J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 40, No. 3, September 2014, 289-295

pISSN 1226-2587
eISSN 2288-9507
http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2014.40.3.289

돌외 잎 추출물의 콜라겐 합성 증진 성분 규명

임 준 환 · 장 문 식 · 정 욱 순 · 문 미 연 · 이 하 연 · 김 영 훈 · 이 기 용* · 이 남 호**†

(주)내추럴솔루션 중앙연구소, *충북대학교 원예과학과, **제주대학교 화학 · 코스메틱스학부
(2014년 5월 2일 접수, 2014년 5월 13일 수정, 2014년 6월 3일 채택)

Constituents of Collagen Synthesis Activation from the Extracts of Gynostemma pentaphyllum Leaves

Jun Hwan Yim, Moon Sik Jang, Uk Sun Jung, Mi Yeon Moon, Ha Youn Lee, Young Hoon Kim, Gi Yong Lee*, and Nam Ho Lee**

Naturalsolution Co., Ltd, 158B 11L, #501, 730-10 Gojan, Namdong, Incheon, 405-822, Korea
*Department of Horticultural Science, Chungbuk National University, 52 Naesudong-ro, Cheongju 361-763, Korea
**Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Ara-1, Jeju 690-756, Korea
(Received May 2, 2014; Revised May 13, 2014; Accepted June 3, 2014)

요 약: 본 연구에서는 주름개선 화장품 원료를 개발하기 위하여 돌외 잎 70% 에탄올 추출물을 제조하여 섬유아세포 HDFn에 대하여 콜라겐 합성능을 측정하였다. 그 결과 돌외 추출물이 세포 독성 없이 농도 의존적으로 콜라겐 합성을 촉진함을 확인하였다. 돌외 추출물로부터 용매 분획 및 크로마토그래피 분리과정을 거쳐 2개의 활성 성분을 분리하였다. NMR 데이터 및 문헌치로 확인한 결과 이들은 플라보노이드 배당체인 Ombuine 3-*O*-rutinoside(1) 및 Quercetin 3-*O*-rutinoside(2)로 규명되었다. 섬유아세포의 type I procollagen 생합성에 미치는 영향을 분석한 결과 상기 화합물은 농도 의존적으로 콜라겐 합성을 촉진함을 알 수 있었다. 본 실험 결과는 화합물 1과 2를 함유한 돌외 추출물의 주름개선 화장품 소재로서의 개발 가능성을 보여주고 있다.

Abstract: In order to discover ingredients for wrinkle-care cosmetics, we prepared 70% ethanol extract from *Gynostemma pentaphyllum* and examined its activity on collagen synthesis using fibroblast HDFn cells. The *G. pentaphyllum* extract induced the production of type I procollagen in a dose-dependent manner without showing cell toxicity. The active constituents were isolated from the extract by solvent fractionation and chromatographic purification procedures. NMR data and literature studies led to determine the two isolated compounds as the flavonoid glycosides such as ombuine 3-O-rutinoside (1) and quercetin 3-O-rutinoside (2). The activity screening tests showed that the isolates 1 and 2 induced the production of type I procollagen in a dose-dependent manner. These results suggested that *G. pentaphyllum* extract containing the flavonoids 1 and 2 could be useful as an active ingredient for wrinkle-care cosmetics.

Keywords: *Gynostemma pentaphyllum, anti-wrinkle, fibroblast cell, collagen synthesis activation, flavonoids*

† 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)

