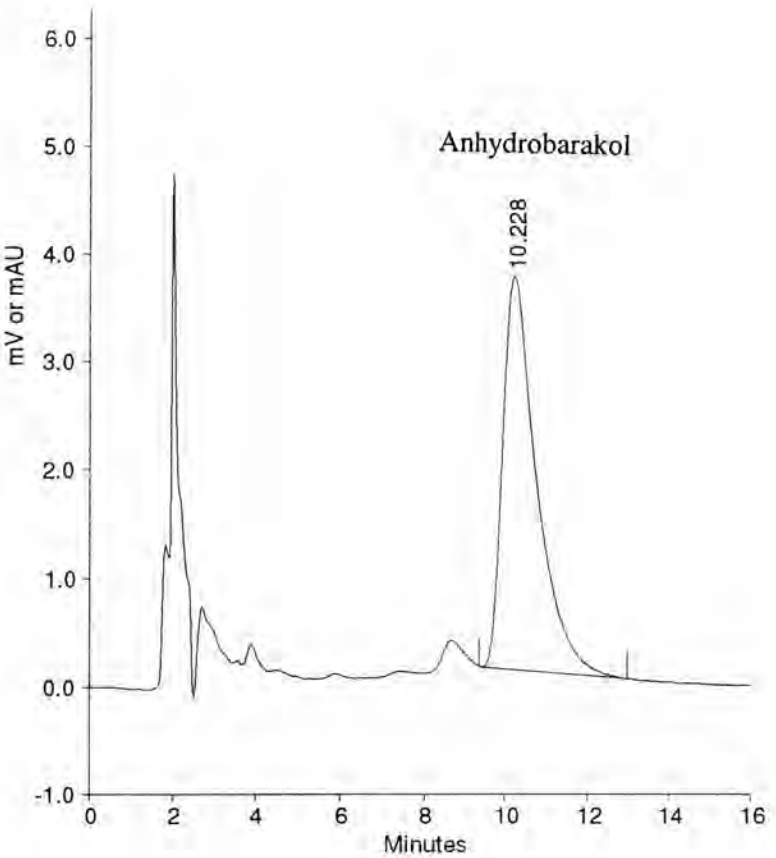
เป็นใบอ่อนและดอกขี้เหล็ก ดังนั้นในการเตรียมสารสกัดจากขี้เหล็กเพื่อนำไปใช้ตั้งตำรับนั้น จึงน่าจะเลือกใช้ส่วนที่เป็นใบอ่อน และดอกขี้เหล็ก เนื่องจากมีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลอยู่มาก แต่ในทางอุตสาหกรรม การจะเลือกใช้แต่ส่วนของใบอ่อน และดอกนั้นอาจทำได้ยาก เพราะส่วนของใบอ่อนและดอกมีไม่มากนัก อาจทำได้เพียงเตรียมสารสกัดจากส่วนของใบอ่อน และดอก แล้วเก็บไว้ใช้ในการปรับปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในสารสกัด ให้มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลตามต้องการ โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอลในสารสกัดจากใบขี้เหล็กแก่, ใบขี้เหล็กอ่อน และดอกขี้เหล็ก แสดงในภาพที่ 15-17 ตามลำดับ โดยในขี้เหล็กแต่ละส่วนจะมีโครมาโทแกรมที่แตกต่างกันเล็กน้อย ในสารสกัดจากใบอ่อนและดอกขี้เหล็ก จะมีส่วนสูงสุดของกราฟ (peak) ที่เวลาประมาณ 8 นาที เพิ่มขึ้นมาหน้าส่วนสูงสุดของกราฟที่เป็นแอนไฮโดรบาราคอลด้วย ในขณะที่ในสารสกัดจากใบแก่ขี้เหล็กแก่นั้นไม่มีส่วนสูงสุดของกราฟที่เวลา 8 นาทีนี้ ดังนั้นจึงอาจใช้ความแตกต่างของโครมาโทแกรมนี้ในการระบุว่าเป็นสารสกัดที่ได้มาจากส่วนใดของขี้เหล็ก



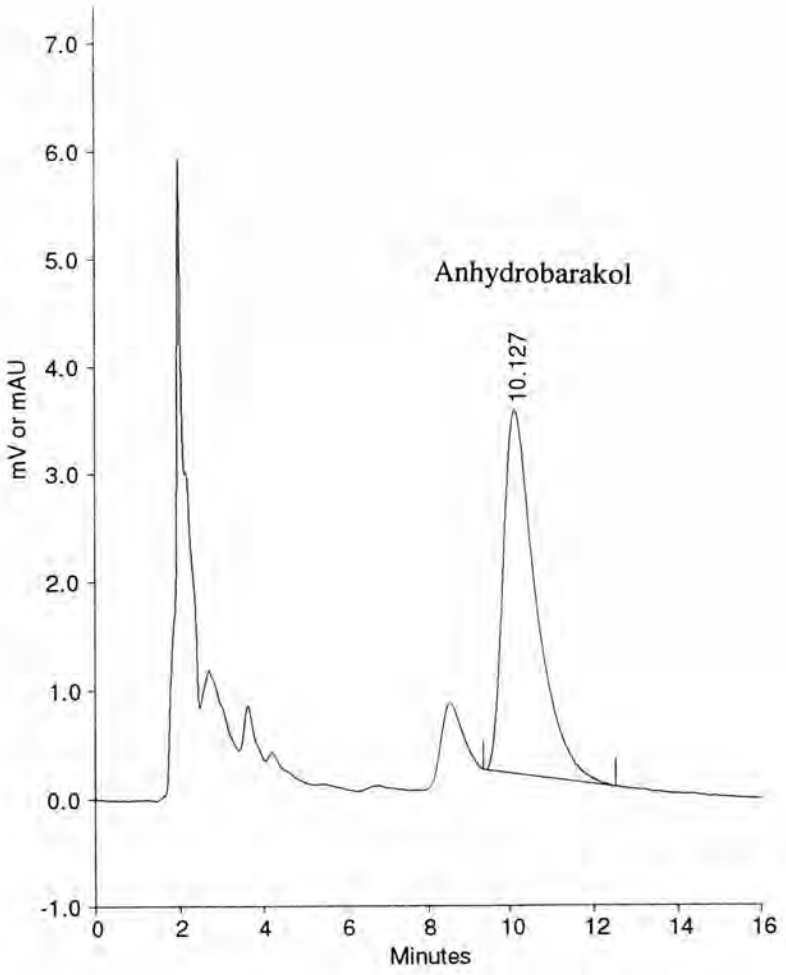
ภาพที่ 14 แสดงปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในใบแก่, ใบอ่อน และดอกขี้เหล็ก ซึ่งสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร



ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดจากใบขี้เหล็กแก่ ซึ่งสกัดโดยใช้ เอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร



ภาพที่ 16 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดจากใบขี้เหล็กอ่อน ซึ่งสกัดโดยใช้ เอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร



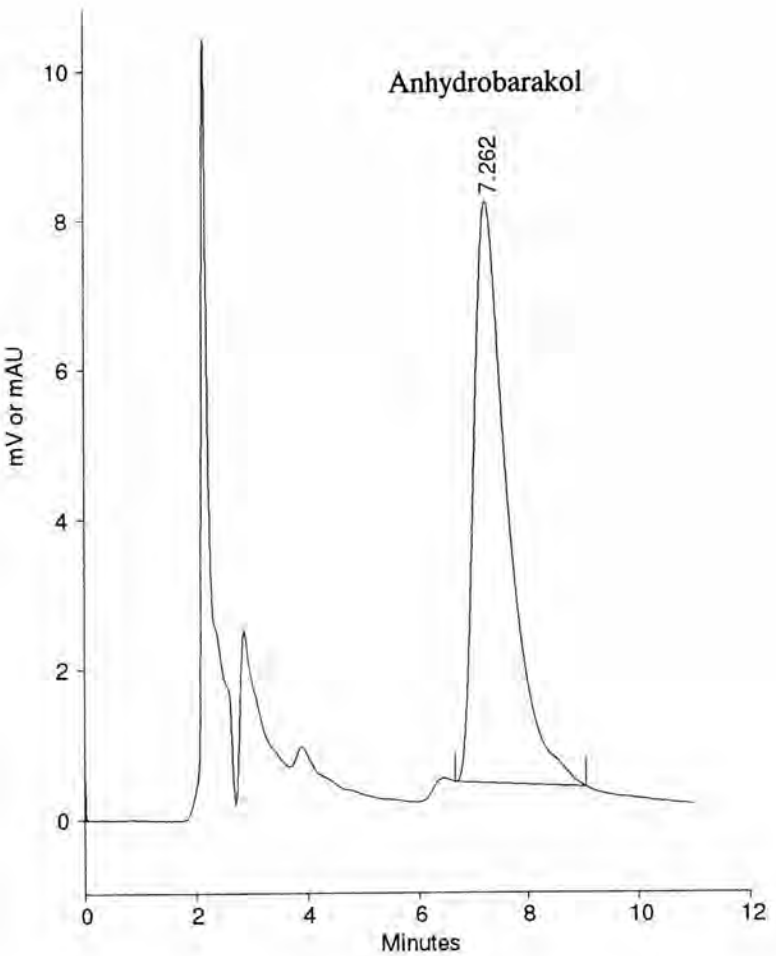
ภาพที่ 17 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดจากดอกขี้เหล็ก ซึ่งสกัดโดยใช้ เอทิลแอลกอฮอล์ 15% โดยปริมาตร

