

백량금의 화장품 원료로서의 특성

이 대 우[†] · 김 영 진 · 김 영 실 · 엄 상 용 · 김 종 현

(주)참존 기술원 응용연구소
(2006년 11월 7일 접수, 2006년 11월 20일 채택)

Application as a Cosmeceutical Ingredient of Methanolic Extract from *Ardisia crenata*

Dae-Woo Lee[†], Young-Jin Kim, Young-Sil Kim, Sang-Yong Eom, and Jong-Heon Kim

R&D Center, Charmzone, 1720-1, Taejang 2-dong, Wonju-si, Kangwon-do 220-962, Korea
(Received November 7, 2006; Accepted November 20, 2006)

요약 본 연구는 백량금 추출물의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항산화, 미백 및 항염 효과와 관련된 다양한 실험을 실시하였다. 70% 메탄올 추출물을 대상으로 실험한 결과 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 효과는 0.01% 이상의 농도에서 90%의 효과를 나타내었고, 세포내 멜라닌 생성 억제 효과는 0.05% 이상의 농도에서 50% 이상의 효과를 나타내었다. 이 후 70% 메탄올 추출물을 대상으로 MPLC를 사용하여 성분 분리 실험을 실시하여 5개의 분획들을 얻었고, 이들을 대상으로 실험한 결과 3번, 4번 그리고 5번 분획들에서 항산화(DPPH 라디칼 소거, Mn-SOD 생성 억제), 미백(멜라닌 생성 억제) 그리고 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제)효과를 나타내었다.

Abstract: In this study, we evaluated anti-oxidation, whitening and anti-inflammatory effects of *Ardisia crenata* for use as the cosmeceuticals. *Ardisia crenata* extract (70% MeOH) showed a significant free-radical scavenging effect (up to 90% over at the concentration of 0.01 %) against DPPH radical generation and showed a significant inhibitory effect (up to 50% over at the concentration of 0.05 %) on melanin synthesis in B16 melanoma cells. We separated 5 fractions from *Ardisia crenata* extract (70% MeOH) by MPLC. The 3rd, 4th, and 5th fractions showed the anti-oxidation (DPPH radical scavenging activity and suppressive effect on Mn-SOD), whitening (inhibitory effect on melanin synthesis) and anti-inflammatory (suppressive effects on IL-1 α , IL-6, COX-2 and total NO synthesis) effects.

Keywords: *Ardisia crenata*, anti-oxidation, melanogenesis, anti-inflammation, IL-1 α

1. 서 론

백량금(*Ardisia crenata*)은 자금우과(Myrsinaceae)의 상록 소관목으로 뿌리를 주사근(朱砂根), 량산자(涼傘子), 홍동반(紅銅盤), 대량산(大涼傘), 봉황상(鳳凰翔), 봉황장(鳳凰腸), 그늘백량금이라고 하며, 열매와 뿌리를 한방과 민간에서 이노, 구충(驅蟲), 태독(胎毒), 조경(調經) 등에 약재로 사용하고, 주사근은 해열, 해독, 소염의 효능이 있으며, 편도선염, 급성인후염, 단독, 림프선염, 토혈, 위통, 류머티즘을 치료한다. 잎을 주사근엽(朱砂根葉)이라고 하며, phenol, amino acid, 당류, saponin이 함유 되어 있고, 활혈, 행어의 효능이 있고, 해혈, 중독, 타박상을 치료한다[1,2].

백량금에 대한 연구로는 triterpenoid saponin의 cAMP phosphodiesterase 억제 효과[3], triterpenoid saponin에 대한 연구[4-6], antithrombin 활성 연구[7]에 대하여 보고 되었다.

