

蛇床子萃取物於抗氧化、抑制黑色素生成及抗致突變的研究

曾文楷¹、陳宜嫻²、官常慶^{*1}

靜宜大學¹應用化學系；²化粧品科學系

(97 年 07 月 29 日受理，97 年 11 月 18 日接受刊載)

本研究採用蛇床子 (*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.) 的乾燥成熟果實為材料，經95%乙醇萃取後，所製得的蛇床子乙醇萃取物再進行抗氧化性、抑制黑色素生成的效果以及抗致突變性等試驗。在抗氧化方面，100.0 mg/ml蛇床子萃取物清除DPPH自由基的效果相當於同濃度Ascorbic acid 的68.4%、BHA的67.9%以及BHT的67.6%；100.0 mg/ml蛇床子萃取物的還原力相當於同濃度Ascorbic acid的75.6%、BHA的80.3%以及BHT的83.6%；25.0 mg/ml蛇床子萃取物螯合亞鐵離子的效果相當於同濃度EDTA的93.3%。在抑制黑色素生成方面，蛇床子萃取物抑制生成黑色素的中間產物Dopachrome的IC₅₀為68.70 mg/ml。另由沙門氏菌回復突變性試驗之結果顯示蛇床子萃取物不具致突變性，而且0.1 mg/plate蛇床子萃取物對4-NQO引起致*Salmonella typhimurium* TA98突變的抑制率為26.9%，0.05 mg/plate蛇床子萃取物對4-NQO引起致*Salmonella typhimurium* TA100突變的抑制率為38.6%，均表示有輕度活性的抗致突變作用。綜合上述結果，蛇床子萃取物為一安全而具有化學防護效果的中草藥，應可再進一步進行活性成分的分析研究，以確定其於抗老化、抑制黑色素沉著方面的應用價值。

關鍵詞：蛇床子、抗氧化、黑色素、抗致突變

前 言

蛇床子為繖形科 (Umbelliferae) 植物 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的乾燥成熟果實¹。《神農本草經》列為上品，為常用的中草藥，在歷代本草均有記述，《清，本草正義》記載：外瘍溼熱痛癢、浸淫諸瘡，可作湯洗，可為末敷，收效甚捷，不得以賤品而忽之。而近代研究發現，蛇床子主要內含香豆素 (coumarins)、色原酮 (chromones) 以及萜類 (terpenoids) 揮發油

²，並具有止癢³、抑制骨質疏鬆⁴、抗過敏⁵、抗發炎、擴張血管、延緩老化⁶以及局部麻醉⁷等藥理活性。而文獻中甚少有關於蛇床子之抗氧化、抑制黑色素以及抗致突變方面的報導，因此本研究針對蛇床子的抗氧化性、抑制黑色素生成的效果以及抗致突變性等進行活性效能的評估，以期更了解蛇床子的應用價值。

活性氧分為自由基類和非自由基類，當體內活性氧的產生和抗氧化防禦力不平衡時則產生氧化壓力 (oxidative stress)，嚴重的氧化壓

力會導致細胞傷害和死亡⁸，與心血管疾病、癌症、神經方面的疾病、糖尿病以及老化有密切的關係⁹。另外，活性氧也會促進黑色素的合成以及黑色素細胞的分化¹⁰，而導致表皮黑色素沉著，雖然不會對健康有危害，但是卻會影響容貌的美觀。抗氧化劑（antioxidants）的作用可分為自由基的終結者（free-radical terminators）、螯合劑（chelators）、還原劑（reducing agents）以及能分解過氧化氫的二級抗氧化劑（secondary antioxidants），都能防止氧化壓力所造成人體的傷害¹¹，而具有抗氧化性的物質於研究中亦顯示與其抗致突變性呈正相關性¹²⁻¹³。

癌症為基因突變所誘發¹⁴的一種機能老化性疾病，而引起生物體細胞遺傳物質發生改變的作用稱為致突變作用（mutagenicity），凡能引起生物體發生突變的物質統稱為致突變物（mutagen）¹⁵。沙門氏菌回復突變測試法是利用一系列具有組胺酸需求性（histidine dependent, His⁻）之沙門氏菌突變菌系，受致突變物質刺激時，由需要組胺酸之營養缺失型回復突變為能自行合成組胺酸（histidine independent, His⁺）之野生型之特性，藉缺乏組胺酸之選擇培養基檢定，以測知化合物之致變性，由於此方法不但具有一般微生物系統之「快速、經濟」的優點，對致癌物質的預測準確性更高達90%¹⁵，是目前最廣為採納的化合物遺傳毒性簡易偵測法之一，由於致癌物質所誘導的致突變可以藉由抗致突變劑（antimutagen）所抑制，因此亦可用來判別檢品的抗致突變效果。

