

ผลของรังสีแกมมาต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาและสมบัติทางเคมีของผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจร
Effect of Gamma Irradiation on Chemical Properties and Microbiological Quality
of King of Bitter (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. Ex Nees) Powder

เขมรจิติ เข้มทอง¹ วชิราภรณ์ ผิวล่อง¹ สุรศักดิ์ สัจจบุตร¹ จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ¹ และ ศิริลักษณ์ ชูแก้ว¹
Khemthong, K.¹, Pewlong, W.¹, Sajjabut, S.¹, Eamsiri, J.¹ and Chookaew, S.¹

Abstract

Andrographis paniculata is an important of medicinal herbs, being used for the medicinal reputation for treating various ailments. This study evaluated the effect of gamma irradiation with 5, 10, 15 and 20 kGy on microbiological load quality and chemical properties of *A. paniculata* powder. The irradiated and non-irradiated samples were determined for their microbial load, antioxidant activities and andrographolide content. Results showed that the initial microbial load in samples was exceeded the permissible limits. At radiation dose of 5 kGy, the microbial qualities reduced to the standard level. In addition, total phenolic contents and andrographolide contents were not changed when radiation doses were increased. Whereas, gamma irradiated samples above 10 kGy could significantly enhance their antioxidant activities as FRAP value ($p < 0.05$).

Keywords: *Andrographis paniculata*, Gamma irradiation, Microbiological quality, Chemical properties

บทคัดย่อ

ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับการยอมรับและได้ถูกบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ในรูปแบบยาเดี่ยว งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางเคมีในผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจร โดยนำผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5, 10, 15 และ 20 กิโลเกรย์ วิเคราะห์ปริมาณคุณภาพทางจุลินทรีย์ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ฉายรังสี พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างที่ไม่ฉายรังสีมีค่าสูงเกินมาตรฐานยาสมุนไพรไทย การฉายรังสีปริมาณ 5 กิโลเกรย์ สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดให้ต่ำกว่าค่ามาตรฐานได้ เมื่อฉายรังสีที่ปริมาณรังสีสูงขึ้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ แต่พบว่าตัวอย่างที่ฉายรังสีปริมาณ 10 กิโลเกรย์ขึ้นไป มีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: ฟ้าทะลายโจร รังสีแกมมา คุณภาพทางชีววิทยา สมบัติทางเคมี

คำนำ

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. Ex Nees) ได้รับความสนใจ และถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายจากสรรพคุณช่วยเสริมภูมิคุ้มกันร่างกายและรักษาโรค และได้ถูกบรรจุในบัญชียาหลักแห่งชาติของกระทรวงสาธารณสุข จัดอยู่ในกลุ่มยาเย็น มีรสขม ส่วนที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ ใบ และลำต้นเหนือดิน เนื่องจากประกอบด้วยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ บรรเทาอาการท้องเสียชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ บรรเทาอาการเจ็บคอ อาการของโรคไข้หวัด (Malinee และคณะ, 2012; Sirikarin และคณะ, 2018) โดยเฉพาะสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ที่มีรายงานวิจัยว่าช่วยลดการรวมตัวของเกล็ดเลือด และฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น (PubChem, 2021)

อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์สมุนไพรมักพบปัญหาปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากธรรมชาติ และกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม ซึ่งประเทศไทยใช้ประโยชน์จากรังสีแกมมาในด้านการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร, กำจัดแมลง และฆ่าเชื้ออุปกรณ์การแพทย์ เป็นต้น ปริมาณรังสีที่กำหนดไว้เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์

¹ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) 9/9 ต.ทรายมูล อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

¹ Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization), 9/9 moo 7, Saimoon, Ongkharuk, Nakhon Nayok 26120, Thailand

ในอาหาร ไม่เกิน 10 กิโลเกรย์ (kGy) การฉายรังสีแกมมามีประสิทธิภาพสูงในการลดปริมาณจุลินทรีย์ เกิดความร้อนต่ำ และไม่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ (เขาวลิต, 2556; FAO, IAEA, WHO, 1981)

