



ฤทธิ์การยับยั้งของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree ต่อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย
The Inhibitory Effects of Herbal Product, CHD-1 Raisin Tree on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Food Spoilage Bacteria

สุบันจิต นิมรัตน์^{1*} จำลอง แสงสง² วีรสิทธิ์ ชาวพ่อง²
พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์³ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย⁴

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์สมุนไพรยี่ห้อ CHD-1 Raisin Tree ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของสาธารณรัฐเกาหลีที่เรียกว่า Raisin tree 2 รูปแบบ คือรูปแบบเม็ดและรูปแบบแคปซูลซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต่ออายุหลายชนิดและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Spoilage bacteria) ที่แยกจากอาหารทะเลแห้ง จำนวน 5 ชนิด (*Bacillus coagulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *Staphylococcus caprae* และ *S. hominis*) โดยการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้ง 2 รูปแบบด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay พบว่าผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเม็ด (ละลายด้วยน้ำ) สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA ทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้จำนวน 5 สายพันธุ์และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียจำนวน 5 สายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.00 ± 0.00 ถึง 16.70 ± 0.12 มิลลิเมตร และ 13.30 ± 0.15 ถึง 21.00 ± 0.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนในรูปแบบของเหลวในแคปซูลไม่พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด ดังนั้นผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ CHD-1 Raisin Tree ในรูปแบบเม็ดน่าจะนำไปประยุกต์ใช้เป็นยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่ม MRSA และแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ทดแทนยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา และโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

²โครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

³ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

⁴ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

*Corresponding Author, E-mail: subunti@buu.ac.th

ABSTRACT

In this study, the CHD-1 Raisin Tree, a herbal product which derived from plant called Raisin tree and produced in Republic of Korea, was investigated. The two types of product: tablet and capsule, were different for their antibacterial activity against two bacterial groups of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistant to several antibiotics and spoilage bacteria isolated from dried seafood product (*Bacillus coagulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *Staphylococcus caprae* and *S. hominis*). The activities of two herbal product types were revealed by the agar well diffusion assay. The tablet type dissolved by distilled water showed effective growth inhibition against 5 strains of MRSA and spoilage bacteria with inhibition zone in a range of 10.00 ± 0.00 to 16.70 ± 0.12 mm and 13.30 ± 0.15 to 21.00 ± 0.10 mm, respectively. Whereas, product in capsule type showed no activity against all of the both test MRSA and spoilage bacteria. Therefore, the herbal product, CHD-1 Raisin Tree in tablet type was able to apply as a new effective drug in order to inhibit pathogenic bacteria, especially MRSA, and other bacteria for replacing antibiotics in future.

คำสำคัญ: MRSA แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย CHD-1 Raisin Tree Agar well diffusion assay

Keywords: MRSA, Spoilage bacteria, CHD-1 raisin tree, Agar well diffusion assay

บทนำ

ในปัจจุบันความนิยมใช้สมุนไพรเพิ่มมากขึ้น ทั้งที่ใช้เพื่อเป็นยารักษาโรคเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง อาหารเสริมและเครื่องดื่ม (วันดี, 2538) นอกจากนี้ในประเทศต่าง ๆ มีความสนใจในการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเพื่อวัตถุประสงค์ทาง

การแพทย์มากขึ้น รวมทั้งในสาธารณรัฐเกาหลีมีผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ได้รับความนิยมมากคือ CHD-1 Raisin Tree (ภาพที่ 1) เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ได้มาจากต้น Raisin Tree และดำเนินการจำหน่ายโดยรัฐบาลรวมทั้งในร้านค้าทั่วไป ซึ่งสมุนไพรชนิดนี้มีสรรพคุณในการขับสารตกค้างในตับ



ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree; (a) บรรจุภัณฑ์ (b) สมุนไพรแบบเม็ด และ (c) สมุนไพรแบบแคปซูล