材料與方法

一、試驗材料

（一）檢品

蛇床子 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 購於台中市中藥行。

（二）藥品

Kojic acid購於台灣佳河公司。Butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT) 購於台灣富鉑公司。Arbutin購於Merk公司。1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)、ascorbic acid、potassium hexacyanoferrate (III) (K₃Fe(CN)₆)、ferrous chloride tetrahydrate (FeCl₂ · 4H₂O)、tyrosine、tyrosinase、4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO) 購於Sigma公司。

（三）試驗菌株：

Salmonella typhimurium TA98與TA100購於新竹食品工業研究所菌種保存中心。

二、試驗方法

（一）蛇床子乙醇萃取物的製備

將蛇床子以95%乙醇進行萃取，經過濾、濃縮、冷凍乾燥後置於4℃冰箱之中備用。

蛇床子萃取率(%) =

$$\left[\frac{\text{蛇床子萃取物重量(g)}}{\text{蛇床子重量(g)}} \right] \times 100\%$$

（二）抗氧化能力的測定

1. 清除DPPH自由基之能力

參考Yamaguchi等人¹⁶之方法，在微量離心管內，依序加入100 μl 檢品、400 μl 100 mM Tris-HCl 緩衝溶液（pH=7.4）、500 μl 250 μM DPPH 自由基乙醇溶液，經振盪20秒將溶液混合均勻後，再於25℃的恆溫反應槽中避光靜置20分鐘，以紫外光-可見光光譜儀測定於517 nm的吸光值。檢品試驗重複3次。計算DPPH自由基清除率，公式如下：

DPPH自由基清除率(%) =

$$\left[1 - \left(\frac{\text{Sample於517 nm之吸光值}}{\text{Blank於517 nm之吸光值}} \right) \right] \times 100\%$$

2. 還原力

參考Yen等人¹⁷之方法，在樣品瓶中加入5 ml 檢品、5 ml 0.2M 磷酸鹽緩衝液 (pH=6.6) 以及 5 ml 1% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液，放置於50°C水浴20分鐘後，以冰浴冷卻，再加入5 ml 10% trichloroacetic acid 溶液後，以離心機3000 rpm、離心10分鐘，取上清液5 ml並加入5 ml去離子水及1 ml 0.1% $FeCl_3$ 溶液混合均勻，靜置10分鐘後，以紫外光-可見光光譜儀測定於700 nm的吸光值。檢品試驗重複3次。

3. 螯合亞鐵之能力

參考Dinis等人¹⁸之方法，在樣品瓶中依序加入1ml檢品、3.7 ml 95% 乙醇以及0.1 ml 2 mM $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶液，靜置30秒後，再加入0.2 ml 5 mM Ferrozine溶液，在25°C下反應10 分鐘後，以紫外光-可見光光譜儀測定於562 nm的吸光值。檢品試驗重複3次。計算螯合亞鐵能力，公式如下：

螯合亞鐵能力(%) =

$$\left[1 - \left(\frac{\text{Sample於562 nm之吸光值}}{\text{Blank於562 nm之吸光值}} \right) \right] \times 100\%$$

(三) 抑制生成黑色素能力的測定

參考Lee等人¹⁹之方法，取0.9 ml的磷酸鹽緩衝溶液 (pH=6.8)、1 ml檢品以及1 ml 0.03 % tyrosine水溶液於樣品瓶中混合，置於恆溫水槽中維持37°C 10分鐘後，再加入0.1 ml 350 units/ml tyrosinase水溶液，將溶液混合均勻，於恆溫水槽中反應 25分鐘後，以紫外光-可見光光譜儀測定於475 nm的吸光值 (A_t)。以磷酸鹽緩衝溶液取代tyrosinase，測定於475 nm的吸光值 (A_1)。以去離子水取代檢品，測定於475 nm的吸光值

(A_b)。以去離子水取代檢品，並以磷酸鹽緩衝溶液取代tyrosinase測定於475 nm的吸光值 (A_0)。檢品試驗重複3次。計算dopachrome抑制率，公式如下：

Dopachrome抑制率(%) =

$$\left\{ \frac{[(A_b - A_0) - (A_t - A_1)]}{(A_b - A_0)} \right\} \times 100\%$$

IC₅₀，意指檢品抑制dopachrome生成達50%時的濃度 (50% inhibition concentration)，是以連續不同濃度之檢品測試其dopachrome抑制率，並利用線性回歸曲線求得。