1. 서 론

섬유성 단백질(fibrous protein)을 이루는 콜라겐(collagen)은 피부 진피 세포외기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분으로서 인체 건조 피부의 70%를 차지하고 있다. 진피 기질 내에는 타입 I 콜라겐이 전체 콜라겐 중에서 80 - 85%를 차지하고 있으며 진피 인장 강도를 결정하고 있다. 콜라겐 I는 광노화 피부에서 함량 감소가 나타나며 피부노화 과정에서 관찰되는 가장 중요한 콜라겐 타입이다[1]. 피부의 주름은 콜라겐 합성과 분해의 불균형에서 기인하고 있다. 일반 피부에서는 타입 I 콜라겐의 합성과 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 효소에 의한 분해가 균형을 이루고 있다. 콜라겐은 세포외기질에 존재하는 섬유아세포(fibroblast)에서 전구체인 프로콜라겐(procollagen)을 거쳐 합성된다. 섬유아세포에서 생성된 프로콜라겐은 proline과 lysine 잔기가 히드록시화(hydroxylation)된 후 세포 밖으로 분비된다. 세포외기질로 분비된 프로콜라겐은 N-말단과 C-말단이 propeptidase와 endopeptidase에 의해 분리된 후 각각의 사슬이 중합되어 콜라겐 섬유를 형성하게 된다.

나이가 들수록 피부 콜라겐 양은 단위 면적당 연간 1% 정도 감소한다고 알려져 있다[2]. 자연노화 혹은 광노화에 의하여 감소되는 콜라겐 함량을 유지하는 것은 피부 노화 억제의 가장 중요한 전략이다. 콜라겐 합성을 촉진하고 MMP 발현을 억제하여 피부 광노화를 개선하는 물질로 레티노이드가 잘 알려져 있다[3]. 콜라겐 양의 감소가 피부 주름 생성의 주요 원인으로 인식되면서 콜라겐 합성을 촉진할 수 있는 항노화 물질의 개발에 많은 노력이 모아지고 있다[4,5].

돌외(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)는 박과(Cucurbitaceae)의 다년생 덩굴 식물로 우리나라 남부와 아시아 지역에 분포되어 있다[6]. 돌외의 주요 성분은 dammarane 타입의 트리터펜(triterpene) 배당체 화합물인 gypenoside이며 100여 종이 분리되어 보고되고 있다[7]. 사포닌 외에도 플라보노이드[8], 미네랄[9], 다당류[10], 카로테노이드[11], 알카로이드[12] 등이 분리 보고되었다. 돌외 추출물 및 gypenoside를 대상으로 하여 생리활성이 연구되었으며, 주요 활성으로는 항산화 효과 및 혈관내피세포 보호작용[13,14], 혈관 기능개선 작용[15], 콜레스테롤 저하효과[16], 암세포 성장저해 작용[17], 항당뇨 작용[18], 간기능 보호효과[19], 만성 기관지염 및 위궤양에 대한 항염증 작용[20], 미백효과[21] 등이 알려져 있다. 그러나, 돌외 추출물을 이용한 콜라겐 합성에 미치는 영향에 관한 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 돌외 잎 에탄올 추출물의 콜라겐(collagen) 생합성 촉진작용에 대하여 검색하였다. 또한 돌외에서 유효성분을 분리하여 분광학적 기법으로 화학구조를 동정하였고, 분리된 화합물의 활성을 확인하였다. 본 연구를 통하여 돌외 추출물의 피부 주름 개선 효과를 확인하여 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

본 실험에서 사용된 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)는 제주산으로 제주자원식물산업연구소(Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 돌외의 추출과정 및 분획에 사용된 용매들은 시약급을 사용하였다. 순상(normal-phased) column chromatography (CC)에는 실리카겔 60 (Merk, 95 - 110 μm, Germany), 세파덱스 LH-20 (sigma, Sweden)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 실리카겔 60F254 (Merck, Germany)을 사용하였다. 구조 분석에는 FT-NMR (JNM-ECX400, JEOL, Japan)을 사용하였다. 콜라겐 생합성능 측정에는 procollagen type I protein synthesis kit (Takara, Japan)을 구입하여 사용하였다. 인간 섬유아세포(HDFn)는 한국세포주 은행에서 구입하였다. 세포 생존율 측정에는 methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT)를 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. 추출 및 분획

건조된 돌외 잎 170 g을 70% 에탄올 1.7 L에 침적 교반하여 실온에서 2일 동안 침출시켰다. 침출 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 여과하여 얻어진 여액은 40 ℃ 수욕상에서 진공회전농축기로 농축하여 에탄올 추출물을 얻었다. 농축된 에탄올 추출물 25.0 g을 물에 현탁하여 *n*-hexane을 가한 다음 잘 흔들고 방치하여 수용액층과 *n*-hexane층을 얻

