



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดหึ่งเหือกม้า

ชลดา จัดประกอบ^{*1}, พรพรรณ เหล่าวัชรสุวรรณ², เมธิน ผดุงกิจ³

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดหึ่งเหือกม้า

ชลดา จัดประกอบ^{*1}, พรพรรณ เหล่าวัชรสุวรรณ², เมธิน ผดุงกิจ³

บทนำ: เห็ดหึ่งเหือกม้า หรือ *Phellinus rimosus* เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดราที่อยู่ในวงศ์ Hymenochaetaceae จากการศึกษาพบว่าเห็ดชนิดนี้มีฤทธิ์ทางยาและมักพบในเขตภาคอีสาน ตามภูมิปัญญาดั้งเดิมทางการแพทย์แผนไทยได้มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยารักษาเมเร็ง รักษาโรคมะเร็ง อาการปวดหู และอาการผื่นคันปวดแสบปวดร้อน **วัตถุประสงค์:** การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดหึ่งเหือกม้าที่สกัดด้วยเอทานอล, น้ำ และการสกัดแอลกอฮอล์ **วิธีการทดลอง:** ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2 - Diphenyl- picrylhydrazyl radical assay (DPPH assay) และ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test ซึ่งทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย คือ *Salmonella typhimurium* strain TA98 และ TA100 **ผลการทดลองและสรุปผล:** สารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด คือ สารสกัด *P. rimosus* โดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: เห็ดหึ่งเหือกม้า, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

¹ นิสิตปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

² อาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

³ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

* ติดต่อผู้พิมพ์: E-mail: shoon_taniya@hotmail.com

Abstract

Antioxidant and Antimutagenic Activities of *Phellinus rimosus*

Chonlada Judprakob^{*1}, Pornpun Laovachirasuwan², Methin Phadungkit³

Introduction: *Phellinus rimosus* is fungi in the family Hymenochaetaceae. It commonly grows in northeast of Thailand. In traditional medicine, *P. rimosus* was used as an ingredient in cancer treatment drug, herpes, earache and rash. **Objective:** This study investigated the antioxidant and antimutagenic activities of ethanol, water and procedure from alkaloid extraction of *P. rimosus*. **Methods:** Antioxidant activity was studied using Scavenging activity on 2,2 - Diphenyl- picrylhydrazyl radical assay (DPPH assay) and Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay). Antimutagenic activity was studied by Ames mutagenicity assay with *Salmonella typhimurium* strain TA98 and TA100 against mutagen, 1-aminopyrene treated with nitrite. **Results and conclusion:** The ethanol extract of *P. rimosus* was the best antioxidation and antimutagenic activities in this model. Thus, *P. rimosus* is an interesting to developed for natural product in the future study.

Keywords: *Phellinus rimosus*, Antioxidant, Antimutagenic

¹ Graduate student in M.Sc. (Medicinal plants and Natural Product), Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University,

² Lecturer, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University

³ Assistant Professor, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University

*Corresponding author: E-mail: shoon_taniya@hotmail.com



1. บทนำ

ในปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านยารักษาโรค อาหาร เครื่องดื่ม และเครื่องสำอาง (Chaimutti, 2004) และได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรเป็นจำนวนมาก สมุนไพรบางชนิดมีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาโรคที่ร้ายแรงหรือโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายได้ ทำให้มีผู้สนใจศึกษาฤทธิ์จากสมุนไพรในการรักษาโรคต่าง ๆ มากขึ้น ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเคมี เช่น การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในพืชสมุนไพร (Taewongsorat, 2001) ที่เป็นตัวช่วยยับยั้งกระบวนการเกิดโรคได้หลายโรค เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจและมะเร็ง (Kritsanapan, 2005) และสามารถนำไปใช้ให้เกิดคุณประโยชน์ทางด้านยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้