Raisin Tree หรือ Japanese raisin tree เป็นสมุนไพรพื้นเมืองพบได้ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น การเติมในอาหาร และในหลายประเทศใช้เป็นยารักษาโรค อาทิเช่น ประเทศญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาชนจีน และสาธารณรัฐเกาหลี เป็นต้น (Hyun et al., 2010) และจากงานวิจัยหลายฉบับที่ผ่านมาพบว่าในส่วนต่าง ๆ ของ Raisin Tree มีคุณสมบัติมากมาย เช่น ส่วนผลมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกิดโรคเบาหวาน เป็นต้น (Kim et al., 2005; Lee et al., 2005) ส่วนเปลือกมีคุณสมบัติต้านการเกิดมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Korea Food and Drug Administration, 2012; Li et al., 2005) และส่วนใบมีคุณสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิเช่น *Giardia lamblia* และ *Salmonella Typhimurium* strains TA98 และ TA100 รวมทั้งต้านการเกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น (Gadelha et al., 2005; Rincent et al., 2008; Cho et al., 2004; Park et al., 2007)

แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงสรรพคุณทางด้านอื่น ๆ รวมทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีการพัฒนาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะมีผลทำให้สารต้านจุลชีพทั่วไปที่ใช้รักษาโรคไม่มีประสิทธิภาพในการรักษา (Montefore et al., 1989) ทำให้แบคทีเรียก่อโรคจำนวนมากมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ รวมทั้งการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียในอาหารก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้มากขึ้น แบคทีเรียกลุ่มที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ อาทิเช่น แบคทีเรียกลุ่ม MRSA (Machdo et al., 2003), *Helicobacter pylori* (Malekzadeh et al., 2001) และ *Klebsiella pneumoniae* (Hernandez-Alles et al., 1999; Martinez-Martinez et al., 1999) เป็นต้น นอกจากนี้

แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียซึ่งบางชนิดสามารถก่อโรคได้ อาทิเช่น *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. และ *Photobacterium phosphoreum* และอาจพบจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ เช่น Lactic acid bacteria (LAB), แบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae และ *Brochothrix thermosphacta* (Matamoros et al., 2009) ถ้ารับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียเหล่านี้จะทำให้ผู้บริโภคเกิดความเจ็บป่วยได้ ซึ่งความเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นสร้างความกังวลให้กับผู้บริโภคเป็นอย่างมากทางด้านความปลอดภัยทางอาหาร

ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงทำการศึกษาลักษณะคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่ม MRSA เนื่องจากในปัจจุบันมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาของ จุฑามณี และมณฑล (2547) ได้ตรวจหาเชื้อ MRSA จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชุมชนเขตอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร โดยการเก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อจากผู้ป่วยจำนวน 10 ราย รวม 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ MRSA ในผู้ป่วยจำนวน 3 ราย (16.60%) และจากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า MRSA ดื้อต่อยา Nalidixic acid ขณะที่ MSSA (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) ทั้งหมดดื้อยาในกลุ่ม Penicillin เช่น Oxacillin, Ampicillin และยากลุ่มอื่น ๆ เช่น Nalidixic acid, Gentamicin, Erythromycin, Tetracycline และ Trimetoprim และการศึกษาของ Kerttula et al. (2004) ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะการระบาดของแบคทีเรียกลุ่ม MRSA ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997-2002 ที่เมือง Helsinki สาธารณรัฐฟินแลนด์ พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย

กลุ่มนี้จำนวน 1,718 ราย โดยพบในตัวอย่างเลือด 1.90%, ปัสสาวะ 4.60% และอื่น ๆ 93.50% โดยช่วงอายุที่พบ MRSA จะเฉลี่ยอยู่ที่ 65 ปี และพบว่าเป็นผู้ชาย 49.00% โดยพบว่าเป็นปี ค.ศ. 1997 พบ MRSA 0.23% และในปี ค.ศ. 2002 พบ 1.15% จากโรงพยาบาลที่ในเขตเมือง Helsinki ซึ่งช่วงอายุของผู้ป่วยที่พบจะมีอายุมากกว่า 65 ปี ส่วนโรงพยาบาลในเขตนอกเมือง Helsinki มีอัตราการเพิ่มขึ้นจาก 31.00% เป็น 63.00%

