



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사학위논문

급·만성 위염치료제로 유용한 목별자
추출물 및 유효성분

**Momordicae cochichinensis Seed Extract as a Therapeutic
Agent for Acute & Chronic Gastritis and Its Constituents**

2012 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 생약학전공

정 기 원

국문초록

위점막은 위산, 알코올, 헬리코박터균 (*Helicobacter pylori*), 각종 약물 (대표적으로 NSAIDs; non-steroidal anti-inflammatory drugs) 등의 공격인자 또는 스트레스로 인한 위점막 혈액순환 저하에 의해 쉽게 손상을 받는다. 공격인자에 의해 위점막이 손상되면 발적, 출혈, 부종, 미란을 동반하는 위염이 발생하게 되고, 그 증상이 심한 경우에는 점막하 (粘膜下) 조직과 근육층까지 손상이 미치는 위궤양이 발생하게 된다.

현재, 위장관 병변에 대한 표준 치료제로 위산의 분비를 억제하는 프로톤 펌프 억제제 (PPIs; proton pump inhibitors) 또는 H₂ 수용체 길항제 (H₂-receptor antagonists)가 주로 사용되며 임상에서 우수한 치료 효과를 보이고 있지만, 약물 복용을 중단한 경우 위장관 병변이 쉽게 재발하거나 일부 만성 및 난치성 위염 및 위궤양에 대해서는 치료의 한계를 보이는 경우가 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 위점막 보호제를 위산 분비 억제제와 병용하는 사례가 급격히 증가하고 있으나, 약효와 작용기전이 뚜렷하지 않거나 복용량이 많은 단점이 있어서 우수한 약물을 개발할 필요성이 여전히 있다.

본 연구에서는 각종 한의서와 문헌 검색 등을 통하여 위점막 보호 (급성 및 만성 위염치료) 효능을 보일 가능성이 있는 생약 후보들을 선별하였으며, 선별된 생약에 대해 동물모델 스크리닝을 실시하였다. 스크리닝을 위해 에탄올 유발 위염 모델과 NASID 중 하나인

디클로페낙 (diclofenac) 유발 위염 모델 실험을 수행하였으며, 그 결과 목별자 추출물이 가장 우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었고, 이러한 결과로 목별자를 최종 후보생약으로 선정하였다. 목별자는 중국 남부지방과 베트남에 널리 분포하는 다년생의 박과 (Cucurbitaceae) 식물인 목별 (木鱉, *Momordica cochichinensis* Springer)의 종자로서 소염작용이 강하고 우수한 상처 치료효과와 함께 류머티즘성 동통 및 근경련 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

선정된 목별자에 대해 에탄올 유발 위염 모델에서 분획 활성연구를 수행하였으며, 이를 통해 활성을 보인 *n*-BuOH 층에 대해 물질 분리를 시도하였다. 그 결과 3종의 사포닌을 분리하였고, 각종 분석광학적 데이터를 활용하여 구조분석을 실시한 결과, 화합물 **1**은 gypsogenin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside, 화합물 **2**는 quillaic acid-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside, 그리고 화합물 **3**은 gysogenin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosido-28-*O*- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopyranoside로 구조를 규명하였다. 화합물 **1**은 천연물에서 처음 분리된 물질이며, 화합물 **2**는 *Momordica* 속에서 처음 분리된 물질이고, 화합물 **3**은 목별자에서 이미 분리, 보고된 *Momordica* saponin I으로 동정하였다.

3종 화합물에 대한 에탄올 유도 위염 모델에서 약리활성을 측정한

결과, 통계적 유의성은 없었으나 모두 항위염 활성을 나타내었고, 화합물 3이 가장 높은 효능을 나타내는 경향을 보였다. 이러한 결과로 볼 때, 위점막 보호 활성이 어느 정도 사포닌에 기인하는 것으로 사료된다. 분리된 화합물의 경우 수율이 낮고 분리가 어려우며, 활성도 상대적으로 추출물 보다 높지 않다고 판단되고, 합성 자체도 어려운 문제점이 있기 때문에 단일화합물이 아닌 목별자 에탄올 추출물 (MSE; *Momordicae Semen Extract*)로 연구를 수행하였다.

MSE에 대한 위점막 보호 활성을 검증하기 위해 각종 동물 모델 및 기전 관련된 실험을 수행하였다. 그 결과, 에탄올 및 디클로페낙 (*diclofenac*)으로 유발된 급성 위염 모델, 그리고 *H. pylori*로 유발된 만성 위염 모델 모두에서 우수한 보호활성을 보였으며, 이러한 우수한 약효는 위점액 (*gastric mucus*) 분비 촉진 효과, 상처치료 (*wound-healing*) 효과, 항염증 및 진통 효과에 기인함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 약리작용은 기전 연구를 통해 위점막 보호 활성을 지닌 *neuropeptide*인 *calcitonin gene-related peptide (CGRP)*와 가스트린 (*gastrin*) 분비를 억제하는 인자로 보고된 *somatostatin*이 주로 역할을 담당할 것으로 추정하였다. 약효와 더불어 MSE에 대한 랫드 독성시험을 실시하였는데, 그 결과 반복 경구투여 최소치사용량 (*MLD*)와 4주 반복 독성시험에서 무해용량 (*NOAEL*)이 2,000 mg/kg 임을 알 수 있었다.

목별자 원생약 자원의 안정적인 확보를 위해 *LC-MS similarity analysis*를 수행하였으며, 분석 결과 중국 운남성 산지의 목별자가 기준에

적합함을 알 수 있었다. 이와 더불어 목별자 원생약의 수급 과정 중에 동속 식물과의 혼돈 가능성에 대해 문헌적 연구를 실시하였는데, 그 결과 동속 식물과 혼재될 가능성이 희박하고, 만약 혼재되어 있다고 하더라도 다른 동속 식물과 육안으로 쉽게 구분 가능함을 알 수 있었다. 또한, MSE의 함량 분석법에 대한 신뢰성을 확보하기 위해 밸리데이션 연구를 수행하였으며, 이를 통해 분석법에 대한 신뢰성을 확보하였다. 이러한 결과들은 목별자의 GCAP (Good Collecting & Agricultural Practice)를 위한 기초 데이터로 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

이상의 연구 결과들을 종합해 볼 때, 목별자 추출물은 다양한 급성 및 만성 위염 모델에서 우수한 효능을 보였고, 다양한 *in vivo* 및 *in vitro* 기전 모델에서도 우수한 효과를 나타내었기에 향후 임상에 적용했을 경우에서도 뛰어난 위점막 보호 효과를 보일 가능성이 높다고 생각되며, 단회 및 반복 경구투여 독성시험을 통해 우수한 안전성을 확인할 수 있었다. 더욱이 원생약에 대한 문헌적 연구, similarity analysis, 분석법 밸리데이션 연구를 통해 GCAP를 위한 다양한 기초 데이터를 확보함에 따라, 위점막 보호 활성을 갖는 신규 천연물의약품 개발의 가능성이 높을 것으로 판단된다.

주요어 : *Momordica cochichinensis* Sprenger, Gastroprotective, Calcitonin gene-related peptide, Somatostatin, *Momordica saponin*

학 번 : 2004-31145

목 차

국문초록	i
목차	v
List of Schemes	ix
List of Tables	x
List of Figures	xiii
List of Abbreviations	xvi
I. 서 론	1
1. 위염의 원인 및 치료	1
2. 목별자 (Seed of <i>Momordica cochichinensis</i> Springer)의 특징	5
3. 목별자의 식물화학적 성분	6
4. 급성 및 만성 위염 동물모델 및 기전	11
4.1. 위염 동물 모델	11
4.2. 위염 관련 기전	12
II. 실험재료 및 방법	15
1. 실험 재료	15
1.1. 식물 재료	15
1.2. 기기 및 시약	16
2. 위염 치료 효과를 지닌 생약의 선별	19
3. 목별자로부터 급·만성 위염 활성 분획물 제조, 활성성분의 분리 및 구조분석	20
3.1. 목별자의 추출 및 분획물 제조.....	20

3.2. 목별자의 활성성분의 분리	21
3.3. 화합물 1의 분리 및 구조분석	24
3.4. 화합물 2의 분리 및 구조분석	28
3.5. 화합물 3의 분리 및 구조분석	32
3.6. 화합물 1과 2의 당 분석	33
4. 위염 관련 동물 모델 및 기전 연구	34
4.1. 에탄올 유발 위염 모델	34
4.2. 디클로페낙 유발 위염 모델	35
4.3. <i>H. pylori</i> 유발 만성 위염 모델	36
4.4. Alcian Blue-Staining of Gastric Mucosal	36
4.5. Croton oil 유발 Ear Edema 모델	37
4.6. 진통 모델 (Formalin test)	38
4.7. 상처치료 모델 (Wound healing model)	38
4.8. CGRP 수용체 특이적 조직 Assay	39
4.9. 위장 조직 내 CGRP 분비 측정	39
4.10. Somatostatin 수용체 특이적 조직 Assay	40
5. 단회 및 반복 경구투여 독성시험 연구	41
6. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)를 이용한 Similarity Analysis 연구	42
7. 목별자 동속 식물에 대한 연구	44
8. 목별자 추출물의 분석법 밸리데이션 연구	46
III. 결과 및 고찰	49
1. 후보생약의 선정	49

2. 동물 위염 모델에서의 후보생약의 선별	51
3. 목별자로부터 활성 성분의 분리 및 이의 구조 규명	54
3.1. 목별자 분획 활성 연구.....	54
3.2. 화합물 1의 구조	55
3.3. 화합물 2의 구조	61
3.4. 화합물 3의 구조	66
3.5. 화합물 1, 2 및 3의 활성 연구	70
4. 목별자 추출물의 급만성 위염 치료 효능	72
4.1. 목별자 추출물의 에탄올 유발 위염 모델에서의 효능	72
4.2. 목별자 추출물의 디클로페낙 유발 위염 모델에서의 효능 ...	73
4.3. 목별자 추출물의 <i>H. pylori</i> 유발 위염 모델에서의 효능	74
4.4. 목별자 추출물의 위점액 분비 촉진 모델에서의 효능	75
4.5. 목별자 추출물의 상처치료 모델에서의 효능	76
4.6. 목별자 추출물의 Croton oil로 유도된 귀부종 실험 모델에서의 효능	78
4.7. 목별자 추출물의 진통 모델 (Formalin test)에서의 효능	79
4.8. 목별자 추출물의 CGRP 수용체 특이적 조직 Assay에서의 활성	80
4.9. 목별자 추출물의 위조직에서 CGRP 분비에 미치는 영향	81
4.10. 목별자 추출물의 Somatostatin 수용체 특이적 조직 Assay에서의 활성	82
5. 목별자 추출물의 독성시험 연구	83
5.1. 랫드 단회 경구투여 급성독성시험	83

5.2. 랫드 4주 반복 경구투여 독성시험	83
6. LS-MS를 이용한 목별자 산지별 Similarity Analysis 연구	85
7. 목별자의 동속 식물에 대한 연구	89
7.1. 목별자의 동속 식물에 대한 문헌적 연구	89
7.2. 여주 (<i>M. charantia</i>) 내 Momordica saponin I의 존재 유무에 대한 연구	110
8. 목별자 추출물의 분석법 밸리데이션 연구	114
IV. 결 론	126
V. 참고문헌	131
Abstract	142

List of Schemes

Scheme 1.	Extraction and fractionation scheme of <i>M. cochinchinensis</i>	20
Scheme 2.	Isolation of compounds 1 , 2 , and 3 from <i>n</i> -BuOH soluble fraction of <i>M. cochinchinensis</i>	21
Scheme 3.	Maximum likelihood tree for Momordica obtained from combined plastid, nuclear and mitochondrial sequence data	91
Scheme 4.	The historical biogeography of Momordica inferred on the preferred maximum likelihood tree under maximum likelihood optimization ·	92
Scheme 5.	Momordica species from Asia geographic origin	94

List of Tables

Table 1.	Classification for the anti-gastritis and anti-gastric ulcer agents	4
Table 2.	Constituents of <i>M. cochinchinensis</i> in its various parts.....	10
Table 3.	¹³ C- and ¹ H-NMR spectroscopic data of aglycon for compound 1 (in Pyridine- <i>d</i> ₅)	26
Table 4.	¹³ C- and ¹ H-NMR spectroscopic data of sugar moieties for compound 1 (in Pyridine- <i>d</i> ₅)	27
Table 5.	¹³ C- and ¹ H-NMR spectroscopic data of aglycon for compound 2 (in Pyridine- <i>d</i> ₅)	30
Table 6.	¹³ C- and ¹ H-NMR spectroscopic data of sugar moieties for compound 2 (in Pyridine- <i>d</i> ₅)	31
Table 7.	Instruments and condition for analytical method validation	47
Table 8.	List of candidates for anti-gastritis agent	49
Table 9.	Optimized mobile phase condition for LC-MS similarity analysis ..	85
Table 10.	Correlation analysis chart among <i>M. cochichinensis</i> samples from Vietnam and China	87
Table 11.	Classification and naming of <i>M. cochinchinensis</i>	89
Table 12.	Momordica species originated from Asia	93
Table 13.	Extraction and summary: Momordica species from Asia geographic origin	95
Table 14.	Extraction and summary: Momordica species of Cucurbitaceae inhabiting in China	96

Table 15.	Extraction and summary: Momordica species as an economic plants in Asia.....	98
Table 16.	Extraction and summary: Momordica species having an apparent habitat (national) in Asia	99
Table 17.	Classification of Momordica species by habitats	101
Table 18.	The excluded Momordica spices from the research subject and the reasons	102
Table 19.	The final Momordica species for research subject	103
Table 20.	Information about <i>M. cochinchinensis</i>	104
Table 21.	Information about <i>M. subangulata</i> Blume	105
Table 22.	Information about <i>M. dioica</i>	106
Table 23.	Morphology of Group I species	107
Table 24.	The gross output of Gac fruit in Hai Duong region, Vietnam	109
Table 25.	The validation items and specifications for the analytical method ..	114
Table 26.	The result of standard solution in specificity test	115
Table 27.	The result of testing solution in specificity test	115
Table 28.	The result of purity test by PDA	116
Table 29.	Summary of the test results in specificity test	116
Table 30.	The result of standard solution in linearity test	117
Table 31.	Summary of the results in linearity test	118
Table 32.	The result of standard solution in accuracy test	119

Table 33.	The result of testing solution in accuracy test – spiking	120
Table 34.	The result of testing solution in accuracy test – addition	120
Table 35.	Summary of results in accuracy test	121
Table 36.	The result of injection repeatability - 100% standard solution (14.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (ten times injection)	121
Table 37.	The result of method repeatability - 100% standard solution (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (After making 6 samples, five times injection)	122
Table 38.	The result of injection reproducibility - 100% standard solution (14.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ten times injection)	123
Table 39.	The result of method reproducibility. 100% standard solution (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (After making 6 samples, five times injection)	123
Table 40.	Cumulative Results	124
Table 41.	Summary of the results in precision test	124
Table 42.	Summary of results in validation for analytical method	125

List of Figures

Figure 1.	Results of chronic gastric <i>H. pylori</i> infection	2
Figure 2.	Structures of terpenoids in <i>M.cochinchinensis</i>	7
Figure 3.	Structures of saponins in <i>M.cochinchinensis</i>	9
Figure 4.	Relation between the activity of vagal nerves and enteric cholinergic and GRP-releasing neurons and gastrin released from the G-cells (A) in intact and <i>H. pylori</i> infected mucosa.	14
Figure 5.	Morphology of <i>M. cochinchinensis</i> seeds	15
Figure 6.	UPLC chromatogram of 50% ethanol extract of <i>M. cochinchinensis</i> ·	23
Figure 7.	Pictures of the raw materials of candidates	50
Figure 8.	Gastroprotective effects of candidates (MP09~MP15) in rat model of NSAID (diclofenac)-induced acute gastritis	51
Figure 9.	Gastroprotective effects of candidates (MP09~MP15) in rat model of NSAID (diclofenac)-induced acute gastritis erosion	52
Figure 10.	Gastroprotective effects of candidates (MP09, 12, 15) in rat model of ethanol-induced acute gastritis	53
Figure 11.	Gastroprotective effects of MP09, MP09 EtOAc fraction, and MP09 <i>n</i> -BuOH fraction in rat model of ethanol-induced acute gastritis	54
Figure 12.	The molecular structure of compound 1	57
Figure 13.	¹ H-NMR spectrum of compound 1 (600 MHz, Pyridine- <i>d</i> ₅)	58
Figure 14.	¹³ C-NMR spectrum of compound 1 (150 MHz, Pyridine- <i>d</i> ₅)	59
Figure 15.	HMBC spectrum of compound 1	60

Figure 16.	The molecular structure of compound 2	62
Figure 17.	¹ H-NMR Spectrum of compound 2 (600 MHz, Pyridine- <i>d</i> ₅)	63
Figure 18.	¹³ C-NMR Spectrum of compound 2 (150 MHz, Pyridine- <i>d</i> ₅)	64
Figure 19.	HMBC spectrum of compound 2	65
Figure 20.	The molecular structure of compound 3	67
Figure 21.	¹ H-NMR spectrum of compound 3 (900 MHz, Pyridine- <i>d</i> ₅ -D ₂ O (1:1))	68
Figure 22.	¹³ C-NMR spectrum of compound 3 (225 MHz, Pyridine- <i>d</i> ₅ -D ₂ O (1:1))	69
Figure 23.	Gastroprotective effects of MP09 <i>n</i> -BuOH fraction, compounds 1 , 2 , and 3 in rat model of ethanol-induced acute gastritis	70
Figure 24.	Comparisons of the gastric damage indices in rat models of ethanol- induced gastritis	72
Figure 25.	Comparisons of the gastric damage indices in rat models of diclofenac-induced gastritis	73
Figure 26.	Comparisons of ulceration scores in mouse model of <i>H. pylori</i> - induced gastritis	74
Figure 27.	Histological comparison of depth of the gastric mucus between MSE- treated and water-treated rats after ethanol challenge	75
Figure 28.	Time course of wound healing in mouse cutaneous injury model ..	77
Figure 29.	Anti-inflammatory effect of MSE in croton oil-induced ear edema test	78
Figure 30.	Analgesic effect of MSE in formalin test	79

Figure 31. Dose–response curve of MSE in CGRP-specific tissue inotropy assay	80
Figure 32. CGRP secretion effect from gastric tissue of MSE	81
Figure 33. Dose–response curve of MSE in somatostatin-specific tissue neurogenic twitch assay	82
Figure 34. LC-MS chromatogram of 50% ethanol extract of <i>M. cochinchinensis</i>	86
Figure 35. LC-MS Chromatograms of 50% ethanol extract of <i>M. cochinchinensis</i> (MCREF), MCC2, and MCV6	88
Figure 36. Momordica species in genus of Cucurbitaceae	96
Figure 37. Native distribution of Momordica species in Asia	97
Figure 38. Momordica species in Herbaria around the world	99
Figure 39. Synonyms of Momordica species	100
Figure 40. Morphology of <i>M. charantia</i>	107
Figure 41. Morphology of <i>M. balsamina</i>	107
Figure 42. Pattern chromatograms of MSE, <i>M. charantia</i> , and Spiking	111
Figure 43. Overlay chromatogram of MSE, <i>M. charantia</i> & Spiking	112
Figure 44. LC-MS SIM of MSE and <i>M. charantia</i>	113
Figure 45. UPLC Chromatogram of MSE	116
Figure 46. Linearity graph of standard (Momordica saponin I)	118

List of Abbreviations

AcCN	: Acetonitrile
ANOVA	: Analysis of variance
Ave.	: Average
<i>n</i> -BuOH	: Normal buthanol
CaCl ₂	: Calcium chloride
CD	: Circular dichroism
CFU	: Colony-forming unit
CGRP	: Calcitonin gene-related peptide
CMC	: Carboxymethyl cellulose
CO ₂	: Carbon dioxide
Conc.	: Concentration
COSY	: Correlation spectroscopy
CT ₅₀	: Half closure time
EC ₅₀	: 50% effective concentration
ESI	: Electrospray ionization
EtOAc	: Ethyl acetate
EtOH	: Ethanol
FID	: Flame ionization detector
Gal	: Galactose
GC	: Gas chromatography
GCAP	: Good collecting and agricultural practice

GC-MS	: Gas chromatography-mass spectrometry
GlcA	: Glucuronic acid
GRIN	: Germplasm resourced information network
GRP	: Gastrin-releasing peptide
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMBC	: Heteronuclear multiple bond correlation
H ₂ O	: Water
HPLC	: High performance liquid chromatography
HR-FAB-MS	: High resolution-fast atom bombardment-mass spectroscopy
HSQC	: Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
ICR	: Imprinting control region
ID	: Internal diameter
IL-1 β	: Interleukin-1 beta
IL-8	: Interleukin-8
IR	: Infrared absorption
IV	: Intra venous
KCl	: Potassium chloride
Lab	: Laboratory
LC-MS	: Liquid chromatography-mass chromatography
MC	: Methyl cellulose
MCC	: <i>Momordica cochichinensis</i> from China
MCV	: <i>Momordica cochichinensis</i> from Vietnam
MeOH	: Methanol

MgCl ₂	: Magnesium chloride
MLD	: Minimum lethal dose
mp	: Melting point
MP	: Mucosa protective
MPLC	: Medium pressure liquid chromatography
MS	: Mass spectrometry
MS I	: Momordica saponin I
MSE	: Momordicae cochichinensis seed extract
NaCl	: Sodium chloride
NaHCO ₃	: Sodium bicarbonate
NMR	: Nuclear magnetic resonance
NO	: Nitric oxide
NOAEL	: No observable adverse effect level
NSAID	: Non-steroidal anti-inflammatory drug
PBS	: Phosphate buffered saline
PDA	: Photodiode array
PG	: Prostaglandin
PPI	: Proton pump inhibitors
RF	: Response factor
Rha	: Rhamnose
ROESY	: Rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy
RP	: Reversed-phase
RSD	: Relative standard deviation

RT	: Retention time
SEM	: Standard error of mean
SD	: Sprague-Dawley
SIM	: Single ion monitoring
S/N	: Signal-to-noise ratio
SPF	: Specific-pathogen-free
SST	: Somatostatin
SSTR2	: Somatostatin receptor 2
TMS	: Tetramethylsilane
TNF- α	: Tumor necrosis factor-alpha
TOCSY	: Total correlation spectroscopy
TOP	: Topically
UPLC	: Ultra performance liquid chromatography
UV	: Ultraviolet absorption
VEGF	: Vascular endothelial growth factor

I. 서론

1. 위염의 원인 및 치료

위를 보호하는 위점막층은 여러 종류의 인자로부터 공격을 받아 손상받기 쉽다. 대표적인 공격 인자로서 위산, 알코올, 각종 약물 [non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), 골다공증 치료제 (알렌드로네이트) 등], *H. pylori*, 스트레스에 의해 유도된 위점막 혈액순환 (microcirculation) 장애와 혈압 등이 있다 (Amaral *et al.*, 2010; Frezza *et al.*, 2001; Mizuno, 1987; Suzuki *et al.*, 1993). 이러한 요인으로 인해 점막층이 손상되었을 때 미란, 발적, 출혈, 부종을 동반한 염증이 발생하게 되며, 손상이 심하여 점막하 조직 (submucosa)까지 손상되었을 때 이를 위궤양이라 한다. 또한, 위와 직접 연결되어 있는 십이지장도 비슷한 요인에 의해 염증과 십이지장궤양이 발생할 수 있다.

참고로 위에 언급된 공격인자에 의해 만성표재성 위염이 발생하며, 그 정도가 심해짐에 따라 위축성 위염, 장상피화생, 위점막 이형성증과 같은 임상적 증상을 보이게 되고, 마지막 단계인 위암이 발생하게 된다. 위축성 위염은 위염이 만성화되어 위점막이 얇아지고 주름이 생기는 것을 말한다. 장상피화생 (intestinal metaplasia)은 위점막의 상피세포가 장점막의 상피세포로 변화하는 것을 말하며, 위점막에서 소화액을 분비하지 못하는 상황이 지속될 때 생긴다 (Stemmermann, 1994). 장상피화생 환자 중 0.25%가 위암으로 진전되는데, 이는 정상인보다 10배 이상 위암이 발생할 가능성이 있는 것이다. 위암의 전 단계로

알려진 위점막 이형성증 (gastric epithelial dysplasia)은 위암으로 진행되는 위점막 상피에 나타나는 종양성 증식을 말한다 (Lauwers, 1999).

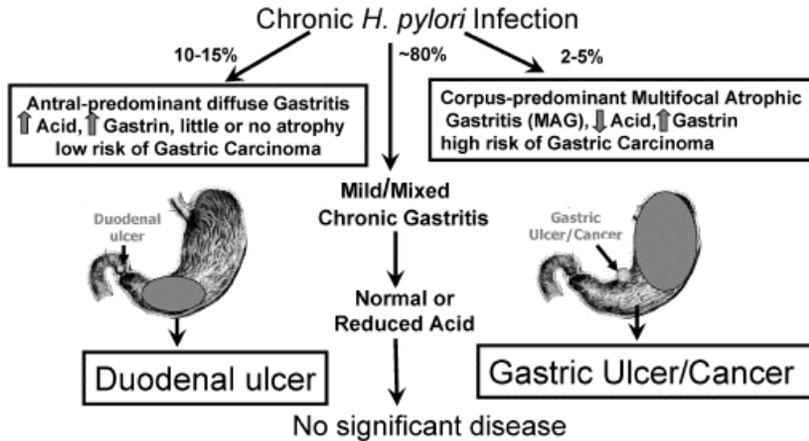


Figure 1. Results of chronic gastric *H. pylori* infection. This infection results either in antral predominant gastritis with hypergastrinemia and hyperchlohydria leading to duodenal or gastric peptic ulceration, while corpus predominant *H. pylori*-induced atrophic gastritis leads to hypochlohydria and increased gastrin release, resulting in the cancerogenesis. Most of infected patients (~80%) show only mild mixed gastritis and normal gastric acid secretion without significant gastric diseases (Konturek *et al.*, 2006).