เห็ดหึ่งเหือกมัว หรือ *P. rimosus* เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดราที่อยู่ในวงศ์ Hymenochaetaceae (Klinhome, 2005) จากการศึกษาพบว่าเห็ดชนิดนี้มีฤทธิ์ทางยาและมักพบในเขตภาคอีสาน เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มีการใช้ตามภูมิปัญญาดั้งเดิมทางการแพทย์แผนไทยโดยนำมาใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยารักษา มะเร็ง รักษาโรคเรื้อรัง อาการปวดหู และอาการผื่นคันปวดแสบปวดร้อน (The Medical Foundation Thailand, Bureau of Sanatorium and Art of Healing, 2009) แต่การรักษาโรคดังกล่าวยังไม่มียาวิจักษ์หรือข้อมูลที่ยืนยันพอและแน่ชัด

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของกลุ่มเห็ดหึ่งเหือกมัว ซึ่งจะได้ข้อมูลคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การสกัดสาร

2.1.1 การสกัดด้วยเอทานอล (Yun SS *et al.*, 2003)

สกัดด้วยการหมัก (maceration) โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดคือเอทานอล หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporatory แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer

2.1.2 การสกัดด้วยน้ำ (Mi YS *et al.*, 2002)

สกัดด้วยการต้ม โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดคือน้ำ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer

2.1.3 การสกัด alkaloid (Hildebert W *et al.*, 1996)

นำเห็ดหึ่งเหือกมัว 500 กรัม เติมน้ำละลายยาแอมโมเนีย 10% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที จากนั้นเติมน้ำตาล 2500 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมากรอง

2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (Chu, 2000)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดหึ่งเหือกมัว ต่ออนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

2.2.1.1 เตรียมสารสกัดเห็ดหึ่งเหือกมัว ให้มีความเข้มข้น 5 ระดับ (15-500 ppm) ด้วยเมทานอล ในหลอดทดลอง

2.2.1.2 เตรียม DPPH ความเข้มข้น 60 ppm ด้วยเมทานอล

2.2.1.3 นำสารสกัดในข้อ 1 จำนวน 750 ไมโครลิตร และ DPPH จำนวน 750 ไมโครลิตร มาผสมให้เข้ากัน ใส่ใน 96 well plate

2.2.1.4 ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วหาค่า % radical scavenging จากสูตร

$$\frac{A_{\text{ctr}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{ctr}}} \times 100$$

เมื่อ A_{ctr} คือ ค่า absorbance ของ control (มีเฉพาะ DPPH)

A_{sample} คือ ค่า absorbance ของสารสกัดเห็ดหึ่งเหือกมัว

2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี FRAP assay (Benzie, 1999)

2.2.2.1 เตรียมสารสกัดเห็ดหึ่งเหือกมัว ให้มีความเข้มข้น ระหว่าง 15-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.2.2.2 เตรียม FRAP reagent โดยมีส่วนประกอบของ acetate buffer : TPTZ (2,4,6-tripyridyl-striazine) ในอัตราส่วน 30:1

2.2.2.3 นำสารสกัดในข้อ 1 จำนวน 100 ไมโครลิตร และ FRAP reagent ข้อที่ 2 จำนวน 3,000 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองเดียวกัน

2.2.2.4 นำสารละลายที่ได้จากข้อที่ 3 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร นาที่ที่ 10 เปรียบเทียบสารมาตรฐาน ในการทดลองนี้ใช้ Ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

2.2.2.5 โดยนำค่าที่ได้ไปคำนวณ FRAP value เปรียบเทียบสารมาตรฐาน FeSO_4



2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test (Kangsadalampai, 1996)

2.2.3.1 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

นำเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 100 และ TA 98 มาเลี้ยงในอาหาร oxid nutrient broth (12 มิลลิลิตร) แล้วนำมาเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เจือจางเชื้อลง 8 เท่า ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % เพื่อวัดค่า OD อ่านค่าที่ความยาว 620 นาโนเมตร

2.2.3.2 การเตรียม nitrosated products

1) เตรียม nitrosated products

โดย เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอดสำหรับ TA 100 และ TA 98 โดยการเติม 0.2 N กรดไฮโดรคลอริก 740 ไมโครลิตร, 1-aminopyrine 10 ไมโครลิตร และ 2 M NaNO₃ 250 ไมโครลิตร ตามลำดับ สำหรับ TA 98 และ 0.2 N กรดไฮโดรคลอริก 710 ไมโครลิตร, 1-AP 40 ไมโครลิตร และ 2 M NaNO₃ 250 ไมโครลิตร ตามลำดับสำหรับ TA 100