4. การเตรียมสารสกัดจากใบขี้เหล็กโดยวิธีเปอร์โคเลชันเพื่อนำไปใช้ในการตั้งสูตรตำรับ ได้ผลการทดลอง ดังนี้

จากการรวบรวมสารสกัดเข้มข้น เพื่อนำไปใช้ในการตั้งตำรับ ได้ทำการเตรียมสารสกัดด้วยวิธีเปอร์โคเลชัน ทั้งหมด 4 ครั้ง และพบว่าในแต่ละครั้งต้องทำการสกัดซ้ำ 7 รอบ ซึ่งในเปอร์โคเลตครั้งสุดท้ายมีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงหยุดทำการสกัด จากการทำเปอร์โคเลชัน 4 ครั้งนี้ ได้สารสกัด 30,500 มิลลิลิตร และเมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกและแยกเอาตะกอนออกแล้วเหลือปริมาตรสารสกัดเข้มข้น 1,400 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้น ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 และโครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้นที่เตรียมไว้สำหรับนำไปใช้ตั้งตำรับ แสดงในภาพที่ 18 ซึ่งจากโครมาโทแกรมนี้แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดเข้มข้น นอกจากมีแอนไฮโดรบาราคอลแล้วยังมีสารอื่น ๆ อยู่ด้วย และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้สามารถแยกวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในสารสกัดเข้มข้นนี้ได้

ตารางที่ 6 : ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้นที่เตรียมไว้สำหรับนำไปใช้ในการตั้งตำรับ

ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้น 1 กรัม (มิลลิกรัม)
1	37.74
2	37.81
3	37.73
$\bar{x}$ + SD	37.77 ± 0.05



ภาพที่ 18 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้นที่เตรียมไว้สำหรับนำไปใช้ตั้งตำรับ

5. การตั้งสูตรตำรับ

5.1) จากผลการทดลองในข้อ 4) พบว่าในสารสกัดเข้มข้น 1 กรัม มีปริมาณแอนไฮโดร-บาราคอล อยู่ 37.77 มิลลิกรัม ดังนั้นถ้าต้องการให้ในตำรับ 1 กรัม มีแอนไฮโดร-บาราคอล อยู่ประมาณ 2.5 มิลลิกรัม จึงต้องใช้สารสกัดเข้มข้นนี้ 0.07 กรัม ต่อตำรับ 1 กรัม หรือต้องใช้สารสกัดเข้มข้นนี้ 7 กรัม ต่อตำรับ 100 กรัม

5.2) จากการทดสอบรสชาติของตำรับ โดยใช้การทดสอบแบบอธิบาย (Descriptive test) ซึ่งใช้อาสาสมัครในการทดสอบ 15 คน และการประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 1-19 ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 7 ดังนี้

ตารางที่ 7 : ลักษณะทางกายภาพของยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กสูตรตำรับที่ 1-19

ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพ				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
1	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขมมาก, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.44	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขมมาก, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.48	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
3	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขมมาก, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.47	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
4	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขมมาก, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.49	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
5	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขม, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.51	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
6	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขม, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.53	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
7	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขม, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.62	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน

ตารางที่ 7 : ลักษณะทางกายภาพของยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กสูตรตำรับที่ 1-19 (ต่อ)

ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพ				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
8	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	ขม, เปรี้ยวเล็กน้อย, หวานเล็กน้อย	4.63	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
9	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวาน แต่ยังมีรสขมอยู่, เปรี้ยวเล็กน้อย	4.62	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
10	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวาน แต่ยังมีรสขมอยู่, เปรี้ยวเล็กน้อย	4.65	ตั้งทิ้งไว้ตกตะกอน
11	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวาน แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย, เปรี้ยวเล็กน้อย	4.64	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
12	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวาน แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย, เปรี้ยวเล็กน้อย	4.65	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
13	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวาน แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย, เปรี้ยวเล็กน้อย	4.77	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
14	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานขึ้น แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย	4.76	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
15	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานขึ้น แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย	4.77	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
16	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานขึ้น แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย	4.79	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
17	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานขึ้น แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย	4.74	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
18	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานขึ้น แต่ยังมีรสขมอยู่เล็กน้อย	4.87	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน
19	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานขึ้น มีรสขมอยู่แต่น้อยมาก	4.87	ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน

ในตารางที่ 2 สูตรพื้นฐานคือสูตรตำรับที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยสารแต่งรสหวาน 3 ชนิด คือ น้ำเชื่อมโกโก้ 40 กรัม ซอร์บิทอล 10 กรัม กลีเซอรีน 5 กรัม ในสูตรตำรับที่ 2-6 ได้ทำการปรับเพิ่มซอร์บิทอลและกลีเซอรีน ในสูตรตำรับที่ 7-12 เพิ่มปริมาณน้ำเชื่อมโกโก้เป็น 50 กรัม และปรับปริมาณซอร์บิทอล และกลีเซอรีนด้วย ในสูตรตำรับที่ 13-17 เพิ่มปริมาณน้ำเชื่อมโกโก้เป็น 60 กรัม และปรับปริมาณซอร์บิทอล และกลีเซอรีนด้วย ในสูตรตำรับที่ 18-19 เพิ่มปริมาณน้ำเชื่อมโกโก้ 65 กรัม และปรับปริมาณซอร์บิทอล และกลีเซอรีนด้วย จากการประเมินลักษณะทางกายภาพ และทดสอบรสชาติ ของทั้ง 19 ตำรับ โดยใช้การทดสอบแบบอธิบาย (Descriptive test) ซึ่งใช้อาสาสมัครในการทดสอบ 15 คน และจากผลการทดสอบได้ผลสรุปสี กลิ่น รสชาติ จากอาสาสมัครทั้ง 15 คน (ตารางที่ 7) ว่าทุกตำรับมีสีน้ำตาลเข้ม และมีกลิ่นโกโก้ เหมือนกัน หมด ส่วนค่า pH จะเป็นกรดคืออยู่ในช่วง 4.4 - 4.8 ในตำรับที่ 1-8 ยังมีรสขมของสารสกัดอยู่ค่อนข้างมาก มีรสหวานเล็กน้อย รสเปรี้ยวเล็กน้อย ค่า pH ของตำรับอยู่ในช่วง 4.4 - 4.6 และถ้าตั้งทิ้งไว้จะตกตะกอน ในตำรับที่ 9-13 มีรสหวานขึ้นเล็กน้อย ยังมีรสขมอยู่แต่น้อยลง และมีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ค่า pH อยู่ในช่วง 4.6-4.7 ตำรับที่ 9-10 ถ้าตั้งทิ้งไว้จะตกตะกอน จะเห็นว่าในตำรับที่ 1-10 นั้น เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการตกตะกอน ซึ่งตะกอนที่ตกนี้น่าจะเป็นตะกอนของผงโกโก้ ซึ่งเกิดขึ้นจากการที่ตำรับที่ 1-10 มีน้ำอยู่มากจึงทำให้น้ำเชื่อมโกโก้มีความหนืดลดลง ผงโกโก้ซึ่งเดิมเคยแขวนตะกอนอยู่จึงตกตะกอนลงมา จึงทำให้ตำรับไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ตัวยาก็จะกระจายตัวไม่สม่ำเสมอทำให้คนไข้ได้รับขนาดยาในแต่ละครั้งไม่คงที่ ดังนั้นตำรับที่ตั้งทิ้งไว้แล้วตกตะกอนนี้จึงไม่ผ่านการประเมินลักษณะทางกายภาพ ส่วนตำรับที่ 11-13 ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน ในตำรับที่ 14-18 มีรสหวานมากขึ้น รสขมยังคงมีอยู่เล็กน้อย แต่ไม่มีรสเปรี้ยว ค่า pH อยู่ในช่วง 4.7-4.8 ตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน ส่วนตำรับที่ 19 เป็นตำรับที่มีรสชาติค่อนข้างดี เนื่องจากมีรสหวานกำลังดี และสามารถกลบรสขมของสารสกัดได้จนเหลือรสขมน้อยมาก ซึ่งรสขมที่มีอยู่บ้างเล็กน้อยนี้น่าจะเป็นรสขมของตัวน้ำเชื่อมโกโก้เอง และตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน ดังนั้นจึงเลือกตำรับที่ 19 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตำรับที่ 19

	% (โดยน้ำหนัก)
สารสกัดขี้เหล็กเข้มข้น	7
น้ำเชื่อมโกโก้	65
ซอร์บิทอล	10
กลีเซอรีน	10
โซเดียม เบนโซเอต	0.1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปรับเป็น	100

6. ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่มีอยู่ในสูตรตำรับ

6.1) ผลการทดลองหาปริมาตรที่เหมาะสมของเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในการสกัดแยกแอนไฮโดรบาราคอล ออกจากตำรับที่ 19 ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 ดังนี้

ตารางที่ 8 : การเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดออกจากตำรับที่ 19 โดยใช้ เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในปริมาตร 100 และ 200 มิลลิลิตร

ปริมาตรเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร (มิลลิลิตร)	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในตำรับที่ 19 (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)	ร้อยละการกลับคืน*
100	1	15.08	92.80
	2	15.18	93.42
	3	15.09	92.86
	$\bar{x}$ ± SD	15.13 ± 0.07	93.11 ± 0.44
200	1	16.06	98.83
	2	16.20	99.69
	3	16.14	99.32
	$\bar{x}$ ± SD	16.13 ± 0.10	99.26 ± 0.61

* โดยคิดจาก $\frac{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่วิเคราะห์ได้ในตำรับ 6 กรัม}}{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัด (0.42 กรัม) ที่เติมลงไปในตำรับ}} \times 100$

ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในสารสกัด 0.42 กรัม (ซึ่งเป็นปริมาณสารสกัดที่เติมในตำรับ 6 กรัม) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 ดังนี้

ตารางที่ 9 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้น (ที่ใช้เติมลงในตำรับ) 0.42 กรัม

ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัดเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อสารสกัดเข้มข้น 0.42 กรัม)
1	16.24
2	16.25
3	16.28
$\bar{x}$ ± SD	16.25 ± 0.01

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดออกจากตำรับที่ 19 โดยใช้เมทิล-แอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในปริมาตร 100 และ 200 มิลลิลิตร แล้วใช้สถิติ Independent t-test ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง พบว่าเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในปริมาตร 200 มิลลิลิตร สามารถสกัดแยกแอนไฮโดรบาราคอลออกจากตำรับได้มากกว่าปริมาตร 100 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ข) โดยเมทิล-แอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร สามารถสกัดแยกแอนไฮโดร-บาราคอล ออกจากตำรับ 6 กรัมได้ คิดเป็นร้อยละ 93.11 ส่วนเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ในปริมาตร 200 มิลลิลิตร สามารถสกัดแยกแอนไฮโดรบาราคอลออกจากตำรับ 6 กรัม ได้ คิดเป็นร้อยละ 99.26 และจากโครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดแยกได้จากตำรับ 6 กรัม โดยใช้เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร 200 มิลลิลิตร แสดงในภาพที่ 19 ซึ่งจากโครมาโทแกรมนี้แสดงให้เห็นว่า สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับเนื่องจากสามารถวิเคราะห์แยกแอนไฮโดรบาราคอลได้โดยไม่มีสารอื่น ๆ ในตำรับรบกวนที่เวลา 7.8 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในการสกัดแยกแอนไฮโดร-บาราคอล ออกจากตำรับ 6 กรัม และในการทดลองขั้นต่อไป

6.2) จากการหาร้อยละการกลับคืน และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสมจากข้อ 6.1) ในการสกัดแอนไฮโดรบาราคอล ออกจากตำรับ ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 ดังนี้

ตารางที่ 10 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดออกจากตำรับ 6 กรัม โดยสกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในตำรับ 6 กรัม (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)	ร้อยละการกลับคืน*
1	16.18	99.73
2	15.73	96.99
3	15.93	98.22
4	16.06	99.02
5	16.20	99.91
6	16.17	99.69
$\bar{x}$ ± SD	16.02 ± 0.19	98.77 ± 1.22

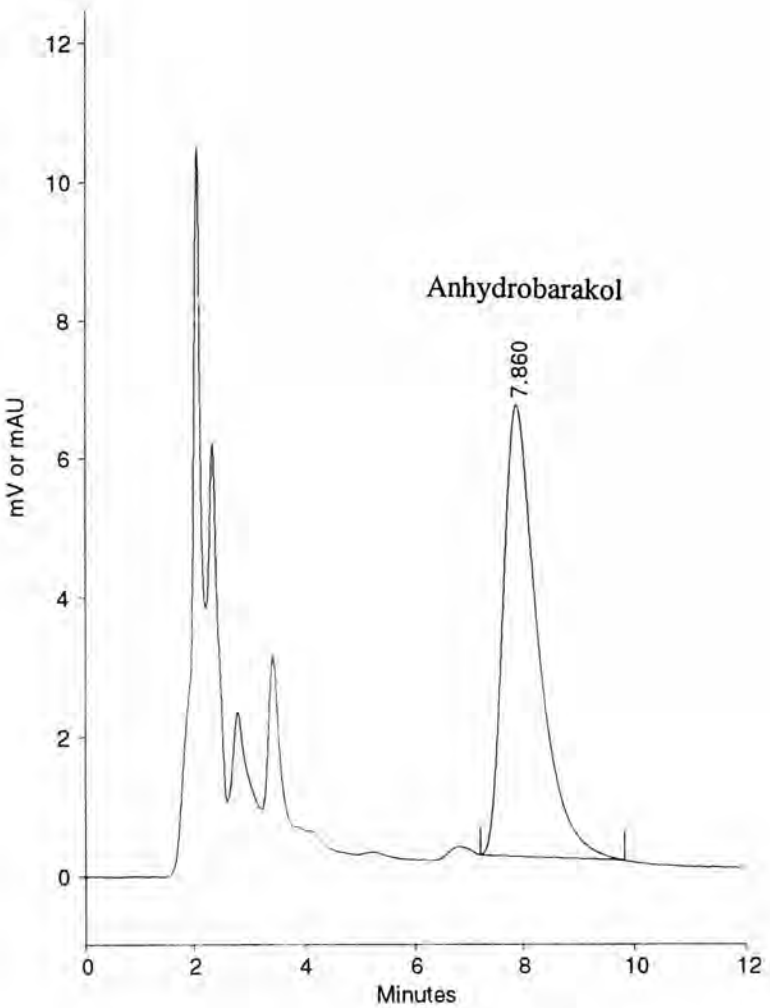
* ร้อยละการกลับคืน = $\frac{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ที่วิเคราะห์ได้ในตำรับ 6 กรัม}}{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสารสกัด (0.42 กรัม) ที่เติมลงไปในตำรับ}} \times 100$

สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน = $\frac{SD}{\bar{X}} \times 100$

= $\frac{0.1948}{16.02} \times 100$

= 1.22

จากผลการคำนวณ (ตารางที่ 10) พบว่าร้อยละการกลับคืน ในการสกัดแอนไฮโดร-บาราคอลออกจากตำรับยาน้ำเชื่อม 6 กรัม โดยใช้เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 98.77 และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 1.22 จึงถือได้ว่าวิธีการสกัดที่ใช้นี้สามารถสกัดแอนไฮโดรบาราคอลออกจากตำรับได้อยู่ในเกณฑ์ที่สูงและยอมรับได้ นอกจากนี้วิธีนี้ยังมีความเที่ยงตรงสูงอีกด้วย เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธ์ความแปรปรวนค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีนี้ในการสกัดแอนไฮโดรบาราคอลออกจากตำรับ ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 19 โครมาโทแกรมของแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งสกัดแยกได้จากตำรับ 6 กรัม โดยใช้ เมทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยปริมาตร 200 มิลลิลิตร

7. ผลการศึกษาความคงตัวทางกายภาพ และเคมีของตำรับที่ 19

7.1) ผลของ pH ต่อความคงตัวของตำรับที่ 19

จากการวัด pH ของตำรับที่ 19 พบว่าตำรับมี pH 4.82 ในการทดลองนี้จึงทำการปรับ pH ของตำรับให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดคือ 4.8-5.5 สาเหตุที่ปรับ pH ให้อยู่ในช่วงนี้เนื่องจากมีปัญหาในเรื่องของรสชาติ คือได้ทดลองปรับ pH ตำรับให้ต่ำกว่า 4.8 โดยใช้กรดซิตริก พบว่า ตำรับจะมีรสเปรี้ยว ซึ่งเป็นรสที่ไม่เข้ากับรสโกโก้ของตำรับ และเมื่อปรับ pH ตำรับให้สูงกว่า 4.8 โดยใช้โซเดียม ซิเตรท พบว่าจะทำให้ตำรับมีรสเค็มขึ้น ซึ่งตำรับที่มี pH 5 และ 5.5 นั้น จะมีรสเค็มขึ้นเล็กน้อย อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

7.1.1) จากการนำตำรับที่ 19 มาปรับ pH โดยใช้โซเดียม ซิเตรท ได้แสดงปริมาณโซเดียม ซิเตรท ที่ใช้ และ pH ที่ได้ ในตารางที่ 11 ดังนี้

ตารางที่ 11 : แสดงส่วนประกอบของตำรับและ ค่า pH ของตำรับที่ 19.1 - 19.3

สารในตำรับ (กรัม)	ตำรับที่		
	19.1	19.2	19.3
สารสกัดขี้เหล็กเข้มข้น	7	7	7
น้ำเชื่อมโกโก้	65	65	65
ซอร์บิทอล	10	10	10
กลีเซอรีน	10	10	10
โซเดียม เบนโซเอต	0.1	0.1	0.1
โซเดียม ซิเตรท	-	0.3	1.33
น้ำกลั่นบริสุทธ์ ปรับเป็น	100	100	100
pH	4.82	5.00	5.51

7.1.2) ลักษณะทางกายภาพ และปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ของตำรับที่ 19.1 - 19.3 เมื่อเวลาเริ่มต้น แสดงในตารางที่ 12 และตารางที่ 13 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 12 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1 - 19.3 เมื่อเวลาเริ่มต้น

ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับเมื่อเวลาเริ่มต้น				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี ขมบ้างแต่น้อยมาก	4.82	ไม่ตกตะกอน
19.2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี เค็มเล็กน้อย ขมบ้างแต่น้อยมาก	5.00	ไม่ตกตะกอน
19.3	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี เค็มขึ้นอีกเล็กน้อย ขมบ้างแต่น้อยมาก	5.51	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 13 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่ 19.1 - 19.3 เมื่อเวลาเริ่มต้น

ตำรับที่	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)
19.1	1	14.42
	2	14.74
	3	14.73
	$\bar{x}$ ± SD	14.58 ± 0.23
19.2	1	14.62
	2	14.69
	3	14.75
	$\bar{x}$ ± SD	14.66 ± 0.05
19.3	1	14.43
	2	14.74
	3	14.55
	$\bar{x}$ ± SD	14.59 ± 0.22

7.1.3) ลักษณะทางกายภาพ และปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ของตำรับที่ 19.1-19.3 เมื่อผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ) แสดงในตารางที่ 14 ตารางที่ 15 และภาพที่ 20 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 14 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1 - 19.3 เมื่อผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ)

ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับเมื่อผ่านสภาพเร่ง				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานน้อยลงเล็กน้อย ขมเล็กน้อย	4.79 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
19.2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานน้อยลงเล็กน้อย มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย และขมกว่าตำรับที่ 19.1 เล็กน้อย	4.96 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
19.3	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย และขมกว่า ตำรับที่ 19.1 และ 19.2 เล็กน้อย	5.42 ±0.00	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 15 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในตำรับที่ 19.1 - 19.3 เมื่อผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ)

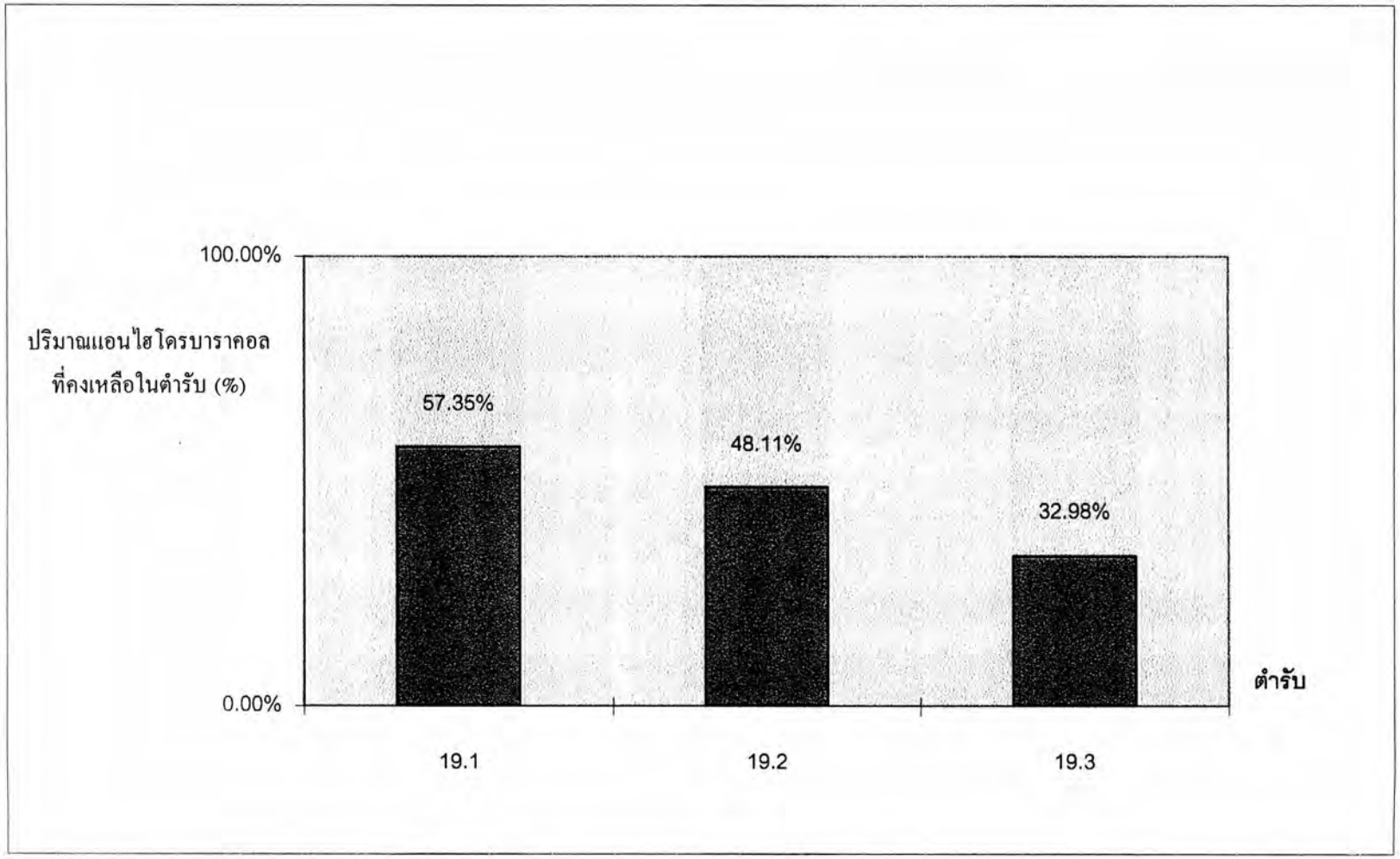
ตำรับที่	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 6 กรัม (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 6 กรัม คิดเป็นร้อยละ *
19.1	1	8.36	57.98
	2	8.36	56.72
	3	8.35	56.69
	$\bar{x}$ ± SD	8.36 ± 0.00	57.35 ± 0.89
19.2	1	7.09	48.50
	2	7.01	47.72
	3	7.11	48.20
	$\bar{x}$ ± SD	7.05 ± 0.06	48.11 ± 0.55
19.3	1	4.75	32.92
	2	4.87	33.04
	3	4.82	33.13
	$\bar{x}$ ± SD	4.81 ± 0.08	32.98 ± 0.85

* โดยคิดจาก $\frac{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในตำรับ 6 กรัม ภายหลังผ่านสภาพเร่ง}}{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 6 กรัม เมื่อเวลาเริ่มต้น}} \times 100$

จากการศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของแอนไฮโดรบาราคอล ในตำรับที่ 19 ได้ดำเนินการทดลองโดยเตรียมตำรับทั้ง 3 (ตำรับที่ 19.1 - 19.3) จากสารสกัดขี้เหล็กเข้มข้นชุดเดียวกัน และทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเริ่มต้น (ในตำรับ 6 กรัม) และเปรียบเทียบปริมาณ แอนไฮโดรบาราคอลเริ่มต้นของทั้ง 3 ตำรับ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของตำรับแต่ละคู่ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test จากผลการทดลอง (ตารางที่

13) และผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ข) พบว่าปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเริ่มต้น (ในตำรับ 6 กรัม) ของตำรับทั้ง 3 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงถือได้ว่าปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล เริ่มต้นของทั้ง 3 ตำรับ เท่ากัน และจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในทั้ง 3 ตำรับ ภายหลังจากการผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ) (ตารางที่ 15) พบว่า ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในทั้ง 3 ตำรับนั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ข) โดยตำรับที่ 19.1 ซึ่งมี pH 4.8 มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับ (6 กรัม) คิดเป็นร้อยละ 57.35 ซึ่งมากกว่าตำรับที่ 19.2 (pH 5) และตำรับที่ 19.3 (pH 5.5) ที่มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับ (6 กรัม) คิดเป็นร้อยละ 48.11 และ 32.98 ตามลำดับ ส่วนในด้านการประเมินลักษณะทางกายภาพ ทั้ง 3 ตำรับ เมื่อเวลาเริ่มต้น จะมีสีน้ำตาลเข้ม, มีกลิ่นโกโก้ และเมื่อตั้งทิ้งไว้จะไม่เกิดการตกตะกอนเหมือนกันทั้ง 3 ตำรับ แต่ในด้านรสชาติตำรับที่ 19.2 และ 19.3 ซึ่งมีการเติมโซเดียม ซิเตรท เพื่อปรับ pH นั้น จะมีรสเค็มกว่าตำรับที่ 19.1 และเมื่อทั้ง 3 ตำรับผ่านสภาพเร่งพบว่าตำรับยังคงมีสีน้ำตาลเข้ม, มีกลิ่นโกโก้ และเมื่อตั้งทิ้งไว้จะไม่เกิดการตกตะกอนเหมือนเดิม แต่รสชาติของทั้ง 3 ตำรับจะขมกว่าเดิม โดยตำรับที่ 19.1 นั้น จะขมขึ้นเพียงเล็กน้อย สำหรับตำรับที่ 19.2 และ 19.3 ซึ่งเติมโซเดียมซิเตรทจะมีรสขมกว่าตำรับที่ 19.1 ส่วนค่า pH ของตำรับ พบว่าทั้ง 3 ตำรับ เมื่อผ่านสภาพเร่งแล้วค่า pH จะลดลงเล็กน้อย