위에 제시된 공격인자로 인해 유발된 위 및 십이지장의 염증/궤양을 치료하기 위해서는 위산 분비 억제, *H. pylori*의 증식 억제, 점액 분비 촉진, 상피세포 재생 촉진, 항염증 등의 효능을 가진 약물이 필요하다. 현재 가장 대표적인 위염 및 위궤양 치료제로는 위산 분비 억제의

효능을 지닌 H₂-receptor antagonist와 proton pump inhibitor (PPI) 류의 약물이며 임상에서 우수한 효과가 입증되었다 (Bell *et al.*, 1992; Feldman *et al.*, 1990; Schunack *et al.*, 1989; Mark *et al.*, 1990; Mills *et al.*, 1989). PPI의 대표적인 성분은 omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, rabeprazole 등이 있으며, H₂-receptor antagonist의 대표적인 성분은 cimetidine, ranitidine 등이 있다. 이들 약물은 임상적으로 우수한 치료 효과를 보이고 있지만 약물 복용을 중단한 경우 위장관 병변이 쉽게 재발하거나 일부 만성·난치성 위염 및 위궤양에 대해서는 치료의 한계를 보이는 경우가 있다 (Berardi *et al.*, 1987; Fullarton *et al.*, 1989; Szabo and Bynum, 1988).

위장관 병변에 대한 치료 효율을 높이는 동시에 치료 후 재발률을 낮추기 위해서는 위점막 손상 유발 인자인 위산을 지속적으로 억제하는 것도 중요하지만 한편으로는 점액의 분비를 촉진하고 상피세포의 재생을 촉진하여 점막을 강화시키고 항염증과 항산화 작용을 통하여 위점막을 보호하는 효능을 지닌 위점막 보호제 (gastroprotectant)를 함께 사용하는 것이 매우 중요하다. 또한 노년층의 증가와 더불어 퇴행성질환을 치료하기 위해 위장관의 손상을 유발하기 쉬운 NSAID류 약물 또는 알렌드로네이트 등의 장기간 복용이 급속도로 증가함에 따라 이들 약물에 의한 위장 손상을 예방하기 위하여 위산 억제제 보다는 위점막 보호제를 위손상 유발 약물과 병행 처방하는 하는 것이 바람직하기에 위점막 보호제의 수요는 급격히 증가하고 있다.

현재 위점막 보호제로서 에엽 95% 에탄올연조엑스 (스티렌정), 레바미피드 (rebamipide, 뮤코스타정), 에카벳트나트륨 (Ecabet Sodium,

가스트렉스과립), 테프레논 (teprenone), 수크랄페이트 (sucralfate), 폴라프레징크 (Polaprezinc, 프로맥과립), 쏘팔콘 (sofalcone, 쏘론정) 등의 약물이 개발되어 있으나 (Yamasaki *et al.*, 1989; Takei, 2012; Terano *et al.*, 2007; Higuchi *et al.*, 2010), 일반적으로 속효성이 적고 작용기전이 뚜렷하지 않거나 복용량이 많은 단점이 있어서 개선된 약물의 개발이 필요하다.

Table 1. Classification for the anti-gastritis and anti-gastric ulcer agents (except *H. pylori* infection medicines)

	위점막 보호제	PPI	H ₂ receptor antagonist	제산제
개요	위점막 회복, 점액 합성 및 분비 촉진 등을 통한 위점막 보호	위산분비 최종단계인 proton pump 차단	위산분비기전의 하나인 histamine 수용체 차단	알칼리성 물질로 위산을 중화시킴
장·단점	위궤양 재발방지 효과 있으며, 공격인자 차단제 (PPI, H ₂ -RA)와 병용함. 처방 base 약물	가장 강력한 효과를 가지나 고가임. 약물 복용 중단 후 쉽게 재발 가능성 존재	위궤양 및 위염에 모두 적용 가능. Half dose 발매로 제산제 대체 추세. 위산분비 억제 효과가 PPI에 비해 약함	즉각적인 속쓰림 개선효과가 있으나, 장기 복용 시 위장 내 환경이 알칼리화 되어 소화 장애 유발. 변비 또는 설사 유발
주요 제품	스티렌, 무코스타, 가스트렉스	란스톤, 판토톡, 파리에트, 레바넥스	잔탁, 큐란	겔포스엠

2. 목별자 (Seed of *Momordica cochinchinensis* Sprenger)의 특징

목별자는 박과 (Cucurbitaceae)에 속하는 다년생 덩굴식물로서 목별 (*Momordica cochinchinensis* Sprenger)의 건조된 성숙한 종자이다. 중국에서 몰루카스 제도까지 분포하며 동아시아와 동남아시아에서 전통 생약으로 사용 되어 왔다.

목별은 다년생 초질 등본 식물로 팽대한 덩이 모양의 뿌리가 있다. 줄기에는 세로의 모서리가 있다. 덩굴손은 굵고 튼튼하며 잎과 대생하여 한 개이고 분지하지 않았다.



잎은 어긋나고 원형 내지 넓은 달걀 모양이며 길이는 7~14 cm이고 보통 3개로 얇게 갈라지거나 깊게 갈라진다. 산비탈, 숲, 토층이 비교적 두터운 지역에서 자라며 재배하기도 한다 (중약대사전, 2006; Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997).

목별자는 편평한 원판~거북잔등 모양이며 지름 2~3 cm, 두께 약 5 mm이다. 바깥 면은 회갈색~회흑색이며 양쪽에 거친 톱니상의 돌기가 10여 개씩 있다. 외종피는 굳으며 내종피는 회록색의 얇은 막으로 되어 있고 그 안에 2장의 황백색의 떡잎이 들어 있다. 이 약은 특이한 기름 냄새가 있고 맛은 쓰다. 양품의 경우 알이 크고 고르며 무겁고 깨어진 것이 없고 기름기가 많은 것이어야 한다 (대한약전외한약(생약) 규격집, 2007).

목별자는 상용하는 중약의 하나이나 대개는 외용으로 사용하고 아주

드물게 복용으로 사용한다. 목별자는 맛이 쓰고, 떫고, 성질이 차며, 열증의 억제, 해열, 해독의 효과가 있어 간, 비장 이상, 치질, 상처, 타박상, 종기, 서혜선종 (buboes), 볼거리 (mumps), 하지부종 등에 사용되어 왔으며, 화농성 피부 감염증에 효과를 지닌 것으로 알려져 있다 (Cheung *et al.*, 1985; Gao *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 1980). 최근 문헌에 의하면 목별자 추출물이 랫드 모델에서 위궤양 치료와 혈관신생성 효과를 증진시키는 것으로 보고 되었다 (Kang *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010)

3. 목별자의 식물 화학적 성분

목별자에 함유된 지방산에는 decanoic acid, palmitic acid, stearic acid, peanut acid이 있으며, 그 중 함량이 제일 높은 것은 stearic acid로 51.68%를 차지한다. 불포화지방산은 hexanoic acid, 2-heptadecenoic acid, oleic acid, (Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid, linoleic acid, 10-nonadecenoic acid과 11-eicosenoic acid가 존재하며, 함량이 가장 높은 것은 oleic acid이며 지방산 총량의 21.62%를 차지한다. karounidiol, isokarounidiol, 5-dehydrokarounidiol, 7-oxodihydrokarounidiol과 같은 triterpenoid와 β -sitosterol, stigmast-en-3 β -alcohol, stigmast-7,22-diene-3 β -alcohol과 같은 sterol 성분이 분리되었으며 (De Shan *et al.*, 2001; Kan *et al.*, 2006), 목별자에만 존재하는 화학성분인 momordica saponin I과 momordica saponin II (Iwamoto *et al.*, 1985), 그리고 momordic acid, oleanolic acid, momorcochin 등이 보고되었다. 면역과 항암 등의 활성을 지닌 단백질류와 펩타이드류도 보고되었다 (Chan *et al.*, 2009; Chuethong *et al.*, 2007; Tsoi *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004).

참고로 oleanolic 배당체의 경우 에탄올 또는 인도메타신으로 유도된 위염 모델에서 항위염 효능을 지니는 것으로 보고되었다 (Matsuda *et al.*, 1998).

목별자에서 분리된 terpenoid는 구조는 아래와 같다 (Iwamoto *et al.*, 1985; Kubota *et al.*, 1971; Shan *et al.*, 2001).

Columbin

Vergatic acid

Chondrillasterol

Nardol

Figure 2. The molecular structures of terpenoids in *M. cochinchinensis*

Momordicine III

Momordin I

Momordin IC

Momordin ID

Momordin IE

Hemsloside MA-1

Momordin IIA

Momordin IIB

Momordin IIC

Momordin IID

Momordin IIE

Momordin III

Figure 3. The molecular structures of saponins in *M.cochinchinensis*

Table 2. Constituents of *M. cochinchinensis* in its various parts

Compound Name	성분 계열	Part
Chondrillasterol	Stigmasterol	found in tuber; TradiMed*
Columbin	Diterpenoid	found in root; Waterman <i>et al.</i> , 1985
Momorcochin	Protein	found in fruit; TradiMed
Momordica saponin I	Gypsogenin saponin	found in seed; Iwamoto <i>et al.</i> , 1985
Momordica saponin II	Quillaic acid saponin	found in seed; Iwamoto <i>et al.</i> , 1985
Momordicine III	Cucurbitacine saponin	found in root; TradiMed
Momordin I	Oleanolic acid saponin	found in root; Iwamoto <i>et al.</i> , 1985(2)
6'-Methyl momordin I	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin Ia	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin Ib	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin Ic	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin Id	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin Ie	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin II	Oleanolic acid saponin	found in root; Iwamoto <i>et al.</i> , 1985 (2)
Momordin IIa	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin IIb	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin IIc	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin IId	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin IIe	Oleanolic acid saponin	found in root; Nawamura <i>et al.</i> , 1988
Momordin III	Epoxy-oleanolide	found in root; Iwamoto <i>et al.</i> , 1985 (2)
Nardol	Sesquiterpenoid	TradMed
Vergatic acid	Triterpenoid	TradMed

* TradiMed : 전통동양약물 데이터베이스(<http://www.tradimed.co.kr>)

4. 급성 및 만성 위염 동물모델 및 기전

위점막은 생리적인 보호막으로서 1차적으로 점막상피를 보호하는 점액층을 분비한다. 그러나, 끊임없이 많은 공격 인자에 노출될 수 있으며, 여러 요소들이 위점막 보호 기전에 기여하는 것으로 알려져 있다.

4.1. 위염 동물 모델

위염 동물 모델의 경우, 위염을 일으킬 수 있는 다양한 공격 인자를 제거한 여러 동물모델이 만들어져 왔다. 주로 사용되는 동물 모델 유발 인자로는 에탄올, 디클로페낙, 인도메타신, 아세트산, 암모니아, 스트레스 (water immersion restraint stress), *H. pylori*가 있다. 그리고, NSAID에 의해 발생하는 위염 또는 위궤양 치료의 효능을 검증하기 위해 주로 디클로페낙 또는 인도메타신으로 유발된 모델을 사용한다 (Hsu *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 1999; Urushidani *et al.*, 1977). 참고로 본 연구에서는 에탄올, 디클로페낙, *H. pylori*로 유발된 위염 모델을 사용하였다. 각 모델의 경우 alcian blue staining을 이용하여 위점액 분비 여부를 측정할 수 있다 (Kitagawa *et al.*, 1986).

이와 더불어 위염의 효능을 간접적으로 증명할 수 있는 모델로 함염 모델 (croton oil or arachidonic acid-induced ear edema model)과 진통 모델 (formalin test, tail flick model, writhing test), 상처치료 모델 (wound-healing model)을 들 수 있다 (Hunskaar *et al.*, 1985; Inoue *et al.*, 1991; D'Amour *et al.*, 1941; Montesinos *et al.*, 1997).

4.2. 위염 관련 기전

점막액을 형성하는 Paracrine과 신경조절 기전은 neuropeptide의 한 종류인 calcitonin gene-related peptide (CGRP), nitric oxide (NO) 그리고 prostaglandin (PG)로 보고 되었으며 (Akiba *et al.*, 2000; Akiba *et al.*, 2001; Ichikawa *et al.*, 2000), CGRP의 경우 랫드 모델에서 NO 의존적으로 mucin 생성을 자극하였고 (Ichikawa *et al.*, 2000), 고농도의 에탄올을 처리한 랫드의 위조직에서 CGRP의 농도가 감소됨이 관찰되었다 (Evangelista *et al.*, 1993). 단기적으로 capsaicin을 경구 투여로 afferent fiber를 자극하는 경우 위점막의 혈류량이 뚜렷하게 증가되는 것으로 나타났으며, 이러한 활성의 주요 매개체는 CGRP라는 것이 밝혀졌다 (Holzer, 1998; Holzer *et al.*, 1991; Holzer, 2007). 또한, CGRP는 혈관 평활근에 직접 작용하기도 하며, NO 형성을 증가시킴으로써 부분적으로 혈관이완을 유도하는 것으로 보고되었다 (Lambrecht *et al.*, 1993). 즉, 위점막 보호에 관련하는 구조로 capsaicin-sensitive afferent fiber를 경유하여 CGRP 분비가 촉진되는 것으로 추측된다 (Hayashi, 2001). 이러한 결과 점막 미세혈류가 증가되고 점막세포 사이에 침투한 위산의 청소가 원활하게 되며 점액 생성이 증가될 것으로 추측 되고 있다.

최근 위점액 증가에 관한 기전으로 PG와 NO 의존성 경로 및 heat shock protein이 관여한다는 연구 결과들이 보고 되고 있는데 위점막 보호제로 쓰이고 있는 geranylgeranylacetone의 경우 PG와는 관계없이 NO-의존성 경로 및 heat shock protein이 관여하리라 추측되고 있다 (Brzozowski *et al.*, 2005).

Somatostatin의 경우 위장 호르몬인 가스트린 분비를 억제하여 위점막 보호 효능을 지닌 것으로 알려져 있는데 (Avgerinos *et al.*, 2005; Konturek *et al.*, 2006), UCB에서 Somatostatin-ucbTM라는 이름의 위궤양 치료제로 개발되었다. UCB에서 출시된 또 다른 위궤양 치료제인 Stogar® (lafutidine, H₂-receptor antagonist)의 경우 *H. pylori* 감염된 환자에게 투여 시, CGRP와 somatostatin의 혈장 농도를 유의성 있게 낮추었는데 이는 capsaicin-sensitive neuron을 경유하여 작용하는 것으로 추측된다 (Shimatani *et al.* 2006). 한편, CGRP는 somatostatin의 방출을 증가시키며, 이와 동시에 가스트린 방출을 억제하는 것으로 보고 되었다 (Manela *et al.*, 1995).

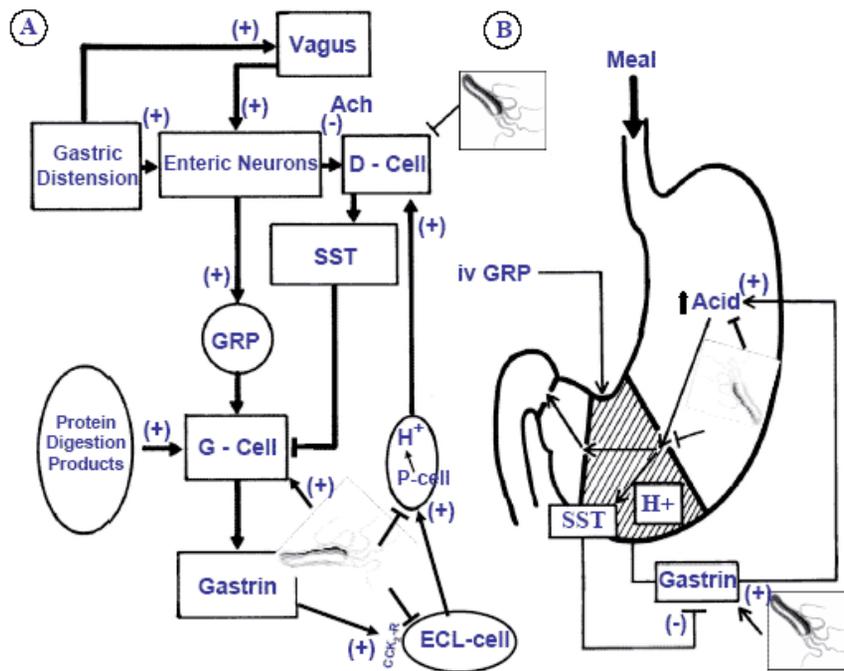


Figure 4. Relation between the activity of vagal nerves and enteric cholinergic and GRP-releasing neurons and gastrin released from the G-cells (A) in intact and *H. pylori* infected mucosa. Meal and IV injection of gastrin-releasing peptide (GRP) induces gastric acid secretion via releasing gastrin and subsequent stimulation of the parietal cells to secrete acid that in turn inhibits further release of antral hormone by stimulating the D-cells and releasing somatostatin (SST). The latter peptide inhibits gastrin release via SST receptors (SSTR2) and thus attenuates gastric acid secretion (Konturek *et al.*, 2006)

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1.1. 식물 재료

실험에 사용한 목별자 (20 kg)는 2008년 6월 중국 운남성에서 구입하여 김진웅 교수로부터 감정을 받은 후 본 실험에 사용하였다. 표본은 서울대학교 약학대학 약초원 (KJ 0024C)에 보관되어 있다.



Figure 5. Morphology of seeds of *M. cochinchinensis*

1.2. 기기 및 시약

- Alcian blue (Sigma-Aldrich, USA)
- Carboxymethyl cellulose (Sigma-Aldrich, USA)
- CGRP linked immunoassay kit (SPI-Bio, Australia)
- α -CGRP₍₈₋₃₇₎ (Bachem, Switzerland)
- CGS-21680 (Tocris, USA)
- Clarithromycin (Abbott, USA)
- Columns and cartridge
 - ACQUITY UPLC[®] BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm (Waters, Milford, USA)
 - Ascentis Express C18, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m (Sigma-Aldrich, USA)
 - Biotage[®] SNAP Cartridge (Biotage, Charlotte, NC, USA)
 - BPX-50, 0.25 mm \times 30 m (SGE, Melbourne, Australia)
 - J'sphere ODS H-80, S-4 μ m, 250 \times 10 mm i.d., 80A (YMC, Tokyo, Japan)
 - YMC*GEL ODS-A, S-150 μ m, 450 mm \times 20 mm i.d. (YMC, Tokyo, Japan)
- Croton oil (Sigma-Aldrich, USA)
- Diclofenac (Sigma-Aldrich, USA)
- Ether (SkySoltech, SK Chemicals, Korea)
- First grade reagent for analysis (Deajung Chemical & Metals Co. Ltd., Korea)
- Flash purification system (Isolera[™] Flash Purification System; Biotage, Sweden)
- Formalin (Formaldehyde, Aqueous solution of 37%; Sigma-Aldrich, USA)
- FT-IR (JASCO FT/IR-300E spectrophotometer; Jasco, Tokyo, Japan)
- FT-NMR (Bruker AVANCE 900 / Bruker AVANCE 600 spectrometer; Bruker,

Rheinstetten, Germany)

- GC-MS system (Perkin-Elmer Clarus 600 gas chromatograph and Clarus 600T mass spectrometer; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)
- Graph-Prism (Graph Software, USA)
- *Helicobacter pylori* selective supplements (3.2×10^9 colony-forming unit/0.4 mL/mouse; Clinical isolates, National Taiwan University Hospital Laboratory)
- Hexobarbital (Sigma-Aldrich, USA)
- HPLC Solvents (Fisher Scientific, Korea)
- HPLC system
 - Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
 - ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, USA)
- HR-FAB-MS (JEOL JMS 700 MStation; Akishima, Tokyo, Japan)
- Image-ProPlus Version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, CA, USA)
- Krebs-Henseleit buffer (In-house)
- LC-ESI-MS (Finnigan LCQ ion-trap mass (ThermoQuest; San Jose, CA, USA)
- Male CD-1 (Crl.) (under Charles River Laboratories)
- Mass spectrometer (JEOL JMS-700; Akishima, Tokyo, Japan)
- MS System (LCQ Deca XP; Thermo Finnigan, CA, USA)
- Melting Point Tester (Buchi B-540; Buchi, Flawil, Switzerland)
- Microbalance (Mettler AE 50; Zürich, Switzerland)
- Omeprazole (Astra, Sweden)
- Phosphate Buffered Saline (pH 7.4; Sigma-Aldrich, USA)
- Pipette (Pipetman P20; Gilson, France)

- Polarimeter (JASCO DIP-1000; Jasco, Tokyo, Japan)
- Pyrogen free saline (Sintong, Republic of China)
- Rebamipide (Sigma-Aldrich, USA)
- Rotary evaporator (N-1100; EYELA, Japan)
- Sharp punch, ID 12 mm (Sinter, Republic of China).
- SigmaStat version 3.5 (Systat Software, Chicago, IL USA)
- Sodium chloride (Wako, Japan)
- Somatostatin₂₈ (Sigma-Aldrich, USA)
- Sucrose (Sigma-Aldrich, USA)
- Sterile distilled water (In-house)
- Tyrode buffer (In-house)
- UPLC system (ACQUITY UPLC™; Waters Corp, Milford, USA)
- UV spectrometer (Beckman DU 650 spectrophotometer; Fullerton, USA)

2. 위염 치료 효과를 지닌 생약의 선별

위점막 보호 (급성 및 만성 위염 치료) 효능을 지닌 후보생약을 선정하기 위하여, 각종 정보 [KFDA 생약종합정보시스템, 전통동양약물 데이터베이스 (TradiMed; <http://www.tradimed.co.kr>), Pubmed, 중앙대사전, 향약대사전, 동의보감, 한의사 자문]를 활용하였다. 이를 통해 1차로 생약을 선별하였으며, 선별된 생약에 대해 신규성과 학술적 가치를 재검토하여 2차 후보생약을 선정하였고, 이에 대해 동물모델 스크리닝을 실시하였다.

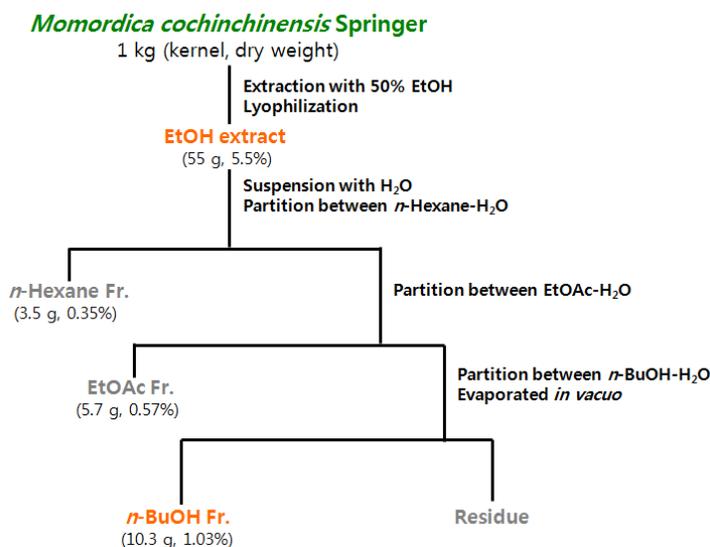
선정된 생약의 1차 스크리닝을 위해 *in vivo* 모델인 디클로페낙 유발 위염 모델을 수행하였으며, 비교 약물로 레바미피드를 사용하였다. 그리고 1차 스크리닝을 통해 선별된 생약에 대해 2차 스크리닝을 실시하였는데, 이를 위해 *in vivo* 모델인 에탄올 유발 위염 모델을 수행하여 (비교 약물로 레바미피드 사용) 최종 후보 모델을 도출하였다.

참고로 *in vivo* 모델에 대한 실험 방법은 하기 “4.1. *In vivo* 위염 모델”에 서술되어 있다.