การเกิดพลังงานไอออน-เซชัน (ionization) จากการฉายรังสีแกมมาทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Hydroxyl radical; HO•) ที่สามารถไปรบกวน DNA จุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ (Diehl, 1995) ปริมาณรังสีที่เหมาะสมสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยปริมาณที่ใช้จะแตกต่างกันตามชนิดของตัวอย่างและปริมาณเชื้อเริ่มต้น เช่น ผงขมิ้นชันฉายรังสีแกมมาปริมาณ 8 kGy (สุรศักดิ์ และคณะ, 2555) และการฉายรังสีแกมมาในผงอบเชย 5 kGy เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับลดเชื้อจุลินทรีย์ให้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (จารุรัตน์ และคณะ, 2556) และเพื่อตอบสนองต่อแผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 ที่มุ่งหวังว่าประเทศไทยสามารถส่งออกวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพและผลิตภัณฑ์สมุนไพรชั้นนำของภูมิภาคอาเซียน (กรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก, 2560) งานทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาและสมบัติทางเคมีของผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจร เพื่อเป็นองค์ความรู้ให้กับผู้สนใจในเทคโนโลยีการฉายรังสีเพื่อใช้ปรับปรุงคุณภาพของสมุนไพรไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

นำตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจรที่ซื้อจากผู้ผลิตมาแบ่งบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ปิดสนิท ไปฉายรังสีแกมมา (เครื่อง Gamma chamber 5000, BRIT จากประเทศอินเดีย) ณ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ปริมาณรังสี 5, 10, 15 และ 20 kGy มาทดสอบและเปรียบเทียบผลกับตัวอย่างที่ไม่ฉายรังสี โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 60% เอทานอลกับน้ำ ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย เท่ากับ 100 มิลลิกรัม : 10 มิลลิลิตร แล้วนำเข้า ultrasonic bath เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองเอาส่วนในมาทดสอบสมบัติทางเคมี ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity) ด้วย วิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity assay เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (Khattak และคณะ, 2008), ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent method เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) (Veliloglu และคณะ, 1998) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power assay: FRAP) เทียบกับสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO₄) (Langley-Evans, 2000) ปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ SunFire C18 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่คือ 55% เมทานอล : น้ำ (55:45) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 229 นาโนเมตร โดยใช้ photodiode-array detector (PDA) detector สารมาตรฐาน คือ andrographolide (Sigma 90281-5 MG) (อรัญญา และคณะ, 2548) และตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM online chapter3, 2001), ปริมาณยีสต์และราทั้งหมด (BAM online chapter18, 2001), และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และอุจจาระร่วง ได้แก่ *Bacillus cereus* (ISO 7932, 2004) การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติใช้วิธี Duncan's new Multiple Range Test

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5, 10, 15 และ 20 kGy ต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาและสมบัติทางเคมี ผลการศึกษาดังแสดงใน Table 1 โดยพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ปริมาณสาร andrographolide ในตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจร ที่ไม่ฉายและฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสีต่าง ๆ มีค่าไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากการฉายรังสีเป็นกระบวนการ cold process จึงไม่ส่งผลต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ง่าย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tummanichanont และคณะ (2018) ที่พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นมีผลทำให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด, กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และสาร andrographolide ในฟ้าทะลายโจรมีค่าลดลง และการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP value) มีค่าไม่แตกต่างกันในตัวอย่างที่ไม่ฉายรังสีและที่ฉายรังสีแกมมา 5 kGy แต่พบว่าปริมาณรังสีตั้งแต่ 10 kGy ค่า FRAP value เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) การรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Fe³⁺) เป็นการวัดความสามารถของการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้อยู่ในรูปเฟอร์รัสไอออน (Fe²⁺) ที่มีเสถียรภาพ โดยรังสีแกมมาเป็นรังสีก่อไอออนที่อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่า FRAP value ได้ในตัวอย่างบางชนิดได้ (Janiak และคณะ, 2016) สารแทนนินอาจถูกทำลายโครงสร้างจากการฉายรังสีและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุล (Variyar และคณะ, 1998; Topuz และ Ozdemir, 2004) อาจมีผลทำให้สารสำคัญมีความสามารถในการละลายสูงขึ้น ค่าการทดสอบจึงเพิ่มขึ้นได้