(四) 沙門氏菌回復突變性測試法

1. 毒性試驗

參考黃²⁰之方法，於無菌的微量離心管中添加0.1 ml檢品、0.5 ml 0.2 M磷酸鹽緩衝溶液 (pH=7.4) 和0.1ml *Salmonella typhimurium* TA98或TA100的菌液 (OD₆₀₀介於0.3~0.4， $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml)，混合均勻後，於37°C恆溫震盪20分鐘，再加入內含0.5 mM histidine/biotin solution之Top agar 1.98 ml，混合均勻後再倒入已固化之minimal glucose agar plate，待Top agar凝固後，倒置培養皿於37°C恆溫培養48小時後計算菌落數。另外一組不加檢品，而改以dimethyl sulfoxide (DMSO) 代替作為一控制組，為自然回復突變組。檢品試驗重複3次。試驗數據由SPSS統計程式進行差異性分析，以單因子變異數分析 (One-way ANOVA, LSD) 檢定多組間之差異，當p < 0.05表示具有顯著性差異。

2. 致突變性試驗

參考Maron等人¹⁵之方法，於無菌的微量離心管中添加0.1 ml檢品、0.5 ml 0.2 M磷酸鹽緩衝溶液 (pH=7.4) 和0.1 ml *Salmonella typhimurium* TA98或TA100的菌液 (OD₆₀₀介於0.3~0.4， $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml)，混合均勻後，於37°C恆溫

震盪20分鐘，再加入內含0.5 mM histidine/biotin solution之Top agar 1.98 ml，混合均勻後再倒入已固化之minimal glucose agar plate，待Top agar凝固後，倒置培養皿於37℃恆溫培養48小時後計算菌落數。另外一組不加檢品，而改以DMSO代替作為一控制組，為自然回復突變組。檢品試驗重複3次。

3. 抗致突變性試驗

參考Yen等人¹⁷之方法，於無菌微量離心管中添加0.1 ml 0.5 µg/ml的致突變劑（4-NQO）溶液、0.1 ml檢品、0.5 ml 0.2 M 磷酸鹽緩衝溶液（pH=7.4）和0.1 ml *Salmonella typhimurium* TA98或TA100的菌液（OD₆₀₀介於0.3~0.4，10⁷~10⁸ CFU/ml），混合均勻後，於37℃恆溫震盪20分鐘，再加入內含0.5 mM histidine/biotin solution之Top agar 1.98 ml，混合均勻後再倒入已固化之minimal glucose agar plate，待Top agar凝固後，倒置培養皿於37℃恆溫培養48小時後計算菌落數。另外一組不加檢品，而改以DMSO代替作為一正控制組。再一組不加檢品改以DMSO代替，而且不加4-NQO改以DMSO代替作為控制組，為自然

回復突變組。檢品試驗重複3次。計算抗致突變率，公式如下：

$$\text{抗致突變率(\%)} = \left[\frac{\left(\begin{array}{l} \text{只加4-NQO之回復突變菌落數} - \\ \text{加4-NQO和Sample之回復突變菌落數} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{l} \text{只加4-NQO之回復突變菌落數} - \\ \text{自然回復突變菌落數} \end{array} \right)} \right] \times 100\%$$

結果與討論

一、蛇床子乙醇萃取物

蛇床子以95%乙醇萃取、過濾、濃縮及冷凍乾燥後，所得之萃取率為5.01%。

二、蛇床子乙醇萃取物的抗氧化能力

（一）清除DPPH自由基之能力

由於抗氧化劑在抑制脂質氧化之機制上，通常是氫原子供應者或是自由態游離基接受者來清除脂質過氧化自由基。DPPH 自由基為一相當安定的自由基，在 517 nm有最大吸光值，當被抗氧化劑還原，或與另外一個自由基結合時，其吸光值會減低，由此來判斷檢品清除自由基之