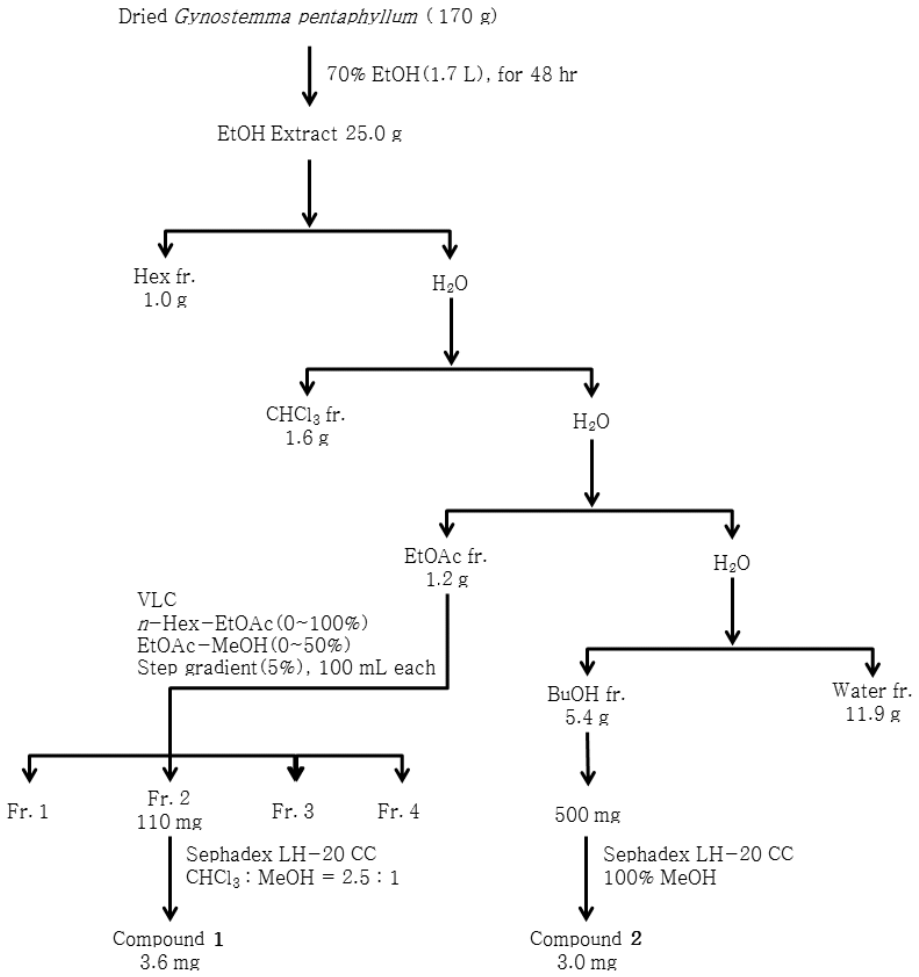


Figure 1. Isolation procedure of the compounds 1 and 2 from *G. pentaphyllum*.

었다. 수용액층을 다시 chloroform ($CHCl_3$), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol 순으로 용매 분획하였다. 각각의 용매 분획물을 감압 농축하여 *n*-hexane층에서 1.0 g, chloroform층에서 1.6 g, EtOAc층에서 1.2 g, *n*-butanol층에서 5.4 g, 물층에서 11.9 g의 농축 분획물을 얻었다.