Table 2 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่าตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจรมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total bacterial count) ในตัวอย่างเริ่มต้นก่อนการฉายรังสีมีค่าเกินมาตรฐาน โดยตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2009) กำหนดให้มีค่า $\leq 2.0 \times 10^5$ cfu/g (จิตรา และคณะ, 2557) เมื่อผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 5 kGy มีค่าลดลง 2 log cycle ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ส่วนปริมาณยีสต์และราทั้งหมด (total yeast and mold) และจุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus* มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนฉายรังสีไม่เกินค่ามาตรฐาน และเมื่อฉายรังสีแกมมาพบว่าปริมาณเชื้อปนเปื้อนมีค่าลดลงตามปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น จากการไปรบกวน DNA และยับยั้งเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (เดียมเอกซาร์อั้งอิง) (Diehl, 1995)

สรุปผล

ผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเป็นยาสมุนไพรที่นิยมใช้เพื่อเสริมภูมิคุ้มกันและบรรเทาอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สูงเกินเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีคุณภาพ รังสีแกมมาจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การฉายรังสีแกมมาปริมาณ 5 kGy เป็นปริมาณรังสีที่เหมาะสมและเพียงพอในการควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์และสมบัติทางเคมีอื่นๆ ในผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

เอกสารอ้างอิง

- กรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก, 2560, แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564, [สืบค้น], <https://www.dtam.moph.go.th/images/download/dl0021/MasterPlan-Thaiherb.pdf> [6/ March /21].
- จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ วชิราภรณ์ ผิวล่อง สุรศักดิ์ สัจจบุตร และศิริลักษณ์ สิงห์เพชร, 2556, ผลของการฉายรังสีแกมมา และลำอิเล็กตรอนต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผอบเชย, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 44(2) (พิเศษ): 229-232.
- จิตรา ชัยวัฒน์ จิรานุช แจ่มทวีกุล สันติพงศ์ วงศ์เพ็ญทักษ์ และปรัชญาพร อินทองแก้ว, 2557, ความปลอดภัยของยาจากสมุนไพร ในบัญชียาหลักแห่งชาติ, วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 56(3): 123 – 134.
- เขาวลิต มณฑล, 2556, การฉายรังสีแกมมา : กระบวนการทำไร่เชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์สมุนไพร, ไทยโภชนาการ, 8 (1): 41-54
- สุรศักดิ์ สัจจบุตร, วชิราภรณ์ ผิวล่อง, สุชาดา เสกสรรวิริยะ, สุชาดา พงษ์พัฒน์ และจารุรัตน์ เอี่ยมศิริ, 2555, ผลของรังสีแกมมาและลำอิเล็กตรอนต่อการเปลี่ยนแปลงของสี ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารเคอร์คูมินในขมิ้นชันผง วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 43(2) (พิเศษ): 109-112
- อรัญญา ศรีบุศราคม, พนิดา ไทญ์ธรรมสาร, กฤติกา ไชยนอก และนันทวัน บุญยะประภัสรา, 2548, ข้อสังเกตในการวิเคราะห์ lactone และ andrographolide. วารสารสมุนไพร, 12: 31-38.
- Bacteriological Analytical Manual Online, 2001, Chapter 3: Aerobic Plate Count, USFDA. 10 pp. [Online], <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>.
- Bacteriological Analytical Manual Online, 2001, Chapter 18 Yeast, Mold and Mycotoxins. USFDA [Online], <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>.
- Diehl, J.F., 1995, Safety of Irradiated Foods. 2 nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 454 p.
- Kurokawa, M., Kumeda, C.A., Yamamura, J., Kamiyama, T. and Shiraki, K., 1998, Antipyretic Activity of Cinnamyl Derivatives and Related Compounds in Influenza Virus-infected Mice, European Journal of Pharmacology, 348(1): 45-51.
- FAO, IAEA, WHO, 1981, The Wholesomeness of Irradiated Food, WHO Technical Report Series No. 659, Geneva.
- Haina, B. Zhenyu, W. Jie, C and Chilin, C., 2014, Synergistic Radiation Protective Effect of Purified *Auricularia auricular-judae* Polysaccharide (AAP IV) with Grape Seed Procyanidins, Molecules, 19 :20675-20694.
- ISO 7932:2004, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of Presumptive *Bacillus cereus*-Colony-count Technique at 30°C, [Online], <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/76664/24cf4583cbb948f194dee34812fec5ff/ISO-7932-2004-Amd-1-2020.pdf> [March 1, 2021].
- Janiak, M.A., Slavova-Kazakova, A., Karamac, M., Kancheva, V., Terzieva, A., Ivanova, M., Tsrunchev, T. and Amarowicz, R., 2016, Effects of Gamma-Irradiation on the Antioxidant Potential of Traditional Bulgarian Teas, Natural Product Communications, 12 (2), 181-184.