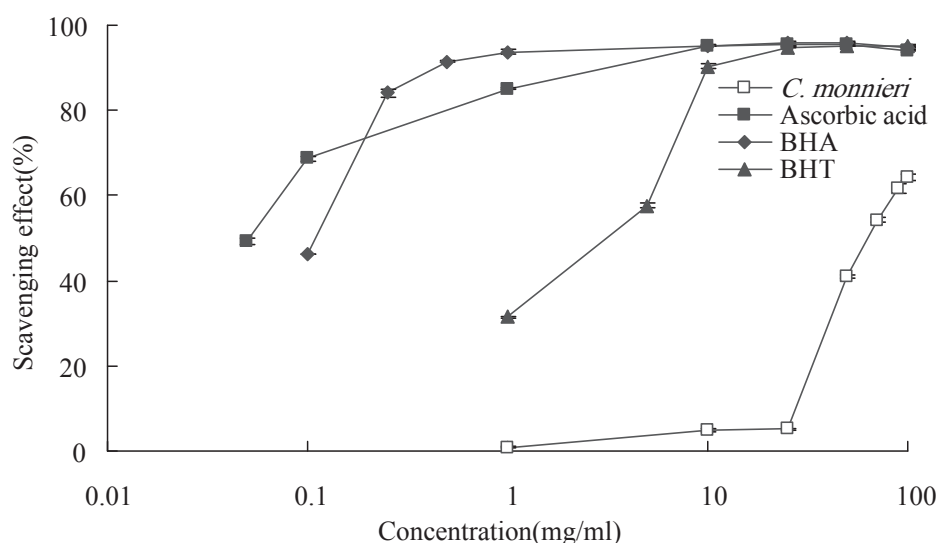


Fig. 1 Scavenging effects of the ethanolic extract from *Cnidium monnieri* fruits on DPPH free radicals.

Each value is expressed as mean ± S.D.(n=3)

能力，其吸光值愈低表示檢品清除自由基之能力愈強。圖1為蛇床子乙醇萃取物清除DPPH自由基之能力，結果顯示，蛇床子乙醇萃取物對DPPH自由基之清除能力隨濃度的增加而增加，當濃度為100.0 mg/ml時，蛇床子乙醇萃取物清除DPPH自由基的效果為64.4%，效果為同濃度ascorbic acid的68.4%、BHA的67.9%以及BHT的67.6%，蛇床子的抗氧化活性很少被探討，主要成分香豆素亦少有相關抗氧化的文獻記載，由青藤（*Sinomonium acutum*）分離出的scopoletin為一香豆素結構的成分，能清除超氧陰離子（ $O_2^{\cdot-}$ ）²¹，在本研究中亦有測試蛇床子乙醇萃取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 的活性，結果顯示無清除 $O_2^{\cdot-}$ 的效果，而本試驗的結果表示蛇床子乙醇萃取物能藉由提供氫原子來清除自由基，但是其活性成分尚須進一步的研究。

（二）還原力

還原劑（reducing agents），會提供一個傾向於還原狀態的環境，或者還原已氧化的過氧化物以減緩氧化作用。若檢品具有還原力，就會將

$Fe^{3+}(CN)_6$ 還原成 $Fe^{2+}(CN)_6$ ， $Fe^{2+}(CN)_6$ 會與 Fe^{3+} 形成普魯士藍（ $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ ），普魯士藍為一深藍色之化合物，在700 nm有最大吸光值，當吸光值愈高表示檢品的還原力愈強。圖2為蛇床子乙醇萃取物之還原力，結果顯示，蛇床子乙醇萃取物的還原力隨濃度的增加而增加，當濃度為100.0 mg/ml時，蛇床子乙醇萃取物的還原力為1.995，效果為同濃度ascorbic acid的75.6%、BHA的80.3%以及BHT的83.6%，表示蛇床子乙醇萃取物能提供電子或與自由基反應以減緩氧化作用，但是其活性成分尚須進一步的研究。

（三）螯合亞鐵之能力

亞鐵離子（ Fe^{2+} ）的存在，除了會藉由Fenton反應生成羥基自由基（ $\cdot OH$ ），亦會與過氧化脂質（LOOH）反應生成氧化脂質自由基（ $LO\cdot$ ）而對細胞造成破壞，因此具有螯合 Fe^{2+} 能力之物質，亦可以作為抗氧化的協同劑。 Fe^{2+} 能與Ferrozine形成複合物，在562 nm有最大吸光值，當吸光值愈低表示檢品螯合 Fe^{2+} 的能力愈強。圖3為蛇床子乙醇萃取物螯合 Fe^{2+} 之能力，結