จากงานวิจัยหลายฉบับที่ผ่านมา อาทิเช่น การศึกษาของพีรพัฒน์ และคณะ (2553) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรจากขมิ้นชันและกระเทียมที่ผลิตเป็นการค้าในการยับยั้ง MRSA และ MSSA ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าจากขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA และ MSSA ได้บางสายพันธุ์ และการศึกษาของสุภัณฑิลา และคณะ (2553) ที่ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของกระชายดำและส้มแขกสำเร็จรูปในการต้านเชื้อ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ และยังพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าชนิดอื่น เช่น ขมิ้นชัน จิงกระเทียม และมะกรูด สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้เช่นเดียวกัน จากการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสมุนไพรสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ ได้ซึ่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อ (Cos et al., 2006; Elegami et al., 2007; Zhao et al., 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้พืชสมุนไพร จากการวิจัยพบว่าสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรนั้นมีผลข้างเคียงในการรักษาน้อยมากเมื่อเทียบกับยารักษาโรคที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมี (วันดี, 2541; Quave et al., 2008) จึงทำให้การวิจัยเพื่อค้นหาตัวยาใหม่ในรูปสารบริสุทธิ์จากพืช

ยังคงดำเนินการอย่างต่อเนื่องและในการศึกษาคั้งนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งสมุนไพรดังกล่าวจะนำไปประยุกต์ใช้เป็นยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม MRSA และแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม MRSA จำนวน 5 สายพันธุ์ (MRSA สายพันธุ์ H8, P16, Q17, T18 และ T20) และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย จำนวน 5 สายพันธุ์ (*Bacillus coagulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *Staphylococcus caprae* และ *S. hominis*) มาขีดแยกเชื้อ (Streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง และปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียทดสอบให้มีค่าเท่ากับ 1.0×10^4 CFU/mL ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) Normal saline

2. การเตรียมสารละลายสมุนไพรสำเร็จรูป

นำผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูปแบบเม็ดมาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อในอัตราส่วนสมุนไพรสำเร็จรูป 1 เม็ดต่อน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร (1:1) ส่วนผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูปแบบแคปซูลใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อเจาะนำสารละลายออกมาจากแคปซูลและใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ โดยที่สารละลายผลิตภัณฑ์สมุนไพร

สำเร็จรูปทั้ง 2 รูปแบบจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาใช้

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร ด้วยเทคนิค agar well diffusion assay (Shan et al, 2007)

ใช้ไม้พ่นสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มและบิดกับ ข้างหลอดทดลอง จากนั้นป้าย (swab) แบคทีเรีย ทดสอบที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.0×10^4 CFU/mL จากการทดลองข้อ 1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) วางจานเพาะเชื้อไว้ 15 นาที จากนั้นเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย Metallic borer ปราศจากเชื้อ (แบคทีเรียทดสอบละ 3 หลุม) และเติมสารละลาย สมุนไพรรูปแบบเม็ด (ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) และสมุนไพรรูปแบบแคปซูลลงในหลุมที่เจาะ ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และวัดขนาดบริเวณยับยั้งรอบหลุมในหน่วย มิลลิเมตร โดยการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay ใช้ *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม พร้อมทั้งคำนวณค่าอัตราส่วนของพื้นที่บริเวณยับยั้งต่อ พื้นที่ของหลุมและดัชนีค่าการยับยั้ง ตามวิธีการของ Leonel Ochoa-Solano and Olmos-Soto (2006) ดังสมการข้างล่างนี้ โดยกำหนดดัชนีค่าการยับยั้งเป็น 0, 1+, 2+, 3+, 4+, 5+, 6+, 7+, 8+, 9+, 10+ เมื่อ ประสิทธิภาพการยับยั้งเป็น 0.00, 0.01-0.50, 0.51-0.70, 0.71-1.00, 1.01-2.00, 2.01-3.00, 3.01-4.00, 4.01-5.00, 5.01-6.00, 6.01-7.00 และ 7.01-8.00

ค่าประสิทธิภาพการยับยั้ง

$$= \frac{[(\pi \times (\text{รัศมีบริเวณยับยั้ง})^2) - (\pi \times (\text{รัศมีของหลุม})^2)]}{(\pi \times \text{รัศมีของหลุม}^2)}$$

ผลการวิจัย

1. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree

จากการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของ ผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree รูปแบบเม็ด และแคปซูล ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

2. การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของ ผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม MRSA และ แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่แยกได้จากอาหาร ทะเลแห้ง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree ในการยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียกลุ่ม MRSA และแบคทีเรียที่ทำให้อาหาร เน่าเสียที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้ง ด้วยวิธี Agar well diffusion assay พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพร รูปแบบเม็ด (ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ) สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA จำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA สายพันธุ์ P16 ได้สูงสุด โดยมีบริเวณยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 16.70 ± 0.35 มิลลิเมตร, 6.75 และ 9+ ตามลำดับ รองลงมาคือ MRSA สายพันธุ์ T18, T20, Q17 และ H8 โดยมีบริเวณยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีการยับยั้งอยู่ในช่วง 10.00 ± 0.00 ถึง 16.30 ± 0.12 มิลลิเมตร, 1.78 ถึง 6.38 และ 4+ ถึง 9+ ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้ง *S. caprae* ได้ สูงสุด โดยมีบริเวณยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และ ดัชนีการยับยั้งเท่ากับ 23.30 ± 0.29 มิลลิเมตร, 14.08 และ >10+ ตามลำดับ รองลงมาคือ *S. hominis*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis* และ *B. coagulans* โดยมี

บริเวณยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีการยับยั้งอยู่ในช่วง 13.30 ± 0.15 ถึง 21.00 ± 0.10 มิลลิเมตร, 3.91 ถึง 11.25 และ 6+ ถึง >10+ ตามลำดับ ตามลำดับ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์สมุนไพรรูปแบบแคปซูลพบว่าไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree

คุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์	สมุนไพรรูปแบบเม็ด	สมุนไพรรูปแบบแคปซูล
ผลิตภัณฑ์ของประเทศ	สาธารณรัฐเกาหลี	สาธารณรัฐเกาหลี
ความนิ่มของแคปซูล	ไม่มีแคปซูล	นิ่ม
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	3.0	5.0
ความสามารถในการละลายน้ำ	ละลายน้ำได้ดี (ภายใน 2 ชั่วโมง)	ไม่ละลายน้ำ
ความสามารถในการลอยน้ำ	จมน้ำ	จมน้ำ
ความสามารถในการละลายในกรดเกลือ (HCl, pH = 2)	ละลายหมดภายใน 2 ชั่วโมง	ละลายหมดภายใน 10 ชั่วโมง
ประสาทสัมผัสด้านกลิ่น	กลิ่นหอมและมีแคปซูลอ่อนนุ่ม	กลิ่นสมุนไพรที่อาจรบกวนผู้บริโภค
การรับประทาน	รับประทานง่าย	รับประทานได้ง่ายแต่อาจจะมีกลิ่น

ตารางที่ 2 ขนาดบริเวณยับยั้ง ประสิทธิภาพการยับยั้ง และดัชนีการยับยั้งของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree ต่อ MRSA และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

แบคทีเรียทดสอบ	สมุนไพรรูปแบบเม็ด			สมุนไพรรูปแบบแคปซูล		
	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนีการยับยั้ง	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	ดัชนีการยับยั้ง
MRSA สายพันธุ์ H8	10.00 ± 0.00	1.78	4+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
MRSA สายพันธุ์ P16	16.70 ± 0.35	6.75	9+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
MRSA สายพันธุ์ Q17	13.50 ± 0.07	4.06	7+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
MRSA สายพันธุ์ T18	16.30 ± 0.12	6.38	9+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
MRSA สายพันธุ์ T20	13.70 ± 0.12	4.21	7+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>Bacillus coagulans</i>	13.30 ± 0.15	3.91	6+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>Bacillus laterosporus</i>	17.30 ± 0.12	7.31	10+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>Bacillus licheniformis</i>	16.30 ± 0.12	6.38	9+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>Staphylococcus caprae</i>	23.30 ± 0.29	14.08	>10+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>Staphylococcus hominis</i>	21.00 ± 0.10	11.25	>10+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	16.70 ± 0.35	6.75	9+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	21.00 ± 0.10	11.25	>10+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>E. coli</i> ATCC25922	11.50 ± 2.12	2.56	5+	0.00 ± 0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ: ดัชนีค่าการยับยั้ง: 0 (0.00), 1+ (0.01-0.50), 2+ (0.51-0.70), 3+ (0.71-1.0), 4+ (1.01-2.00), 5+ (2.01-3.00), 6+ (3.01-4.00), 7+ (4.01-5.00), 8+ (5.01-6.00), 9+ (6.01-7.00) และ 10+ (7.01-8.00)