본 연구에서는 천연물을 대상으로 실시한 스크리닝에서 주목할만한 결과를 나타낸 시료들을 선별하여 얻은 백량금의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항산화(DPPH 라디칼 소거, Mn-SOD 생성 억제), 미백(멜라닌 생성 억제) 및 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제)과 관련된 실험을 실시하여, 화장품 원료로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

[†] 주 저자 (e-mail: leed@charmzone.co.kr)

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 기기

본 실험에 사용한 백량금은 2005년 6월 제주도에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약으로는 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), L-tyrosine, tyrosinase (from mushroom), potassium phosphate (mono-basic, di-basic), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA solution, dimethyl sulfoxide (DMSO), H₂O₂ (hydrogen peroxide), nutrient mixture F-12 Ham (HAM'S/F-12), phosphate buffered saline (PBS) solution은 Sigma사의 제품을, human IL-1 α ELISA kit, human IL-6 ELISA kit는 Endogen사의 제품을, COX-2 ELISA kit는 Assay Designs사의 제품을, MPLC의 크로마토그래피에 사용한 Silica gel 60 (230~400 mesh)은 Merck사의 제품을, 용매는 덕산화학과 Fisher사의 제품을 사용하였다. Human dermal fibroblast는 국내 MTT사에서, B16-F10 melanoma 세포는 ATCC에서 분양받아 사용하였다. 실험에 사용한 기기로는 aspirator (EYELA), evaporator (EYELA, BUCHI), MPLC (BUCHI), ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 사용하였다.

2.2. 추출 및 분리

백량금 110 g을 3 L의 70% 메탄올의 조건으로 실온에서 일주일동안 추출하였다.

추출액은 여과지(Whatman)와 aspirator (EYELA)를 사용하여 여과한 후, evaporator (EYELA, BUCHI)를 이용하여 농축하였다. 농축된 추출물은 freeze dryer (EYELA)를 사용하여 분말로 만들어 보관하였다.

70% 메탄올 추출물 4 g을 메탄올 20 mL에 용해시킨 후 syringe filter (Sartorius)를 사용하여 여과한 후, silica-gel (230 ~ 400 mesh, Merck)과 MPLC를 사용하여 크로마토그래피를 실행하였다. 실험은 ethylacetate, ethylacetate와 methyl alcohol 혼합용액(1 : 1), methyl alcohol의 조건으로 전개시켜 5개의 분획으로 분리하였다.

2.3. 세포 독성

Human dermal fibroblast를 국내 MTT사에서 구입하여 DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도로 하여 배양하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 측정은 Mosmann 방법[8]을 변형하여 실시하였다. Human dermal fibroblast를 12 well plate에 분주하여

24 h 배양 후, 시료를 처리하고 48 h 배양하였다. 그 후 당일 제조한 50 mg/mL 농도의 MTT를 배양액의 10%가 되도록 처리한 후 4 h 배양하였다. 상등액을 버리고 DMSO를 200 mL씩 넣고 15 min 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 항산화 효과

2.4.1. DPPH 라디칼 소거 효과 실험

항산화 활성은 DPPH를 이용하여 시료의 라디칼 소거 효과를 측정하는 Blois법[9]을 변형하여 실시하였다. 96 well plate에 0.2 mM DPPH 메탄올 용액과 농도별로 희석한 동량의 시료를 혼합하여 실온에서 30 min 반응 후 ELISA reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정 후, radical 소거율(%)을 계산하였다.

2.4.2. Mn-SOD 생성 억제 효과 실험

DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도의 배양액에서 human dermal fibroblast (MTT사)를 배양하였다. Fibroblast를 12 well plate에 분주 한 후 24 h 배양한다. 그 후 2×10^4 M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 sample을 처리하여 48 h 배양하였다. 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리 된 Mn-SOD를 ELISA kit (Assay Designs사)로 정량한다.

2.5. 미백 효과

2.5.1. 세포내 멜라닌 생성 억제 효과 실험

B16-F10 melanoma 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 6 well에 세포수 2×10^4 cells/well의 농도로 각 well에 2 mL씩 첨가하고 5% CO₂, 37°C 조건하에서 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 10% FBS, 0.2 mM theophylline이 함유된 DMEM으로 교체한 농도별 희석한 시료를 각각 첨가하고 나서, 5% CO₂, 37°C 조건하에서 세포가 약 80% 이상 될 때까지 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음 PBS로 세척하고 trypsin으로 처리하여 세포 pellet을 회수하였다. 회수된 pellet을 1.5 mL eppendorf tube로 옮겨 5,000 rpm으로 10 min 원심 분리한 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 pellet을 60°C 항온기에서 24 h 건조시킨 후 1 N NaOH를 첨가하여 세포내의 melanin을 용해시켰다. 용해된 melanin을 PBS로 적당량 희석, ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 후 melanin 생성 저해율(%)을 계산하였다.