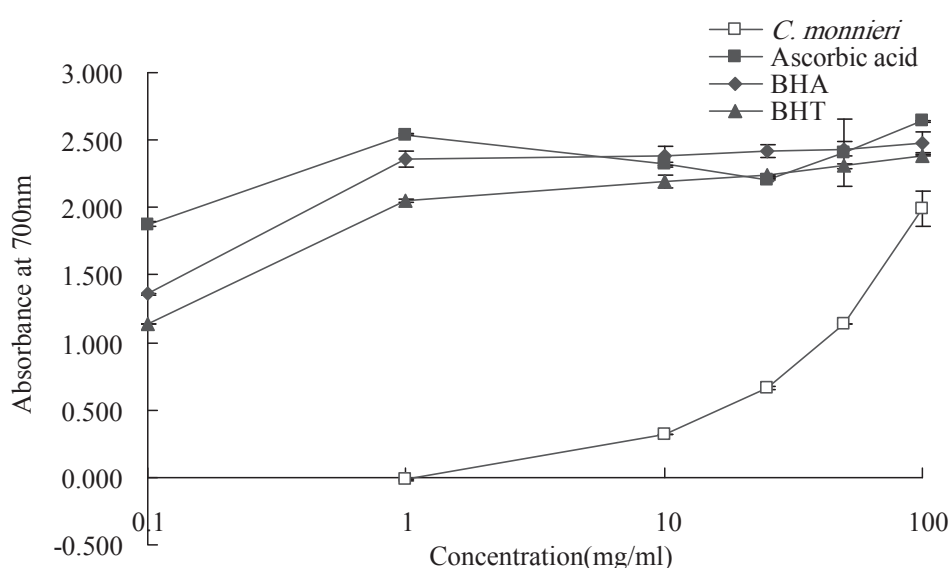


Fig. 2 Reducing power of the ethanolic extract from *Cnidium monnieri* fruits.

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.(n=3)

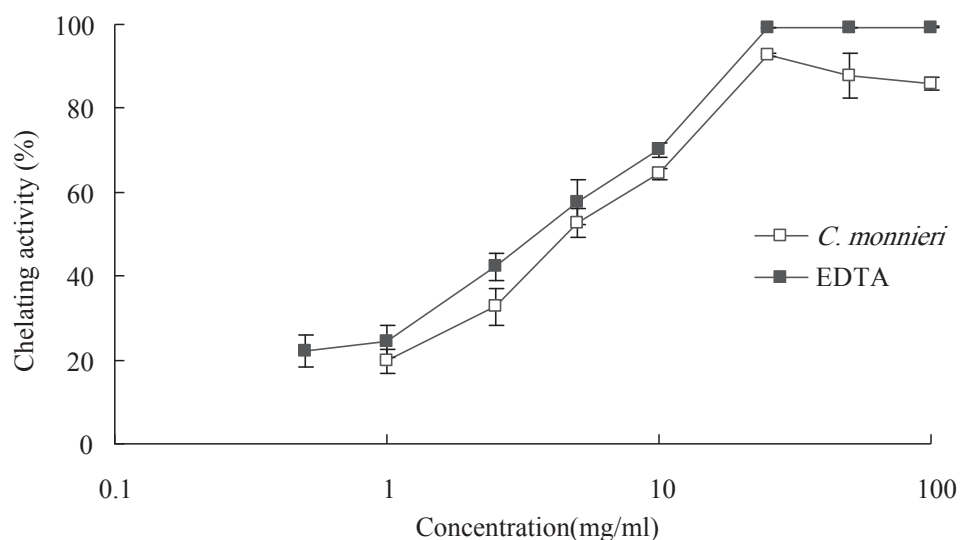


Fig. 3 Chelating activity of the ethanolic extract from *Cnidium monnieri* fruits on ferrous ion.

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.(n=3)

果顯示蛇床子乙醇萃取物螯合 Fe^{2+} 之能力隨濃度的增加而增加，當濃度為25.0 mg/ml時，蛇床子乙醇萃取物螯合 Fe^{2+} 的能力為92.6%，效果是同濃度EDTA的93.3%，表示蛇床子乙醇萃取物能螯合會促進氧化反應的 Fe^{2+} ，但是其活性成分尚須進一步的研究。

三、蛇床子乙醇萃取物抑制生成黑色素之能力

黑色素沉著會經由紫外光照射或活性氧的影響而更加嚴重，也與老化、皮膚的新陳代謝不正常有關，凡是能抑制黑色素生成的物質，可以作為皮膚的美白劑。黑色素於黑色素細胞中所製造，在黑色素的生成過程中，tyrosine會