2) นำสารที่เตรียมได้ทั้ง 2 หลอด ไปเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งนาน 1 นาที

3) เติม 2 M Ammonium sulfamate 250 ไมโครลิตร ลงในทั้งสองหลอดและแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที

2.2.3.3 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์

1) นำ หลอดทดลองเติม nitrosated products 100 ไมโครลิตร และ Na₃PO₄-KCl buffer 500 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดจากเห็ดหังเกือกม้า 100 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 3.5, 7.5, 15 และ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเชื้อ *S. typhimurium* TA 100 หรือ TA 98 100 ไมโครลิตร เขย่าในอ่างนำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2) เมื่อครบกำหนด เติม Top agar ที่เติม Histidine ที่ผสมกับ biotin แล้ว 2 มิลลิตร

3) จากนั้นนำไปเทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนับจำนวนเชื้อที่มีการเจริญ โดยเปรียบเทียบกับ control ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ modification จากสูตร

$$\% \text{ modification} = \frac{(A-B)}{(A-C)} \times 100$$

เมื่อ A หมายถึงค่า revertants colonies ของ positive control

B หมายถึงค่า revertants colonies ของ สารสกัดเห็ดหังเกือกม้า

C หมายถึงค่า revertants colonies ของ negative control ซึ่งจะนำค่า% ที่ได้มาเปรียบเทียบกับช่วงของการยับยั้ง โดยช่วง % การยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ เป็นดังนี้ (Calomme, 1996)

> 60 % หมายถึง ออกฤทธิ์แรง (strong)

40 % – 60 % หมายถึง ออกฤทธิ์ปานกลาง (moderate)

20 % – 40 % หมายถึง ออกฤทธิ์อ่อน (weak)

< 20 % หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ (negligible)

3. ผลการศึกษาวิจัย

3.1 การสกัดเห็ดหังเกือกม้า

ผลการศึกษาพบว่า การสกัดแอลกอฮอล์ ได้ %yield สูงสุด คือ 20.82 % รองลงมาคือ การสกัดด้วยเอทานอล (18.5%) และการสกัดด้วยน้ำ (14.5%) ตามลำดับ

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดที่ให้ค่าอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า EC₅₀ ต่ำที่สุด) คือ สารสกัดเห็ดหังเกือกม้าที่สกัดด้วย เอทานอล (8.26±1.40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาคือ การสกัดด้วยน้ำ (20.12±3.65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสกัดแอลกอฮอล์ (94.15±9.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Ascorbic acid (5.02±0.46 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 1

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดที่ให้ค่าอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า Fe II equivalent สูงที่สุด) คือ สารสกัดเห็ดหังเกือกม้าที่สกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล (0.33±0.017 มิลลิโมล/มิลลิกรัมสารสกัด) รองลงมาคือการสกัดด้วยน้ำ (0.11±0.01 มิลลิโมล/มิลลิกรัมสารสกัด) และสกัดแอลกอฮอล์ (0.13±0.01 มิลลิโมล/มิลลิกรัมสารสกัด) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Ascorbic acid (0.34±0.02 มิลลิโมล/มิลลิกรัมสารสกัด) ดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay และ FRAP assay ของสารสกัดเห็ดหังเกือกม้า (n=8)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	วิธีการสกัด		
	การสกัดด้วยเอทานอล	การสกัดด้วยน้ำ	การสกัดแอลกอฮอล์
DPPH assay ค่า EC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	8.26±1.40	20.12±3.65	94.15±9.08
FRAP assay ค่า FRAP value (Fe II equivalent, มิลลิโมล/มิลลิกรัมสารสกัด)	0.33±0.02	0.11±0.01	0.13±0.01