จากผลการทดลองข้างต้นนี้ จึงเลือกตำรับที่มีความคงตัวดีที่สุดจาก 3 ตำรับ ซึ่งก็คือตำรับที่ 19.1 (มี pH 4.8) ไปเติมบัฟเฟอร์ เพื่อให้ตำรับมี pH คงที่ประมาณ 4.8 และบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้คือกรดซิตริก 0.1% และโซเดียม ซิเตรท 0.3% ซึ่งทั้งกรดซิตริก และโซเดียม ซิเตรท นี้นอกจากจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในตำรับแล้ว ยังมีฤทธิ์เป็นสารคีเลทติงในตำรับอีกด้วย การที่ตำรับที่ 19.2 และ 19.3 ซึ่งมี pH 5 และ 5.5 ตามลำดับ มีความคงตัวน้อยกว่าตำรับที่ 19.1 อาจเนื่องจากตำรับมี pH เพิ่มขึ้น ทำให้แอนไฮโดรบาราคอลสลายตัวได้มากขึ้นกว่าตำรับที่มี pH 4.8



ภาพที่ 20 แสดงปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในตำรับที่ 19.1, 19.2, 19.3 ภายหลังผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ)

ตำรับที่ 19.1 (เติมบัฟเฟอร์)

	% (โดยน้ำหนัก)
สารสกัดขี้เหล็กเข้มข้น	7
น้ำเชื่อมโกโก้	65
ซอร์บิทอล	10
กลีเซอรีน	10
โซเดียม เบนโซเอต	0.1
โซเดียม ซิเตรท	0.3
กรดซิตริก	0.1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปรับเป็น	100

จากนั้นจึงนำตำรับ 19.1 ที่เติมบัฟเฟอร์แล้วนี้ (มี pH 4.85) ไปทำการศึกษาผลของสารต้านออกซิเดชันในข้อ 7.2) ต่อไป

7.2) ผลของสารต้านออกซิเดชันต่อความคงตัวของตำรับที่ 19.1

7.2.1) จากการนำตำรับที่ 19.1 มาเติมสารต้านออกซิเดชัน โดยปริมาณและชนิดของสารต้านออกซิเดชัน ที่เลือกใช้ คือโซเดียม เมทาไบซัลไฟต์ 0.025% (เนื่องจากสารนี้จะทำให้ตำรับมีกลิ่นฉุน ดังนั้นจึงเลือกใช้ในปริมาณที่ต่ำสุดที่จะให้ผลในการต้านออกซิเดชันได้) โพรพิล แกลเลต 0.1% และบิวทิเลท ไฮดรอกซีโทลูอีน 0.02% (เนื่องจากสารต้านออกซิเดชัน 2 ตัวนี้เป็นชนิดที่ละลายในน้ำมัน จึงเลือกใช้ปริมาณนี้ซึ่งเป็นค่าสูงสุด เพราะในตำรับมีส่วนผสมที่เป็นน้ำมัน คือผงโกโก้อยู่ค่อนข้างมาก) ซึ่งแสดง ในตารางที่ 16 ดังนี้

ตารางที่ 16 : การปรับเปลี่ยนชนิดของสารต้านออกซิเดชันในตำรับที่ 19.1.1-19.1.8

ตำรับที่ / สารในตำรับ (กรัม)	19.1.1	19.1.2	19.1.3	19.1.4	19.1.5	19.1.6	19.1.7	19.1.8
สารสกัดขี้เหล็กเข้มข้น	←			7	→			
น้ำเชื่อมโกโก้	←			65	→			
ซอร์บิทอล	←			10	→			
กลีเซอรีน	←			10	→			
โซเดียม เบนโซเอต	←			0.1	→			
โซเดียม ซิเตรท	←			0.3	→			
กรดซิตริก	←			0.1	→			
โซเดียม เมทาไบซัลไฟต์	0.025	-	-	0.025	0.025	-	0.025	-
โพรพิล แกลเลต	-	0.1	-	0.1	-	0.1	0.1	-
บิวทิเลทเทด ไฮดรอกซีโทลูอีน	-	-	0.02	-	0.02	0.02	0.02	-
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปรับเป็น	←			100	→			

7.2.2) ลักษณะทางกายภาพและปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลของตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อเวลาเริ่มต้นแสดงในตารางที่ 17 และตารางที่ 18 ตามลำดับดังนี้

ตารางที่ 17 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อเวลาเริ่มต้น

ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับเมื่อเวลาเริ่มต้น				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1.1	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์ เล็กน้อย	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.83	ไม่ตกตะกอน
19.1.2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.85	ไม่ตกตะกอน
19.1.3	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84	ไม่ตกตะกอน
19.1.4	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์ เล็กน้อย	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.86	ไม่ตกตะกอน
19.1.5	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์ เล็กน้อย	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.86	ไม่ตกตะกอน
19.1.6	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84	ไม่ตกตะกอน
19.1.7	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของโซเดียม เมทาไบซัลไฟท์ เล็กน้อย	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84	ไม่ตกตะกอน
19.1.8	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.85	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 18 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อเวลาเริ่มต้น

ตำรับที่	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)
19.1.1	1	13.11
	2	13.21
	3	13.29
	$\bar{x}$ ± SD	13.16 ± 0.07
19.1.2	1	13.25
	2	13.21
	3	13.28
	$\bar{x}$ ± SD	13.23 ± 0.03
19.1.3	1	13.23
	2	13.17
	3	13.26
	$\bar{x}$ ± SD	13.20 ± 0.04
19.1.4	1	13.24
	2	13.13
	3	13.26
	$\bar{x}$ ± SD	13.19 ± 0.08
19.1.5	1	13.29
	2	13.17
	3	13.31
	$\bar{x}$ ± SD	13.23 ± 0.08
19.1.6	1	13.21
	2	13.15
	3	13.38
	$\bar{x}$ ± SD	13.18 ± 0.04

ตารางที่ 18 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อเวลาเริ่มต้น (ต่อ)

ตำรับที่	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)
19.1.7	1	13.26
	2	13.30
	3	13.35
	$\bar{x}$ ± SD	13.28 ± 0.03
19.1.8	1	13.26
	2	13.22
	3	13.33
	$\bar{x}$ ± SD	13.24 ± 0.03

7.2.3) ลักษณะทางกายภาพและปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลของตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ) แสดงในตารางที่ 19 ตารางที่ 20 และภาพที่ 21 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 19 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ)

ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับเมื่อผ่านสภาพเร่ง				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1.1	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.74 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
19.1.2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.72 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
19.1.3	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.76 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
19.1.4	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.78 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
19.1.5	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.78 ± 0.02	ไม่ตกตะกอน
19.1.6	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.78 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
19.1.7	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้ผสม กลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.78 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
19.1.8	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมกว่าเดิมเล็กน้อย	4.79 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 20 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ)

ตำรับที่	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 6 กรัม คิดเป็นร้อยละ *
19.1.1	1	8.12	61.94
	2	8.13	61.54
	3	8.20	61.70
	$\bar{x}$ ± SD	8.15 ± 0.04	61.74 ± 0.28
19.1.2	1	8.99	67.85
	2	8.91	67.45
	3	8.93	67.24
	$\bar{x}$ ± SD	8.95 ± 0.06	67.65 ± 0.28
19.1.3	1	9.05	68.40
	2	8.96	68.03
	3	8.92	67.27
	$\bar{x}$ ± SD	9.01 ± 0.06	68.22 ± 0.26
19.1.4	1	7.96	60.12
	2	7.89	60.09
	3	7.79	58.88
	$\bar{x}$ ± SD	7.93 ± 0.05	60.11 ± 0.02
19.1.5	1	7.55	56.81
	2	7.48	56.80
	3	7.34	55.15
	$\bar{x}$ ± SD	7.52 ± 0.05	56.81 ± 0.01

ตารางที่ 20 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 เมื่อผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ) (ต่อ)