2.3. 화합물의 분리

용매분획 후 얻어진 EtOAc 분획물(1.2 g)을 분리 정제하기 위하여 우선 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. VLC (10 × 5 cm, silica gel, 20 ~ 40 mash)에서 Hex-EtOAc (0 ~ 100%), EtOAc-MeOH (0 ~ 50%)를 사용하여, 각 용매의 배합비를 5 ~ 10%씩 증감하여 극성을 높이는 방법으로 각 100 mL씩 용출한 후, 각 분획을 TLC로 확인하여 spot 패턴이 비슷한 것들을 모아 총 4개의 분획물(Fr. 1-4)을 얻었다. 분획물 Fr. 2 (110.0 mg)을 세파덱스 LH-20으로 충진된 glass column에 전개용매($CHCl_3$/MeOH = 2.5 : 1)로 용출시켜 화합물 1 (3.6 mg)을 분리하였다. 또한, *n*-butanol 분획물(500 mg)을 100% 메탄올을 전개용매로 세파덱스 LH-20 column chromatography를 실시하여 화합물 2 (3.0 mg)을 분리하였다(Figure 1).

화합물 1 (ombuine 3-*O*-rutinoside) : yellow amorphous powder (syrup); ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 6.37 (1H, d, J = 2.0 Hz), δ 6.69 (1H, d, J = 2.0 Hz), δ 7.55 (1H, d, J = 2.0 Hz), δ 7.04 (1H, d, J = 8.5 Hz), δ 7.72 (1H, dd, J = 2.0 Hz, 8.5 Hz), δ 5.38 (1H, d, J = 7.3 Hz), δ 4.39 (1H, d, J = 0.9 Hz), δ

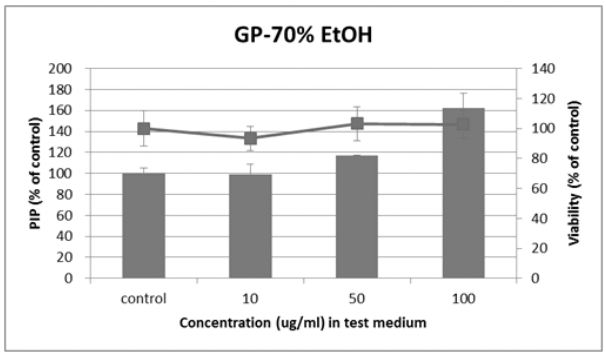


Figure 2. Effect of the *G. pentaphyllum* ethanol extract on collagen type I synthesis and cell toxicities.

0.97 (3H, d, J = 6.1 Hz), δ 3.87 (6H, s); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ 156.4 (C-2), 133.8, 177.5, 160.9, 97.9, 165.1, 92.2, 156.7, 105.0, 121.4, 111.3, 145.9, 150.1, 115.7, 122.4, 101.1, 74.0, 76.3, 69.8, 75.8, 66.8, 100.8, 70.3, 70.5, 71.8, 68.2, 17.7, 56.0, 55.6.

화합물 2 (quercetin 3-*O*-rutinoside) : yellow powder; ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 6.27 (1H, d, J = 2.0 Hz), δ 6.36 (1H, d, J = 2.0 Hz), δ 7.79 (1H, d, J = 2.3 Hz), δ 6.97 (1H, d, J = 8.5 Hz), δ 7.70 (1H, dd, J = 2.3, 8.5 Hz), δ 5.31 (1H, d, J = 7.5 Hz), δ 4.67 (1H, d, J = 1.1 Hz), δ 1.16 (3H, d, J = 6.1 Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz) δ 158.8, 135.7, 179.3, 163.6, 100.1, 166.2, 95.0, 159.1, 105.6, 123.0, 117.9, 146.3, 150.3, 116.3, 123.6, 104.8, 75.9, 78.4, 71.5, 77.5, 68.7, 102.6, 72.2, 72.4, 74.0, 69.9, 18.3.

2.4. 세포배양

구입한 human dermal fibroblast neonatal (HDFn) 세포를 Dulbeco's modified eagle's medium (DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가하여 5% CO_2, 37 ℃ 조건하에서 배양하였다.