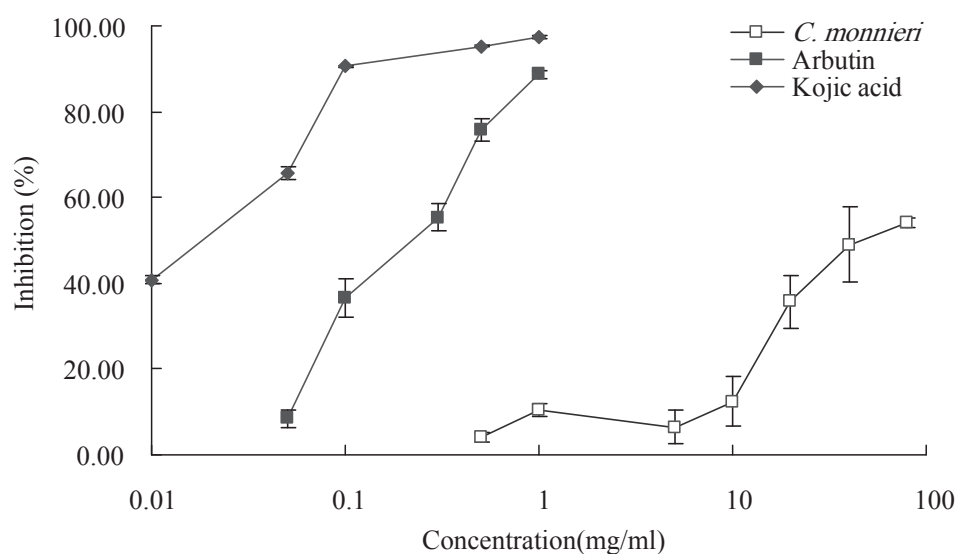


Fig. 4 The effect of inhibiting the formation of dopachrome by the ethanolic extract from *Cnidium monnieri* fruits.

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.(n=3)

藉由tyrosinase的催化形成dopaquinone，再經由一系列的氧化以及聚合反應產生黑色素²²，而dopachrome為黑色素生成過程中較為快速生成的穩定態中間產物，於475 nm有最大吸光值，當吸光值愈低表示檢品抑制dopachrome生成的能力愈好。圖4為蛇床子乙醇萃取物抑制dopachrome生成的效果，結果顯示，蛇床子乙醇萃取物抑制dopachrome生成的能力隨濃度的增加而增加，且其IC₅₀為68.70 mg/ml。由於tyrosinase為內含2價銅離子活性中心的酵素，能催化黑色素生成的氧化反應，當檢品具有還原或螯合金屬離子的能力，黑色素的生成就可能被抑制，在抗氧化試驗中，結果顯示蛇床子乙醇萃取物就具有還原以及螯合金屬離子的作用，這可能是其能降低dopachrome量的機轉之一，而要進一步探討其抑制黑色素生成的作用，須進行tyrosinase活性及黑色素量的測定。

四、蛇床子乙醇萃取物的抗致突變性

(一) 毒性試驗

在進行致突變以及抗致突變測試時，若檢品對*Salmonella typhimurium* TA98、TA100有毒性而降低菌數，將會影響致突變以及抗致突變測試結果的判讀。判別檢品對*Salmonella typhimurium* TA98、TA100有毒性的特徵為在培養基上顯示：
1、稀疏的背景（background lawn）伴隨著減少的回復菌落數（number of revertant colonies）。
2、沒有背景。
3、出現針狀（pinpoint）的非回復菌落（non-revertant colonies）¹⁴。背景的產生起因於培養基上微量的組胺酸能提供His⁻細菌繁殖6~8代所生成的微菌落（microcolonies），而這個生長繁殖期為突變生成（mutagenesis）過程中所不可或缺的，當檢品有些微毒性時，微菌落的形成便會受抑制，而使背景變得稀疏，同時也會降低回復菌落數，當檢品有高毒性時，會使得細菌無法生長以致於無法產生背景，或導致His⁻細菌高效率的使用培養基中微量的組胺酸，使得His⁻細菌能多繁殖數代，而產生針狀的非回復菌落。因此，當觀察結果出現上述毒性特徵或所得之回復菌落數顯著小於自然回復突變菌落數，則表示

Table 1. Toxicity and mutagenicity of the ethanolic extract from *Cnidium monnieri* fruits toward *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

Amount (mg/plate)	His ⁺ revertants/plate (Mutagenicity ratio) ¹	
	TA98	TA100
Control	17±3(1.0)	118±6(1.0)
0.5	@ ²	2±0* ³
0.1	14±4(0.8)	93±7*
0.05	17±4(1.0)	115±3(1.0)
0.01	19±5(1.1)	130±17(1.1)
0.005	17±5(1.0)	— ⁴
0.001	15±4(0.9)	—

¹ Mutagenicity ratio = induced revertants per plate / spontaneous revertants per plate. Each value is expressed as mean±S.D. (n=3)

² Pinpoint non-revertant colonies appear on the plate.

³ Significant difference between the sample and the control.(p < 0.05)

⁴ No data.