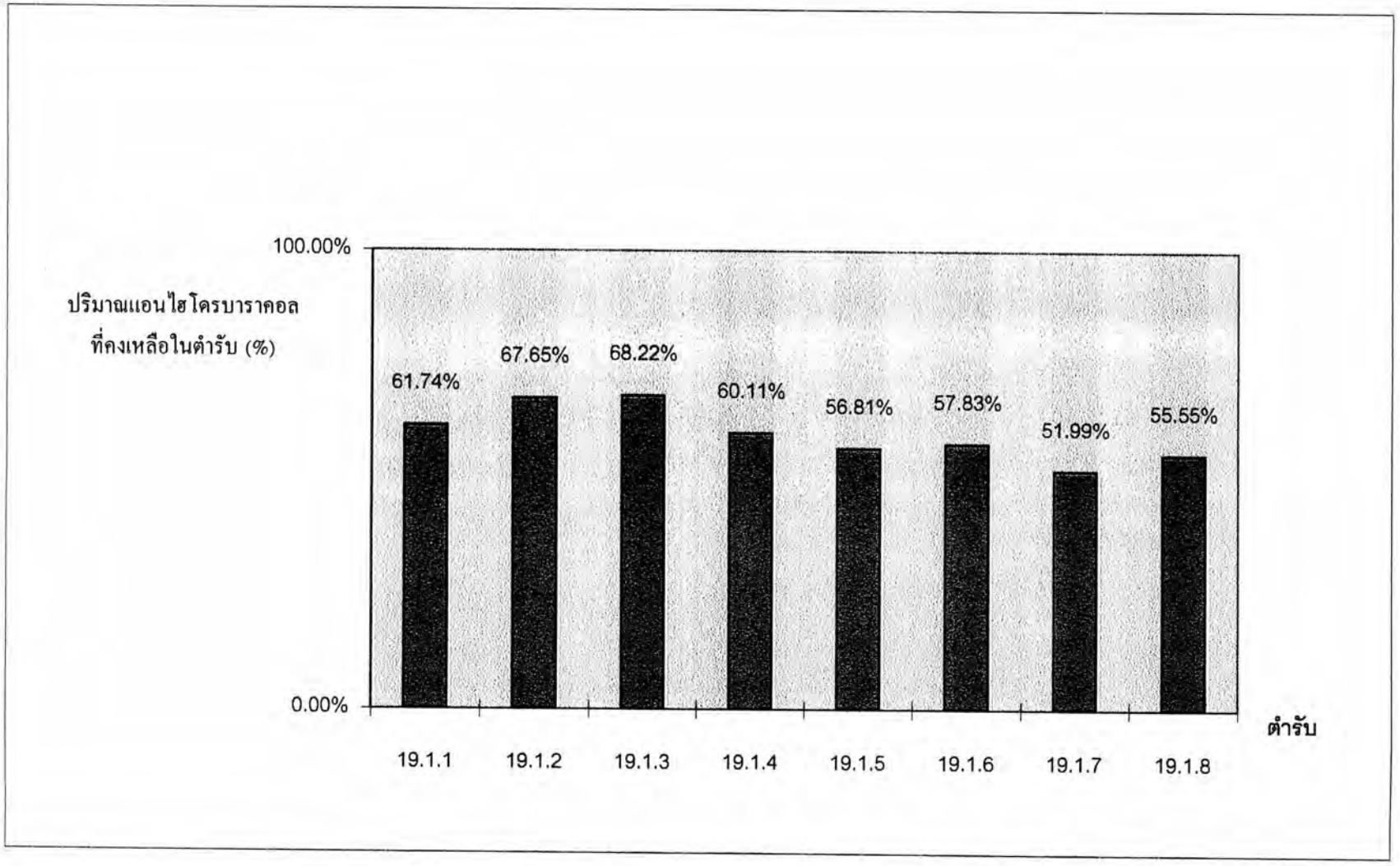
ตำรับที่	ครั้งที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ(มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 6 กรัม คิดเป็นร้อยละ *
19.1.6	1	7.56	58.42
	2	7.54	57.23
	3	7.49	56.00
	$\bar{x}$ ± SD	7.55 ± 0.01	57.83 ± 0.84
19.1.7	1	6.94	52.34
	2	6.87	51.65
	3	6.89	51.61
	$\bar{x}$ ± SD	6.92 ± 0.04	51.99 ± 0.49
19.1.8	1	7.47	56.33
	2	7.24	54.77
	3	7.34	55.06
	$\bar{x}$ ± SD	7.36 ± 0.16	55.55 ± 1.10

* โดยคิดจาก $\frac{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 6 กรัมที่ผ่านสภาพเร่ง}}{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 6 กรัม เมื่อเวลาเริ่มต้น}}$ x 100

จากการศึกษาผลของสารต้านออกซิเดชันต่อความคงตัวของแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่ 19.1 ได้ดำเนินการทดลองโดยเตรียมตำรับทั้ง 8 (ตำรับที่ 19.1.1-19.1.8) จากสารสกัดขี้เหล็กเข้มข้นชุดเดียวกัน และทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเริ่มต้น (ในตำรับ 6 กรัม) และเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเริ่มต้นของทั้ง 8 ตำรับ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของตำรับแต่ละคู่ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test จากผลการทดลอง (ตารางที่ 18) และผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ข) พบว่าปริมาณ

แอนไฮโดรบาราคอลเริ่มต้น (ในตำรับ 6 กรัม) ของทั้ง 8 ตำรับแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงถือได้ว่าปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเริ่มต้นของทั้ง 8 ตำรับเท่ากัน และจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในทั้ง 8 ตำรับภายหลังจากการผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ) (ตารางที่ 20) พบว่าปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในทั้ง 8 ตำรับนั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาคผนวก ข) โดยตำรับที่ 19.1.2 ซึ่งมีโพรพิล แกลเลต ปริมาณ 0.1% โดยน้ำหนัก เป็นสารต้านออกซิเดชันในตำรับนั้น มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับ (6 กรัม) คิดเป็นร้อยละ 67.65 และตำรับที่ 19.1.3 ซึ่งมีบิวทิเลทเทด ไฮดรอกซีโทลูอีน 0.02% โดยน้ำหนัก เป็นสารต้านออกซิเดชันในตำรับนั้น มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับ (6 กรัม) คิดเป็นร้อยละ 68.22 ซึ่งปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ของทั้ง 2 ตำรับนี้ (19.1.2 และ 19.1.3) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ข) และทั้ง 2 ตำรับนี้มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลคงเหลืออยู่ในตำรับมากที่สุด เมื่อเทียบกับตำรับอื่น ๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในตำรับมีส่วนผสมที่เป็นน้ำมัน คือผงโกโก้อยู่ค่อนข้างมาก และในตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 นี้ มีโพรพิล แกลเลต และบิวทิเลทเทด ไฮดรอกซีโทลูอีน ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันชนิดที่ละลายในน้ำมัน อยู่ในปริมาณที่สูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลือในตำรับที่ 19.1.1-19.1.7 กับตำรับที่ 19.1.8 ซึ่งเป็นตำรับที่ไม่มีการเติมสารต้านออกซิเดชัน พบว่าตำรับที่ 19.1.1-19.1.6 มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลคงเหลือในตำรับมากกว่า ตำรับที่ 19.1.8 นั่นแสดงว่าการเติมสารต้านออกซิเดชันในตำรับสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของตำรับที่ 19.1.1-19.1.6 ได้ระดับหนึ่ง ยกเว้นตำรับที่ 19.1.7 ซึ่งมีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลคงเหลือในตำรับน้อยกว่าตำรับที่ 19.1.8 ส่วนในด้านการประเมินลักษณะทางกายภาพ ทั้ง 8 ตำรับ เมื่อเวลาเริ่มต้น จะมีสีน้ำตาลเข้ม, มีกลิ่นโกโก้ ยกเว้น ในตำรับที่ 19.1.1, 19.1.4, 19.1.5, 19.1.7 ซึ่งมีโซเดียม เมทาไบซัลไฟท์ อยู่ในตำรับด้วยนั้น จะมีกลิ่นโกโก้ผสมกับกลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบ ซัลไฟท์ เล็กน้อย และทั้ง 8 ตำรับ เมื่อตั้งทิ้งไว้จะไม่เกิดการตกตะกอน ส่วนค่า pH มีค่าประมาณ 4.8 และเมื่อทั้ง 8 ตำรับผ่านสภาพเร่งพบว่าตำรับยังคงมีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นโกโก้ (ยกเว้นตำรับที่มี โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์ จะมีกลิ่นโกโก้ผสมกับกลิ่นฉุนของ โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์) และไม่เกิดการตกตะกอนเหมือนเดิม แต่รสชาติของทั้ง 8 ตำรับจะขมกว่าเดิมเล็กน้อย ส่วนค่า pH จะลดลงเล็กน้อย

จากผลการทดลองข้างต้นนี้ จึงเลือกตำรับที่มีความคงตัวดีที่สุดจาก 8 ตำรับ ซึ่งก็คือตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เพื่อนำไปศึกษาความคงตัวของตำรับในระยะยาว ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 21 แสดงปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในตำรับที่ 19.1.1-19.1.8 ภายหลังผ่านสภาพเร่ง (Freeze & Thaw cycle 6 รอบ)

7.3) การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 นี้ ได้ทำการทดลองโดยการเก็บทั้ง 2 ตำรับ ในสภาพเร่งคือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และสภาพอื่น ๆ คือ ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) เป็นเวลา 4 เดือน ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

7.3.1) การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ในสภาพเร่ง

ลักษณะทางกายภาพและปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 21 และตารางที่ 22 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 21 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับเมื่อผ่านสภาพเร่ง				
		สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1.2	0	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	1	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้น้อยลง	หวานน้อยลง, มีรสขมมากกว่าตอนเริ่มต้น	4.77 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้น้อยลง	หวานน้อยลง, มีรสขมมากกว่าสัปดาห์ที่ 1	4.68 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
19.1.3	0	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.85 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	1	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้น้อยลง	หวานน้อยลง, มีรสขมมากกว่าตอนเริ่มต้น	4.73 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้น้อยลง	หวานน้อยลง, มีรสขมมากกว่าสัปดาห์ที่ 1	4.65 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 22 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)				ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับคิดเป็นร้อยละ*
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{x} \pm SD$	
19.1.2	0	13.36	13.41	13.29	13.39 ± 0.04	100 ± 0.26
	1	6.44	6.56	6.51	6.39 ± 0.08	48.55 ± 0.63
	2	1.58	1.61	1.68	1.60 ± 0.02	11.91 ± 0.16
19.1.3	0	13.39	13.24	13.28	13.32 ± 0.11	100 ± 0.80
	1	6.32	6.40	6.27	6.36 ± 0.06	47.75 ± 0.42
	2	1.59	1.60	1.51	1.60 ± 0.01	11.98 ± 0.05

* โดยคิดจาก $\frac{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในตำรับที่เวลานั้น}}{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$