3. 목별자로부터 급·만성 위염 활성 분획물 제조, 활성성분 분리 및 구조분석

3.1. 목별자의 추출 및 분획물 제조

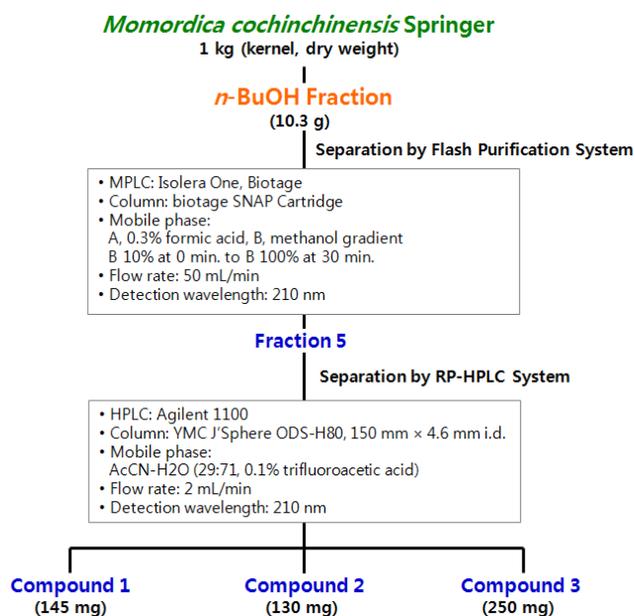
목별자의 껍질을 제거한 kernel 1 kg (dry weight)을 5배 (v/w)의 50% EtOH를 가하여 80°C에서 4시간 동안 2회 추출하였다. 추출액을 여과지로 여과한 후 여액을 감압 농축하고 동결건조하여 목별자 50% EtOH 추출물 55 g을 수득하였다 (수율 5.5%). 수득한 50% EtOH 추출물을 증류수에 현탁한 후 극성지향적 분리기법에 따라 *n*-hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH로 분획하여 각각 3.5 g (수율 0.35%), 5.7 g (수율 0.57%) 및 10.3 g (수율 1.03%)의 분획물을 얻었다 (Scheme 1). 이 중 EtOAc과 *n*-BuOH 분획은 에탄올 유발 위염 모델에서 보호활성을 측정하였다.



Scheme 1. Extraction and fractionation scheme of *M. cochinchinensis*

3.2. 목별자의 활성성분의 분리

목별자 추추물의 *n*-BuOH 분획으로부터 화합물 **1**, **2** 및 **3**을 분리하기 위하여 flash purification system 및 RP-HPLC를 이용하였다. 즉, *n*-BuOH 분획 10.3 g을 정제수에 현탁시킨 후, Biotage SNAP cartridge가 장착된 flash purification System (Isolera One with fixed 210 nm wavelength detector and single fraction collector bed)에 loading하였으며, 0.3% formic acid과 MeOH를 gradient elution (9:1 at 0 min to 100% methanol at 30 min)한 이동상 조건으로 분리하였다. 이를 통해 5개의 분획 (F01~F05)을 얻었으며, 이 중 F05 분획에 대해 RP-HPLC (YMC J'Sphere ODS-H80, 150 mm × 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd.; flow rate of 2 mL/min; AcCN-H₂O (29:71, 0.1% trifluoroacetic acid))에 적용하여 화합물 **1** (145 mg), **2** (130 mg) 및 **3** (250 mg)을 얻었다 (Scheme 2).



Scheme 2. Isolation of compounds **1**, **2**, and **3** from *n*-BuOH soluble fraction of *M. cochinchinensis*

참고로 위의 방법의 경우 우선 *n*-BuOH로 분획을 해야 하고, 고순도의 화합물을 얻기가 어려운 단점이 있어, 에탄올 수용액 추출물을 아세톤으로 침전시킨 후, 침전물을 MPLC와 HPLC를 사용하여 분리하는 또 다른 방법을 고안하였다.

목별자의 껍질을 제거하여 얻어진 kernel 1 kg (dry weight)을 분쇄하여 50% 에탄올 5 L을 넣은 후 80°C에서 3시간 동안 추출을 하였으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 추출액을 여과지로 여과하였으며 여액을 60°C에서 감압농축을 실시한 후, 감압 건조기로 잔류 용매를 제거하였다. 이를 통해 얻어진 추출물 중 10 g을 취하여 100 mL의 정제수에 넣은 후 현탁 시켰으며, 현탁액에 아세톤을 넣어 주어 최종 50% (v/v) 아세톤 수용액이 되게 하였다. 1시간 동안 방치한 후에 침전된 침전물을 여과지에 여과하여 따로 분리 하였으며, 여액인 아세톤 수용액에 추가로 아세톤 400 mL를 첨가하여 재침전시켰다. 이 때 생성된 침전물도 여과하여 이전 침전물과 합친 후, 감압농축 및 감압 건조하여 750 mg의 침전물을 얻었다. 침전물에서 성분을 분리하기 위해 column chromatography를 실시하였다. 역상 컬럼 (YMC*GEL ODS-A 12 nm, S-150 μ m, 450 mm \times 20 mm i.d., YMC Co. Ltd.)을 사용하였으며, 용매 조건으로 MeOH과 H₂O 혼합용액을 선택하여 1:9 비율에서 7:3 비율로 gradient elution을 시켰다. 이를 통해 7개의 분획 (F01~F07) 분하였으며, 이중 F07 분획에 대해 column chromatography를 실시하였다 (YMC J'Sphere ODS-H80, 150 mm \times 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd.; flow rate of 2 mL/min; AcCN-H₂O (29:71, 0.1% trifluoroacetic acid)). 그 결과 98% 이상의 순도를 갖는 화합물 **1**, **2** 및 **3**을 분리할 수 있었다 (data not shown).

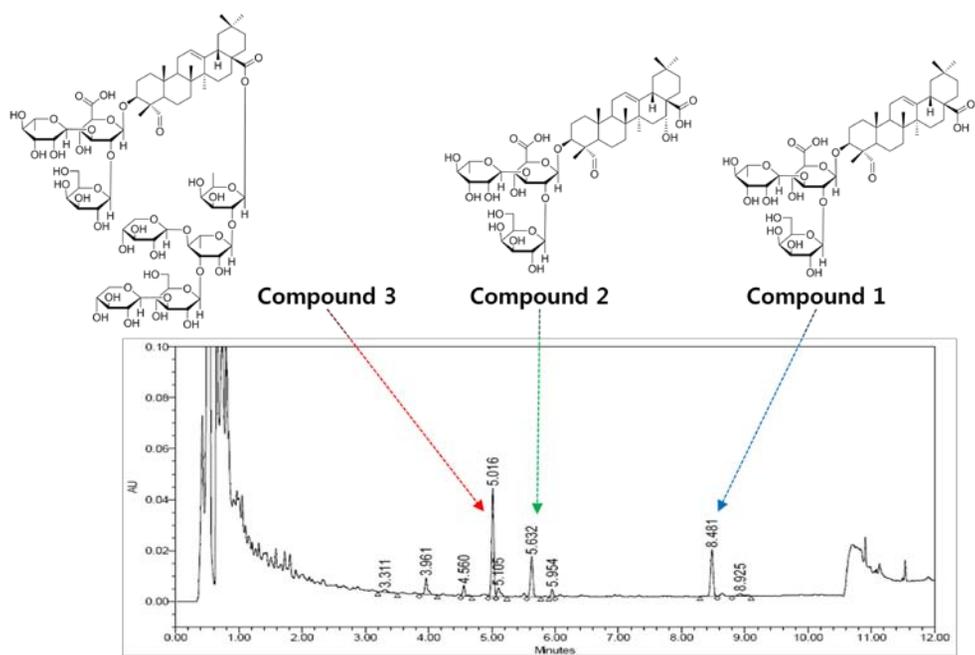


Figure 6. UPLC chromatogram of 50% ethanol extract of *M. cochinchinensis*

3.3. 화합물 1의 분리 및 구조분석

목별자 추추물의 *n*-BuOH 분획을 flash purification system과 RP-HPLC (YMC J'Sphere ODS-H80, 150 mm × 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd.; flow rate of 2 mL/min; AcCN-H₂O (29:71, 0.1% trifluoroacetic acid))에 적용하여 화합물 1을 분리 및 정제하였으며, 아래와 같이 구조분석을 위한 데이터를 확보하였다.

Compound 1

C₄₈H₇₄O₁₉, An amorphous powder

[α]_D²⁴: +29.5 (c 0.21, MeOH)

mp 240.5–242.5°C

IR: ν_{\max} 3400, 2935, 1733, 1691, 1089, 1045 cm⁻¹

HR-FAB-MS (negative ion mode): m/z 953.4757 [M-H]⁻

¹H-NMR (Pyridine-*d*₅, 600 MHz): δ 9.90 (s, H-23), 6.06 (br s, Gal-H-1), 5.44 (s, H-12), 5.17 (d, $J = 7.62$ Hz, Gal H-1), 4.97 (br s, GalH-2), 4.92 (m, Gal H-5), 4.82 (d, $J = 7.20$ Hz, GlcA H-1), 4.55 (dd, $J = 9.33, 0.33$ Hz, Gal H-3), 4.52 (m, $J =$ Hz, GlcA H-4), 4.52 (m, Gal H-4), 4.46 (m, GlcA H-5), 4.46 (m, Gal H-6a), 4.43 (m, Gal H-2), 4.42 (m, Gal H-6b), 4.36 (t, $J = 9.33$ Hz, Gal H-4), 4.27 (t, $J = 7.92$ Hz, GlcA H-2), 4.22 (t, $J = 8.73$ Hz, GlcA H-3), 4.00 (dd, $J = 9.51, 3.27$ Hz, Gal-H-3), 3.95 (dd, $J = 11.82, 4.44$ Hz, H-3), 3.90 (t, $J = 6.24$ Hz, Gal H-5), 3.27 (dd, $J =$

13.65, 3.70 Hz, H-18), 2.12 (m, H-2a), 2.08 (m, H-15a), 2.08 (m, H-16a), 2.03 (m, H-7a), 1.94 (m, H-16b), 1.84 (m, H-11), 1.82 (m, H-7b), 1.81 (m, H-2b), 1.78 (m, H-19a), 1.66 (m, H-9), 1.66 (d, $J = 6.12$ Hz, Gal-H-6), 1.44 (m, H-21a), 1.41 (m, H-22a), 1.40 (m, H-6a), 1.37 (s, H-24), 1.36 (m, H-5), 1.35 (m, H-1a), 1.27 (m, H-19b), 1.25 (s, H-27), 1.21 (m, H-21b), 1.13 (m, H-22b), 1.12 (m, H-15b), 1.01 (s, H-30), 0.96 (s, H-29), 0.96 (m, H-6b), 0.93 (s, H-26), 0.82 (m, H-1b), 0.76 (s, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (Pyridine- d_5 , 150 MHz): δ 210.9 (C-23), 180.6 (C-28), 172.8 (GlcA C - 6), 145.3 (C-13), 122.7 (C-12), 105.0 (Gal C-1), 104.4 (GlcA C-1), 103.9 (Rha C-1), 85.4 (C-3), 85.4 (GlcA C-3), 79.1 (GlcA C-2), 78.1 (GlcA C-4'), 77.3 (Gal C-5), 75.7 (Gal C-3), 74.4 (Rha C-4), 73.6 (Gal C-2), 73.3 (Rha C-3), 72.9 (Rha C-2), 71.9 (GlcA C -5), 70.9 (Rha C-5), 70.5 (Gal C-4), 62.3 (Gal C-6), 55.6 (C-4), 49.3 (C-5), 48.3 (C-9), 47.2 (C-17), 46.9 (C-19), 42.6 (C-14), 42.5 (C-18), 40.5 (C-8), 38.5 (C-1), 36.7 (C-10), 34.7 (C-21), 33.8 (C-29), 33.7 (C-7), 33.0 (C-22), 31.5 (C-20), 28.7 (C-15), 26.6 (C-27), 25.9 (C-2), 24.3 (C-30), 24.2 (C-11), 24.1 (C-16), 21.0 (C-6), 19.0 (Gal C-6), 17.8 (C-26), 16.1 (C-25), 11.7 (C-24)

Table 3. ^{13}C - and ^1H -NMR spectroscopic data of aglycon for compound **1** (in Pyridine- d_5)^{a)}

Position	^{13}C (δ) ^{b)}	^1H (δ) ^{c)}
1	38.5	0.82/1.35
2	25.9	1.81/2.12
3	85.4	3.95
4	55.6	-
5	49.3	1.36
6	21.0	1.40/0.96
7	33.7	1.82/2.03
8	40.5	-
9	48.3	1.66
10	36.7	-
11	24.2	1.84
12	122.7	5.44
13	145.3	-
14	42.6	-
15	28.7	1.12/2.08
16	24.1	1.94/2.08
17	47.2	-
18	42.5	3.27
19	46.9	1.27/1.78
20	31.5	-
21	34.7	1.21/1.44
22	33.0	1.13/1.41
23	210.9	9.9
24	11.7	1.37
25	16.1	0.76
26	17.8	0.93
27	26.6	1.25
28	180.7	-
29	33.8	0.96
30	24.3	1.01

^{a)} The assignments were based on ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC, HMBC, TOCSY and NOESY, ^{b)} 150 MHz for ^{13}C -NMR, ^{c)} 600 MHz for ^1H -NMR

Table 4. ^{13}C - and ^1H -NMR spectroscopic data of sugar moieties for compound **1** (in Pyridine- d_5)^{a)}

Position	^{13}C (δ) ^{b)}	^1H (δ) ^{c)}
glucuronic acid		
1	104.4	4.82 (d, 7.2)
2	79.1	4.27 (t, 7.9)
3	85.4	4.22 (t, 8.7)
4	71.9	4.46 (m)
5	78.1	4.52 (m)
6	172.8	
galactose		
1	105.0	5.17 (d, 7.6)
2	73.6	4.43 (m)
3	75.7	4.00 (dd, 9.5, 3.3)
4	70.5	4.52 (m)
5	77.3	3.90 (t, 6.2)
6	62.3	4.45 (m) 4.53 (m)
rhamnose		
1	103.9	6.06 (br s)
2	72.9	4.97 (br s)
3	73.3	4.55 (m)
4	74.4	4.36 (t, 9.3)
5	70.9	4.92 (m)

^{a)} The assignments were based on ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC, HMBC, TOCSY and NOESY, ^{b)} 150 MHz for ^{13}C -NMR, ^{c)} 600 MHz for ^1H -NMR

3.4. 화합물 2의 분리 및 구조분석

목별자 추출물의 *n*-BuOH 분획을 flash purification system과 RP-HPLC (YMC J'Sphere ODS-H80, 150 mm × 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd.; flow rate of 2 mL/min; AcCN-H₂O (29:71, 0.1% trifluoroacetic acid))에 적용하여 화합물 2를 분리 및 정제하였으며, 아래와 같이 구조분석을 위한 데이터를 확보하였다.

Compound 2

C₄₈H₇₄O₂₀, White amorphous powder

[α]_D²⁴: +4.91 (c 0.3, MeOH); mp 216.5–217.5 °C

IR: ν_{max} 3417, 2943, 1718, 1078, 1044 cm⁻¹

High Resolution (HR)-FAB-MS (negative ion mode): *m/z* 969.4686 [M-H]⁻

¹H-NMR (Pyridine-*d*₅, 600 MHz): δ 9.87 (s, H-23), 6.06 (br s, Rha-H-1), 5.60 (br s, H-12), 5.23 (br s, H-16), 5.17 (d, *J* = 7.62 Hz, Gal-H-1), 4.97 (br s, Rha-H-2), 4.92 (m, Rha-H-5), 4.83 (d, *J* = 7.20 Hz, GlcA-H-1), 4.55 (dd, *J* = 9.33, 3.33 Hz, Rha-H-3), 4.53 (m, GlcA-H-4), 4.51 (m, Gal-H-4), 4.46 (m, H- GlcA-5), 4.46 (m, Gal-H-6), 4.43 (m, Gal-H-2), 4.42 (m, Gal-H-6b), 4.35 (t, *J* = 9.33 Hz, Rha-H-4), 4.27 (t, *J* = 7.92 Hz, GlcA-H-2), 4.22 (t, *J* = 8.73 Hz, GlcA-H-3), 4.00 (dd, *J* = 9.63, 3.33 Hz, Gal-H-3), 3.97 (d, *J* = 4.98 Hz, H-3), 3.90 (t, *J* = 6.24 Hz, Gal-H-5), 3.60 (dd, *J* = 14.25, 4.05 Hz, H-18), 2.83 (m, H-19), 2.51 (m, H-21), 2.43 (m, H-22),

2.31 (m, H-15), 2.25 (m, H-22b), 2.15 (m, H-2), 1.93 (m, H-11), 1.83 (m, H-9), 1.83 (m, H-2b), 1.80 (s, H-27), 1.68 (m, H-15b), 1.67 (d, $J = 6.36$ Hz, Rha-H-6), 1.54 (m, H-7), 1.47 (s, H-24), 1.40 (m, H-1), 1.38 (m, H-5), 1.38 (m, H-6b), 1.38 (m, H-19b), 1.38 (m, H-21b), 1.19 (m, H-7b), 1.18 (s, H-29), 1.07 (s, H-30), 0.96 (s, H-26), 0.94 (m, H-6), 0.89 (m, H-1b), 0.79 (s, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (Pyridine- d_5 , 150 MHz): δ 210.7 (C-23), 180.5 (C-28), 172.8 (C-GlcA-6), 145.7 (C-13), 122.6 (C-12), 105.0 (C-Gal-1), 104.4 (GlcA-C-1), 103.9 (Rha-C-1), 85.3 (C-3), 85.3 (C-GlcA-3), 79.1 (C-GlcA-2), 78.1 (C-GlcA-4), 77.3 (Gal-C-5), 75.7 (Gal-C-3), 75.2 (C-16), 74.4 (Rha-C-4), 73.6 (Gal-C-2), 73.3 (Rha-C-3), 72.9 (Rha-C-2), 71.9 (C-GlcA-5), 70.9 (Rha-C-5), 70.5 (Gal-C-4), 62.3 (Gal-C-6), 55.6 (C-4), 49.3 (C-17), 49.3 (C-5), 47.8 (C-19), 47.5 (C-9), 42.6 (C-14), 41.9 (C-18), 40.6 (C-8), 38.6 (C-1), 36.7 (C-10), 36.7 (C-21), 36.6 (C-15), 33.8 (C-29), 33.4 (C-22), 33.3 (C-7), 31.6 (C-20), 27.7 (C-27), 25.9 (C-2), 25.2 (C-30), 24.2 (C-11), 21.0 (C-6), 19.0 (Rha-C-6), 17.9 (C-26), 16.2 (C-25), 11.7 (C-24)

Table 5. ^{13}C - and ^1H -NMR spectroscopic data of aglycon for compound **2** (in Pyridine- d_5)^{a)}

Position	^{13}C (δ) ^{b)}	^1H (δ) ^{c)}
1	38.6	0.89/1.40
2	25.9	1.83/2.15
3	85.3	3.97
4	55.6	-
5	49.3	1.38
6	21.0	1.38/0.94
7	33.3	1.19/1.54
8	40.6	-
9	47.5	1.83
10	36.7	-
11	24.2	1.93
12	122.6	5.6
13	145.7	-
14	42.6	-
15	36.6	1.68/2.31
16	75.2	5.23
17	49.3	-
18	41.9	3.6
19	47.8	1.38/2.83
20	31.6	-
21	36.7	1.38/2.51
22	33.4	2.25/2.43
23	210.7	9.87
24	11.7	1.47
25	16.2	0.79
26	17.9	0.96
27	27.7	1.8
28	180.5	-
29	33.9	1.18
30	25.2	1.07

^{a)} The assignments were based on ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC, HMBC, TOCSY and NOESY, ^{b)} 150 MHz for ^{13}C -NMR, ^{c)} 600 MHz for ^1H -NMR

Table 6. ^{13}C - and ^1H -NMR spectroscopic data of sugar moieties for compound **2** (in Pyridine- d_5)^{a)}

Position	^{13}C (δ) ^{b)}	^1H (δ) ^{c)}
glucuronic acid		
1	104.4	4.83 (d, 7.2)
2	79.1	4.27 (t, 7.9)
3	85.3	4.22 (t, 8.7)
4	71.9	4.46 (m)
5	78.1	4.53 (m)
6	172.8	
galactose		
1	105.0	5.17 (d, 7.6)
2	73.6	4.43 (m)
3	75.7	4.00 (dd, 9.6, 3.3)
4	70.5	4.51 (m)
5	77.3	3.90 (t, 6.2)
6	62.3	4.44 (m)
		4.53 (m)
rhamnose		
1	103.9	6.06 (br s)
2	72.9	4.97 (br s)
3	73.3	4.55 (m)
4	74.4	4.35 (t, 9.3)
5	70.9	4.92 (m)

^{a)} The assignments were based on ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC, HMBC, TOCSY and NOESY, ^{b)} 150 MHz for ^{13}C -NMR, ^{c)} 600 MHz for ^1H -NMR

3.5. 화합물 3의 분리 및 구조분석

목별자 추추물의 *n*-BuOH 분획을 flash purification system과 RP-HPLC (YMC J'Sphere ODS-H80, 150 mm × 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd.; flow rate of 2 mL/min; AcCN-H₂O (29:71, 0.1% trifluoroacetic acid))에 적용하여 화합물 3을 분리 및 정제하였으며, 아래와 같이 구조분석을 위한 데이터를 확보하였다.

Compound 3 (Momordica saponin I)

C₄₈H₇₄O₂₀, White amorphous powder

$[\alpha]_D^{24}$ -15.95 (c = 0.2, MeOH-H₂O (1:2))

mp 240.5–242.5 °C

IR: ν_{\max} 3600-3200 (OH), 3000-2800 (CH₃, CH₂), 1780-1700 (-COOR), 1670-1570 (-COO-), 1150-1000 (C-O-) cm⁻¹

High Resolution (HR)-FAB-MS (negative ion mode): m/z 1671.7264 [M-H]⁻

¹H-NMR (Pyridine-*d*₅-D₂O (1:1), 900 MHz): δ 9.79 (s, H-23), 5.86 (d, J = 8.1 Hz, anomeric), 5.82 (br s, anomeric), 5.75 (br s, anomeric), 5.29 (d, J = 8.1 Hz, anomeric), 5.26 (d, J = 8.1 Hz, anomeric), 5.13 (d, J = 8.1 Hz, anomeric), 5.02 (d, J = 7.2 Hz, anomeric), 4.88 (d, J = 6.3 Hz, GlcA-H-1), 1.73 (d, J = 6.3 Hz, CH₃, sugar), 1.64 (d, J = 5.4 Hz, CH₃, sugar), 1.55 (d, J = 6.3 Hz, CH₃, sugar), 1.50 (s, CH₃), 1.28 (s, CH₃), 1.03 (s, CH₃), 0.99 (s, CH₃), 0.94 (s, CH₃), 0.92 (s, CH₃)

^{13}C -NMR (Pyridine- d_5 - D_2O (1:1), 225 MHz): δ 213.4 (C-23), 179.4 (C-28), 177.7 (GlcA-H-6), 145.7 (C-13), 124.4 (C-12), 106.7 (anomeric), 106.2 (anomeric), 106.1 (anomeric), 105.3 (anomeric), 104.9 (anomeric), 104.3 (anomeric), 103.3 (anomeric), 96.6 (Fuc-H-1), 88.7, 87.0 (GlcA-C-1), 86.4, 83.8, 80.2, 79.6, 79.5, 78.6, 78.7, 78.4, 77.2, 76.9, 76.4, 75.7, 75.7, 75.0, 74.2, 74.1, 73.5, 73.3, 72.3, 72.3, 71.9, 72.0, 70.8, 70.6, 68.0, 63.9, 63.7, 63.4, 57.5, 49.9, 49.5, 49.0, 48.1, 44.0, 43.6, 41.8, 39.9, 37.7, 36.4, 35.6, 34.9 (CH_3), 34.2, 34.0, 32.4, 32.4, 29.9, 27.7 (CH_3), 26.6, 25.4 (CH_3), 25.1, 22.4, 21.7, 20.9, 20.4 (CH_3 , sugar), 19.5 (CH_3 , sugar), 19.1 (CH_3), 18.3 (CH_3 , sugar), 17.7, 17.5 (CH_3), 15.7, 12.4 (C-24)

3.6. 화합물 1과 2의 당 분석

화합물 1 과 2 의 당 분석을 위해 기존의 문헌의 방법과 같은 방법으로 GC-MS 에 적용하여 분석하였다 (Yoon *et al.*, 2007). [Capillary column: BPX-50 (0.25 mm \times 3 m; SGE, Melbourne, Australia), detector: flame ionization detector (FID), column temperature: 210°C, injector temperature: 270°C, detection temperature: 300°C, carrier gas: He (2.0 kg/cm)]

화합물 1 과 2 의 산가수물은 trimethylsilylated 된 표준 물질(D-galactose, D-glucuronic acid 및 L-rhamnose)의 GC-MS 상의 retention time 과 비교하여 검증하였다.

4. 위염 관련 동물 모델 및 기전 연구

4.1. 에탄올 유발 위염 모델

에탄올 유발 위염 모델은 에탄올에 의해 발생하는 급성 위점막 손상 여부를 측정하는 모델로 아래와 같은 시험 방법으로 효능을 평가하였다.

랫드를 18시간 동안 절식시킨 후 경구투여용 랫드 존데를 이용하여 control, 시험물질, 대조물질의 각각의 용량을 경구로 투여하였다. 경구투여 1 시간 후에 위점막 손상 유발인자로서 100% ethanol 5 mL/kg를 경구투여 하고 그로부터 6시간 후에 ether 마취 하에 치사 시킨 후, 개복하여 위를 적출하였다. 적출한 위를 수술용 가위를 이용하여 바깥쪽 들레를 따라 반쯤 절개한 후 안의 내용물을 saline으로 세척하면서 깨끗이 제거하였다. 적당한 크기의 코르크판에 위의 점막부분이 위를 향하게 하고 팽팽하게 펼치면서 핀으로 고정시켰다. 위점막 손상 정도는 숙련된 전문가를 통해 아래와 같은 gross ulcer index 식에 따라 평가하였다 (Nam *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2004).

$$(\text{number of type I lesions}) + (\text{number of type II lesions}) \times 2 + (\text{number of type II lesions}) \times 3$$

- Type I: 부종, 충혈 또는 한 군데 점막하의 점모양의 출혈 존재
- Type II: 작은 미란을 수반하는 점막하의 출혈 병변 존재
- Type III: 미란과 침습성 병변을 수반하는 깊은 궤양 존재

4.2. 디클로페낙 유발 위염 모델

디클로페낙 유발 위염 모델은 NSAID로 인한 급성 위점막의 손상을 효능을 평가하는 모델로 아래와 같은 시험 방법으로 효능을 평가하였다.