檢品對 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 有毒性。毒性試驗的結果顯示（表1），蛇床子乙醇萃取物於試驗劑量下對 *Salmonella typhimurium* TA98 與TA100不具毒性之劑量分別為 ≤ 0.1 mg/plate以及 ≤ 0.05 mg/plate，推測具有DNA框構位移突變（frame-shift mutation）的 *Salmonella typhimurium* TA98對於蛇床子乙醇萃取物較具劑量耐受性，而具有DNA鹽基置換突變（base-pair substitution）的 *Salmonella typhimurium* TA100對於蛇床子乙醇萃取物較具敏感性。

（二）致突變性試驗

在進行抗致突變測試時，若檢品對 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100有致突變性而增加菌數，將會影響抗致突變測試結果的判讀。若檢品之回復菌落數大於自然回復突變菌落數的2倍以上，則代表檢品具致突變性。致突變性試驗的結果顯示（表1），在蛇床子乙醇萃取物對於 *Salmonella typhimurium* TA98和TA100為無毒性的劑量以下，蛇床子乙醇萃取物對 *Salmonella typhimurium* TA98和TA100所測試之回復菌落數皆小於自然回復突變菌落數的2倍，表示蛇床子乙醇

萃取物不顯示具有致突變性，於安全性的考量方面，可以做為不具致癌性的參考¹⁴⁻¹⁵。

（三）抗致突變性試驗

將4-NQO控制劑量至約誘發2倍自然回復突變的菌落數，測試蛇床子乙醇萃取物對誘發突變性的抑制效果，並參考Monroe等人²³試驗的判定標準，將檢品抑制致突變劑對 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100之致突變能力分為抑制率0~20% 為沒有活性（negative），20~40% 為輕度活性（weak），40~60% 為中度活性（positive），60~90% 為高度活性（strong），>90% 為可能有致沙門氏菌毒性的疑慮。抗致突變性試驗的結果顯示（表2），0.1 mg/plate蛇床子乙醇萃取物對4-NQO引起致 *Salmonella typhimurium* TA98突變的抑制率為26.9%，而0.05 mg/plate蛇床子乙醇萃取物對4-NQO引起致 *Salmonella typhimurium* TA100突變的抑制率為38.6%，均屬於輕度活性的抑制作用，表示蛇床子乙醇萃取物對於DNA框構位移的突變以及DNA鹽基置換的突變作用都具有輕度活性的抑制效果。劉等人²⁴研究指出蛇床子水萃取物能抑制aflatoxin B₁所誘

Table 2. Antimutagenicity of the ethanolic extract from *Cnidium monnieri* fruits toward *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

Amount (mg/plate)	His ⁺ revertants/plate (% of inhibition) ¹	
	TA98	TA100
Control	15±6	76±24
Positive control	41±2	159±7
0.1	34±3(26.9)	— ²
0.05	44±5(0.0)	127±14(38.6)
0.01	51±11(0.0)	147±8(14.5)
0.005	46±5(0.0)	142±6(20.5)
0.001	45±9(0.0)	146±11(15.7)

¹ Each value is expressed as mean ± S.D.(n=3)

² No data.

導*Salmonella typhimurium* TA98和TA100的突變作用、抑制daunomycin和cyclophosphamide所誘導的姐妹染色單體互換(sister chromatid exchange)以及抑制cyclophosphamide所誘發活體小鼠的骨髓細胞染色體畸變和微核細胞的增加。另有研究指出蛇床子乙醇萃取物能強效的抑制人類血癌細胞(HL-60)、子宮頸癌細胞(HeLa)以及結腸直腸的癌細胞(CoLo205)，從蛇床子乙醇萃取物分離出的香豆素成份osthol和imperatorin能誘導HL-60的細胞凋零²⁵。因此，由本試驗結果及相關文獻的佐證下，蛇床子乙醇萃取物應可作為“化學性防護劑”(chemopreventers)²⁶，以進行更進一步的抗癌活性研究。