เมื่อเก็บยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ซึ่งเตรียมจากสารสกัดขี้เหล็กชุดเดียวกัน ในสภาพเร่ง คือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ ทั้ง 2 ตำรับ มีสีน้ำตาลเข้ม, ไม่มีตะกอนเหมือนตอนเริ่มต้น แต่มีกลิ่นโกโก้น้อยลง มีรสหวานน้อยลง, มีรสขมมากกว่าตอนเริ่มต้น และมีค่า pH ลดลงจากเดิมเล็กน้อย และเมื่อทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ พบว่าทั้ง 2 ตำรับมีสีน้ำตาลเข้ม, ไม่มีตะกอนเหมือนตอนเริ่มต้นเช่นกัน แต่มีกลิ่นโกโก้น้อยลง มีรสหวานน้อยลง, มีรสขมมากกว่าตำรับที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 1 สัปดาห์ และมีค่า pH ลดลงจากตำรับที่ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์เล็กน้อย (ตารางที่ 21) ส่วนปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในทั้ง 2 ตำรับ ที่เวลา 0, 1, 2 สัปดาห์นั้น จากการใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในสัปดาห์ต่างๆ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (ภาคผนวก ข) ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล พบว่าปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในแต่ละตำรับ ที่เวลา 0, 1, 2 สัปดาห์

นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ในตำรับที่ 19.1.2 มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับ คิดเป็นร้อยละ 48.55 และ 11.91 ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนในตำรับที่ 19.1.3 มีปริมาณแอนไฮโดร- บาราคอลเหลืออยู่ในตำรับ คิดเป็นร้อยละ 47.75 และ 11.98 ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้ง 2 ตำรับ คือ ตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 นั้น ไม่มีความคงตัวทั้งทางกายภาพ และทางเคมี เมื่อเก็บไว้ในสภาพเร่ง (ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ซึ่งพบว่าภายในระยะเวลาเพียง 2 สัปดาห์ ทั้ง 2 ตำรับ มีการเปลี่ยนแลงทั้งทางกายภาพ และทางเคมีอย่างชัดเจน โดยในทางกายภาพ ทั้ง 2 ตำรับ มีกลิ่นและรสชาติเปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจเกิดจากความร้อนทำให้น้ำเชื่อมโกโก้เสียสภาพ ส่วนในทางเคมีนั้นพบว่าปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับลดลงเหลือเพียงร้อยละ 11 เท่านั้น ดังนั้นในการศึกษาความคงตัวของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 จึงทำการศึกษาเพียงแค่ 2 สัปดาห์ เนื่องจากมีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับน้อยมาก (ประมาณ 1.6 มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม) ซึ่งยากต่อการวิเคราะห์และจากข้อมูลที่ได้มา 2 สัปดาห์นี้ ก็เพียงพอที่จะสรุปได้ว่าตำรับทั้ง 2 นั้น ไม่มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี เมื่อเก็บไว้ในสภาพเร่ง (ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส)

7.3.2) การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ที่อุณหภูมิห้อง

ลักษณะทางกายภาพและปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน แสดงในตารางที่ 23 ตารางที่ 24 และภาพที่ 22 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 23 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับ				
		สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1.2	0	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.82 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	4	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.79 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	6	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.87 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	8	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.75 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	10	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.80 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	12	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.79 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	14	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.76 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	16	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.80 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 23 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน (ต่อ)

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับ				
		สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1.3	0	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.85 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.82 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	4	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.80 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	6	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.88 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	8	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.77 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	10	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.76 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	12	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.75 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	14	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.77 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	16	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย	4.80 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 24 : ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)				ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับคิดเป็นร้อยละ*
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{x}$ ± SD	
19.1.2	0	13.36	13.41	13.29	13.39 ± 0.04	100 ± 0.26
	2	9.98	9.80	9.80	9.89 ± 0.13	73.86 ± 0.95
	4	8.68	8.71	8.63	8.70 ± 0.02	64.94 ± 0.16
	6	3.54	3.54	3.43	3.54 ± 0.00	26.44 ± 0.00
	8	2.75	2.77	2.69	2.76 ± 0.01	20.62 ± 0.11
	10	2.21	2.09	2.11	2.13 ± 0.07	16.06 ± 0.63
	12	1.99	1.87	1.92	1.93 ± 0.08	14.42 ± 0.63
	14	1.36	1.31	1.41	1.34 ± 0.04	9.97 ± 0.27
	16	1.08	0.99	1.01	1.04 ± 0.06	7.73 ± 0.48
19.1.3	0	13.39	13.24	13.28	13.32 ± 0.11	100 ± 0.80
	2	9.66	9.86	9.74	9.76 ± 0.14	73.27 ± 1.06
	4	8.66	8.55	8.67	8.61 ± 0.08	64.61 ± 0.59
	6	3.26	3.25	3.19	3.26 ± 0.01	24.44 ± 0.05
	8	2.53	2.55	2.46	2.54 ± 0.01	19.07 ± 0.11
	10	2.14	2.06	2.10	2.10 ± 0.05	15.77 ± 0.42
	12	1.88	1.75	1.82	1.82 ± 0.09	14.70 ± 1.32
	14	1.10	1.12	1.06	1.11 ± 0.14	8.34 ± 0.11
	16	0.94	1.00	0.91	0.97 ± 0.04	7.29 ± 0.32

* โดยคิดจาก $\frac{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในตำรับที่เวลานั้น}}{\text{ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$

7.3.3) การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น)

ลักษณะทางกายภาพและปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน แสดงในตารางที่ 25 ตารางที่ 26 และภาพที่ 22 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 25 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับ				
		สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1.2	0	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	4	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	6	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.99 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	8	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.80 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	10	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.77 ± 0.02	ไม่ตกตะกอน
	12	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.76 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	14	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.79 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	16	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.81 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน

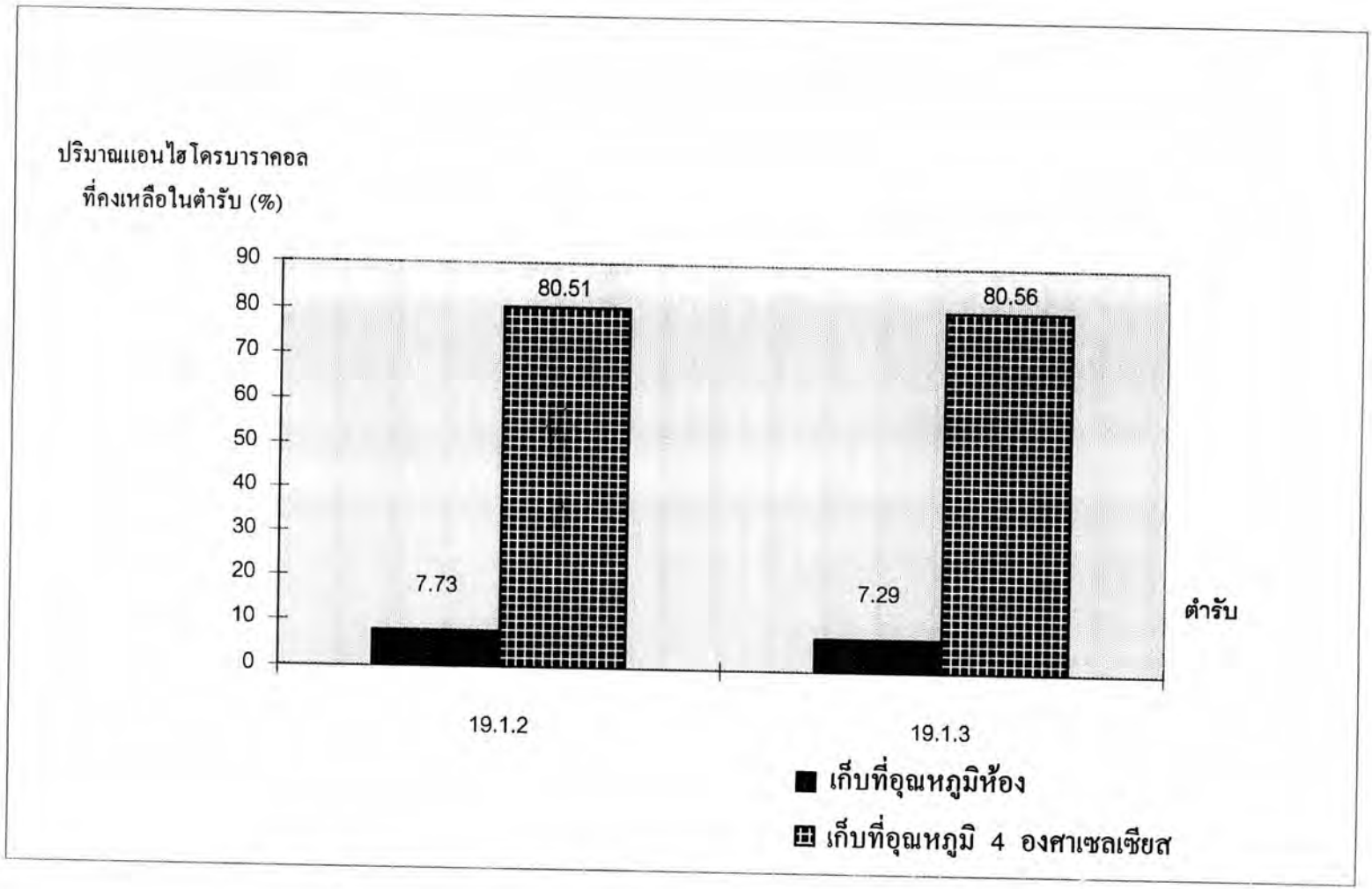
ตารางที่ 25 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน (ต่อ)