랫드를 18시간 동안 절식시킨 후 경구투여용 랫드 존데를 이용하여 control, 시험물질, 대조물질의 각각의 용량을 경구로 투여하였다. 경구투여 1 시간 후에 디클로페낙을 40 mg/kg로 경구투여 하고 6 시간 후에 ether 마취 하에 치사 시킨 후 개복하여 위를 적출하였다. 적출한 위를 수술용 가위를 이용하여 바깥쪽 둘레를 따라 반쯤 절개한 후 안의 내용물을 saline으로 washing하면서 깨끗이 제거하였다. 적당한 크기의 코르크판에 위의 점막부분이 위를 향하게 하고 팽팽하게 펼치면서 핀으로 고정시켰다. 위점막 손상 정도는 숙련된 전문가를 통해 아래와 같은 gross ulcer index 식에 따라 평가하였다 (Nam *et al.*, 2005; Urushidani *et al.*, 1977).

$$(\text{number of type I lesions}) + (\text{number of type II lesions}) \times 2 + (\text{number of type II lesions}) \times 3$$

- Type I: 부종, 출혈 또는 한 군데 점막하의 점모양의 출혈 존재
- Type II: 작은 미란을 수반하는 점막하의 출혈 병변 존재
- Type III: 미란과 침습성 병변을 수반하는 깊은 궤양 존재

4.3. *H. pylori* 유발 만성 위염 모델

실제 임상적으로 위점막 손상의 가장 중요한 원인인 세균인 *H. pylori*에 의해 유발되는 만성 위점막 손상을 측정하는 모델로 아래와 같은 시험 방법으로 효능을 평가하였다.

마우스를 18시간 동안 절식시킨 후 *H. pylori* (suspension at 3.2×10^9 CFU/0.4 mL/mouse)를 경구 투여 하여 접종하였다. 시험물질과 vehicle (2% Tween 80)을 *H. pylori*를 접종한 후 1시간 시점에서 경구투여 하며, 이를 7일간 매일 경구투여 하였다. 대조물질 (omeprazole 1 mg/kg + clarithromycin 10 mg/kg in combination)도 시험물질도 하루에 한번씩 일주일간 경구 투여한다. 감염 후 8일이 되는 시점 (마우스를 overnight 절식)에 마우스를 치사 시킨 후 회복하여 위를 적출하였다. 적출한 위를 수술용 가위를 이용하여 바깥쪽 둘레를 따라 반쯤 절개한 후 안의 내용물을 saline으로 washing하면서 깨끗이 제거하였다. 적당한 크기의 코르크판에 위의 점막부분이 위를 향하게 하고 팽팽하게 펼치면서 핀으로 고정시켰다. Ulceration score는 점막의 손상도에 따라 4단계로 평가하였다 (0 = normal appearance, 1 = mild red spots, 2 = moderate red spots and/or hemorrhage spots, 3 = marked hemorrhage spots) (Marchetti *et al.*, 1995).

4.4. Alcian Blue-Staining of Gastric Mucosal

랫드에 시험약물을 경구 투여한 후 30분에 에탄올 1.5 mL을 경구 투여하였다. 1시간 후 랫드를 치사 시킨 다음 위를 적출하여 위점막의

일부를 취한 후 ice-cold 0.025 M Sucrose로 씻어내었다. 씻어낸 위점막 부위를 세절하여, 0.16 M of sucrose buffered with 0.05 M of sodium acetate(pH 5.8) 에 녹여 있는 0.1% alcian blue에 2시간 동안 담가 염색시켰다. 결합되지 않은 염색액은 0.25 M sucrose로 15분 내지 45분 동안 깨끗이 씻어 내었다. 염색된 위점막을 현미경으로 관찰하여 정성적으로 평가하였다 (Kitagawa *et al.*, 1986).

4.5. Croton oil 유발 Ear Edema 모델

시험물질의 항염 효과를 평가하기 위하여 아래와 같은 방법으로 시험하였다.

ICR 마우스를 미리 실험실로 옮겨 30분 이상 순화시킨 후, 시험약물과 대조약물을 경구 투여하고 빈 cage에 옮겨 1시간 동안 안정화시켰다. 경구 투여 1시간 후 마우스를 왼손으로 보정한 뒤 아세톤에 용해시킨 2.5 % croton oil을 오른쪽 귀의 안쪽과 바깥쪽에 각각 pipette (PIPETMAN® P20)을 이용하여 12.5 μ l씩 고르게 도포한 후 입으로 불어 acetone이 휘발되도록 하였다. 1군당 분주된 1개의 발염제 tube를 사용하였다. 발염 4시간 후 ICR mouse를 ether chamber에 넣고 과마치사 시켰다. 과마치사 시킨 ICR mouse를 thickness gauge로 속도변화법을 이용해 왼쪽, 오른쪽의 순서로 양쪽 귀의 두께를 측정하였다. 오른쪽 귀의 두께에서 왼쪽 귀의 두께를 뺀 값을 왼쪽 귀의 두께로 나누고 이 값에 100을 곱하여 발염율을 계산하였다 (Gabor, 2000; Park *et al.*, 2004).

발염율 = [(오른쪽 귀의 두께-왼쪽 귀의 두께)÷왼쪽 귀의 두께] x 100

4.6. 진통 모델 (Formalin test)

시험물질의 진통 효과를 평가하기 위하여 아래와 같은 방법으로 시험하였다.

ICR 마우스를 미리 실험실로 옮겨 30분 이상 순화시킨 후, 시험약물과 대조약물 morphine을 경구 투여하고 거울이 달린 빈 cage에 옮겨 1시간 동안 안정화시켰다. 시험 약물과 대조약 약물을 경구 투여하고, 1시간 후 29.5 gauge의 insulin syringe를 사용하여 미리 준비한 formalin을 마우스의 왼쪽 발바닥 한 가운데에 20 μ l씩 피하로 주사하고 관찰 cage로 옮겨 5분 동안 1차 측정 (early phase)하였다. 10분 후 같은 방법으로 2차 측정 (late phase)을 실시하였다. 측정은 2마리씩 진행하며, 발바닥을 핥는 시간 (licking time)을 timer로 기록하였다. Formalin 피하 주사 시 발바닥에 피가 나거나 formalin이 바깥으로 샌 경우, 개체 이상으로 인하여 관찰 cage 안에서 심하게 뛰거나 cage 밖으로 뛰어나가는 경우, 그리고 측정 결과 발바닥을 핥는 시간이 10초 이하로 formalin에 의한 통증 유발이 제대로 되지 않은 경우에는 그 개체의 데이터를 최종 결과에서 제외하였다 (Tjølsen *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2002).

4.7. 상처치료 모델 (Wound healing model)

시험물질의 상처치료 효과를 평가하기 위하여 아래와 같은 방법으로 시험하였다.

준비된 마우스를 hexobarbital (90 mg/kg, *i.p.*)로 마취시킨 후, 어깨와

등쪽 부위의 털을 깎았다. 직경 12 mm의 날카로운 편지로 근육층 (*Panniculus carnosus*)과 이에 부착된 피부조직을 제거하며, 그 즉시 시험물질(MSE 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) 또는 대조물질 (CGS-21680 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)을 국소적으로 발라 주었으며, 이후 10일 동안 하루에 한 번 지속적으로 국소적으로 발라 주었다. 상처 부위는 Image-ProPlus 기기를 사용하여 1, 3, 5, 7, 9, 11일 되는 날에 측정하였다. 상처치료율(%)을 측정하였으며, wound half-closure time (CT_{50})은 Graph-Prism 소프트웨어를 사용하여 선형회귀 방법으로 분석하였다 (Montesinos *et al.*, 1997).

4.8. CGRP 수용체 특이적 조직 Assay

MSE가 CGRP 수용체에 대한 자극을 촉진시키는지 여부를 증명하기 위해 organ bath 상에서 기넹피그 좌심방 조직을 사용하여 CGRP 수용체에 특이적인 조직 수축 시험을 수행하였다 (Ohno *et al.*, 2008). 다양한 농도의 시험물질을 기넹피그 좌심방 조직이 놓여 있는 organ bath의 반응 완충액에 혼합하였다. 수축 정도는 human $\alpha\text{-CGRP}_{(8-37)}$ (0.03 μM) (Bachem, Switzerland)과 비교하여 측정하였다.

4.9. 위장 조직 내 CGRP 분비 측정

시험물질의 CGRP 분비 효과를 평가하기 위하여 아래와 같은 방법으로 시험을 실시하였다.

7주령 랫드를 18시간 동안 절식 후, 마취 하에서 위를 적출하였다.

적출된 위를 절개하여 점막 부위가 밖으로 나오게 하였다. 점막 조직을 깨끗하게 씻은 후, 혼합 산소포화 modified Krebs-Henseleit 용액 (in mM: NaCl 110, KCl 4.7, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 1.15, NaHCO₃ 25, glucose 5.6 and HEPES 10, pH 7.4)에서 1시간 동안 안정화시켰다. 95% O₂와 5% CO₂로 포화시킨 modified Krebs-Henseleit 용액 2 mL이 포함된 시험관에 시험물질을 넣은 후 조직을 배양하였다. 30분 후 배양액을 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하였다 (Nishihara *et al.*, 2002; Inaba *et al.*, 1996). 상등액의 CGRP 농도를 CGRP linked immunoassay (SPI-Bio, Massy Cedex, France) 로 측정하였다 (Frobert *et al.*, 1999).

4.10. Somatostatin 수용체 특이적 조직 Assay

MSE가 somatostatin 수용체에 대한 자극을 촉진시키는지 여부를 증명하기 위해 organ bath 상에서 기네피그 회장 조직을 사용하여 somatostatin 수용체에 특이적인 조직 수축 시험을 수행하였다 (Feniuk *et al.*, 1993). 다양한 농도의 시험물질을 기네피그 좌심방 조직이 놓여 있는 organ bath의 반응 완충액에 혼합하였다. 수축 정도는 somatostatin₂₈ (0.03 μ M) (Sigma-Aldrich, USA)과 비교하여 측정하였다.

5. 단회 및 반복 경구투여 독성시험 연구

시험물질의 반복 경구투여 독성을 평가하기 위해 Sprague-Dawley (SD) 본 실험은 식품의약품안전청 (KFDA)에서 제공하는 의약품 독성시험 가이드라인에 따라 수행하였다. MSE 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 또는 vehicle (0.5% MC 용액)을 12.5 mL/kg 용량으로 군당 10마리 (암수 각 5마리) 랫드에 반복 경구투여한 후 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 14일간 관찰하여 대조군과 비교하였다. 14일째 되는 날 랫드를 이산화탄소로 희생시킨 후 주요 장기들의 변화를 평가하였다.

또한, 4주 반복투여 독성 연구를 위해 MSE를 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 군당 암수 각각 10마리 (회복군은 15마리)에 투여한 후, 4주 동안 사망률, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안검사 및 임상적 징후를 관찰하였다. 4주 후 랫드를 희생시켜 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 요검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적 소견을 관찰하였다.

6. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)를 이용한 Similarity Analysis 연구

일반적으로 생약은 많은 성분들이 포함되어 있으며, 다수의 성분이 상호 Synergy를 일으키며 multi-target 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Xie *et al.*, 2008). 생약의 이러한 특징 때문에 많은 성분 중에 활성이 있는 특정 성분을 가려내기가 쉽지 않으며, 결국 천연물 의약품을 표준화하고 품질을 관리하는 것이 어렵다는 것을 반증한다고 할 수 있다. 이를 극복하기 위한 노력으로 특정 지표성분이나 활성 성분들에 대해 함량을 측정하는 방법으로 품질을 관리하고 있으나 (marker approach) (Mok and Chau, 2006), 이러한 전략은 천연물 의약품에 대한 품질관리 방법으로는 부족한 것으로 여겨진다 (Li *et al.*, 2010). 이러한 문제점을 극복하기 위해 많은 노력들이 있었으며, 최근에는 HPLC, GC, NMR 등에서 얻어지는 다양한 화학적 profile을 이용하여 품질 관리를 시도하고 있다.

본 연구에서는 LC-MS를 이용하여 pattern chromatogram에 대한 유사성 분석을 시도하였으며, 유사성 분석을 위해 베트남과 중국에서 확보된 목별자 생약을 사용하였다.

유사성 분석을 위한 분석 조건은 아래와 같다.

- LC-ESI-MS: Finnigan LCQ ion-trap mass
- Column: Ascentis Express C₁₈ (150 mm × 4.6 mm)
- Flow rate: 0.3 mL/min
- Mobile phase: A, formic acid 0.1% in water; B, acetonitrile

	A (%)	B (%)
0	95	5
45	30	70
46	0	100
55	0	100
56	95	5
70	95	5

시료는 목별자 50% 에탄올 추출물을 사용하였으며, 유사성 분석을 위해 LC-MS chromatogram 상에 의미 있는 peak 들을 선정하고, 선정된 피크에 대해 상관분석법을 사용하여 분석을 시도하였다. 상관계수에 따른 유사성에 대해 자체 기준 0.9 이상으로 설정하였으며, 0.9 이상의 수치가 나올 경우 유사하다고 판단하기로 하였다.

7. 목별자 동속 식물에 대한 연구

목별자의 경우 다수의 동속 식물이 존재하여 원생약 수급 시 혼돈의 문제가 발생할 가능성이 존재하기에 이를 방지하기 위한 기초적인 연구를 수행하였다.

우선 목별자 동속식물에 대한 문헌적 연구를 실시하여 목별자가 혼돈될 가능성이 있는지에 대한 여부를 알아 보았다. 이를 위해 목별자의 계통도 및 명명에 관한 기초 조사를 실시하였고, *Momordica* 속 식물 계통도, 원산지 분류 (Historical biogeography), 아시아 지역에 분포하는 species 에 대한 근거 자료 취합, Synonyms DB (TROPICOS® database)를 통해 *Momordica* 속 식물을 조사하여 혼돈 가능성 여부를 확인하였다.

이와 더불어 실제적인 연구를 위해 목별자의 지표성분인 *Momordica* saponin I이 여주 (*M. charantia*) 추출물에 함유 되었는지에 대한 정성적 비교, 분석을 실시하였으며, 이를 통해 동속 식물과 혼돈 가능성을 배제하고자 하였다. 참고로 *Momordica* saponin I은 TradiMed (<http://www.tradimed.co.kr>) 및 문헌 조사에 의하면, 목별자의 동속 식물 및 그 외 다른 종에서는 발견되지 않는 것으로 알려졌다. 시험을 위해 UPLC를 이용한 spiking 법으로 분석하여 여주 내 MS I의 존재 유무를 확인하였고, 다시 LS-MS를 이용한 selected ion monitoring (SIM)법으로 분석하여 재확인 시험을 진행하였다. 분석 조건은 아래와 같다.

[UPLC 분석 조건]

- 분석기기: Waters UPLC
- Solvent: A: 0.1% phosphoric acid, B: acetonitrile
- 칼럼: ACQUITY UPLC[®] BEH C18, 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm
- 온도: Sample temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, column oven 30 $^{\circ}\text{C}$
- Detector: UV 210 nm

[LC-MS 분석 조건]

- HPLC System: Agilent 1100
- Solvent: A: 0.1% formic acid, B: acetonitrile
- 칼럼: YMC Hydrosphere C18, S-5 μm , 12 nm, 250 \times 4.6 mm
- 온도: Sample temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, column oven 30 $^{\circ}\text{C}$
- Detector: UV 210 nm
- MS System: LCQ Deca XP (Thermo Finnigan)
- Ionization: ESI / positive mode
- Full ms: 600.00 ~ 2000.00
- SIM ms: 1692.00 ~ 1698.00

8. 목별자 추출물의 분석법 밸리데이션 연구

목별자의 지표성분을 정량하고자 할 때 이에 대한 시험법을 통해 얻어진 데이터가 신뢰할 수 있음을 증명하고자 분석법 밸리데이션 연구를 실시하였다.

밸리데이션을 위해 사용되는 용어의 정의는 아래와 같다.

- 1) 정확성 (accuracy/trueness) : 시험방법으로 얻어진 시험결과(실측치)와 진실의 수치(참값)와 일치하는 정도를 나타내는 것이다. 정확성은 종종 기지량을 첨가한 검체의 분석에 의한 회수율로 나타내며 시험법의 정확도를 재는 척도이다.
- 2) 정밀성 (precision) : 균일한 재료로부터 다수의 검체를 시험했을 때 시험결과 간에 일치(재현성)하는 정도를 나타내는 것을 말한다. 일반적으로 시험법의 정도는 표준편차 또는 상대적 표준편차(변동계수)로 나타낸다.
- 3) 특이성 (specificity) : 특이성이란 공존이 예측되는 불순물, 분해물, 배합성분 등의 존재 하에서 이 성분들의 영향을 받지 않고 분석 대상물을 정확하고 특이적으로 측정할 수 있는 능력을 말한다.
- 4) 직선성 (linearity) : 시험법에 있어서의 직선성이란 검체 중에 함유되어 있는 분석대상물의 양 또는 농도에 대하여 직선적인 비례관계를 나타내는 능력을 말한다.

분석법 밸리데이션을 위한 분석기기 및 조건은 아래 Table 7와 같다.

Table 7. Instruments and condition for analytical method validation

Instrument	Model
UPLC sample manager	Acquity sample manager
Sample loop	Partial loop with needle overflow
Wash Solvent	Strong solvent: acetonitrile Weak solvent: H ₂ O-Acetonitrile, 90:10 (v/v)
Temperature	Column: 30 °C ± 1 °C Sample manager: 25 °C ± 3 °C
Detector	Tunable UV detector (210 nm) PDA UV detector
Manager S/W	Empower
Analytical column	ACQUITY UPLC® BEH C18, 1.7 μm
Mobile phase	0.2% phosphoric acid-acetonitrile 60:40 (v/v)
Injection volume	2.0 μL
Flow rate	0.5 mL/min

분석법 밸리데이션 시험 항목별 시험방법은 아래와 같다.

- 1) 특이성 (specificity), 분리능 (resolution), 대칭성 (symmetry) : 표준액 및 검액을 HPLC로 분석하였을 때 다른 모든 피크와 주성분의 피크가 겹치지 않음을 확인한다.
- 2) 정밀성 (precision)
 - Repeatability : 동일 검체를 최소 6회 이상 반복 조제하여 조제 간의 상대표준편차를 구하고자 한다.
 - Reproducibility : 다른 날, 다른 실험실, 다른 기기에서 동일 검체를 최소 6회 이상 반복 조제하여 조제 간의 상대준편차를 구한다.

3) 직선성과 범위 (linearity and range): 함량 분석 농도의 300% 이상의 표준액을 이동상으로 희석 제조하여 UPLC 분석하여 직선성을 확인한다.

4) 정확성 (accuracy)

- 표준액 정확성 : 약 60%, 100%, 140% 양에 해당하는 표준품을 취하여 희석액에 녹여 샘플을 제조하여 분석 후, 첨가한 표준품과 계산된 표준품의 회수량을 비교하여 회수율을 평가한다.

- 검액 정확성 : 약 60%, 100%, 140% 양에 해당하는 검체를 취하여 희석액에 녹여 샘플을 제조한 후, 제조된 샘플을 계산된 표준액에 spiking 하거나, 샘플에 계산된 표준품을 추가한 후에 각각 첨가한 표준품과 계산된 표준품의 회수량을 비교하여 회수율을 평가한다.

III. 결과 및 고찰

1. 후보생약의 선정

각종 정보[KFDA 생약종합정보시스템, 전통동양약물 데이터베이스 (TradiMed; <http://www.tradimed.co.kr>), Pubmed, 중앙대사전, 향약대사전, 동의보감, 한의사 자문]를 바탕으로 후보생약에 대한 1차 및 2차 선별을 한 결과, 15종 후보생약을 선별하였으며 선정된 리스트는 아래와 같다 (Table 8). 생약코드에서 MP는 mucosa protective를 의미한다.

Table 8. List of candidates for anti-gastritis agent

생약코드	생약명	생약코드	생약명	생약코드	생약명
MP01	포공영	MP06	진교	MP11	진피(귤)
MP02	곽향	MP07	골쇄보	MP12	백작약
MP03	인동	MP08	황금	MP13	화피
MP04	진피	MP09	목별자	MP14	과고지
MP05	백출	MP10	황련	MP15	만형자

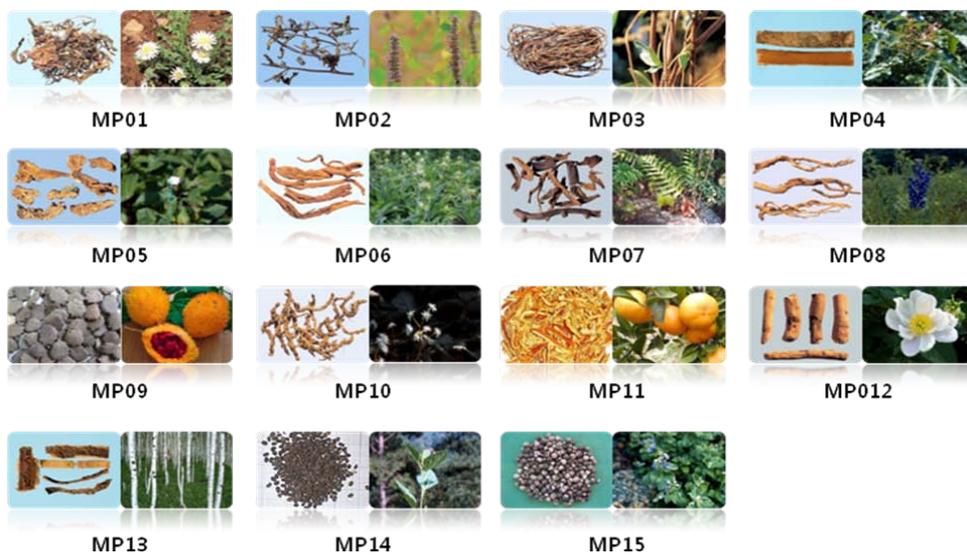


Figure 7. Pictures of the raw materials of candidates

2. 동물 위염 모델에서의 후보생약의 선별

선정된 15종 생약에 대해 디클로페낙 유발 위염 모델에서 효능을 측정된 결과 MP09 (목별자), MP12(백작약), MP15 (만형자) 50% 추출물이 상대적으로 우수한 효능을 보였으며 (Figure 8 & 9), 특히, 목별자 추출물의 경우 3.6점으로 vehicle 대비 (10.2점) 가장 우수한 효능을 나타냄을 알 수 있었다. 참고로 스크리닝 단계이기 때문에 통계적 유의성이 있는 데이터를 확보하는 목적 보다는 상대적 유의성을 가리기 위한 실험을 진행하였다. 결과는 제시하지는 않았으나 MP01~08의 경우 효능을 보이지 않았다. 이로써 MP09, MP12, MP15를 후보생약으로 선별하였고, 3종 후보에 대해 추가로 에탄올 유발 위염 모델을 수행하였다.

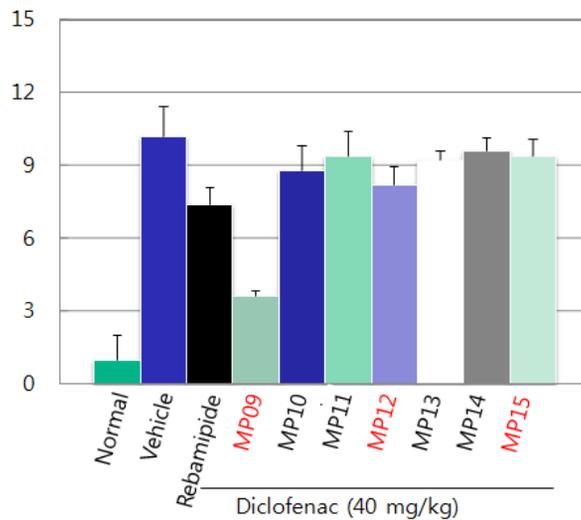


Figure 8. Gastroprotective effects of candidates (MP09~MP15) in rat model of NSAID (diclofenac)-induced acute gastritis. Results are mean ± SEM from six animals per group.