2.5. 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Mosmann[22]의 방법을 변형한 MTT 정량법을 이용하여 측정하였다. 96-Well plate에 HDFn 세포를 1 × 10^5개씩 분주하여 24 h 배양한 후, 다양한 농도로 시료를 첨가하였다. 배양이 끝나면 배양액의 5 mg/mL의 MTT용액 10 μL를 첨가하고 37 ℃에서 4 h 처리한 다음 DMSO 100 μL를 첨가한 상태에서 10 min간 진탕시켜 세포 내에 들어간 색소를 충분히 용출시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 콜라겐 합성능 시험

48-Well plate에 HDFn 세포를 5 × 10^4개로 접종한 후 5% CO_2, 37 ℃하에서 24 h 배양하였다. 이후 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하고, 시료를 첨가하여 24 h 동안 배양하였다. 배양액을 모아서 procollagen type Ⅰ protein synthesis kit를 이용하여 콜라겐 전구체의 C-말단의 양을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 돌외 추출물의 콜라겐 생합성 측정

피부를 구성하는 주단백질인 콜라겐(collagen)은 피부 진피에 존재하는 섬유아세포(fibroblast)에서 프로콜라겐(procollagen)을 거쳐 생성된다. 섬유아세포에서 합성된 프로콜라겐은 세포외기질(extracellular matrix)로 분비되어 세포 표면에 존재하는 procollagen peptidase에 의해 C-peptide가 분해되고 고분자화 과정을 거쳐 활성 콜라겐으로 전환된다. 이러한 원리를 이용하여 콜라겐 생성량의 증가는 사람 섬유아세포(HDFn)에 돌외 추출물을 처리하여 procollagen type I C-peptide (PIP)의 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 Figure 2에 나타나 있다. 돌외 에탄올 추출물(GP-70% EtOH)을 10, 50, 100 μg/mL 농도로 처리하였을 경우, 콜라겐 합성이 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 대조군의 콜라겐 생성량을 100%로 볼 때 돌외 추출물 100 μg/mL은 대조군에 비해 165%의 콜라겐 생성 증가율을 보이고 있다. MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, 추출물을 100 μg/mL 농도로 처리하였을 경우에도 섬유아세포에서 세포 독성은 나타나지 않았다.

3.2. 돌외 추출물로부터 활성 성분의 분리 및 화학구조 동정

제주에서 채집한 식물인 돌외의 에탄올 추출물로부터 유효 성분을 분리하기 위하여 우선 *n*-hexane, chloroform, EtOAc, *n*-butanol로 용매분획을 실시하였

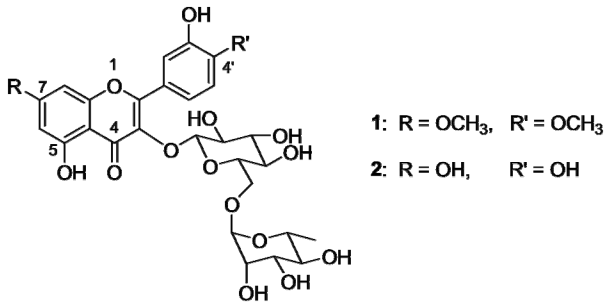


Figure 3. Chemical structures of compounds 1 and 2 isolated from *G. pentaphyllum*.

다. 분획물을 대상으로 콜라겐 합성 증진효과를 검색하였으며, EtOAc와 butanol 분획에서 활성이 관찰되었다. 따라서, EtOAc와 butanol 분획물을 대상으로 유효성분을 분리하고자 하였다. Vacuum liquid chromatography 및 세파덱스 LH-20 column chromatography를 실시하여 Figure 3와 같이 화합물 1과 2를 분리 정제하였다.