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะทางกายภาพของตำรับ				
		สี	กลิ่น	รสชาติ	pH	ตะกอน
19.1.3	0	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.85 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	2	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.86 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	4	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	6	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	8	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.82 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	10	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.83 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	12	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.82 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน
	14	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.81 ± 0.01	ไม่ตกตะกอน
	16	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นโกโก้	หวานกำลังดี, มีรสขมบ้างเล็กน้อย	4.84 ± 0.00	ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 26 : ปริมาณแอนไธโดรบาราคอลของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	สัปดาห์ที่	ปริมาณแอนไธโดรบาราคอลในตำรับ (มิลลิกรัมต่อตำรับ 6 กรัม)				ปริมาณแอนไธโดรบาราคอลในตำรับคิดเป็นร้อยละ*
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{x}$ ± SD	
19.1.2	0	13.36	13.41	13.29	13.39 ± 0.04	100 ± 0.26
	2	12.64	12.82	12.68	12.73 ± 0.13	95.07 ± 0.95
	4	11.83	11.67	11.79	11.75 ± 0.11	87.75 ± 0.85
	6	11.57	11.41	11.33	11.49 ± 0.11	85.81 ± 0.85
	8	11.46	11.40	11.63	11.43 ± 0.04	85.37 ± 0.32
	10	11.36	11.31	11.42	11.34 ± 0.04	84.66 ± 0.26
	12	11.11	11.13	11.20	11.12 ± 0.01	83.05 ± 0.11
	14	10.94	10.84	10.99	10.83 ± 0.07	81.33 ± 0.52
	16	10.79	10.77	10.81	10.78 ± 0.14	80.51 ± 0.11
19.1.3	0	13.39	13.24	13.28	13.32 ± 0.11	100 ± 0.80
	2	12.60	12.84	12.88	12.72 ± 0.17	95.50 ± 1.28
	4	12.02	11.96	11.85	11.99 ± 0.04	90.02 ± 0.32
	6	11.80	11.48	11.71	11.64 ± 0.23	87.39 ± 1.70
	8	11.42	11.53	11.58	11.48 ± 0.78	86.15 ± 0.58
	10	11.31	11.17	11.23	11.24 ± 0.10	84.39 ± 0.74
	12	11.26	11.01	11.10	11.14 ± 0.18	83.60 ± 1.32
	14	10.89	10.97	10.98	10.93 ± 0.57	82.18 ± 0.37
	16	10.70	10.76	10.66	10.73 ± 0.04	80.56 ± 0.32

* โดยคิดจาก $\frac{\text{ปริมาณแอนไธโดรบาราคอลที่คงเหลืออยู่ในตำรับที่เวลานั้น}}{\text{ปริมาณแอนไธโดรบาราคอลในตำรับที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$



ภาพที่ 22 แสดงปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ภายหลังการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) ใช้เวลา 4 เดือน และนำผลที่ได้ (ตารางที่ 23-26) มาเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ และปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในยาน้ำเชื่อมแต่ละตำรับ ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 สัปดาห์ เพื่อศึกษาว่า ในเวลา 4 เดือน ลักษณะทางกายภาพและปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในแต่ละตำรับมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่อย่างไร โดยในการเปรียบเทียบปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในแต่ละตำรับที่เวลาต่าง ๆ ใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในสัปดาห์ต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (ภาคผนวก ข) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าทั้งตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน จะมีสีน้ำตาลเข้ม, มีกลิ่นโกโก้, มีค่า pH ประมาณ 4.8 และไม่มีการตกตะกอนเหมือนกับตำรับที่เวลาเริ่มต้น แต่ในด้านรสชาติ ทั้ง 2 ตำรับ จะมีรสขมขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเล็กน้อย ส่วนปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในทั้ง 2 ตำรับ ที่เวลาต่างๆ นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเมื่อครบ 4 เดือน พบว่ามีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล เหลืออยู่ในตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 คิดเป็นร้อยละ 7.73 และ 7.29 ตามลำดับ และเมื่อเก็บตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ทั้ง 2 ตำรับ จะมีลักษณะทางกายภาพเหมือนเมื่อเวลาเริ่มต้น คือ ทั้ง 2 ตำรับจะมีสีน้ำตาล, มีกลิ่นโกโก้, มีค่า pH ประมาณ 4.8, ไม่มีการตกตะกอน และมีรสชาติไม่เปลี่ยนแปลงจากเมื่อเวลาเริ่มต้น ส่วนปริมาณแอนไฮโดรบาราคอล ในทั้ง 2 ตำรับ ที่เวลาต่าง ๆ นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลในตำรับ 19.1.2 และ 19.1.3 ที่คงเหลืออยู่จะมีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 95.07 และ 95.50 ตามลำดับ และเมื่อครบ 4 เดือน พบว่ามีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 คิดเป็นร้อยละ 80.51 และ 80.56 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 เดือน

จากผลการทดลองแสดงว่า เมื่อเก็บยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ในตู้เย็น จะทำให้ตำรับมีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมีดีกว่าเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยในสัปดาห์ที่ 2 ของการเก็บที่อุณหภูมิห้อง ทั้งตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 มีปริมาณแอนไฮโดรบาราคอลเหลืออยู่ในตำรับเพียงร้อยละ 73.86 และ 73.27 ตามลำดับ ซึ่ง

เมื่อเปรียบเทียบความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีในสภาพเร่ง, อุณหภูมิห้องและในตู้เย็น พบว่าทั้ง 2 ตำรับ มีความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีดีที่สุดเมื่อเก็บในตู้เย็น แต่ไม่มีความคงตัวเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและในสภาพเร่ง จึงสามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิในการเก็บมีผลต่อความคงตัวของตำรับสูงมาก เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของแอนไฮโดรบาราคอล โดยถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้น อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาก็จะยิ่งสูงขึ้นด้วย ดังนั้นสภาวะในการเก็บตำรับที่ดีที่สุดคือ การเก็บในตู้เย็น เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

7.4) ผลการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ

การศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 7.2) ซึ่งได้แก่ตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 โดยวิธีการทดสอบตาม Microbial limit test USP XXIII (United States Pharmacopeial, Inc, 1995) ซึ่งมีมาตรฐานดังนี้ (ให้คิดเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร)

1. Total bacterias	น้อยกว่า 1000
2. Total molds and yeasts	น้อยกว่า 100
3. *Escherichia coli*	ต้องไม่พบ
4. *Staphylococcus aureus*	ต้องไม่พบ
5. *Pseudomonas aeruginosa*	ต้องไม่พบ
6. *Salmonella* spp.	ต้องไม่พบ

ผลการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (ตารางที่ 27-30) เมื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังจากเตรียมตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 เสร็จ 1 วัน พบว่าไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในทั้ง 2 ตำรับ และเมื่อเก็บทั้ง 2 ตำรับ ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) ต่อไป ปรากฏว่าในเดือนที่ 2 และ 4 ก็ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด เช่นกัน นั่นแสดงว่าสารกันเสีย (โซเดียม เบนโซเอต) ที่ใช้ในปริมาณที่เติมในสูตรตำรับนั้น สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเก็บยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับที่ 19.1.2 และ 19.1.3 ที่อุณหภูมิห้อง และในตู้เย็น เป็นเวลา 4 เดือน จึงกล่าวได้ว่า ทั้ง 2 ตำรับ ผ่านการทดสอบมาตรฐานทางจุลชีววิทยาตาม Microbial limit test USP XXIII (United States Pharmacopeial, Inc, 1995).

ตารางที่ 27 : การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับต่าง ๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา (CFU/mL)**ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (เดือน)					
	0		2		4	
	แบคทีเรีย	ยีสต์, รา	แบคทีเรีย	ยีสต์, รา	แบคทีเรีย	ยีสต์, รา
19.1.2	-*	-	-	-	100	-
19.1.3	-	-	-	-	100	-

* หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

** เป็นจำนวนโคโลนีที่คูณ dilution factor คือ 10

ตารางที่ 28 : การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella spp.* ในยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับต่าง ๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	จำนวนโคโลนี (CFU/mL) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ											
	0				2				4			
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*Salmonella spp.*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*Salmonella spp.*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus.*	*Salmonella spp.*
19.1.2	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 29 : การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับต่าง ๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา (CFU/mL)**ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (เดือน)					
	0		2		4	
	แบคทีเรีย	ยีสต์, รา	แบคทีเรีย	ยีสต์, รา	แบคทีเรีย	ยีสต์, รา
19.1.2	-*	-	-	-	-	1
19.1.3	-	-	-	-	100	-

* หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 30 : การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella spp.* ในยาน้ำเชื่อมขี้เหล็กตำรับต่าง ๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน

ตำรับที่	จำนวนโคโลนี (CFU/mL) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ											
	0				2				4			
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*Salmonella spp.*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*Salmonella spp.*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*Salmonella spp.*
19.1.2	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์