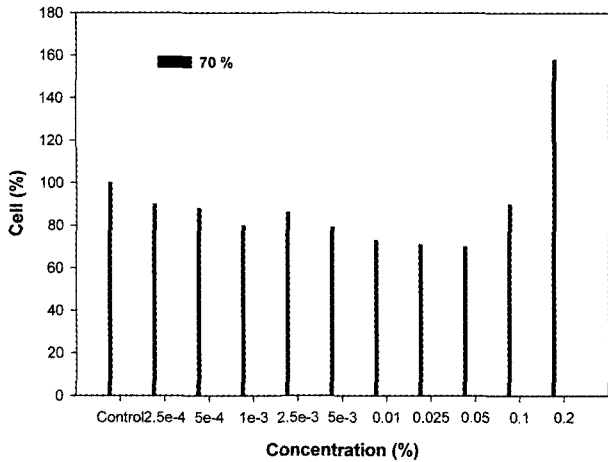


Figure 1. Cytotoxicity of 70% MeOH extract from *Ardisia crenata*.

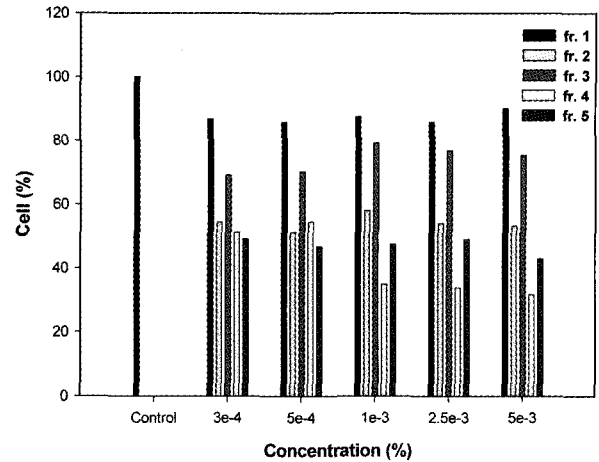


Figure 2. Cytotoxicity of MPLC fractions from *Ardisia crenata*.

2.6. 항염 효과

2.6.1. IL-1 α 생성 억제 효과 실험

DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도의 배양액에서 human dermal fibroblast (MTT사)를 배양하였다. Fibroblast를 12 well plate에 분주 한 후 24 h 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 sample을 처리하여 48 h 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 IL-1 α 를 ELISA kit (ENDOGEN사)로 정량한다.

2.6.2. IL-6 생성 억제 효과 실험

DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도의 배양액에서 human dermal fibroblast (MTT사)를 배양하였다. Fibroblast를 12 well plate에 분주 한 후 24 h 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 sample을 처리하여 48 h 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 IL-6를 ELISA kit (ENDOGEN사)로 정량한다.

2.6.3. COX-II 생성 억제 효과 실험

DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도의 배양액에서 human dermal fibroblast (MTT사)를 배양하였다. Fibroblast를 12 well plate에 분주 한 후 24 h 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 sample을 처리하여 48 h 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된

COX-II를 ELISA kit (Assay Designs사)로 정량한다.

2.6.4. Total NO (Nitric Oxide) 생성 억제 효과 실험

DMEM과 HAM'S/F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10% 농도의 배양액에서 human dermal fibroblast (MTT사)를 배양하였다. Fibroblast를 12 well plate에 분주 한 후 24 h 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 sample을 처리하여 48 h 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 total NO를 ELISA kit (Assay Designs 사)로 정량한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 독성

70% 추출물은 0.00025 ~ 0.005% 농도에서 80 ~ 90%의 세포 생존율을 나타내었고, 0.2%의 농도에서는 세포 증식 및 대사를 촉진시키는 결과를 나타내었다(Figure 1).