화합물 1과 2의 화학 구조는 핵자기공명분광기(NMR spectroscopy)를 통해 얻어진 스펙트럼을 분석하여 규명되었다. 화합물 1의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 분석 결과 화학적이동(δ) 7.72, 7.55, 7.24, 6.69, 6.37 ppm의 시그날은 방향족 프로톤에 해당됨을 예측할 수 있다. 또한 이들의 짝지음상수(J)를 보면 2개의 *meta* coupling (J = 2.0, Hz)과 한 개의 *ortho* coupling (J = 8.5 Hz)이 관찰되었다. 또한, δ 5.38 (1H, d, J = 7.3 Hz)과 4.39 (1H, d, J = 0.9 Hz)에서 당 성분인 glucose와 rhamnose의 아노머(anomer) 프로톤 시그날, 그리고 δ 0.97 (3H, d, J = 6.18 Hz)에서 rhamnose의 메틸(methyl)에 해당되는 피크가 관찰되었다. ^{13}C-NMR 스펙트럼에서는 총 29개의 탄소 시그날이 관측되었다. 이 중에서 카보닐 시그날(δ 177.5 ppm)을 포함해서 15개의 sp^{2} 탄소(δ 177.5 ~ 92.2) 시그날이 관찰되어 화합물 1은 플라보노이드 골격을 함유한 화합물로 예상하였다. 플라보노이드 골격은 quercetin 구조로 판단되었다. 또한 δ 101.1와 100.7에서 2개의 아노머 탄소 시그날로 추정되는 피크가 관찰되어 2분자의 당(glucose와 rhamnose)이 결합되어 있음을 알 수 있었다. 탄소 스펙트럼에서 δ 56.0와 55.6에서 나타난 메틸 피크의 경우 down field shift하는 양상을 보이는 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소와 결합된 메톡시(methoxy)임을 알 수 있다. 메톡시기의 위치를 확인하기 위하여 2-D NMR인 HMBC 스펙트럼을 분석하였다. 그 결과, C-4' (δ 150.1)과 C-7 (δ 165.1)이 메톡시 기의 수소와 상관관계를 나타내었다. 이것은 메틸기가 4'-OH와 7-OH에 치환되어 있음을 나타낸다. 이상의 결과를 종합하여 화합물 1은 플라보노이드 배당체인 ombuine 3-*O*-rutinoside로 동정하였다. 또한, 문헌상의 데이터와 비교하여 구조를 확정하였다[23]. 화합물 1은 기지의 물질이나 돌외에서는 처음으로 분리된 물질이다.

화합물 2의 NMR 스펙트럼을 측정한 결과, 화합물 1과 거의 유사함을 알 수 있었다. ^{13}C-NMR 스펙트럼에서 화합물 1보다 두 개의 탄소가 적은 총 27개의 탄소 signal이 관측되었다. ^{1}H-NMR과 함께 자세히 분석해 본 결과, 화합물의 1에서 나타나는 두 개의 메톡시 피크가 화합물 2에서는 나타나지 않는다. 그 외의 피크는 화합물 1과 거의 일치하였다. 따라서, 화합물 2는 플라보노이드 배당체인 quercetin 3-*O*-rutinoside로 동정하였다. 화합물 2의 화학구조 동정은 문헌치와 비교하여 확정하였다[24].

전체 시료(건조 중량, 170 g) 중에서 분리된 화합물 1 (3.6 mg, 수율 2.1 × 10^{-3}%)과 화합물 2 (3.0 mg, 수율 1.8 × 10^{-3}%)의 수율은 매우 낮은 수준이다. 그러나, 향후 추출 공정을 최적화하는 과정을 통하여 유효성분의 추출 수율은 증가되리라 기대한다.

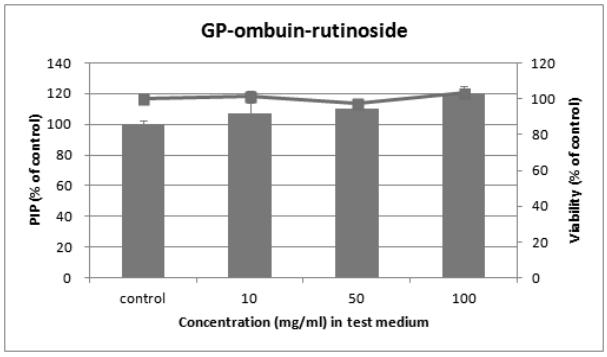
3.3. 분리 화합물의 콜라겐 생합성 측정

분리된 화합물 1과 2를 대상으로 하여 사람 섬유아세포의 프로콜라겐 합성 증가율을 조사하였다.