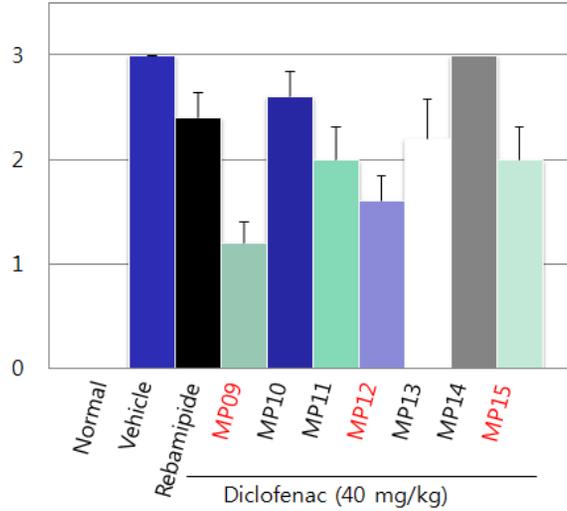


Figure 9. Gastroprotective effects of candidates (MP09~MP15) in rat model of NSAID (diclofenac)-induced acute gastritis erosion. Results are mean \pm SEM from six animals per group.

디클로페낙 유발 모델로 선정된 3종 생약에 대해 추가적으로 에탄올 유발 위염모델을 수행한 결과 MP09 (목별자) 추출물의 gastric damage score가 3.0점으로 가장 우수하였으며, vehicle 대비 (9.2점) 통계적 유의성을 나타내었다 ($P=0.031$) (Figure 10). 이러한 결과를 토대로 목별자를 향후 연구를 위한 최종 생약 후보로 선정하였다.

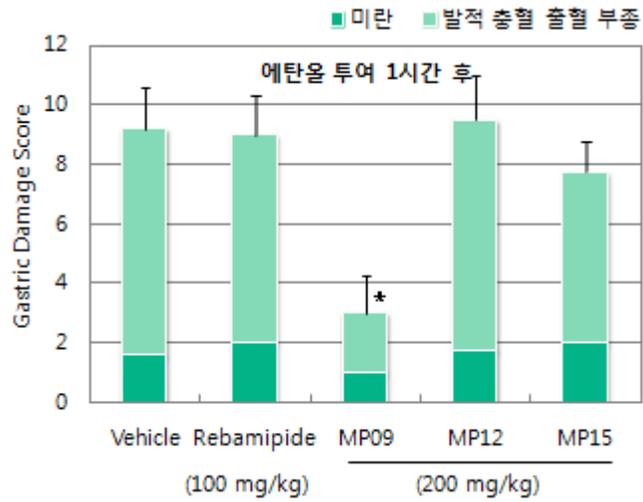


Figure 10. Gastroprotective effects of candidates (MP09, MP12, and MP15) in rat model of ethanol-induced acute gastritis. Results are mean \pm SEM from six animals per group. * $P < 0.05$ compared with vehicle group.

3. 목별자로부터 활성 분리 및 이의 구조 규명

3.1. 목별자 분획 활성 연구

선정된 목별자 생약을 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 층으로 분획하였으며, 이 중 지방성분이 많이 포함되는 것으로 판단되는 *n*-hexane 층을 제외한 EtOAc와 *n*-BuOH 층에 대해 에탄올 유발 위염 모델을 실시하였다. 본 실험에서는 유의성에 대한 변별력을 높이기 위해 100 mg/kg의 농도에서 비교하였다. 시험 결과 통계적 유의성을 보이지 않지만 *n*-BuOH층이 활성이 더 좋은 것으로 판단하여 *n*-BuOH 층에 대해 성분 연구를 실시하였으며, 이를 통해 3종의 화합물을 분리하게 되었다.

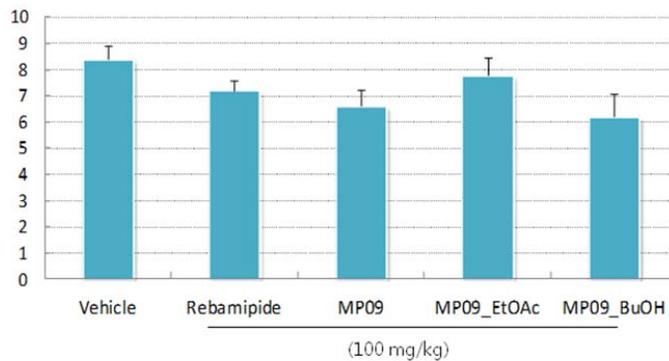


Figure 11. Gastroprotective effects of MP09, MP09 EtOAc fraction, and MP09 *n*-BuOH fraction in rat model of ethanol-induced acute gastritis. Results are mean \pm SEM from six animals per group.

3.2. 화합물 1의 구조

화합물 1은 흰색 무정형의 가루형태의 물질로서 선광도는 $[\alpha]_D^{24} +29.47$ (C=0.21, MeOH)이었으며, high-resolution (HR)-FAB-MS (negative ion mode)에서 m/z 953.4746 $[M-H]^-$ 의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{48}H_{74}O_{19}$ 으로 추정하였다.

^{13}C -NMR Spectrum (Figure 13)을 통해 48개의 carbon signal을 확인하였으며, 그 중 30개는 aglycon, 18개는 sugar moiety에서 유래된 것으로 확인하였다. 1H -NMR spectrum (Figure 14)을 통해 δ 0.76, 0.93, 0.96, 1.01, 1.25, 1.37에서 6개의 tertiary methyl proton singlet을 확인하였으며, δ 5.44 (br s)에서 olefinic proton 및 δ 9.90 (s)에서 aldehyde proton을 확인하였다. 또한, ^{13}C -NMR spectrum을 통해 δ 180.6에서 carboxyl carbon signal을 확인하였다. 이러한 데이터를 기존의 문헌과 주의 깊게 비교한 결과 화합물 1의 aglycon이 gypsogenin임을 확인할 수 있었다 (Bouguet-Bonnet *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2007). 1H -NMR에서 anomeric proton signal을 δ 4.82 (d, $J = 7.2$ Hz, GlcA-H-1), 5.17 (d, $J = 7.6$ Hz, Gal-H-1), 6.06 (br s, Rha-H-1)에서 확인하였으며, ^{13}C -NMR spectrum에서 anomeric carbon signal을 δ 104.4 (Rha C-1), 105.0 (Gal C-1), 103.9 (GlcA C-1)에서 확인하였다. NOESY spectrum을 확인한 결과, δ_H 9.90 (H-23) 피크와 3.95 (H-3) 피크 그리고 1.25 (H-27) 피크와 0.96 (H-29) 피크 사이에 강한 correlation을 보임에 따라, aldehyde group이 α -orientation을 이루고 있음을 알 수 있었다. 화합물 1을 가수분해한 후 trimethylsilylated 유도체화하여 GC-MS 분석을 한 결과, D-galactose, L-rhamnose 및 D-glucuronic acid가 존재함을 알 수 있었고,

glucuronic acid와 galactose anomeric proton의 J value가 각각 7.2 및 7.6 Hz를 보임에 따라 glucuronopyranosyl과 galactopyranosyl moiety가 β -configuration으로 되어 있음을 확인할 수 있었다. Rhamnopyranosyl moiety의 configuration의 경우 anomeric signal이 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 각각 δ 6.06 (br s) 및 δ 103.9에서 관찰됨에 따라 α -orientation으로 정하였다 (Jia *et al.*, 1998). 당과 gypsogenin과의 결합 위치는 HMBC spectrum을 통해 C-3위치임을 확인하였다 (Figure 15). 또한, 5.17 (Gal-H-1)에서의 proton signal은 δ_{C} 79.1 (GlcA-C-2)과 long range correlation이 확인되어 galactose가 glucuronic acid C-2 위치와 결합되어 있음을 알 수 있었고, δ_{H} 6.06 (Rha-H-1)과 85.4 (GlcA-C-3) signal 사이에 cross 피크를 보임에 따라 rhamnose가 glucuronic acid C-3 위치에 연결되어 있음을 확인하였다.

이상의 결과를 근거로 하여 화합물 **1**의 구조를 gypsogenin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside 로 동정하였으며, 이 화합물은 천연물에서 처음 분리, 보고되는 물질이다 (Figure 12).

Figure 12. The molecular structure of compound **1** (gypsogenin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside)

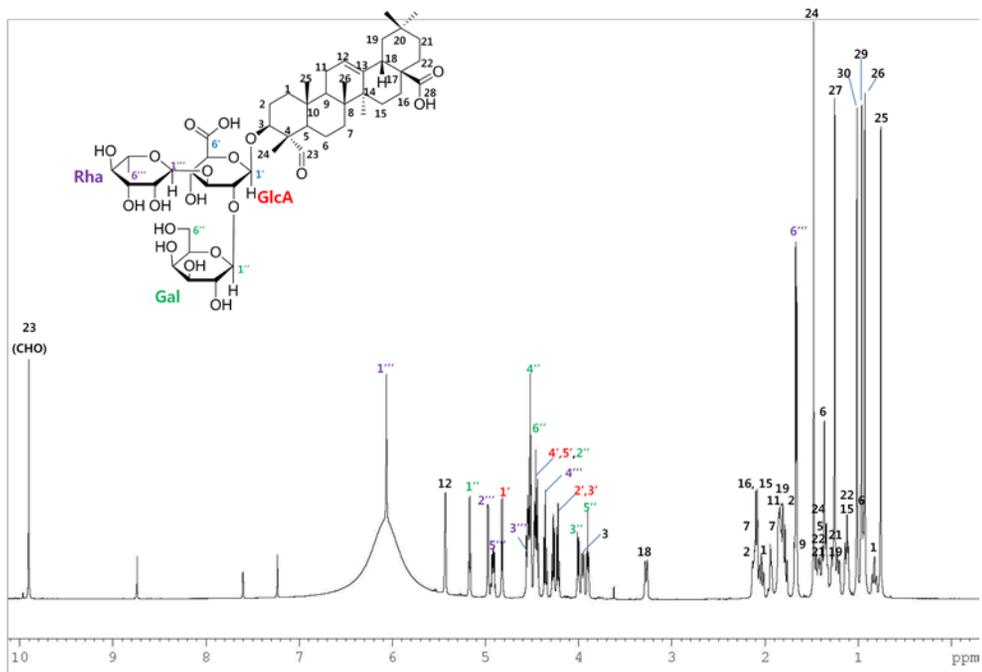


Figure 13. ¹H-NMR spectrum of compound 1 (600 MHz, Pyridine-*d*₅)

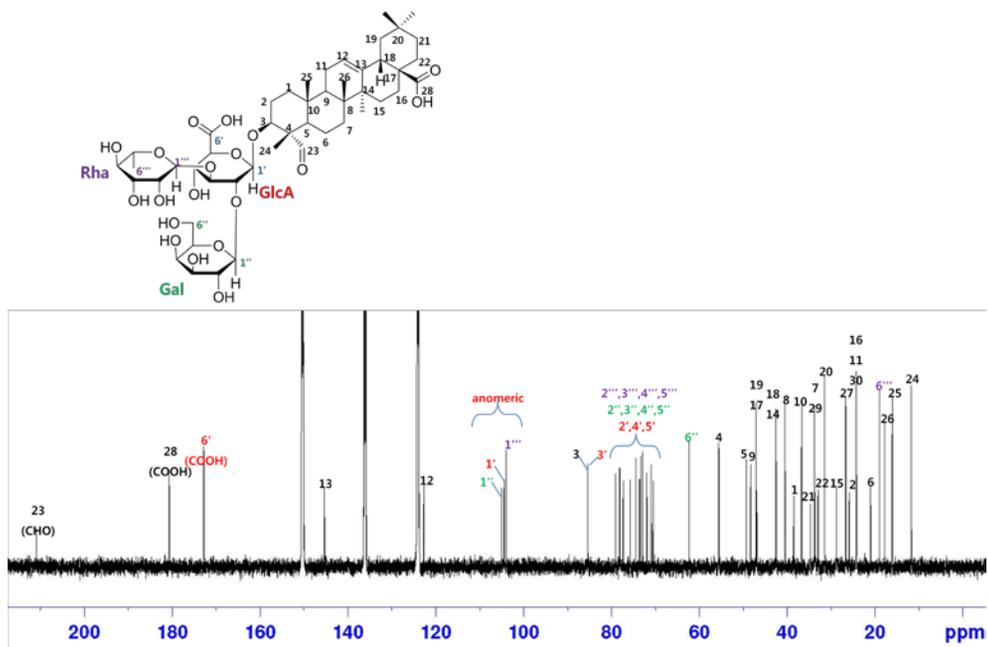


Figure 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (150 MHz, Pyridine- d_5)

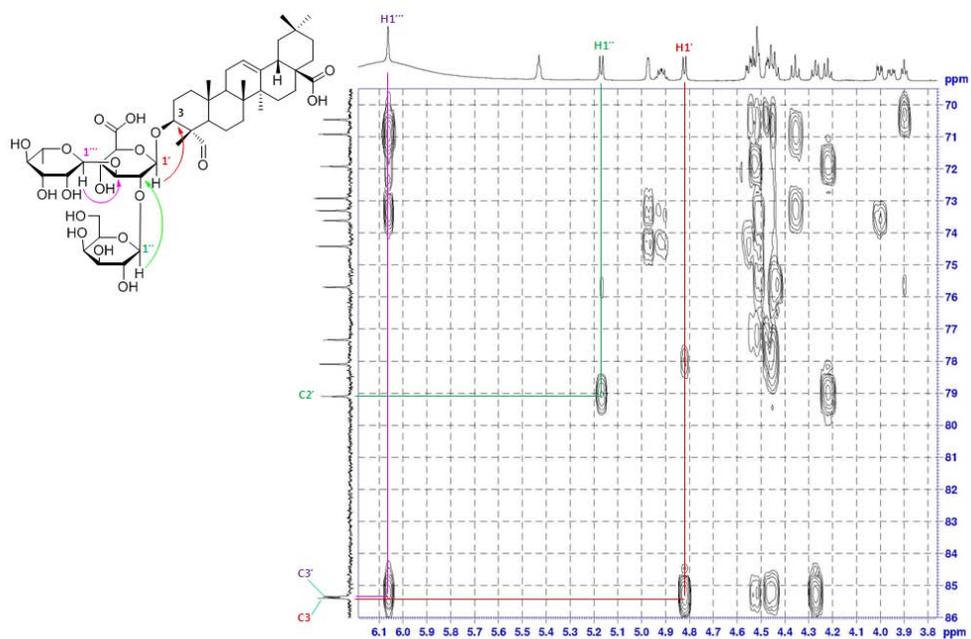


Figure 15. HMBC spectrum of compound 1

3.3. 화합물 2의 구조

화합물 2는 흰색 무정형의 가루 형태의 물질로써 선광도는 $[\alpha]_D^{24} +4.915$ (C=0.3, MeOH)이었으며, high-resolution (HR)-FAB-MS (negative ion mode)에서 m/z 969.4695 $[M-H]^-$ 의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{48}H_{74}O_{20}$ 으로 추정하였다.

^{13}C -NMR spectrum (Figure 17)을 통해 48개의 carbon signal을 확인하였으며, 그 중 30개는 aglycon, 18개는 sugar moiety에서 유래된 것으로 확인하였다. 1H -NMR spectrum (Figure 18)을 통해 δ 0.79, 0.96, 1.07, 1.18, 1.47, 1.80에서 6개의 tertiary methyl proton singlet을 δ 5.60 (br s)에서 doublet olefinic proton 및 δ 9.87 (s)에서 aldehyde proton을 확인하였으며, δ 5.23 (br s)에서 hydroxymethylene proton signal (H-16 β)을 확인하였다. 또한, ^{13}C -NMR spectrum을 통해 δ 180.5에서 carboxyl carbon signal을 확인함에 따라, 화합물 2의 aglycon이 quillaic acid임을 확인하였다 (Bouguet-Bonnet *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2006; Zheung *et al.*, 2007). 1H -NMR spectrum을 통해 δ 4.83 (d, $J = 7.20$ Hz, GlcA-H-1), 5.17 (d, $J = 7.62$ Hz, Gal-H-1), 6.06 (br s, Rha-H-1)에서 3개의 anomeric proton을 확인하였으며, 이에 해당하는 ^{13}C -NMR Spectrum에서의 anomeric carbon signal은 δ 104.4, 105.0, 103.9에서 확인하였다. 당에 의해 생성되는 모든 proton peak는 HSQC, TOCSY, ROESY, HMBC correlation을 활용하여 주의 깊게 Assign하였다. 화합물 2을 가수분해한 후 trimethylsilylated 유도체화하여 GC-MS 분석을 한 결과, D-galactose, L-rhamnose 및 D-glucuronic acid가 존재함을 알 수 있었다. Glucuronopyranosyl과 galactopyranosyl moiety의 β anomeric configuration은

$^3J_{H_1, H_2}$ coupling constant 수치 (7.1-8.0 Hz)로 확인할 수 있었다. Aglycon과 당과의 연결, 그리고 당 사이의 결합은 Figure 19에서와 같이 HMBC correlation을 통해 확인하였다. [δ_H 5.17 (Gal-H-1) with δ_C 79.1 (GlcA-C-2), δ_H 6.06 (Rha-H-1) with 85.3 (GlcA-C-3), δ_H 4.83 (GlcA-H-1) with 85.3 (C-3)]

이상의 결과를 근거로 하여 화합물 **2**을 quillaic acid-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside로 동정하였다 (Guo *et al.*, 1998). 이 화합물은 *Momordica* 속에서 처음 분리, 보고되는 물질이다.

Figure 16. The molecular structure of compound **2** (quillaic acid-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside)

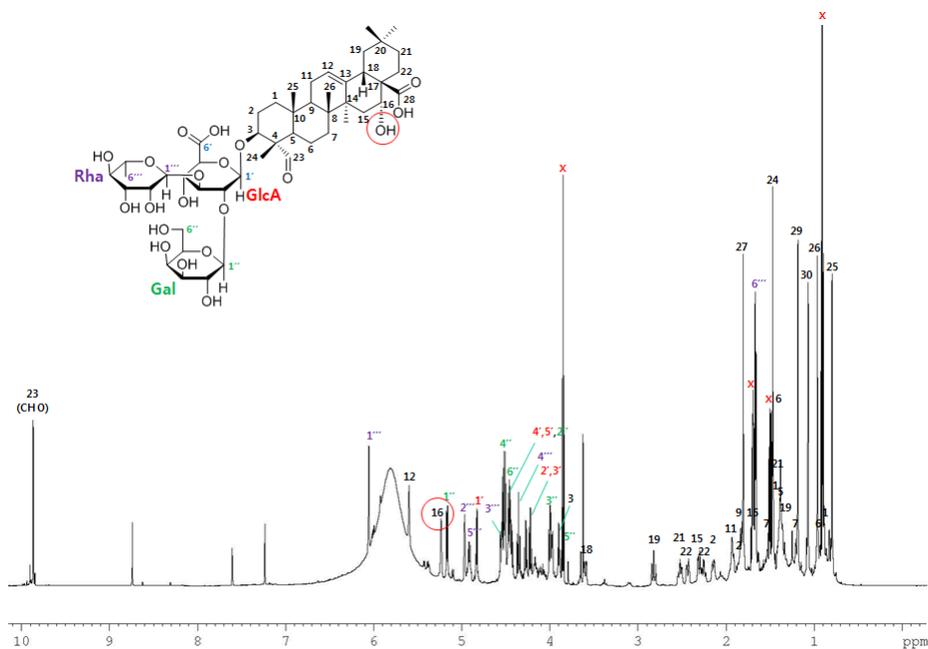


Figure 17. ¹H-NMR spectrum of compound 2 (600 MHz, Pyridine-d₅)

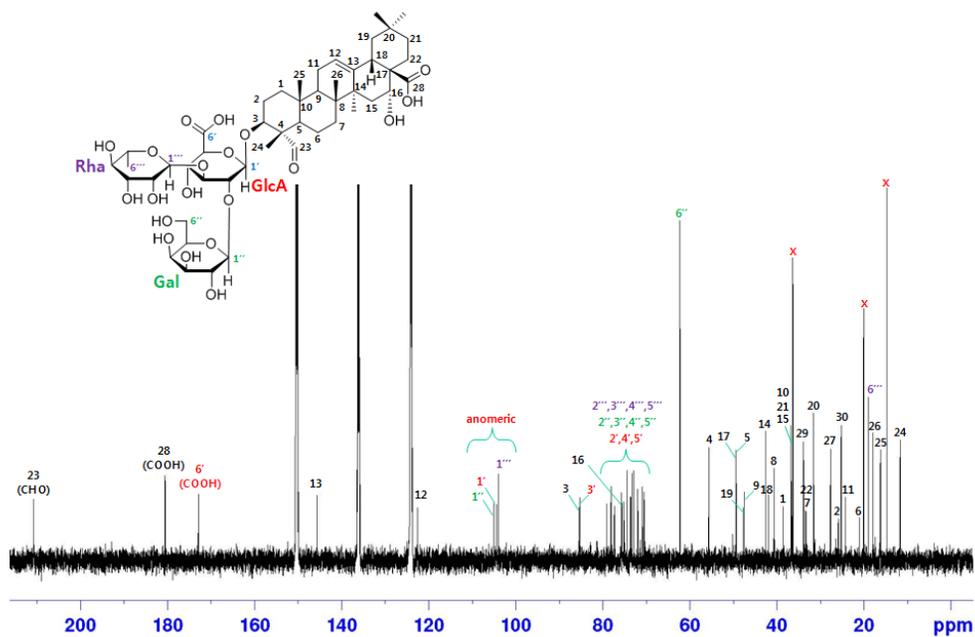


Figure 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** (150 MHz, Pyridine- d_5)

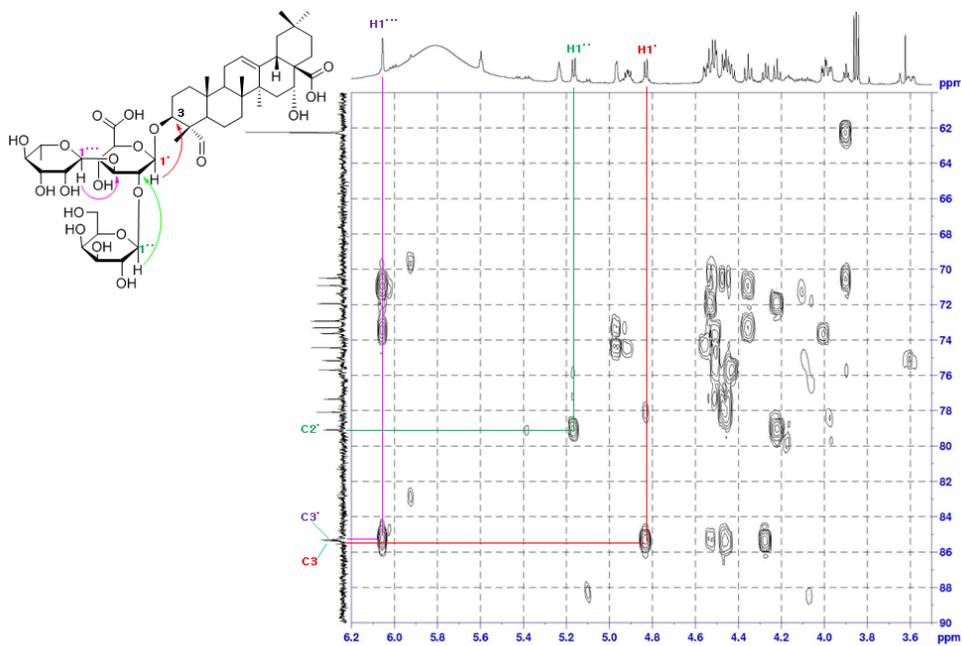


Figure 19. HMBC spectrum of compound 2

3.4. 화합물 3의 구조

화합물 3은 흰색 무정형의 화합물로서 선광도는 $[\alpha]_D^{24}$ -15.95 (C=0.2, MeOH-H₂O(1:2))이었으며, high-resolution (HR)-FAB-MS (negative ion mode)에서 m/z 1671.7264 [M-H]⁻의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 C₇₆H₁₂₀O₄₀으로 추정하였다. 용해점 mp는 240.5–242.5 °C이었으며, IR ν_{\max} 값은 3600-3200 (-OH), 3000-2800 (CH₃, CH₂), 1780-1700 (-COOR), 1670-1570 (-COO⁻), 1150-1000 (C-O⁻) cm⁻¹ 이었다.

¹³C-NMR Spectrum을 통해 76개의 carbon signal을 확인하였으며, 그 중 30개는 Algycon, 46개는 sugar moiety에서 유래된 것으로 확인하였다. ¹H-NMR spectrum을 통해 δ 0.92, 0.94, 0.99, 1.03, 1.28, 1.50에서 6개의 Tertiary methyl proton singlet을 δ 5.44 (br s)에서 doublet olefinic proton 및 δ 9.79 (s)에서 aldehyde proton을 확인하였다. 또한, ¹³C-NMR spectrum을 통해 δ 179.40에서 carboxyl carbon signal을 확인함에 따라, 화합물 2의 aglycon이 gypsogenin임을 확인하였다 (Bouguet-Bonnet *et al.*, 2002).

¹H-NMR spectrum을 통해 4.88 (d, J = 6.3 Hz, GlcA-H-1), 5.02 (d, J = 7.2 Hz, anomeric), 5.13 (d, J = 8.1 Hz, anomeric), 5.26 (d, J = 8.1 Hz, anomeric), 5.29 (d, J = 8.1 Hz, anomeric), 5.75 (br s, Rha-H-1), 5.82 (br s, Rha-H-1), 5.86 (d, J = 8.1 Hz, Fuc-H-1)에서 8개의 anomeric proton을 확인하였으며, 이에 해당하는 ¹³C-NMR spectrum에서의 anomeric carbon signal은 의 δ 104.89, 105.29, 106.68, 106.07, 106.18, 104.31, 103.31, 96.57에서 확인하였다. Aglycon C-3 및 C-28과 sugar unit과의 linkage는 HMBC correlation을 통해 확인하였다 [δ_H 4.88 (GlcA-H-1) with δ_C 86.99 (C-3), δ_H 5.86 (Fuc-H-1) with

170.40 (C-28)].