1번 분획은 실험한 모든 농도에서 90%의 세포 생존율을 나타내었고, 3번 분획은 0.001% 이상의 농도에서 80%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 2).

3.2. 항산화 효과

3.2.1. DPPH 라디칼 소거 효과

70% 추출물은 실험한 모든 농도에서 강한 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 0.005%의 농도에서 60%, 0.01% 이상의 농도에서 90%의 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타내었다(Figure 3).

5번, 4번, 1번, 2번 그리고 3번 분획 순으로 DPPH 라디

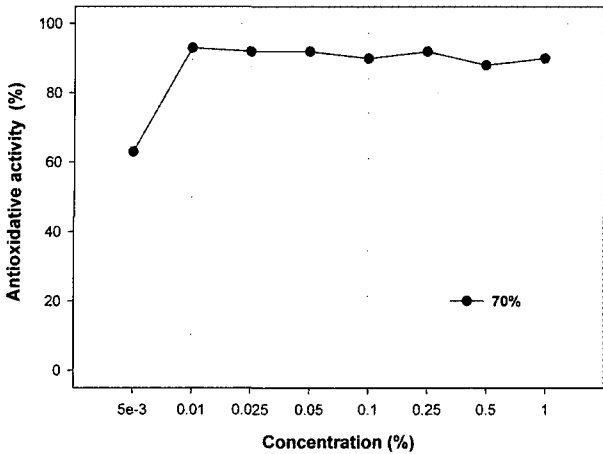


Figure 3. DPPH radical scavenging activity of 70% MeOH extract from *Ardisia crenata*.

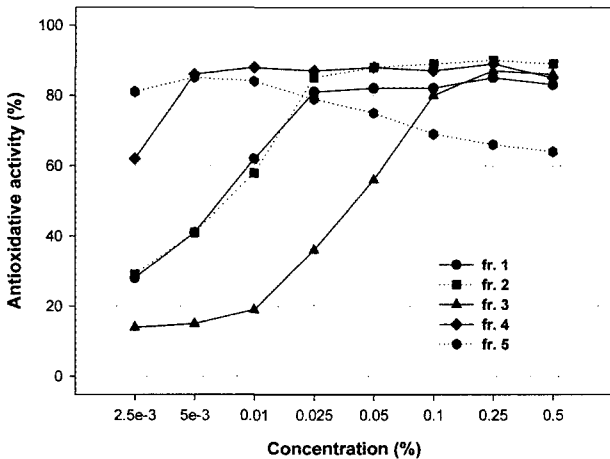


Figure 4. DPPH radical scavenging activity of MPLC fractions from *Ardisia crenata*.

갈 소거 효과를 나타내었다. 5번 분획은 실험한 모든 농도에서 60% 이상의 효과를 나타내었는데, 0.0025% 농도에서 80%의 효과를 나타내었고, 농도가 증가할수록 효과가 약간씩 감소하여 0.5% 농도에서 60%의 효과를 나타내었다. 4번 분획은 0.0025% 농도에서 60%의 효과를 나타내었고, 0.005% 이상의 농도에서는 80% 이상의 효과를 나타내었다. 1번과 2번 분획은 유사한 결과를 나타내었는데, 0.025% 이상의 농도에서 80%의 효과를 나타내었고, 3번 분획은 0.1% 이상의 농도에서 80%의 효과를 나타내었다. 분리된 분획들에서 DPPH 라디칼 소거 효과의 차이를 확인 할 수 있었다(Figure 4).

3.2.2. Mn-SOD 생성 억제 효과

1번과 2번 분획은 농도에 관계없이 10 ~ 20%의 Mn-

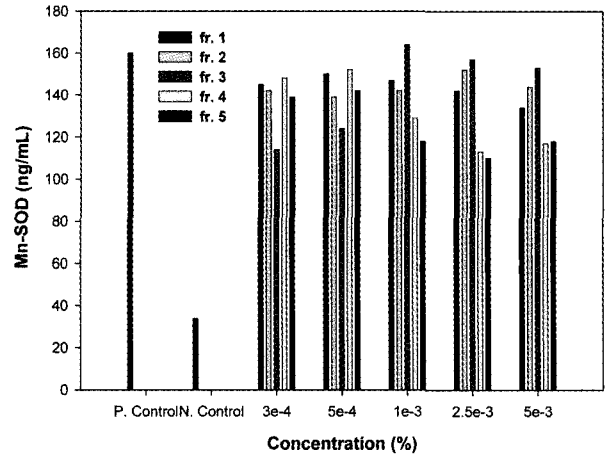


Figure 5. Suppressive effect of MPLC fractions from *Ardisia crenata* on Mn-SOD synthesis.