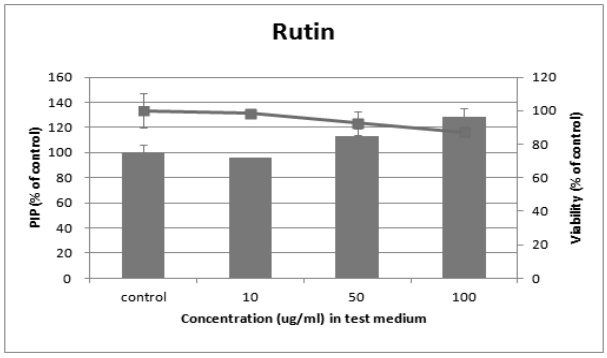
Figure 4에서 나타난 것처럼 플라보노이드 배당체 1과 2는 10, 50, 100 μg/mL 농도에서 PIP 생성량을 농도 의존적으로 증가시키고 있음을 알 수 있다. 화합물 1과 2는 100 μg/mL 농도에서 대조군에 비하여 120% 및 128%의 콜라겐 생성 증가율을 보였다. MTT 검사법을 이용한 세포 생존율 확인 결과, 100 μg/mL 농도에서도 세포 독성은 나타나지 않았다.

4. 결 론

본 연구에서는 주름 개선 활성 물질을 개발하기 위하여 제주 자생 덩굴식물인 돌외(*G. pentaphyllum*)를 선정하여 추출물을 얻고 피부 섬유아세포에서 콜라겐



(a)



(b)

Figure 4. Effect of compounds 1(a) and 2(b) on collagen type I synthesis and cytotoxicities.

합성 촉진 여부를 평가하였다. 평가결과 돌외 에탄올 추출물은 100 μg/mL 농도에서 세포독성 없이 165%의 콜라겐 생성 증가율을 보였다. 활성 성분을 규명하기 위하여 추출물로부터 용매분획 및 크로마토그래피 등의 분리과정을 거쳐 2개의 성분을 분리하였다. 분리된 플라보노이드 배당체 Ombuin 3-*O*-rutinoside(1) 및 quercetin 3-*O*-rutinoside(2)는 세포 독성 없이 농도 의존적으로 콜라겐 생성 촉진 활성을 나타내었다.

Figure 4에서 나타나듯이 분리물 1과 2의 콜라겐 합성 증가율은 추출물 상태의 증가율(165%) 보다는 낮은 수치이다. 이 결과는 추출물 내에서 콜라겐 생합성을 촉진하는 다른 종류의 활성 성분들이 존재하고 있음을 보여주고 있다. 앞으로 후속적인 연구를 통하여 이 부분은 계속 규명해 나갈 예정이다. 결론적으로 본 연구에서는 플라보노이드 배당체를 함유한 돌외 추출물은 진피 콜라겐 생성 증진을 통한 주름개선 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

Acknowledgement

저자(N. H. Lee)는 2014학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의한 지원에 감사드린다.

Reference

1. L. Maumann, Cosmetic dermatology, principles and practice, 10, McGraw-Hill Co., New York (2002).
2. S. Shuster, M. M. Black, and E. McVitie, The influence of age and sex on skin thikness, skin collage and density, *Br. J. Dermatol*., **93**, 639 (1975).
3. D. R. Brigstock, The CCN family: A new stimulus package, *J. Endocrinol*., **178**, 169 (2003).
4. G. W. Lee, S. M. Park, Y. C. Yoo, and Y. H. Cho, Effect of ponrici fructus extracts fermented with *Ganoderma lucidum* on the collagen synthesis and expression of matrix metalloproteinase-1, *Korean Soc. Biotechnol. Bioengin. J*., **28**, 106 (2013).
5. H. J. Ko, G. B. Kim, D. H. Lee, G. S. Lee, and H. B. Pyo, The effects of hydrolyzed Jeju *Ulva pertusa* on the proliferation and type I collagen synthesis in replicative senescent fibroblasts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**, 177 (2013).
6. V. Razmovski-Naumovski, T. H. W. Huang, V. H. Tran, G. Q. Li, C. C. Duke, and B. D. Roufogalis, Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*, *Phytochem. Reviews,* **4**, 197 (2005).
7. K. Yoshikawa, M. Mitake, T. Takemoto, and S. Arihara, Studies on the constituents of Curcubitaceae plants. XVII. On the saponins constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Yakugaku. Zasshi.,* **107**, 355 (1987).
8. Z. P. Fang and X. Y. Zeng, Isolation and identification of flavonoids and organic acid from *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **14**, 676 (1989).
9. Z. Zhang, S. J. Xie, S. P. Huang, and Q. Zhang, Analysis of medicinal and nutritional components in *Gynostemma pentaphyllum*, *Shanxi Daxue Xuebao Ziran Kexueban*, **16**, 307 (1993).