이상의 결과를 바탕으로 기존 문헌에 제시된 데이터와의 비교 및, 결과는 제시하지 않았지만, standard와의 UPLC 정성 분석을 통해 화합물 **3**을 gysogenin-3-*O*- β -D-Galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosido-28-*O*- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucofuranosyl(1 \rightarrow 3)-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopyranoside로 동정하였으며, 이는 목별자에서 이미 분리, 동정된 Momordica saponin I (MS I)으로 판명되었다 (Iwamoto *et al.*, 1985).

Figure 20. The molecular structure of compound **3** (Momordica saponin I)

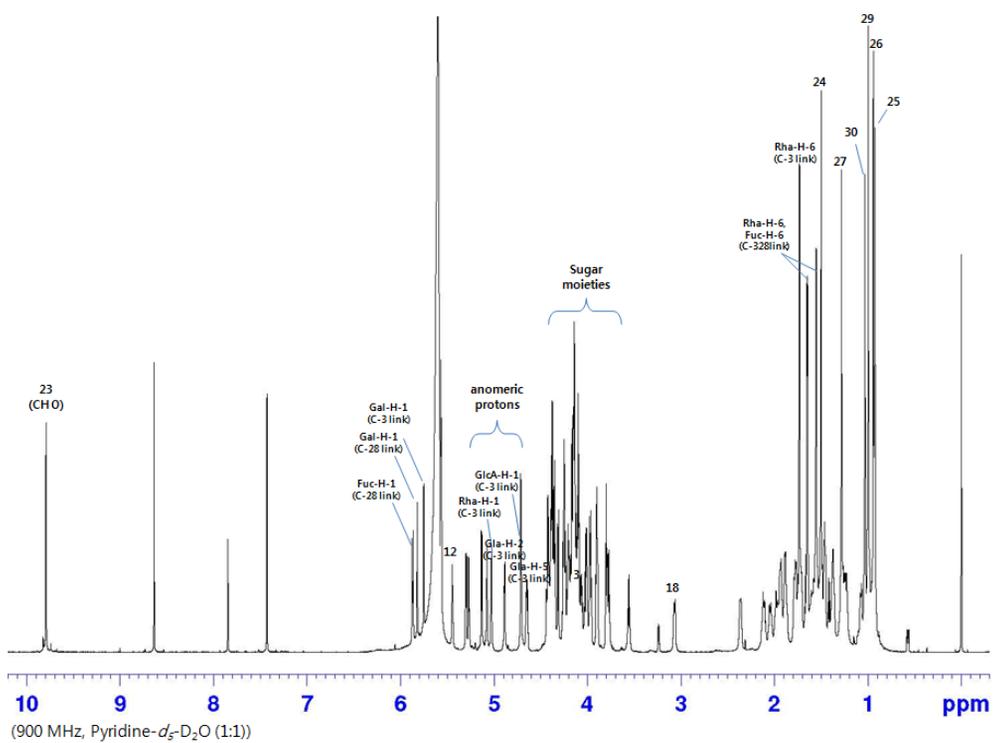


Figure 21. ¹H-NMR spectrum of compound **3** (Pyridine-*d*₅-D₂O (1:1))

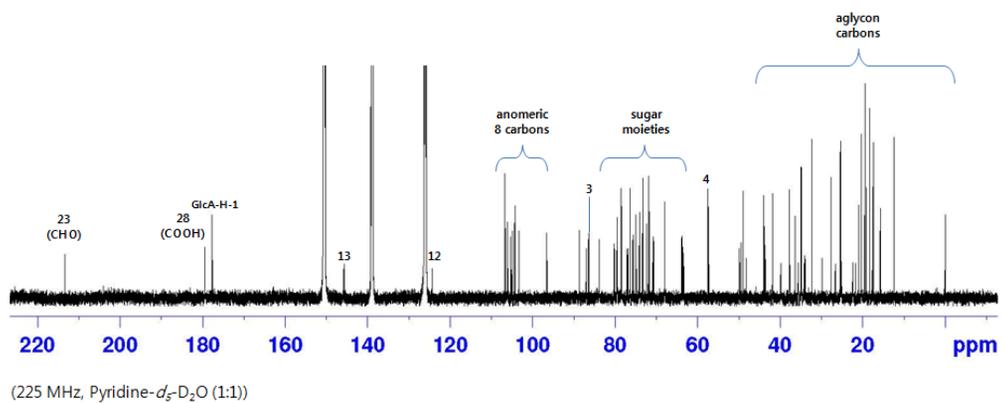


Figure 22. ¹³C-NMR spectrum of compound **3** (Pyridine-*d*₅-D₂O (1:1))

3.5. 화합물 1, 2 및 3의 활성 연구

분리된 화합물 1, 2 및 3에 대해 에탄올 유발 위염 모델에서 활성 연구를 실시하였다. *n*-BuOH 층 (100 mg/kg)과 레바미피드 (100 mg/kg)를 대조 약물로 하였으며, 화합물 1, 2 및 3은 20 mg/kg의 농도로 투여하였다. 실험 결과, 통계적 유의성을 보이지 않지만, 세가지 화합물 모두 활성이 나타나는 경향을 보였으며 통계적 유의성은 없지만 이중 화합물 3이 상대적으로 가장 좋은 효능을 보였다.

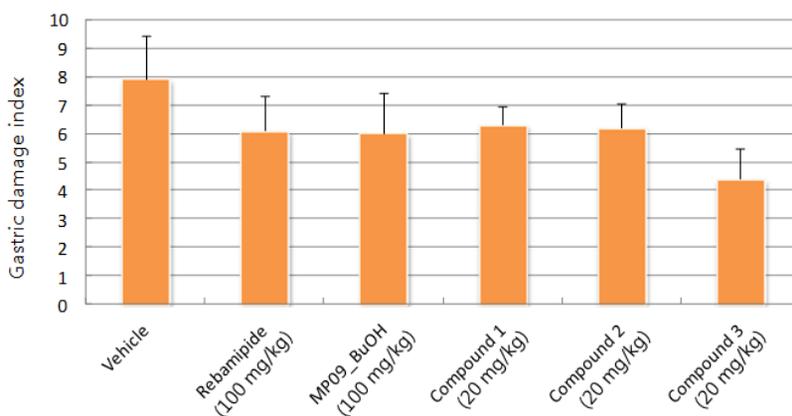


Figure 23. Gastroprotective effects of MP09 *n*-BuOH fraction, compounds 1, 2, and 3 in rat model of ethanol-induced acute gastritis. Rats were orally administrated with MP09 *n*-BuOH fraction (100 mg/kg), compounds 1, 2, and 3 (20 mg/kg) or rebamipide (100 mg/kg), and 30 minutes later, ethanol (1.5 mL) was administrated using gastric sonde. Results are mean \pm SEM from six animals per group.

하지만 화합물 **1**, **2** 및 **3**의 경우 20 mg/kg에서 활성을 나타내는 경향을 보이긴 하였으나, *n*-BuOH 분획 대비 뚜렷한 약효를 보이지 않았을 뿐만 아니라, 함량이 낮고 (화합물 **3**의 경우 수율이 원생약 대비 약 0.025%) 분리가 용이하지 않아 약효 시험을 수행하기가 어려운 단점이 있다. 이러한 단점에 의해 화합물 **1**, **2** 및 **3**을 위염치료제로 개발하는 것이 어렵다고 판단되었다. 그리하여 단일화합물 대신 추출물로 활성 연구 수행하기로 하였다. 10% 에탄올을 추출용매로 하여 향후 실험을 위한 추출물을 얻었으며, 이 추출물을 MSE (*Momordicae cochinchinensis* extract)로 명명하였다. 데이터를 제시하지는 않았지만 에탄올 유도 위염모델에서 예비실험을 실행한 결과 MSE는 *n*-BuOH 분획물과 유사한 위염 활성을 보였다. 화합물 **3** (MS I)의 경우 MSE를 대표하는 화합물로 사용하기에 적합하다고 판단하여 지표물질로 선정하였다.

4. 목별자 추출물의 급·만성 위염 치료 효능

4.1. 목별자 추출물의 에탄올 유발 위염 모델에서의 효능

MSE의 에탄올에 의해 유발되는 급성 위점막 손상에 대한 예방 효과를 확인하기 위해 랫드를 이용한 에탄올 유발 급성 위점막 손상 모델 시험을 수행한 결과, vehicle 군 대비 gastric damage index 수치를 현저히 낮추었으며 농도 의존성도 보였다 (Figure 24). 대조군인 레바미피드가 200 mg/kg에서 유의적인 효과를 보인 것과 비교할 때, 에탄올 유발 위염 모델에서는 MSE가 레바미피드 보다 더 강한 위염 예방 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

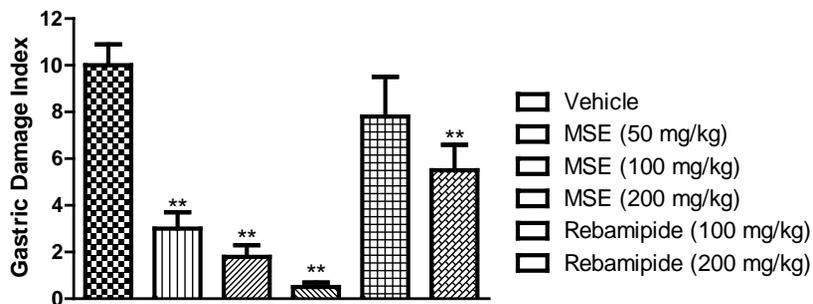


Figure 24. Comparisons of the gastric damage indices in rat models of ethanol-induced gastritis. The data shown are the means of gastric damage index induced by ethanol. Rats were given MSE at 50, 100, and 200 mg/kg or rebamipide at 100 mg/kg followed by the administration of ethanol (1.5 mL). Results are mean \pm SEM from six animals per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with vehicle group.

4.2. 목별자 추출물의 디클로페낙 유발 위염 모델에서의 효능

Non-Steroidal Anti-Inflammatory drug (NSAID)은 PG의 생성을 억제하여 강력한 항염증 작용을 발휘하는 동시에 위장관에서는 PG의 위장관 보호 기능이 감소되어 위점막의 손상을 유발하는 부작용이 있다. NSAID 약물로 유발된 위점막 손상에 대한 MSE의 보호 효능을 알아보기 위해 40 mg/kg 디클로페낙을 이용한 급성 위점막 손상 모델 시험을 수행하였다. 시험 결과, 디클로페낙으로 유발된 위점막 손상은 MSE의 전 처리에 의해 현저히 감소되었으며 위점막 손상 억제율은 200 mg/kg에서 vehicle 군 대비 각각 16%, 42%, 62%를 나타내었다. 반면 대조군인 레바미피드의 경우 두 농도 모두 효능을 나타내지 않았다 (Figure 25).

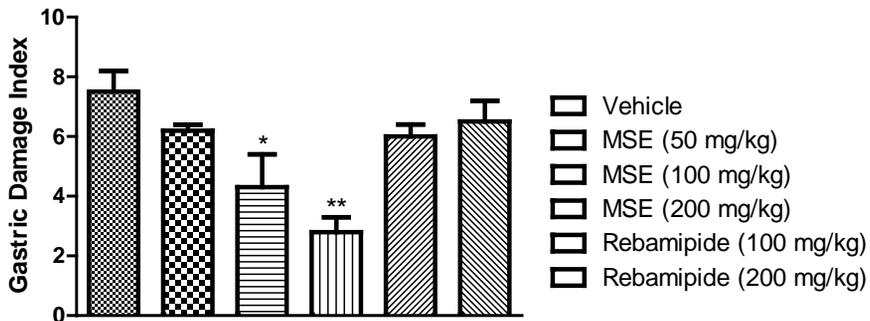


Figure 25. Comparisons of the gastric damage indices in rat models of diclofenac-induced gastritis. The data shown are the means of gastric damage index induced by diclofenac. Rats were given MSE at 50, 100, and 200 mg/kg or rebamipide at 100 mg/kg followed by the administration of diclofenac (40 mg/kg). Results are mean \pm SEM from six animals per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with vehicle group.

4.3. 목별자 추출물의 *H. pylori* 유발 위염 모델에서의 효능

이전 연구에서 MSE가 에탄올 또는 디클로페낙에 의해 유도되는 위점막 손상을 효과적으로 억제하는 효과를 확인하는 것과 더불어 실제 임상적으로 위점막 손상의 가장 중요한 원인인 *H. pylori*에 의해 유발되는 만성 위점막 손상을 억제 또는 치유하는데 있어서 MSE의 효과를 확인하였다. 실험 결과 MSE를 50, 100, 200 mg/kg의 용량으로 투여한 경우 vehicle 군 대비 위점막 손상을 각각 45, 64, 82% 억제하였으며, 200 mg/kg에서 통계적 유의성을 보였다. 반면 Omeprazole + clarithromycin 투여군은 vehicle 군 대비 위점막 손상이 55% 억제되었다 (Figure 26).

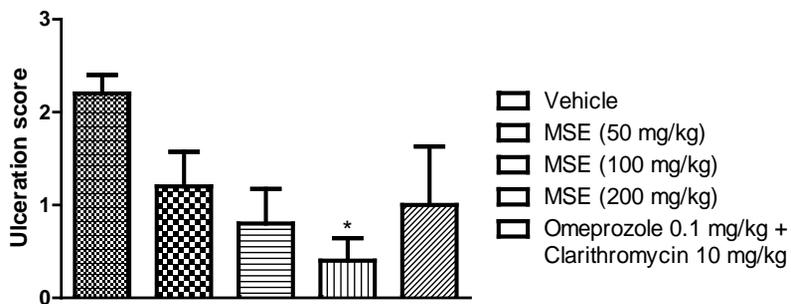


Figure 26. Comparisons of ulceration scores in mouse model of *H. pylori*-induced gastritis. Gastric damage was scored at four levels according to the degree of hemorrhage and severity of erosive lesions: 0 = normal appearance, 1 = mild red spots, 2 = moderate red spots and/or hemorrhage spots, and 3 = marked hemorrhage spots. Results are mean \pm SEM from six animals per group. * $P < 0.05$ compared with vehicle group.

4.4. 목별자 추출물의 위점액 분비 촉진 모델에서의 효능

위점막은 위산으로부터 위를 보호하는 가장 중요한 장벽이다. MSE를 처리한 군과 처리하지 않은 군에 대해 위벽에 존재하는 점막 두께를 현미경으로 분석하였는데, 위조직에 대한 조직학적 슬라이드를 비교한 결과, Figure 27에서 볼 수 있듯이 MSE를 경구 투여한 군에서의 점막 두께가 더 두꺼웠다 (Figure 27). 이는 MSE가 위점액 분비를 통해 위점막 보호에 중요한 역할을 할 수 있음을 보여주는 근거로 사료된다.

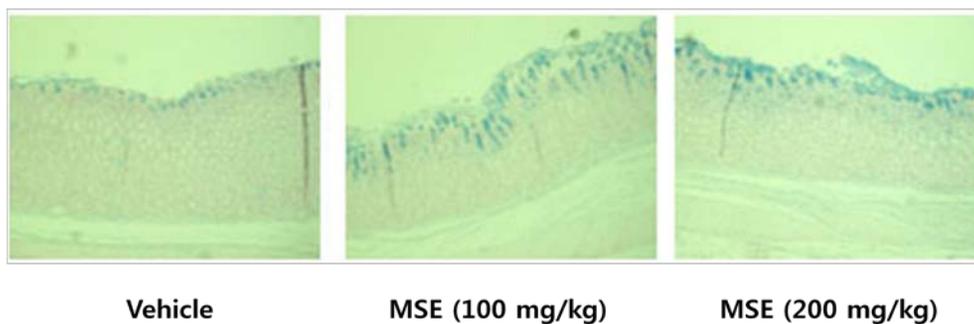


Figure 27. Histological comparison of depth of the gastric mucus between MSE-treated and water-treated rats after ethanol challenge. Rats were treated with MSE (100, 200 mg/kg) or water (control group) 30 minutes before oral administration of pure ethanol (1.5 mL). One hour after the ethanol challenge, rat's stomach was taken, sliced and stained with alcian blue dye, which acid mucopolysaccharides and glycosaminoglycans blue to bluish-green.

4.5. 목별자 추출물의 상처치료 모델에서의 효능

상피 세포의 증식과 이동 촉진 (proliferation & migration of epithelial cells)은 손상된 위점막의 회복을 촉진하므로 위염 위궤양의 치료제에 있어서 중요한 요소이면서 동시에 일반적인 상처치료의 촉진에 있어서도 매우 중요하다. 이에 따라 피부의 상처 치료에 있어서 MSE의 영향을 비교하였다.

직경 12 mm 펀치로 마우스의 등에 상처를 낸 후 MSE를 vehicle에 녹여 10일간 매일 바르면서 상처의 면적을 분석한 결과 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 용량으로 MSE를 상처에 바른 경우 wound half-closure time (CT_{50})이 각각 5.3 ± 0.1 , 5.7 ± 0.1 , 5.6 ± 0.2 day이었으나, vehicle 군의 경우 CT_{50} 은 6.9 ± 0.3 day 로서 통계적으로 유의하게 MSE를 처리한 군의 상처치유 속도가 빨라진 것을 알 수 있었다. 상처치료 과정을 촉진시키는 것으로 알려진 양성대조군 CGS-21680 (Adenosine $\text{A}_{2\text{A}}$ subtype receptor agonist; Montesinos *et al.*, 1997)을 처리한 실험군의 CT_{50} 은 5.2 ± 0.13 day로서 MSE 처리군과 유사하였다 (Figure 28). 이 실험을 통해서 MSE가 우수한 상처치료 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

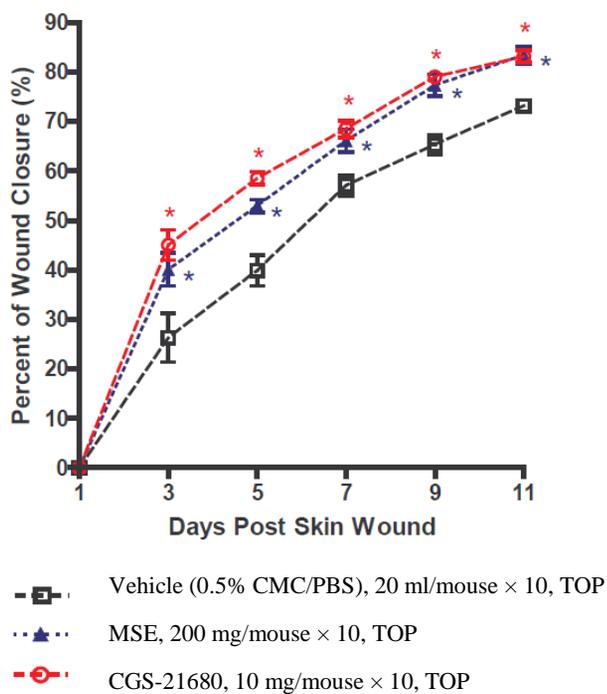


Figure 28. Time course of wound healing in mouse cutaneous injury model. Test substance was administered topically (TOP) once daily for 10 consecutive days. MSE at 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ or CGS-21680 at 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ or Vehicle (0.5% CMC/PBS) administered topically once daily for 10 consecutive days (n=5 per group). Significant differences are considered compared to vehicle at $*P < 0.05$.

4.6. 목별자 추출물의 Croton oil로 유도된 귀부종 실험 모델에서의 효능

본 연구에서는 MSE의 항염증 효과를 검증하기 위해 croton oil 유도 귀부종 실험을 수행하였다. 그 결과 MSE가 용량의존적으로 부종을 감소시키는 것이 확인되었으며 그 효과는 비교약물로 사용한 디클로페낙, 레바미피드의 효능과 동등 또는 그 이상이었다 (Figure 29). MSE의 우수한 항염증 효과는 *H. pylori*나 여러 위점막 인자 공격인자에 의해 유발되는 염증반응을 억제 함으로서 위점막 손상이 확대되는 것을 막고 신속하게 회복시키는데 매우 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참고로 “4.10. 목별자 추출물의 somatostatin 수용체 특이적 조직 assay” 결과에서 MSE가 somatostatin와의 연관 가능성이 있음을 보여 주었는데, somatostatin은 항염증과 관련된다는 여러 보고가 있다 (Markovics *et al.*, 2011; Dror *et al.*, 2008; Helyes *et al.*, 2006; Pintér *et al.*, 2006).

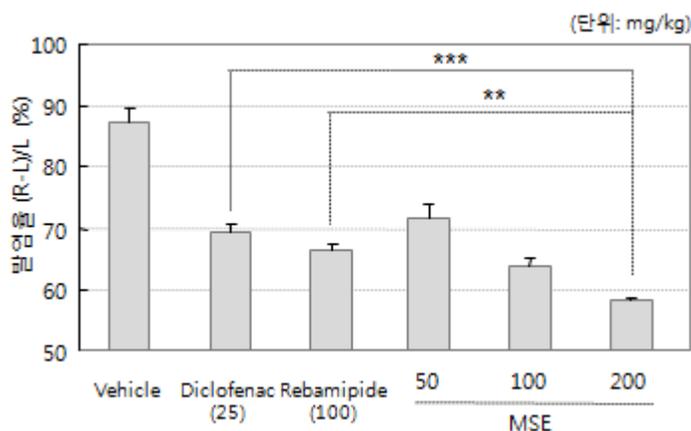


Figure 29. Anti-inflammatory effect of MSE in croton oil-induced ear edema test. Results are mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with vehicle group.

4.7. 목별자 추출물의 진통모델 (Formalin Test)에서의 효능

본 실험에서는 일반적으로 많이 사용되는 formalin test를 실시하여 MSE의 진통효과를 확인하였다. 시험 결과 formalin test의 phase 1시험에서는 양성대조약물로 사용한 morphine (30 mg/kg)이 67%의 진통효과를 보였으며 MSE는 50, 100, 200 mg/kg용량에서 18%, 33% 72%의 용량의존적인 진통효과를 보였다. 특히, MSE가 200 mg/kg에서 보인 진통효과는 morphine의 활성에 대등한 것이어서 주목할 만하다. 그러나 formalin test의 phase 2 시험에서는 morphine (30 mg/kg)이 87%의 진통효과를 보인 반면 MSE는 모든 용량에서 유의한 진통효과를 보이지 못했다. 일반적으로 formalin test의 phase 2에서 나타나는 통증은 염증과 관련된 만성통증이며, phase 1에서 유발되는 통증은 pain receptor가 직접 관여하는 nociceptive pain이다. 이러한 결과는 위염과 위궤양으로 인해 위점막에서 발생하는 통증을 MSE가 경감시킬 수 있는 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

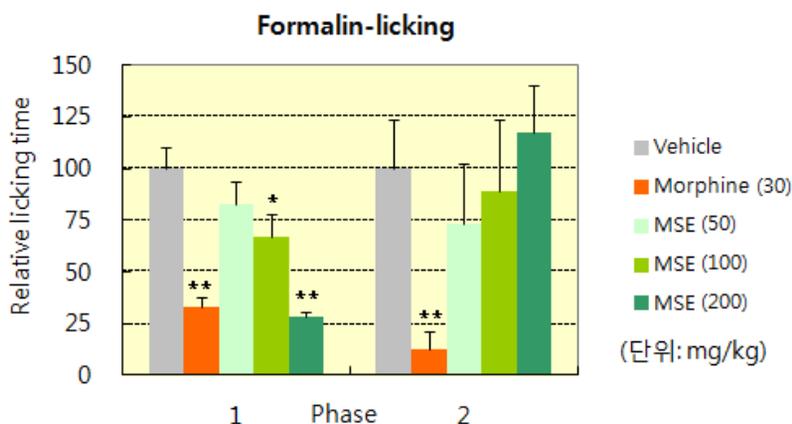


Figure 30. Analgesic effect of MSE (50, 100, and 200 mg/kg) in formalin test. Results are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with vehicle group.