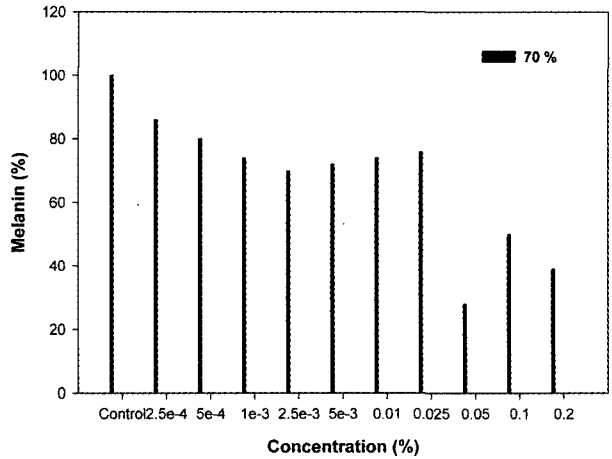


Figure 6. Inhibitory effect of 70% MeOH extract from *Ardisia crenata* on melanogenesis.

SOD 생성 억제 효과를 나타내었다. 3번 분획은 0.0003%와 0.0005%의 농도에서 각각 37%와 29%의 효과를 나타내었다. 4번과 5번 분획은 0.001%, 0.0025% 그리고 0.005%의 농도에서 각각 25 ~ 37%, 33 ~ 40% 그리고 33 ~ 34%의 효과를 나타내었다(Figure 5).

3.3. 미백 효과

3.3.1. 세포내 멜라닌 생성 억제 효과

70% 추출물은 0.0005 ~ 0.025%의 농도에서 10 ~ 30%, 0.05%의 농도에서 70%, 0.1%의 농도에서 50%, 0.2% 농도에서 60%의 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다. 고농도에서 강한 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 6).

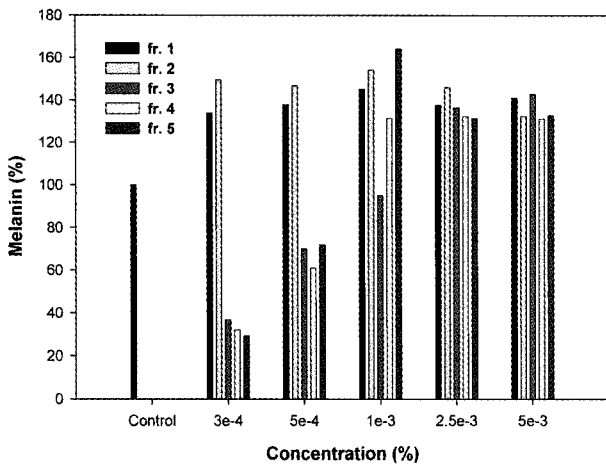


Figure 7. Inhibitory effect of MPLC fractions from *Ardisia crenata* on melanogenesis.

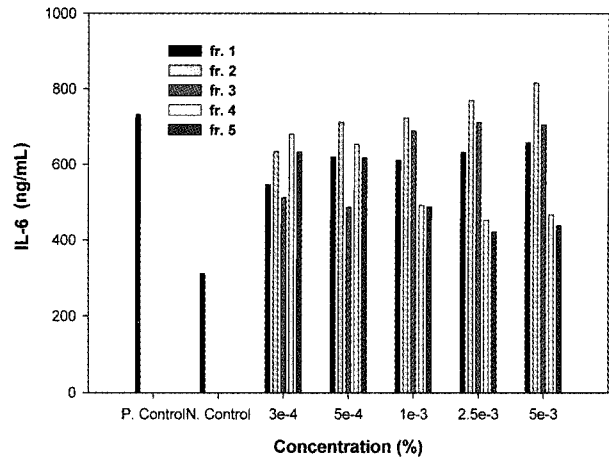


Figure 9. Suppressive effect of MPLC fractions from *Ardisia crenata* on IL-6 synthesis.