- Khattak, K.F., Simpson, T. and Ihasnullah, J., 2008, Effect of Gamma Irradiation on the Extraction Yield, Total Phenolic Content and Free Radical-Scavenging Activity of *Nigella sativa* seed, Food Chemistry, 110 (4): 967-972.
- Langley-Evans, S.C., 2000, Antioxidant Potential of Green and Black Tea Determined Using the Ferric- Reducing Power (FRAP) Assay, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 51: 181-188.
- Wongnawa, M., Soontaro, P., Ritudid, W., Wongpoowarak, P., and Ruengkittisakul, S., 2012, The Effects of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Midazolam in Healthy Volunteers, Songklanakarin Journal of Science and Technology, 34 (5), 533-539.
- PubChem, 2021, PubChem Compound Summary for CID 5318517, Andrographolide., National Center for Biotechnology Information [Online], <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Andrographolide> [March 6, 2021].
- Sirikarin, T., Palo, T., Chotewuttakorn, S., Chandranipapongse, W., Limsuvan, S. and Akarasereenont, P., 2018, The Effects of *Andrographis paniculata* on Platelet Activity in Healthy Thai Volunteers., Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2018, Article ID 2458281, 9 pages.
- Topuz, A. and Ozdemir, F., 2004, Influences of Gamma Irradiation and Storage on the Capsaicinoids of Sun-dried and Dehydrated Paprika, Food Chemistry, 86:509-515.
- Variyar, P.S., Bandyopadhyay, C. and Thomas, P., 1998, Effect of Gamma Irradiation on the Phenolic Acid of Some Indian Spices, International Journal of Food Science and Technology, 33:533-537.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D., 1998, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41:13-4117.

Table 1. Effects of gamma irradiation on total phenolics content, DPPH, FRAP value and andrographolide content of *Andrographis paniculata*. powder.

Dose (kGy)	total phenolic (mgGAE/g)	DPPH (mgAAE/g)	FRAP value ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$)	Andrographolide content (mg/g of sample)
0	20.85 \pm 1.69 ^a	15.91 \pm 0.94 ^a	213.26 \pm 2.58 ^a	4.73 \pm 0.05 ^a
5	21.65 \pm 2.19 ^a	16.08 \pm 0.13 ^a	216.21 \pm 1.17 ^a	4.77 \pm 0.15 ^a
10	21.33 \pm 1.15 ^a	18.37 \pm 1.98 ^a	231.19 \pm 6.52 ^b	4.67 \pm 0.11 ^a
15	21.27 \pm 1.61 ^a	16.11 \pm 0.43 ^a	227.66 \pm 5.01 ^b	4.63 \pm 0.15 ^a
20	21.12 \pm 0.93 ^a	16.60 \pm 1.04 ^a	229.13 \pm 6.22 ^b	4.57 \pm 0.23 ^a

Values are expressed as mean \pm SD of triplicate measurements.

Different letter in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$.

Table 2 Microbiological quality of *Andrographis paniculata* powder that irradiated by gamma radiation.

Dose (kGy)	Total Bacterial Count (CFU/g)	Total Yeast and Mold (CFU/g)	<i>Bacillus cereus</i> (CFU/g)
0	5.2 \times 10 ⁵	3.4 \times 10 ³	2.6 \times 10 ²
5	2.5 \times 10 ³	<10	<10
10	<10	<10	<10
15	<10	<10	<10
20	<10	<10	<10