4.8. 목별자 추출물의 CGRP 수용체 특이적 조직 Assay에서의 활성

CGRP는 강력한 혈관이완성 neuropeptide로써 위점막의 혈류량을 증가시키며 점액과 bicarbonate 분비를 촉진하여 위점막 보호 활성을 나타낸다. 또한, PGI₂ (prostacycline I₂), PGE₂ (prostacycline E₂), NO의 발현을 증가시키며, 염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-8) 분비를 억제시키고, acetylcholine의 유리를 유도한다. 따라서 CGRP tissue assay를 통해 MSE가 CGRP의 agonist 역할을 하는지 알아 보았다. 실험결과 MSE는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 30 nM hCGRP α 에 의해 유발되는 수축 대비 85%의 수축 (agonist-like positive inotropy of 85%)을 보였으며, MSE의 EC₅₀은 62.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 것으로 나타났다. CGRP의 경우 specific antagonist인 α -CGRP₍₈₋₃₇₎을 처리할 경우 MSE가 보인 양성 반응이 억제되는지를 확인하였으며 (Lawson *et al.*, 1994), 그 결과 94% 억제되었다. 이와 같은 결과를 통해 MSE가 CGRP 수용체의 agonist로서 작용할 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

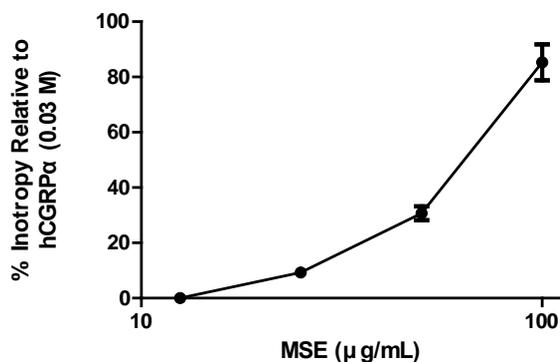


Figure 31. Dose–response curves of MSE in CGRP-specific tissue inotropy assay (EC₅₀ = 62.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.9. 목별자 추출물의 위조직에서 CGRP 분비에 미치는 영향

위조직에서 MSE가 CGRP 분비에 미치는 영향을 확인하기 위해 위 조직을 적출한 후에 buffer에서 안정화 시킨 다음 MSE의 처리에 따른 CGRP release의 변화를 관찰하였다. 실험 결과, MSE를 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 처리한 경우 CGRP의 분비가 증가 하였으며, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 통계적 유의성을 보였다. 이러한 결과를 통해 이전에 실시한 CGRP receptor tissue assay에서의 양성 반응이 CGRP의 발현을 증가시켜서 유도되었음을 추측할 수 있다. 하지만, 적출한 조직을 이용한 실험 결과를 *in vivo* 실험을 통해서 평가할 필요가 있다고 사료 된다.

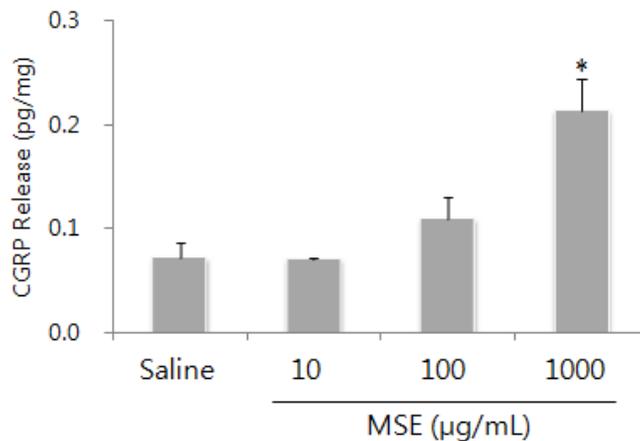


Figure 32. CGRP secretion effect from gastric tissue of MSE. Results are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle group.

4.10. 목별자 추출물의 Somatostatin 수용체 특이적 조직 Assay에서의 활성

Somatostatin은 강하게 위산을 억제하여 가스트린 분비 촉진과 함께 위 산도를 조절하는 neuropeptide이며, 점액과 bicarbonate의 분비를 촉진하여 위점막 보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 MSE의 점막보호 활성의 작용기전을 탐색하기 위해 somatostatin tissue assay를 수행하였다 (Dennis, 1989; Feniuk *et al.*, 1993). 실험 결과 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 용량에서 MSE가 용량의존적으로 유의하게 양성 반응을 나타내었으며, MSE의 EC_{50} 은 25.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 것으로 나타났다. 이로써 MSE가 somatostatin 수용체에 자극하는 역할을 할 가능성이 있음을 확인할 수 있다.

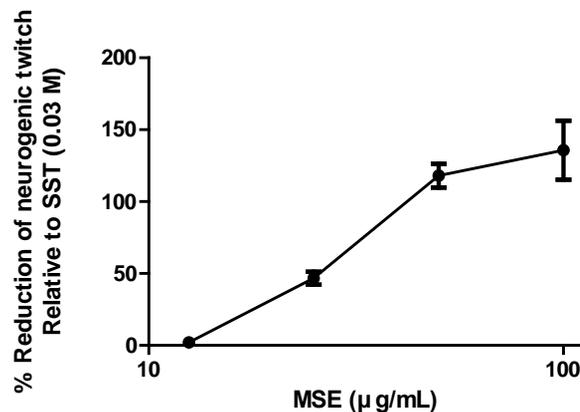


Figure 33. Dose-response curves of MSE in somatostatin-specific tissue neurogenic twitch assay ($\text{EC}_{50} = 25.1 \mu\text{g}/\text{mL}$).

5. 목별자 추출물의 독성시험 연구

5.1. 단회 경구투여 급성독성시험

MSE에 대하여 Sprague-Dawley (SD) 계통 암수 랫드에 단회 경구 투여하여 급성 독성시험을 실시하였다. 시험물질을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량으로, 군당 10 마리 (암수 각 5 마리)에 반복 경구투여한 후 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 14일간 관찰하여 부형제 대조군과 비교하였으며 그 결과, 1) 실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다. 2) 일반증상관찰 결과, 투여당일 암수 동물에서 설사와 항문주위오염이 용량 상관성 있게 관찰되었다. 3) 체중변화 관찰 결과, 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 4) 부검소견 관찰 결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, MSE를 Sprague-Dawley (SD) 계통의 암수 랫드에 단회 경구 투여하였을 때, 본 시험물질의 최소치사량 (MLD: Minimum Lethal Dose)은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

5.2. 랫드 4주 반복 경구투여 독성시험

본 시험은 MSE를 SD 계통의 랫드에 4 주간 반복 경구 투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하며, 2 주간의 회복기간을 두어 회복성을 알아보고자 수행하였다. 시험물질을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 군당 암수 각각 10 마리 (회복군은 15 마리)에 투여한 후

사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리화학적 소견을 관찰한 결과, 1) 실험기간 동안 시험물질의 투여와 관련된 일반증상의 이상이나 사망동물은 없었다. 2) 체중, 사료 및 물섭취량 측정 결과, 독성학적으로 시험물질의 투여와 관련된 특이한 변화는 확인되지 않았다. 3) 요검사 결과, 시험물질의 투여와 관련된 특이한 소견은 없었다. 4) 혈액학 및 혈액생화학적검사 결과, 독성학적으로 시험물질의 투여와 관련된 특이한 변화는 없었다. 5) 장기중량 측정결과, 시험물질의 투여와 관련된 독성학적인 변화는 없었다. 6) 육안적인 부검소견 및 조직병리학적 검사결과, 시험물질의 투여와 관련된 이상소견은 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, MSE를 SD 계통의 암수 랫드에 4주간 반복 경구 투여하였을 때, 본 시험 조건하에서 본 시험물질의 무독성량 (NOAEL; no observed adverse effect level)은 암수 모두 2,000 mg/kg/day 이상으로 판단하였으며, 표적 장기는 관찰되지 않았다.

6. LS-MS를 이용한 목별자 산지별 Similarity Analysis 연구

목별자 50% 에탄올 추출물에 대한 유사성 분석을 위해 분리 조건을 최적화시키는 작업을 하였다. 이를 위해 Ascentis Express C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 컬럼을 사용하였으며, 이동상은 formic acid 0.1%와 AcCN을 gradient 조건으로 사용하였다.

최적의 이동상 조건은 Table 9과 같으며, 이 조건에서 얻어진 대표 LC-MS chromatogram은 Figure 34과 같다. 참고로 추출 및 농축의 용의성을 위해 50% 에탄올을 추출용매로 사용하였다.

Table 9. Optimized mobile phase condition for LC-MS similarity analysis

	Formic acid 0.1%	Acetonitrile
0	95%	5%
45	30%	70%
46	0%	100%
55	0%	100%
56	95%	5%
70	95%	5%

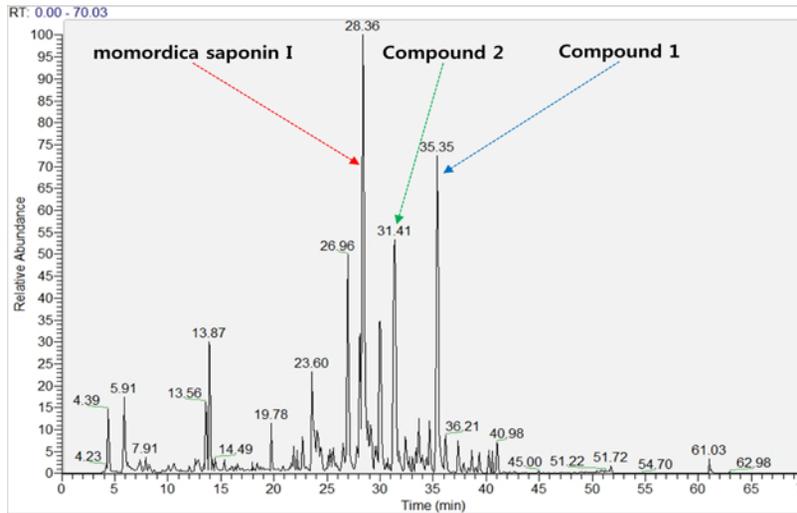


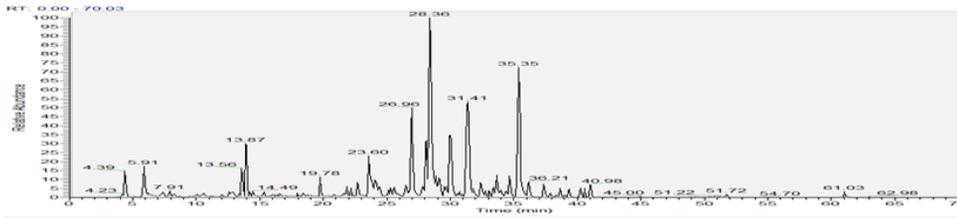
Figure 34. LC-MS chromatogram of 50% ethanol extract of reference *M. cochinchinensis* (MCREF)

Figure 34에서 검출된 피크 중 전체를 대표할 수 있는 peak 11종을 선택하여 similarity analysis를 수행하였다. 구체적으로 RT 4.39, 5.91, 13.56, 13.87, 19.78, 23.60, 26.96, 28.36, 30.00, 31.41, 35.35분에 존재하는 피크를 선택하였으며, 선택된 피크에 대해 Table 10에서와 같이 상관분석을 실시하였다.

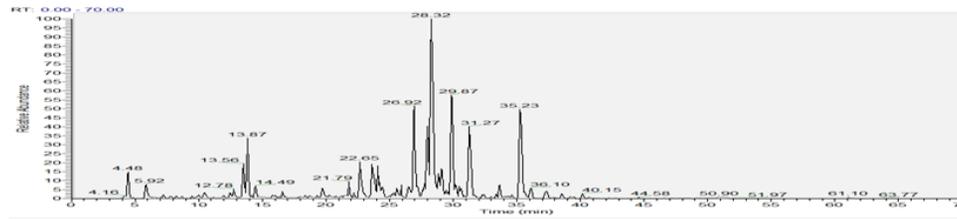
Table 10. Correlation analysis chart among *M. cochichinensis* samples from Vietnam and China.

	MCREF	MCV1	MCV2	MCV3	MCV4	MCV5	MCV6	MCV7	MCV8	MCC1	MCC2
MCREF	1										
MCV1	0.884915	1									
MCV2	0.830174	0.959079	1								
MCV3	0.873628	0.948864	0.968938	1							
MCV4	0.844439	0.953371	0.985729	0.992749	1						
MCV5	0.893988	0.938697	0.946298	0.993897	0.977145	1					
MCV6	-0.02821	-0.16522	-0.15637	-0.23993	-0.25278	-0.2404	1				
MCV7	0.859563	0.941866	0.973839	0.989523	0.985289	0.98539	-0.2162	1			
MCV8	0.85181	0.97669	0.98125	0.939746	0.955588	0.917578	-0.12771	0.93953	1		
MCC1	0.876676	0.927375	0.961395	0.991155	0.981995	0.992	-0.22562	0.985744	0.924046	1	
MCC2	0.906578	0.910222	0.891215	0.960466	0.933115	0.980372	-0.20836	0.95675	0.855	0.960795	1

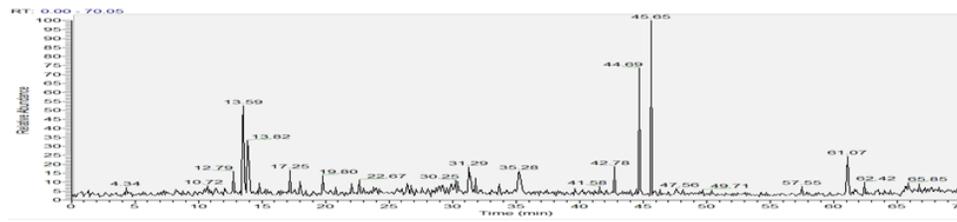
상관분석 결과 Reference 목별자의 50% 에탄올 추출물 (MCREF)은 중국 운남성 (MCC2) 목별자와 가장 유사함을 보였으며, 상관계수를 보았을 때 자체 기준 (> 0.9)에 적합한 수치를 보였다 (> 0.906). 다른 지역의 샘플들과의 상관계수도 0.8-0.9 사이에 값을 가지고 있어 어느 정도 유사성을 보였으나, 베트남 목별자 (MCV6)의 경우는 완전히 다른 pattern을 보여 (-0.028) 적합한 목별자를 수급하기 위해서는 유사성 분석이 필요하다고 판단하였다.



***M. cochinchinensis* (MCE)**



MCC2 (중국 운남성)



MCV6 (베트남)

Figure 35. LC-MS Chromatograms of 50% ethanol extract of reference *M. cochinchinensis* (MCREF), MCC2, and MCV6

7. 목별자의 동속 식물에 대한 연구

7.1. 목별자의 동속 식물에 대한 문헌적 연구

본 연구에서는 목별자의 동속 식물에 대한 문헌적 연구를 통해 목별자 수급을 위한 GCAP에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.

7.1.1. 목별자의 계통도

목별자의 계통도 몇 명명은 Table 11와 같다.

Table 11. Classification and naming of *M. cochinchinensis*

Classification	Naming
Kingdom	Plantae Haeckel, 1866 - plants
Subkingdom	Viridaeplantae Cavalier-Smith, 1981 - green plants
Phylum	Tracheophyta Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998 - vascular plants
Subphylum	Euphyllophytina
Infraphylum	Radiatopses, Kenrick & Crane, 1997
Class	Magnoliopsida, Brongniart, 1843
Subclass	Dilleniidae, Takhtajan, 1967
Superorder	Violanae, R. Dahlgren ex Reveal, 1992
Order	Cucurbitales, Dumortier, 1829
Family	Cucurbitaceae TM , Durande, 1782 - cucumber family
Subfamily	Cucurbitoideae TM
Tribe	Joliffieae
Genus	Momordica C. Linnaeus, 1753

[참고]

Lour.: João de Loureiro

A Portuguese Jesuit missionary, paleontologist, physician and botanist (1717-1791).

In 1742 he travelled to Cochinchina, remaining there for 30 years. He became a specialist in Asian flora and on his return published *Flora Cochinchinensis* (1790).

Spreng. : Curt Polycarp Joachim Sprengel

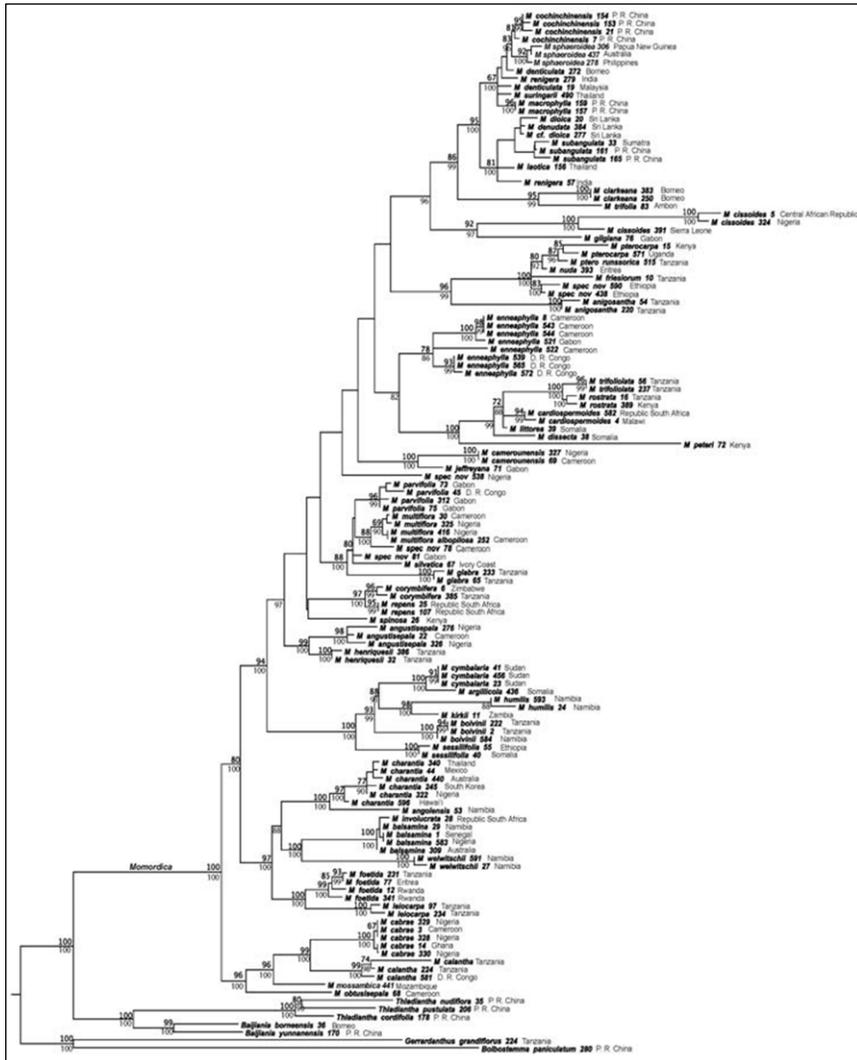
A German botanist and physician. (August 3, 1766 - March 15, 1833)

He also made many improvements in the details of both the Linnaean and the natural systems of classification. The standard botanical author abbreviation Spreng. is applied to species he described.

7.1.2. *Momordica* 속 식물 조사

1) *Momordica* 속 식물 계통도

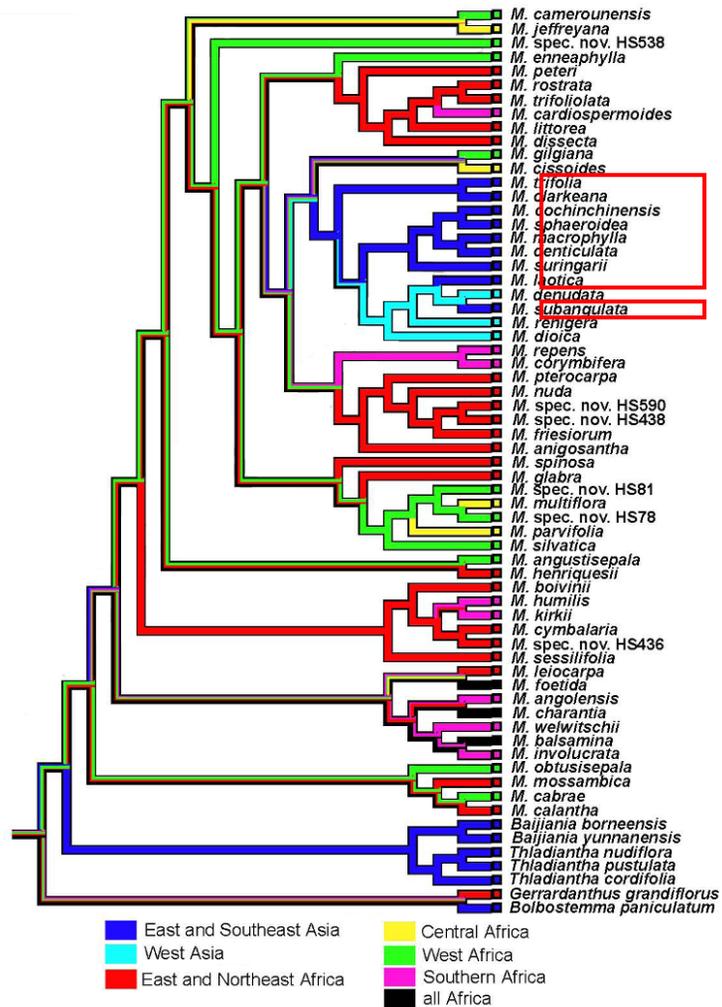
Scheme 3은 *Momordica* 속 식물의 염기서열로부터 상호 유연관계 확인하고, 이를 maximum likelihood 통계법으로 처리한 결과 수치를 나타낸 dendrogram 이다.



Scheme 3. Maximum likelihood tree for *Momordica* obtained from combined plastid, nuclear and mitochondrial sequence data (Schaefer and Renner, 2010)

2) 원산지 분류(Historical biogeography)

Scheme 4는 *Momordica* 속 식물 원산지를 나타내는 dendrogram으로 이 중 동아시아 및 동남아시아에서 기원한 species는 9종임 확인할 수 있다 (Table 12).



Scheme 4. The historical biogeography of *Momordica* inferred on the preferred maximum likelihood tree under maximum likelihood optimization (Schaefer and Renner, 2010)

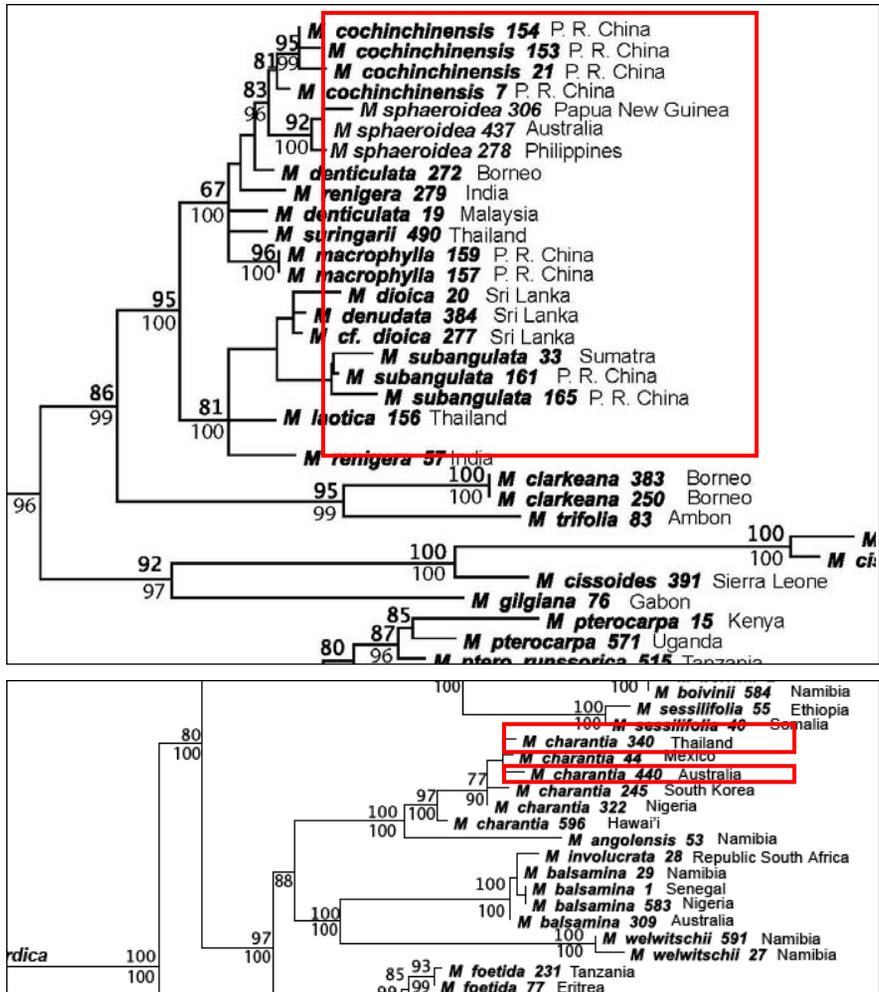
Table 12. Momordica species originated from Asia

Genus	Distribution	Species
Momordica	East & Southeast Asia	<i>M. clarkeana</i>
		<i>M. cochinchinensis</i>
		<i>M. sphaeroidea</i>
		<i>M. macrophylla</i>
		<i>M. denticulata</i>
		<i>M. suringarii</i>
		<i>M. laotica</i>
		<i>M. subangulata</i>
	West Asia	<i>M. denudata</i>
		<i>M. renigera</i>
		<i>M. dioica</i>

7.1. 3. Asia 지역에 분포하는 species에 대한 근거 자료 취합

1) 근거 자료 I

Momordica 속 중 아시아 지역에 분포하고 있는 species 만을 붉은 사각형으로 표시하였으며, 이를 추출하여 자료로 사용하였다 (Schaefer and Renner, 2010). 그 외 지역은 대부분이 아프리카 지역이고 극히 일부 북미/호주 지역이 확인된다 (Scheme 5 & Table 13).