參考文獻

1. 張賢哲、蔡貴花，中藥炮製學，中國醫藥學院，台中，1995。
2. 周則衛、劉培勛，蛇床子化學成分及抗腫瘤活性的研究進展，中國中藥雜誌，30: 1309-1313，2005。
3. Matsuda H, Ido Y, Hirata A, Ino Y, Naruto S. Antipruritic effect of *Cnidii Monnieri Fructus* (fruits of *Cnidium monnieri* Cusson). *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 260-263, 2002.
4. Zhang Q, Qin L, He W, Puyvelde LV, Maes D, Adams A, Zheng H, Kimpe ND. Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity. *Planta Med.*, 73: 13-19, 2007.
5. Matsuda H, Tomohiro N, Ido Y, Kubo M. Anti-allergic effects of *Cnidii Monnieri Fructus* (dried fruits of *Cnidium monnieri*) and its major component, osthol. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 809-812, 2002.
6. Feng Y, Zhang L, Cai J, Wang Z, Xu L, Zhang Z. Analysis of *Cnidium monnieri* fruits in different regions of China. *Talanta*, 53: 1155-1162, 2001.
7. 連其深、上官珠、張志祖、周琍、廖茂華、許桂發，蛇床子提取液的局部麻醉作用，中藥通報，13: 552-554，1988。
8. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 199-212, 1998.
9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39: 44-84, 2007.
10. Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, Kubota Y. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigment Cell Res.*, 16: 629-638, 2003.
11. Dziezak. Preservatives: Antioxidants. *Food Technol.*, September: 94-102, 1986.
12. Yen GC, Tsai LC, Lii JD. Antimutagenic effect of maillard browning products obtained from amino acids and sugars. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 127-132, 1992.
13. 李保宏、謝孟純、蔣宗哲、吳思敬，乾燥製程對芭樂茶抗氧化及抗致突變性之影響，台灣農業化學與食品科學，45: 247-256，2007。
14. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455: 29-60, 2000.
15. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215, 1983.
16. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by

- using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62: 1201-1204, 1998.
17. Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem., 43: 27-32, 1995.
18. Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Arch. Biochem. Biophys., 315: 161-169, 1994.
19. Lee KT, Kim BJ, Kim JH. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. Int. J. Cosmet. Sci., 19: 291-298, 1997.
20. 黃爾竺，數株益生菌對4-nitroquinoline-N-oxide之抗致突變性，國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，台北，2003。
21. Shaw CY, Chen CH, Hsu CC, Chen CC, Tsai YC. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. Phytother. Res., 17: 823-825, 2003.
22. Prota G. Melanins and Melanogenesis. Cosmetics and Toiletries, 111: 43-51, 1996.
23. Monroe EW, Mansukh CW, Thomas JH, Harold T. Plant antimutagenic agents, 1. general bioassay and isolation procedures. J. Nat. Prod., 51: 866-873, 1988.
24. 劉德祥、殷學軍、王河川、周郁，蛇床子水溶液提取物抗誘變性的試驗研究，中藥通報，13: 680-682，1988。
25. Yang LL, Wang MC, Chen LG, Wang CC. Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines. Planta Med., 69: 1091-1095, 2003.
26. Stavric B. Antimutagens and anticarcinogens in food. Food Chem. Toxicol., 32: 79-90, 1994.

STUDY OF *CNIDIUM MONNIERI* FRUITS EXTRACT ON THE EFFECTS OF ANTIOXIDATION, INHIBITING THE FORMATION OF MELANIN AND ANTIMUTAGENICITY

Wen-Kai Tseng¹, Yi-Shyan Chen², and Chang-Chin Kwan^{*1}

¹Department of Applied Chemistry, ²Department of Cosmetic Science, Providence University,
Taichung, Taiwan

(Received 29th July 2008, accepted 18th November 2008)

The dried fruits of *Cnidium monnieri* were extracted by 95% ethanol, the ethanolic extract was examined on the effects in the antioxidative activity, the inhibiting the formation of dopachrome and the antimutagenicity. In the concentration of 100.0 mg/ml, the ability of the extract for the scavenging DPPH free radicals is 68.4%, 67.9% and 67.6%, while, for the reducing ferric ion is 75.6%, 80.3% and 83.6% to ascorbic acid, BHA, and BHT, respectively. In 25.0 mg/ml, the ability for the chelating ferrous ion is 93.3% to EDTA. The above results indicate the extract behaves antioxidative activity. The IC₅₀ of the extract for the formation of dopachrome is 68.70 mg/ml. Indicating that the extract shows the activity for inhibiting melanogenesis. The extract does not possess mutagenicity. The suppressing rate of the extract with 0.1 mg/plate for the mutation of *Salmonella typhimurium* TA98 caused by 4-NQO is 26.9%, while the suppressing rate of the extract with 0.05 mg/plate for the mutation of *Salmonella typhimurium* TA100 caused by 4-NQO is 38.6%. Suggesting that the extract belongs to the weak activity group of antimutagenicity. In conclusion, the extract of *Cnidium monnieri* fruits is a kind of safe chemopreventer and should be analyzed its active components further. These components may be used for preventing aging and inhibiting pigmentation.

Key words : *Cnidium monnieri* fruits, antioxidation, melanin, antimutagenicity