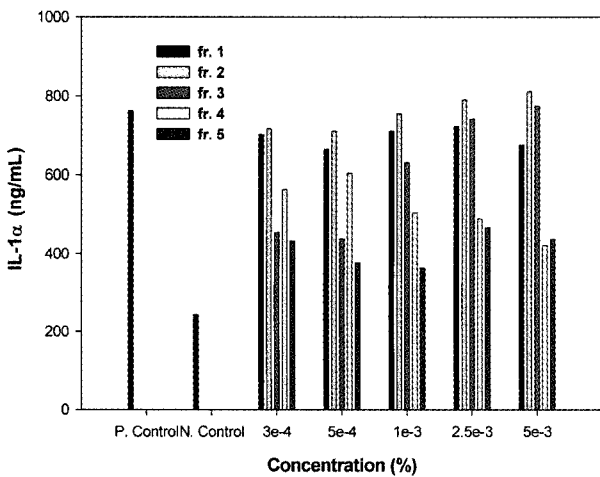


Figure 8. Suppressive effect of MPLC fractions from *Ardisia crenata* on IL-1 α synthesis.

3번, 4번 그리고 5번 분획은 0.0003%와 0.0005%의 농도에서 각각 63 ~ 70%와 28 ~ 39%의 효과를 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 효과를 나타내지 못한 것을 확인 할 수 있었다(Figure 7).

3.4. 항염 효과

3.4.1. IL-1 α 생성 억제 효과

1번과 2번 분획은 농도에 관계없이 10% 정도의 IL-1 α 생성 억제 효과를 나타내었다. 3번 분획은 0.0003%와 0.0005%의 농도에서 각각 60%와 63%의 강한 효과를 나타내었다. 4번 분획은 0.0003%의 농도에서 39%의 효과를 나타내었고, 농도가 증가할수록 효과도 증가하였다. 5번 분획은 실험한 모든 농도에서 57 ~ 74%의 강한 효과를

나타내는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 8).

3.4.2. IL-6 생성 억제 효과

1번 분획은 0.0003%의 저 농도에서 44%의 강한 IL-6 생성 억제 효과를 나타내었고, 실험한 모든 농도에서 20% 정도의 효과를 나타내었다. 2번 분획은 0.0003%의 농도에서 23%의 효과를 나타내었고, 다른 농도에서는 효과를 나타내지 못했다. 3번 분획은 0.0003%와 0.0005%의 저 농도에서 각각 52%와 58%의 강한 효과를 나타내었고, 다른 농도에서는 효과를 나타내지 못했다. 4번 분획은 0.001%, 0.0025% 그리고 0.005%의 농도에서 각각 57%, 66% 그리고 63%의 강한 효과를 나타내었고, 저농도에서는 10%의 효과를 나타내었다. 5번 분획도 4번 분획과 유사한 결과를 나타내었는데, 0.001%, 0.0025% 그리고 0.005%의 농도에서 각각 58%, 74% 그리고 70%의 강한 효과를 나타내었고 저농도에서는 20%의 효과를 나타내었다(Figure 9).

3.4.3. COX-II 생성 억제 효과

1번과 2번 분획들은 농도에 관계없이 10 ~ 20% 정도의 COX-II 생성 억제 효과를 나타내었다. 3번 분획은 0.0003%와 0.0005%의 농도에서 각각 70%와 67%의 강한 효과를 나타내었고, 0.001% 이상의 농도에서 20%의 효과를 나타내었다. 4번과 5번 분획들은 0.001%, 0.0025% 그리고 0.005%의 농도에서 각각 44%와 46%, 45%와 52% 그리고 44%와 55%의 효과를 나타내었고, 0.0005% 이하의 농도에서 20%의 효과를 나타내었다(Figure 10).