บทสรุปและวิจารณ์การวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree 2 รูปแบบคือรูปแบบเม็ดและรูปแบบแคปซูลซึ่งมีความแตกต่างกันโดยที่สมุนไพรรูปแบบเม็ด (ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ) สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA จำนวน 5 สายพันธุ์ (MRSA สายพันธุ์ H8, P16, Q17, T18 และ T20) และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย จำนวน 5 สายพันธุ์ (*B. coagulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *S. caprae* และ *S. hominis*) ได้ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์สมุนไพรรูปแบบแคปซูลพบว่าไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มที่นำมาศึกษา ซึ่งผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree เป็นพืชสมุนไพรที่มีต้นกำเนิดในสาธารณรัฐเกาหลีและมีรายงานถึงฤทธิ์การชำระล้างสารตกค้างในดื่บ (Personal communication) ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ ยังไม่มีรายงาน ดังนั้นจึงมีความสนใจในด้านคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้ง 2 รูปแบบ พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง ความสามารถในการละลายน้ำ ความสามารถในการลอยน้ำ ความสามารถในการละลายในกรดเกลือ (HCl, pH = 2) ประสาทสัมผัสด้านกลิ่น และการรับประทาน รวมทั้งในการศึกษาถึงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่นแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่ม MRSA ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ติดต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาแบคทีเรียชนิดนี้เพิ่มขึ้น (Abeylath et al., 2008) เนื่องจากมีความต้องการยาชนิดใหม่จากแหล่งธรรมชาติเพื่อมาทดแทนยาปฏิชีวนะนั้นเอง และจากผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree ในรูปแบบเม็ดมีความสามารถในการยับยั้ง MRSA ได้สูงจากผลของการยับยั้งที่กว้างมากในช่วง 10.00±0.00 ถึง 23.30±0.29 มิลลิเมตร จาก

การเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในพืชสมุนไพรอื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของพรรณพิชญา และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อมต่อ *Salmonella* Typhimurium ที่แยกได้จากไก่ โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด (acetone, ethyl acetate, ethanol และ methanol) โดยพบบริเวณยับยั้งที่มีความแตกต่างกัน โดยสารสกัดที่สกัดด้วย ethyl acetate ให้บริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเท่ากับ 11.42±1.71 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดที่สกัดด้วย acetone, ethanol, methanol และสารสกัดสดจากผลมะขามป้อมให้บริเวณยับยั้งเท่ากับ 8.92±1.71, 8.57±1.71, 8.01±1.53, 6.92±1.14 มิลลิเมตร ตามลำดับ

รายงานการศึกษาของ Kim et al. (2004) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ *Caesalpinia sappan* ในการยับยั้ง MRSA จำนวน 13 สายพันธุ์ และ Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) จำนวน 1 สายพันธุ์ โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด (chloroform, n-butanol, methanol และน้ำ) พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจาก *Caesalpinia sappan* ที่สกัดด้วย chloroform, n-butanol, methanol และน้ำ ให้บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.00-12.00, 12.00-16.00, 14.00-19.00 และ 8.50-13.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ

การศึกษาที่ผ่านมาของ Oonmetta-aree et al. (2006) ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดจากข่า กระชาย ขิง และขมิ้น พบว่าสารสกัดจากข่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* สูงที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 22.33±0.58 มิลลิเมตร รองลงมาคือ กระชาย (11.00±0.00 มิลลิเมตร) ซึ่ง