10. S. Deng, X. Li, B. Chen, F. Deng, and X. Zhou, Analysis ofamino acids, vitamins, and chemical elements in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino, *Hunan YikeDaxue Xuebao,* **19**, 487 (1994).
11. X. Liu, W. Ye, Z. Mo, B. Yu, S. Zhao, H. Wu, C. Che, R. Jiang, T. C. W. Mak, and W. L. W. Hsaio, Five new ocotillone-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, *J. Nat. Prod.,* **67**, 1147 (2004).
12. D. Arbain, J. R. Cannon, K. Afriastini Kartawinata, R. Djamal, A. Bustari, A. Dharma, H. Rosmawaty Rivai, D. Zaherman Basir, M. Sjafar, R. Sjaiful Nawfa, and S. Kosela, Survey of some west Sumatran plants for alkaloids, *Econ. Bot.,* **43**, 73 (1989).
13. Z. J. Wang and D. H. Luo, Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Carbohyd. Polymers,* **68**, 54 (2007).
14. T. H. Huang, V. H. Tran, B. D. Roufogalis, and Y. Li, Gypenoside XLIX, a naturally occurring PPAR-alpha activator, inhibits cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and activity in human endothelial cells, *Eur. J. Pharmacol.,* **565**, 158 (2007).
15. C. Circosta, R. De Pasquale, and F. Occhiuto, Cardiovascular effects of the aqueous extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Phytomedicine.,* **12**, 638 (2005).
16. S. Megalli, F. Aktan, N. M. Davies, and B. D. Roufogalis, Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in rats, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **8**(3), 507 (2005).
17. J. Hou, S. Liu, Z. MA, X. Lang, J. Wang, J. Wang, and Z. Liang, Effects of *Gynostemma pentaphyllum* Makino on the immunological functions of cancer patients, *J. Trad. Chin. Med.,* **11**, 47 (1991).
18. A. Norberg, N. K. Hoa, E. Liepinsh, D. Van Phan, N. D. Thuan, H. Jornvall, R. Sillard, and C. G. Ostenson, A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*, *J. Biol. Chem.,* **279**, 41361 (2004).
19. J. M. Lin, C. C. Lin, H. F. Chiu, J. J. Yang, and S. G. Lee, Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of anoectochilus formosanus, gnoderma lucidum and *Gynostemma pentaphyllum* in rats, *Am. J. Chin. Med.,* **21**, 59 (1993).
20. C. Rujjanawate, D. Kanjanapothi, and D. Amornlerdpison, The anti-gastric ulcer effect of *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Phytomedicine,* **11**, 431 (2004).
21. S. J. Lee, H. J. Bu, J. A. Lee, and D. S. Jung, Screening of plants in Jeju for whitening materials in cosmeceutical, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea,* **31**, 115 (2007).
22. K. Meada and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of whitening cosmetic components in human melanocyte, *J. Soc. Cosmet. Chem.,* **42**, 361 (1991).
23. H. Matsuda, T. Morikawa, I. Toquchida, and M. Yoshikawa, Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 788 (2002).
24. K. Kazuma, N. Noda, and M. Suzuki, Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*, *Phytochemistry,* **62**, 229 (2003).