ค่า EC₅₀ ของสารมาตรฐาน; ascorbic acid = 5.02±0.46 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ค่า Fe II equivalent ของสารมาตรฐาน; ascorbic acid = 0.34±0.02 มิลลิโมล/มิลลิกรัมสารสกัด

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test

Ames test

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดเห็ดหังเกือกม้าด้วยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งจัดอยู่ในระดับออกฤทธิ์แรงโดยพิจารณาจากค่า %modification > 60% ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสายพันธุ์

TA100 รองลงมาคือ การสกัดด้วยน้ำ จัดอยู่ในระดับออกฤทธิ์แรงที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อในสายพันธุ์ TA98 และ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสายพันธุ์ TA100 และการสกัดแอลกอฮอล์ พบว่า จัดอยู่ในระดับออกฤทธิ์แรงที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อในสายพันธุ์ TA98 และ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสายพันธุ์ TA100 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test ของสารสกัดเห็ดหังเกือกม้า (n=5)

ความเข้มข้น (mg/plate)	วิธีการสกัด					
	การสกัดด้วยเอทานอล		การสกัดด้วยน้ำ		การสกัดแอลกอฮอล์	
	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	TA100
0.5	309.2±42.7 (30.0)	803.4±33.2 (18.8)	384.6±17.0 (12.8)	844.6±32.7 (14.0)	393.6±16.7 (10.7)	890.2±35.8 (8.7)
1	163.8±29.2 (64.0)	695.8±38.1 (31.3)	309.4±21.2 (30.2)	762.6±20.1 (23.5)	305.0±28.1 (31.2)	702.0±32.0 (30.6)
2	127.6±17.8 (72.4)	356.8±34.6 (70.8)	174.0±13.6 (61.6)	620.0±22.1 (40.1)	174.0±12.8 (61.6)	543.0±48.6 (49.1)
4	87.6±6.6 (81.6)	269.0±47.7 (80.0)	107.2±14.4 (77.1)	425.6±15.0 (62.8)	114.8±14.5 (75.3)	361.4±45.2 (70.2)

จำนวนโคโลนีก่อกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย/จานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติคือ 8.4±2.06 โคโลนี และ 105.4±8.07 โคโลนี ของสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ตามลำดับ

4. อภิปรายผลและสรุป

การสกัดเห็ดหังเกือกม้าด้วยวิธีสกัดแอลกอฮอล์ ได้ %yield สูงสุด (20.82) รองลงมาคือ การสกัดด้วยเอทานอล (18.5%) และการสกัดด้วยน้ำ (14.5%) ตามลำดับ ซึ่งการสกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ Ascorbic acid ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่อนุเคราะห์เห็ดหังเกือกม้าในการทำวิจัย และเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ปีการศึกษา 2555



6. เอกสารอ้างอิง

Ajith TA, Janardhanan KK. "Antimutagenic effect of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat against chemical induced mutations of histidine dependent *Salmonella typhimurium* strains". *Food Chem Toxicol* 2011;(49): 2676-2678.

Benzie I.F.F., Strains J.J., "Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration". *Methods Enzymol* 1999;[299]:pp15-27.

Calomme M., Pieters L., Vlietinck A., Berghe CV., "Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids". *Planta Med* 1996;[62]:pp22-26.

Chaimutti P. Antioxidant of Plants. Songklanakarin university 2547.

Chu YH, Chang CL, Hsu HF. "Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity". *Sci Food Agric* 2000;80(5): 561-566.

Kangsadalampai K., Butryee C., Manoonphol K., "Direct mutagenicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon-containing fraction of smoked and charcoal-broiled foods treated with nitrite in acid solution". *Food Chem Toxicol* 1996;(35): 213-218.

Maron DM. and Ames B.N., "Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test". *Mutant Res* 1983;[444]:pp451-461.

Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, *et al.* "Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*". *J Ethnopharmacol* 2003;(88).

The Medical Foundation Thailand, Bureau of Sanatorium and Art of Healing. "Thailand traditional medicine texts". Faculty of Medicine Siriraj Hospital. Mahidol University 2552;(2).

Wagner H, Bladt . "Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas". Newyork: Springer 1996.