3.4.4. Total NO (Nitric Oxide) 생성 억제 효과

1번 분획은 실험한 모든 농도에서 10% 이하의 total

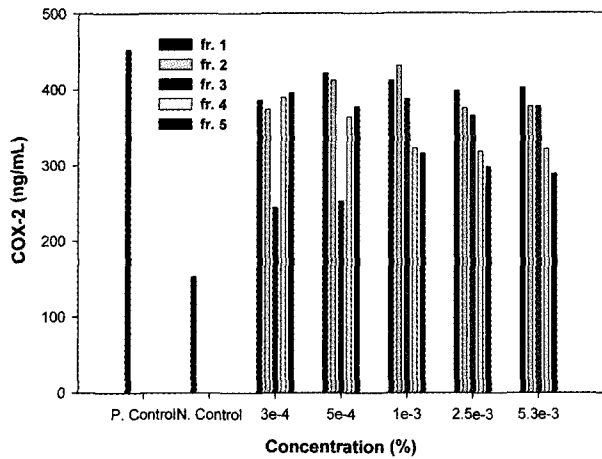


Figure 10. Suppressive effect of MPLC fractions from *Ardisia crenata* on COX-2 synthesis.

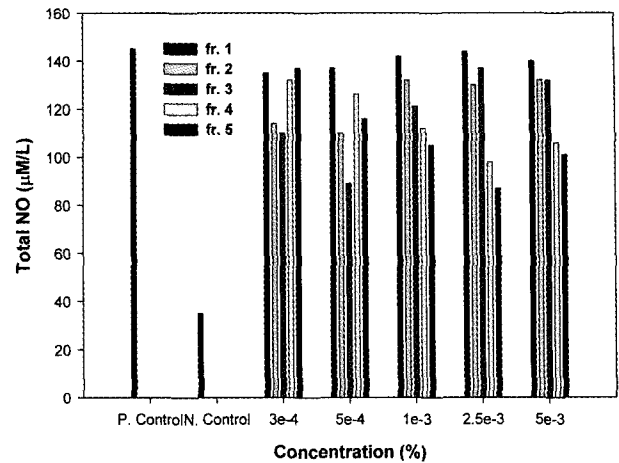


Figure 11. Suppressive effect of MPLC fractions from *Ardisia crenata* on total NO synthesis.

NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 2번 분획은 저농도인 0.0003%와 0.0005%에서 각각 28%와 32%의 효과를 나타내었고, 다른 농도에서는 10%의 효과를 나타내었다. 3번 분획은 0.0005%의 농도에서 51%의 강한 효과를 나타내었고, 0.0003%와 0.001%의 농도에서 각각 32%와 22%의 효과를 나타내었으며, 다른 농도에서는 10%의 효과를 나타내었다. 4번 분획은 0.001%, 0.0025% 그리고 0.005%의 농도에서 각각 30%, 43% 그리고 35%의 효과를 나타내었고, 다른 농도에서는 10%의 효과를 나타내었다. 5번 분획은 0.0025%의 농도에서 53%의 강한 효과를 나타내었고, 0.0005%, 0.001% 그리고 0.005%의 농도에서 각각 26%, 36% 그리고 40%의 효과를 나타내었다(Figure 11).

4. 결 론

본 연구는 백량금 추출물의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 세포 독성, 항산화(DPPH, Mn-SOD 생성 억제), 미백(멜라닌 생성 억제) 및 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제)효과를 연구하였다.

70% 메탄올로 추출한 백량금 추출물을 대상으로 세포 독성, 항산화(DPPH 라디칼 소거) 및 미백(멜라닌 생성 억제)효과 실험을 하였다. DPPH법으로 실시한 라디칼 소거 활성 실험에서 0.0005% 농도에서 60%, 0.01% 이상의 농도에서는 90%의 강한 라디칼 소거 효과를 나타내었다. B16-F10 melanoma 세포를 사용한 세포내 멜라닌 생성 억제 실험에서는 0.00025 ~ 0.025% 농도에서 10 ~ 20%, 0.05% 이상의 농도에서 50% 이상의 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다. 이러한 실험 결과를 토대로 70% 메탄올 추출물에 대하여 MPLC를 사용한 성분 분리 실험을 통한 추가 연구를 진행하게 되었다. MPLC를 이용하여 silica-

gel column chromatography를 실행하여 5개의 분획들을 분리하였고, 이 분획들을 대상으로 세포 독성, 항산화(DPPH 라디칼 소거, Mn-SOD 생성 억제), 미백(멜라닌 생성 억제) 및 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제)효과를 연구하였다.