(11.00 ± 0.00 มิลลิเมตร) และขมิ้น (10.00 ± 0.00 มิลลิเมตร) ตามลำดับ

รายงานของ Islam et al. (2008) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของพืชสมุนไพรพื้นเมืองบางชนิดในสาธารณรัฐประชาชนบังคลาเทศ จากตัวอย่างพืชสมุนไพรจำนวน 16 ชนิด พบว่ามีพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ *Blumea lacera*, *Chenopodium album* Linn., *Enhydra fluctuans* Lour., *Mentha arvensis* Linn. และ *Glinus oppositifolius* Linn. ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* และ *Vibrio cholerae* ด้วยวิธี Disk diffusion พบว่าพืชสมุนไพร *Blumea lacera* สามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ ยกเว้น *P. aeruginosa* โดยให้บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 11.00-23.00 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้สูงสุด (23.00 มิลลิเมตร) พืชสมุนไพร *Enhydra fluctuans* Lour. และ *Mentha arvensis* Linn. ให้บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.00-10.00 มิลลิเมตร โดย *Mentha arvensis* Linn. สามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบยกเว้น *B. cereus* และ *Enhydra fluctuans* สามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ ยกเว้น *S. paratyphi* และ *B. megaterium* ส่วนพืชสมุนไพร *Chenopodium album* Linn. และ *Glinus oppositifolius* Linn. ให้บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.00-13.00 มิลลิเมตร

ส่วนการศึกษาที่ผ่านมาของ Naik et al. (2010) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*,

Klebsiella pneumoniae และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี agar well diffusion ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%, 20%, 25% และ 30% พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกชนิด ยกเว้น *P. aeruginosa* โดยมีบริเวณยับยั้งที่ความเข้มข้น 5-30% ของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดมีค่าอยู่ในช่วง 14.33-29.66, 12.66-28.00, 8.33-24.66, 8.33-22.33 และ 7.66-17.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree มีประสิทธิภาพสูงมาก โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย ยกตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 Raisin Tree น่าจะมีส่วนประกอบของสารสำคัญที่สามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียทั้งกลุ่มที่ก่อโรครุนแรง กลุ่มที่ติดต่อยาปฏิชีวนะมากมาย และแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสียรวมทั้งผลิตภัณฑ์สมุนไพรดังกล่าวอาจมีความเข้มข้นที่สูง

ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปควรดำเนินการศึกษาถึงองค์ประกอบสำคัญ ๆ ของผลิตภัณฑ์สมุนไพร CHD-1 raisin tree เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกของการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้และชนิดอื่น ๆ ต่อไป และน่าจะนำมาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาทดแทนยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ได้และมีความปลอดภัยต่อประชาชนมากกว่ายาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จุฑามณี พูลสวัสดิ์ และมณฑล เลิศคณาวณิชกุล. (2547). การฆ่าล้างเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

- จากผู้ป่วยในหอผู้ป่วยศัลยกรรมชาย โรงพยาบาลชุมพร เขตอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร. วารสารกรมอนามัย 25: 61-71.
- พรรณพิชญา ฟุ้งวิทยา ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย ชาญณรงค์ รอดคำ อุลททิพย์ นิมมานนิตย์. (2550).ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อมต่อเชื้อซัลโมเนลลาไทป์มูเรียมที่แยกได้จากไก่. ใน ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 33 โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ 31 ตุลาคม - 2 พฤศจิกายน 2550.
- พีรพัฒน์ สุพรรณพันธ์ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัตินิต นิมรัตน์. (2552). ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. วารสารพิษวิทยาไทย 25(1): 15-28.
- วันดี กฤษณพันธ์. (2538). สมุนไพรสารพัดประโยชน์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์.
- วันดี กฤษณพันธ์. (2541). สมุนไพรน้ำรู้ (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุบัตินิต นิมรัตน์ พีรพัฒน์ สุพรรณพันธ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553). ประสิทธิภาพของกระชายดำและส้มแขกสำเร็จรูปต่อ *Staphylococcus aureus*. วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 42(1): 15-28.
- Abeylath, S. C., Turos, E., Dickey, S., and Limb, D. V. (2008). Glyconanobiotics: Novel carbohydrate nanoparticle antibiotics for MRSA and *Bacillus anthracis*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16: 2412-2418.
- Cho, J. Y., Moon, J. H., Eun, J. B., Chung, S. J., and Park, K. H. (2004). Isolation and characterization of 3(Z)-dodecenedioic acid as an antibacterial substance from *Hovenia dulcis* THUNB. Food Science and Biotechnology 13: 46-50
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., and Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology 106: 290-302.
- Elegami, A. A., Osman, S. M., Omer, M. E., and Ishag, K. M. (2007). In vitro antibacterial activity on some Sudanese *Combretum* species. International Journal of Tropical Medicine 2(2): 45-51.
- Gadelha, A. P. R., Vidal, F., Castro, T. M., Lopes, C. S., Albarello, N., Coelho, M. G. P., Figueiredo, S. F. L., and Monteiro-Leal, L. H. (2005). Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. Parasitology Research 97: 399-407.
- Hernandez-Alles, S., Albert, S., Alvarez, D., Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Gil, J., Tomas, J. M. and Benedil, V. J. (1999). Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiology 145: 673-679.
- Huang, Y. R., Liu, K. J., Hsieh, H. S., Hsieh, C. H., Hwang, D. F., and Tsai, Y. H. (2010). Histamine level and histamine-forming bacteria in dried fish products sold in Penghu Island of Taiwan. Food Control 2: 1234-1239.
- Hyun, T. K., Eom, S. H., Yu, C. Y., and Roitsch, T. (2010). *Hovenia dulcis* – An Asian traditional herb. Planta Medica 76: 943-949.
- Islam, M. J., Barua, S., DAS, S., Khan, M. S., and Ahmed, A. (2008). Antibacterial Activity of some indigenous medicinal plants. Journal of Soil and Nature 2(3): 26-28.
- Kerttula, A. M., Lyytiläinen, O., Salmenlinna, S., and Vuopio, V. J. (2004). Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. The Journal of Hospital Infection 58: 109-114.
- Kim, K.-J., Yu, H.-H., Jeong, S.-I., Cha, J.-D., Kim, S.-M., and You, Y.-O. (2004). Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion

- of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 81–87.
- Kim, J. S., Na, C. S., and Eun, B. J. (2005). Effect of *Hovenia dulcis* Thunb. extract on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 34: 632–637.
- Korea Food and Drug Administration (KFDA). Available at <http://www.kfda.go.kr>
- Lakshmanan, R., Jeya Shakila, R., and Jeyasekaran, G. (2002). Changes in the halophilic amine forming bacterial flora during salt-drying of sardines (*Sardinella gibbosa*). *Food Research International* 35: 541-546.
- Leonel Ochoa-Solano, J. and Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* 23: 519-525.
- Li, G., Min, B. S., Zheng, C., Lee, J., Oh, S. R., Ahn, K. S., and Lee, H. K. (2005). Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis*. *Archives of Pharmacal Research* 28: 804–809.
- Lee, Y. A., Chae, H. J., and Moon, H. Y. (2005). Effect of *Hoveina dulcia* Thunb. var. *koreana* Nakai fruit extract on glucose, lipid metabolism and antioxidant activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Experimental Biomedical Science* 11: 533–538.
- Machdo, T. B., Pinto, A. V., Pinto, M. C. F. R., Leal, I. C. R., Silva, M. G., Amaral, A. C. F., Kuster, R. M. and Netto-dosSantos, K. R. (2003). In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *S. aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21: 279-284.
- Malekzadeh, F., Ehsanifar, H., Shalamat, M., Levin, M., and Colwell, R. R. (2001). Antimicrobial activity of black myrobalan (*Terminalia chrbula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18: 85-88.
- Martinez-Martinex, L., Pascual, A., Hernandez-Alles, S., Alvarez-Diaz, D., Suarez, A. I., Tran, J., Benedi, V. J., and Jacoby, G. A. (1999). Role of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalospolines against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemother* 43: 1669-1673.
- Montefiore, D., Rotimi, Y. O., and Adeyemi-Doro, F. A. (1989). The problem of antibacterial resistance to antibiotics among strains from hospital patients in Lagos and Ibadan. *Nigerian Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 23: 604.
- Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prevost, H., and Leroi, F. (2009). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26: 638-644.
- Naik, M. I., Fomda, B. A., Jaykumar, E., and Bhat, J. A. (2010). Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 535-538.
- Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT*. 39: 1214–1220.

- Park, S. -H., Chang, E. -Y. (2007). Antimutagenic and cytotoxic effects of *Hovenia dulcis* Thumb. leaves extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 36: 1371-1376
- Pinet, M., Castell, A., Baiges, I., Montagut, G., Arola, L., and Ardevol, A. (2008). Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 7: 299-308.
- Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., and Bennett, B. C. (2008). Effects of extracts from Italian medical plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology 118: 418-428.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J., and Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary species and medicinal herb extracts. International Journal of Food Microbiology 117: 112-119.
- Zhao, J., Li, Y., Liu, Q., and Gao, K. (2010). Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the roots of *Inula hupehensis*. Food Chemistry 120: 512-516.