백량금 추출물로부터 분리한 5개 분획들에 대한 효능 실험 결과를 간단히 요약해 보면, 세포 독성 실험 결과 1번 분획은 실험한 모든 농도에서 80%의 세포 생존율을 나타내었고, 3번 분획은 70%의 세포 생존율을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거 효과는 4, 5번 분획들이 실험한 모든 농도에서 60% 이상의 강한 효과를 나타내었고, 다른 분획들은 이보다 약한 효과를 나타내었다. Mn-SOD 생성 억제 효과는 3, 4, 5번 분획들이 37%, 37%, 40% 억제 효과를 나타내었고, 1, 2번 분획들은 21%, 17%의 효과를 나타내었다. 멜라닌 생성 억제 효과는 3, 4, 5번 분획들이 70%, 61%, 72%의 강한 억제 효과를 나타내었고, 1, 2번 분획들은 효과를 나타내지 않았다. IL-1 α 생성 억제 효과는 3, 4, 5번 분획들이 63%, 66%, 74%의 강한 억제 효과를 나타내었고, 1, 2번 분획들은 10%의 효과를 나타내었다. IL-6 생성 억제 효과는 1번 분획은 44%, 2번 분획은 23%, 3, 4, 5번 분획들은 각각 58%, 66%, 74%의 강한 억제 효과를 나타내었다. COX-2 생성 억제 효과는 3번 분획이 70%의 강한 억제 효과를 나타내었고, 4, 5번 분획들은 각각 45%와 55%의 억제 효과를 나타내었다. Total NO 생성 억제 효과는 3, 5번 분획들이 각각 51%와 53%의 강한 효과를 나타내었고, 2, 4번 분획은 32%, 43%의 억제 효과를 나타내었고, 1번 분획은 9%의 효과를 나타내었다.

위의 실험 결과를 종합해 보면, 백량금 추출물은 항산화, 미백 그리고 항염 효과를 가진 화장품 원료로서의 개

발 가치가 있다는 결론을 얻을 수 있었다. 특히 3, 4, 5번 분획들이 항산화(DPPH 라디칼 소거, Mn-SOD 생성 억제), 미백(멜라닌 생성 억제) 그리고 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제)효과 모두에서 우수한 효과를 갖고 있는 것을 확인하였고, 각각의 분획들로부터 활성 성분 분리 및 성분 물질 구조 확인 등에 대한 보다 다양한 추가 실험 및 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. 배기환, 한국의 약용식물, 교학, 서울 (2000).
2. 김태정, 한국의 자원식물, 서울대학교출판부, 서울 (1996).
3. T. Jia, K. Koike, T. Nikaido, T. Ohmoto, and M. Ni, Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* and their inhibitory activity on cAMP phosphodiesterase, *Chem. Pharm. Bull.*, 42(11), 2309 (1994).
4. K. Koike, Z. Jia, S. Ohura, S. Mochida, and T. Nikaido, Minor triterpenoid saponins from *Ardisia crenata*, *Chem. Pharm. Bull.*, 47(3), 434 (1999).
5. Z. Jia, K. Koike, T. Ohmoto, and M. Ni, Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata*, *Phytochemistry*, 37(5), 1389 (1994).
6. W. Maotian, G. Xiongtai, H. Xiuwen, and H. Shanghai, A new triterpenoid saponin from *Ardisia crenata*, *Planta Med.*, 58, 205 (1992).
7. N. Chistokhodova, C. Nguyen, T. Calvino, I. Kachirskaia, G. Cunningham, and D. H. Miles, Antithrombin activity of medicinal plants from central Florida, *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 277 (2002).
8. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immunol. Methods*, 65, 55 (1983).
9. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199 (1958).