Scheme 5. *Momordica* species from Asia geographic origin

Table 13. Extraction and summary: *Momordica* species from Asia geographic origin

Nation	Species
Korea	<i>M. charantia</i>
China	<i>M. cochinchinensis</i> <i>M. macrophylla</i> <i>M. subangulata</i>
India	<i>M. renigera</i>
Indonesia	<i>M. tofolia</i> (Ambon) <i>M. denticulata</i> (Borneo) <i>M. clarkeana</i> (Borneo) <i>M. subangulata</i> (Sumatra)
Malaysia	<i>M. denticulata</i>
Philippines	<i>M. sphaeroidea</i>
Papua New Guinea	<i>M. sphaeroidea</i>
Sri Lanka	<i>M. denudata</i> <i>M. dioica</i>
Thailand	<i>M. charantia</i> <i>M. laoitca</i> <i>M. suringarii</i>

2) 근거 자료 II

TROPICOS 데이터베이스에서 중국에 서식하는 식물들의 자료를 추출하였는데, 좌측 창은 *Momordica*의 family인 Cucurbitaceae를 선택하였고 우측 창에서 *Momordica* 속 식물들을 확인한 후 이를 자료로 추출하였다 (Figure 36 & Table 14).

* TROPICOS® was originally created for internal research but has since been made available to the world's scientific community. All of the nomenclatural, bibliographic, and specimen data accumulated in MBG's electronic databases during the past 25 years are publicly available here. This system has over one million scientific names and 3.5 million specimen records.

TROPICOS Flora of China Checklist Project

Loniolulaceae Coriariaceae Cornaceae Crassulaceae Crypteroniaceae Cucurbitaceae Cupressaceae Cyatheaceae Cycadaceae Cynomoriaceae Cyperaceae	Lagenaria siceraria var. <i>microcarpa</i> (Naudin) H. Hara Lagenaria siceraria var. <i>microcarpa</i> (Naudin) H. Hara Lagenaria siceraria var. <i>siceraria</i> Luffa acutangula (L.) Roxb. Luffa cylindrica M. Roem. Momordica charantia L. Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng. Momordica dioica Roxb. ex Willd. Momordica subangulata Blume Mukia javanica (Miq.) C. Jeffrey Mukia maderaspatana (L.) M. Roem.
--	--

Figure 36. Momordica species in genus of Cucurbitaceae (TROPICOS database)

Table 14. Extraction and summary: Momordica species of Cucurbitaceae inhabiting in China (TROPICOS database)

Family	Genus Species
Cucurbitaceae	<i>M. charantia</i> L. <i>M. cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng <i>M. dioica</i> Roxb. Ex Willd. <i>M. subangulata</i> Blume

3) 근거 자료 III

Germplasm Resources Information Network (GRIN) 데이터베이스는 미국 농무부 산하 National Genetic Resources Program의 자료로 전세계 46,000여 종의 자료가 있으며, economic plants에 대한 자료 위주로 되어있다. 이 자료로부터 Momordica 속 식물 중 아시아 지역에 분포 되어있는 작물을 추출하여 자료로 사용하였다 (Figure 37 & Table 15).

The figure consists of three vertically stacked screenshots of the GRIN Taxonomy website interface. Each screenshot shows the 'Advanced Query of GRIN TAXONOMY Species Data' search results for Momordica species in Asia.

Top Screenshot: Shows the search criteria: Genus or species name: *momordica*; Family: all families; Continent: Asia-Temperate. The search results list four species:

1. *Momordica balsamina* L.
2. *Momordica charantia* L.
3. *Momordica charantia* subsp. *charantia*
4. *Momordica cochinchinensis* (Lam.) Spreng.

Middle Screenshot: Shows the same search criteria but with the Continent set to 'Asia-Tropical'. The search results list six species:

1. *Momordica balsamina* L.
2. *Momordica charantia* L.
3. *Momordica charantia* subsp. *charantia*
4. *Momordica cochinchinensis* (Lam.) Spreng.
5. *Momordica cymbalaria* Hook. f.
6. *Momordica dioica* Roxb. ex Willd.

Bottom Screenshot: Shows the search criteria: Genus or species name: *momordica*; Family: all families; Continent: Asia-Tropical. The search results list six species:

1. *Momordica balsamina* L.
2. *Momordica charantia* L.
3. *Momordica charantia* subsp. *charantia*
4. *Momordica cochinchinensis* (Lam.) Spreng.
5. *Momordica cymbalaria* Hook. f.
6. *Momordica dioica* Roxb. ex Willd.

Figure 37. Native distribution of Momordica species in Asia (Temperate & Tropical) (GRIN Taxonomy)

Table 15. Extraction and summary: Momordica species as an economic plants in Asia

Distribution	Species
Asia - Temperate	<i>M. balsamina</i> L. <i>M. charantia</i> L. <i>M. charantia</i> subsp. <i>charantia</i> <i>M. cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng.
Asia - Tropical	<i>M. balsamina</i> L. <i>M. charantia</i> L. <i>M. charantia</i> subsp. <i>Charantia</i> <i>M. cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng. <i>M. cymbalaria</i> Hook. f. <i>M. dioica</i> Roxb. ex Willd

4) 근거 자료 IV

India National Bureau of Plant Genetic Resources에서 발행한 자료로 Momordica 속에 대한 자세한 설명과 Momordica species의 India 내 geographical distribution 및 ecological 자료 등이 있는 400여 페이지에 걸쳐 조사된 자료이다 (Joseph, 2004). 그 중 산지가 아시아로 확인된 species 만을 추출하여 자료로 사용하였다 (Figure 38 & Table 16).

Annexure -II

Species representation of the genus *Momordica* in various Herbaria/Genebanks around the world.

S.N	Country/Herbaria/Genebank	Species / Accessions	Source Country	No. of species
1	Virtual herbarium, Cayman Islands	<i>M. charantia</i> var. <i>abbreviata</i>	Asiatic	One
2	Argentina	<i>M. charantia</i>	Asiatic	One
3	Peru	<i>M. charantia</i>	Asiatic	Two
		<i>M. balsamina</i>	African	
4	Amazonas, Manaus	<i>M. charantia</i>	Asiatic	One
5	Bangladesh National Herbarium, Dhaka	<i>M. dioica</i>	Asiatic	Three
		<i>M. cochinchinensis</i>		
		<i>M. charantia</i> (cult.)		
		<i>M. charantia</i> , var. <i>muricata</i>		
6	Forest Research Institute of Malaysia, Kaulalampun	<i>M. charantia</i>	Asiatic	Four
		<i>M. clarkeana</i> King.		
		<i>M. subangulata</i>		
		<i>M. cochinchinensis</i>		
7	Natural History Museum, Seychelles	<i>M. charantia</i>	Asiatic	One
8	Philippines	<i>M. cochinchinensis</i>	Asiatic	Two
		<i>M. charantia</i>		
9	Institute of Jamaica, Jamaica	<i>M. charantia</i>	Asiatic	Two
		<i>M. balsamina</i>	African	
10	South Pacific regional Herbarium, Suva, Fiji	<i>M. charantia</i> var. <i>abbreviata</i>	Asiatic	One
11	Bolus Herbarium, University of Cape Town, South Africa	<i>M. balsamina</i>	African	Eight
		<i>M. bovinii</i>	African	

		<i>M. cardiospermioides</i>	African	
		<i>M. charantia</i>	Asiatic	
		<i>M. foetida</i>	African	
		<i>M. humilis</i>	African	
		<i>M. repens</i>	African	
		<i>M. kirkii</i>	African	
12	National Botanical Institute of Tropical Africa consisting of Namibia, Botswana, Swaziland, Lesotho	<i>M. balsamina</i>	African	Eight +
		<i>M. bovinii</i>	African	One
		<i>M. cardiospermioides</i> (syn. <i>M. ciemantoi</i>)	African	
		<i>M. foetida</i>	African	
		<i>M. humilis</i>	African	
		<i>M. repens</i>	African	
		<i>M. kirkii</i>	African	
		<i>M. welwitschii</i>	African	
		<i>M. charantia</i>	Asiatic	
13	National Herbarium of Surinam	<i>M. charantia</i>	Asiatic	One
14	Honduras	<i>M. charantia</i>	Asiatic	One
15	Jardin Botanique, Dominican Republic	<i>M. charantia</i>	Asiatic	One
16	Nicaragua	<i>M. charantia</i>	Asiatic	One
	LMU Herbarium, Universidade Eduardo Mondlane, Mozambique	<i>M. angiosantha</i>	African	Five
		<i>M. balsamina</i>	African	+One
		<i>M. bovinii</i>	African	
		<i>M. cardiospermioides</i>	African	
		<i>M. foetida</i>	African	
		<i>M. charantia</i>	Asiatic	
18	CAL Herbarium, BSI	<i>M. charantia</i>	Asiatic	

Kolkata, India	<i>M. balsamina</i>	Asiatic	Eleven
	<i>M. dioica</i>	Asiatic	
	<i>M. cochinchinensis</i>	Philippine	
	<i>M. subangulata</i>	Malaysian	
	<i>M. denudata</i>	Sri Lankan	
	<i>M. renigera</i>	Burmese	
	<i>M. foetida</i>	African	
	<i>M. moekorra</i>	Abyssinian	
	<i>M. acuminata</i>	Borneo	
	<i>M. clarkeana</i>	Malaysian	

Figure 38. *Momordica* species in Herbaria around the world

Table 16. Extraction and summary: *Momordica* species having an apparent habitat (national) in Asia

Nation	Species
Burma or Myanma	<i>M. renigera</i>
Indonesia (Borneo)	<i>M. acuminata</i>
Malaysia	<i>M. clarkeana</i> <i>M. subangulata</i>
Philippine	<i>M. cochinchinensis</i>
Sri Lanka	<i>M. denudata</i>

7.1.4. Synonyms

지금까지 추출하여 얻은 종들 중에서 이명(異名)이 있는 종들의 확인이 필요하였다. 이를 위해 신뢰도가 높은 TRIPICOS 데이터베이스를 통해 *Momordica* species의 synonyms 를 추출하여 *M. cochinchinensis* 와 *M. subangulata* 가 이명이 있음을 확인하였다 (Figure 39).

M. cochinchinensis

Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng.				
Details	Synonyms (4)	References (1)	Specimens (1)	Chromosome Counts (1)
<ul style="list-style-type: none">• <i>Momordica macrophylla</i> Gage<ul style="list-style-type: none">◦ Flora of China Editorial Committee, Addendum, 200?. <i>Fl. China</i> ,Checklist Addendum.• <i>Momordica meloniiflora</i> Hand.-Mazz.<ul style="list-style-type: none">◦ Flora of China Editorial Committee, Addendum, 200?. <i>Fl. China</i> ,Checklist Addendum.• <i>Momordica mixta</i> Roxb.<ul style="list-style-type: none">◦ Flora of China Editorial Committee, Addendum, 200?. <i>Fl. China</i> ,Checklist Addendum.• <i>Muricia cochinchinensis</i> Lour.<ul style="list-style-type: none">◦ Flora of China Editorial Committee, Addendum, 200?. <i>Fl. China</i> ,Checklist Addendum.				

M. subangulata

Momordica subangulata Blume		
Details	Synonyms (2)	References (1)
<ul style="list-style-type: none">• <i>Momordica eberhardtii</i> Gagnep.<ul style="list-style-type: none">◦ Flora of China Editorial Committee, Addendum, 200?. <i>Fl. China</i> ,Checklist Addendum.• <i>Momordica laotica</i> Gagnep.<ul style="list-style-type: none">◦ Flora of China Editorial Committee, Addendum, 200?. <i>Fl. China</i> ,Checklist Addendum.		

Figure 39. Synonyms of *Momordica* species

7.1.5. *Momordica cochinchinensis* 동속 식물 조사 범위 결정

1) 아시아 지역에서 확인 되는 종들과 그 서식지 (서아시아 지역 제외)

지금까지 수집한 자료 및 조건에 적합한 *Momordica* 속 식물을 추출한 후, 식물의 학명과 그 서식 지역을 정리하였다 (Table 17). 자료는 species 의 alphabet 순으로 정리하였다. 단, 목별자 (*M. cochinchinensis*)는 가장 상단에 위치시켰다.

Table 17. Classification of *Momordica* species by habitats

Species	Country
<i>M. cochinchinensis</i> (= <i>M. macrophylla</i>)	China, Asia, Philippines
<i>M. acuminata</i>	Indonesia
<i>M. balsamina</i>	China, India
<i>M. charantia</i>	Korea, China, Asia
<i>M. clarkeana</i>	Indonesia, Malaysia
<i>M. denticulata</i>	Malaysia, Indonesia
<i>M. denudata</i>	Sri Lanka
<i>M. dioica</i>	Sri Lanka, China
<i>M. renigera</i>	India, Myanmar
<i>M. sphaeroidea</i>	Philippines, Papua New Guinea
<i>M. subangulata</i> (= <i>M. laotica</i>)	China, Malaysia, Indonesia Thailand
<i>M. suringarii</i>	Thailand

2) 조사 제외 species

Table 17에 있는 자료 중 서식 지역이 중국이나 Cochin china가 아닌 종은 우선 제외하였다 (Table 18. Group I). 본 연구에 사용된 목별자는 중국과 베트남에 한정하여 채집하였고, 이들은 주로 인도네시아, 태국, 미얀마 등지에서 서식하여 추후 원생약의 구입이나 GCP에서 혼용의 여지가 낮다고 판단하였다. 참고로 본 연구에 사용된 목별자는 중국과 베트남에서 구입하였으므로 조사 지역을 중국과 베트남 지역으로 한정하고자 하였다.

다음으로 *M. charantia*, *M. balsamina*의 경우는 서식 지역은 추출 조건에 적합하나, dendrogram 계통도 상에서 서로 상이한 species로 이 두 종은 그 형태학적인 자료만 조사하기로 하였다 (Table 18. Group II).

Table 18. The excluded Momordica spices from the research subject and the reasons

Group	제외 이유	Species
I	China 및 Cochin china 이외의 지역에서 서식함	<i>M. acuminata</i> (Indonesia) <i>M. clarkeana</i> (Indonesia, Malaysia) <i>M. denticulata</i> (Malaysia, Indonesia) <i>M. denudata</i> (Sri Lanka) <i>M. renigera</i> (India, Myanma) <i>M. sphaeroidea</i> (Philippines, Papua New Guinea) <i>M. suringarii</i> (Thailand)
II	Likelihood가 상이함	<i>M. charantia</i> <i>M. balsamina</i>

3) 조사 종들 선택

Table 17와 Table 18으로부터 최종 정리된 자료로 모든 추출 조건에 적합한 *M. cochinchinensis*, *M. subangulata*, *M. dioica* 에 대해서는 자세한 조사를 하였고, *M. charantia*, *M. balsamina* (Group II)에 대해서는 앞에서 밝힌 바와 같이 열매와 seed 의 형태학적인 간단한 조사만을 하였다 (Table 19).

Table 19. The final Momordica species for research subject

조사 방법	Species
자세한 조사 (Group II)	<i>M. cochinchinensis</i> <i>M. subangulata</i> <i>M. dioica</i>
형태 조사 (Group II)	<i>M. charantia</i> <i>M. balsamina</i>

7.1.6. *M. cochinchinensis* 및 유사 동속 식물 5 종 조사

1) 상세 조사

1-1) *M. cochinchinensis* (목별자)

Table 20. Information about *M. cochinchinensis*

Name	<p><i>Momordica cochinchinensis</i> 목별자 gấc (in Vietnamese) 木鳖果 , mùbiēguǒ (in Chinese) Baby Jackfruit, Spiny Bitter Gourd, Sweet Gourd, or Cochinchin Gourd (common name)</p>
Distribution	Grown widely in Southeast Asia, as well as China and Japan
Use	<p>The powder is indicated to “promote the subsidence of nodulation and swelling, combat poisons and cure sores” and is orally consumed for the treatment of sores and inflammatory swellings, mastitis, scrofula, haemorrhoids, anal fistula, chronic eczema, neurodermatitis and scalds” (Pharmacopoeia of the People’s Republic of China, 1997).</p>
Substances	<p>Chondrillasterol, Columbin, Hemsloside MA-1, 6'-Methylmomordin I, Momorcochin Momordica saponin I, Momordica saponin II, Momordicine III, Momordin I, Momordin IC, Momordin ID, Momordin IE, Momordin IIA, Momordin IIB, Momordin IIC, Momordin IID, Momordin IIE, Momordin III, Nardol, Vergatic acid (Tradimed)</p>
Figure	

1-2) *M. subangulata* Blume

Table 21. Information about *M. subangulata* Blume

Name	Ao e mu bie (in Chinese) <i>Momordica subangulata</i> Blume peria katak, kambas Bitter gourd (common name)
Distribution	Guangdong; Guangxi; Guizhou; Yunnan
Use	Being eaten as vegetable and is believed can help to lower the blood pressure and cure diabetic.
Figure	

1-3) *M. dioica*

Table 22. Information about *M. dioica*

Name	<p>Yun nan mu bie (in Chinese)</p> <p><i>Momordica dioica</i></p> <p>Teasle Gourd, Spine gourd</p> <p>Kakrol, Kankro, Kartoli, Kantoli, Kantola or Kantroli</p>
Distribution	<p>A native plant of the Indian sub-continent, Yunnan</p>
Substances	<p>α-spinasterol octadecanolate, α-spinasterol-3-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside, 3-<i>O</i>-β-D--glucuronopyranosyl gypsogenin, 3-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl gypsogenin, 3-<i>O</i>-β-D--glucopyranosyl hederagenin</p>
Figure	

1-4) Seed Length & Width 자료

Table 23. Morphology of Group I species

Species	Mean length (mm)	Mean width (mm)
<i>M. cochinchinensis</i>	20 ~ 30 20 ~ 30	5
<i>M. subangulata</i>	9~10	7
<i>M. dioica</i>	6~7	7

2) 형태 조사 (Group II)

1) *M. charantia* (여주)



Figure 40. Morphology of *M. charantia*

2) *M. balsamina*



Figure 41. Morphology of *M. balsamina*

7.1.7. *Momordica cochinchinensis* 및 유사 동속 식물 조사 결론

Momordica L. 의 Likelihood 계통도 자료 (Schaefer and Renner, 2010)를 기준으로 하여 TRIPICOS, GRIN, Pubmed, Tradimed 와 기타 논문 및 인터넷 자료 등을 검색한 결과 China 및 Cochinchina에 주로 서식하는 *Momordica* 속 식물은 5 종 (*M. balsamina*, *M. charantia*, *M. cochinchinensis*, *M. dioica* 및 *M. subangulata*)임을 확인하였다.

그 중 목별자 (*M. cochinchinensis*)를 포함한 유사도가 높은 *M. subangulata* 및 *M. dioica*에 대한 생약명, 분포 지역, 사용 예, 구성 성분, Pubmed 확인 논문, 과육 혹은 종자의 모양 등을 조사한 결과, 본문에 제시된 각 생약의 사진에서도 알 수 있듯이 과육의 형태와 색상을 통해서도 쉽게 구별할 수 있었으며, 원료 생약인 종자는 크기 (Length)도 구별이 용이하였다. 또한, 중국 약전 및 관련 논문 자료에서도 *M. dioica*, *M. subangulata* 의 크기는 *M. cochinchinensis* 크기의 약 30 ~ 50 % 정도인 것으로 기록되어 있어, 목별자를 구매하거나 GCAP 를 하는 데 있어서 유사종과 혼용되는 일은 없을 거라 예상된다.

Group II에 속한 2 종 (*M. balsamina*, *M. charantia*)의 경우는 형태로만 조사를 실시하였으며, 형태로 보았을 때 목별자와는 열매나 seed의 모양이 상이함을 알 수 있었기 때문에 이 종도 목별자와 혼용되는 일은 없을 것으로 판단된다.

결론적으로 목별자와 유사종으로 판단되는 4가지 생약은 목별자와 혼용되거나 혼돈되는 경우가 없을 것으로 판단되나, 보다 과학적인 증명을 위해 추후 유사 생약의 종자를 직접 확보하여 실제적인 연구를

통해 증명하는 작업이 필요하리라 생각된다.

[참고] 목별자 산지 조사

상기 목별자 동속식물 연구 더불어 목별자의 주산지에 대해 조사를 하였다. 목별자는 중국 남부 광서성/운남성 및 베트남 북부이다.

베트남에서는 목별자의 열매를 Gac이라 부르는데, Gac 의 과육에 존재하는 β -carotene은 그 함량이 당근보다 높다. 특히 Gac 이외에는 β -carotene 섭취가 어려운 베트남인들을 위해 Gac의 생산은 정부 주도 차원에서 대규모로 이루어 지고 있다. 특히, 북부 Hai Duong 지역은 그 생산량이 여타 국가나 지역과는 비교가 되지 않을 정도로 많은데, 그 생산량은 다음과 같다.

Table 24. The gross output of Gac fruit in Hai Duong region, Vietnam (KOTRA report)

Year	2007	2008
The weights of Gac fruit	110,000 tons	250,000 tons

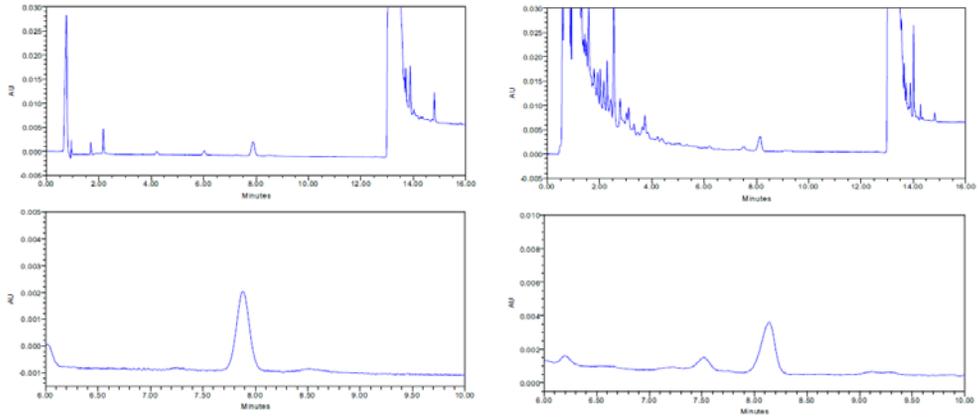
※ An average gac fruit weighing 1 kg yields approximately 190g of fruit pulp and 130 g of seeds

따라서 대규모 생약의 확보를 위해서는 베트남 Hai Duong 산 목별자를 공급하는 것이 유리하다고 판단된다. 참고로 데이터로 제시되지는 않았지만, 활성 및 독성은 산지 (중국 광서, 운남, 호북, 장시, 베트남 등)에 크게 영향을 받지 않는 것으로 판단된다.

7.2. 여주(*M. charantia*) 내 *Momordica saponin I* 존재 유무에 대한 연구

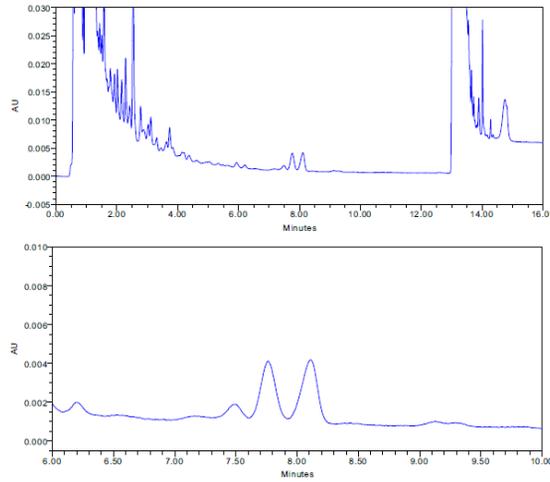
목별자의 학명은 *Momordica cochichinensis* Spr. (Cucurbitaceae)로 그 구성 성분인 *momordica saponin I* (MS I)은 Iwamoto 등이 분리, 구조규명을 하였으며, 이 성분은 Tradimed DB (<http://www.tradimed.co.kr>) 및 문헌 조사에 의하면 목별자의 동속 식물 및 그 외 다른 종에서는 아직 발견되지 않는 것으로 알려져 있다.

여주의 학명은 *Momordica charantia* (Cucurbitaceae)로 목별자의 동속 식물이다. 본 연구는 MS I을 통해 목별자와 여주를 구별하고, 지표성분으로써의 가능성을 확인하는 데 있다. 실험 결과는 Figure 42와 43과 같다.



a. MSE

b. *M. charantia*



c. spiking

Figure 42. Pattern chromatograms of MSE, *M. charantia*, and Spiking

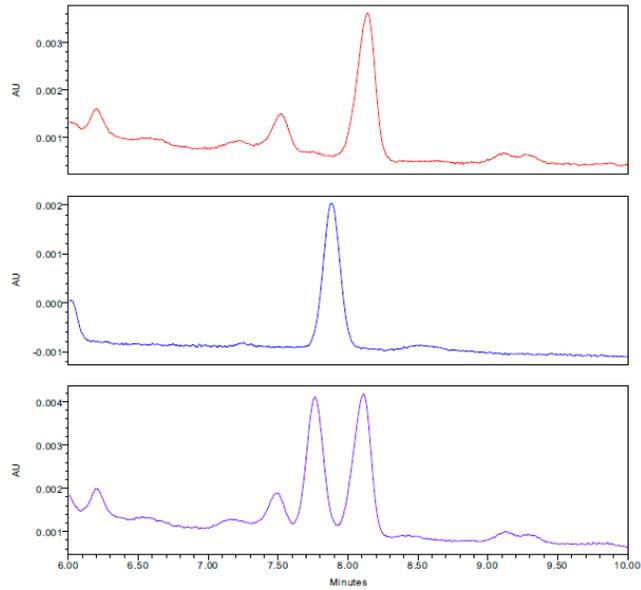
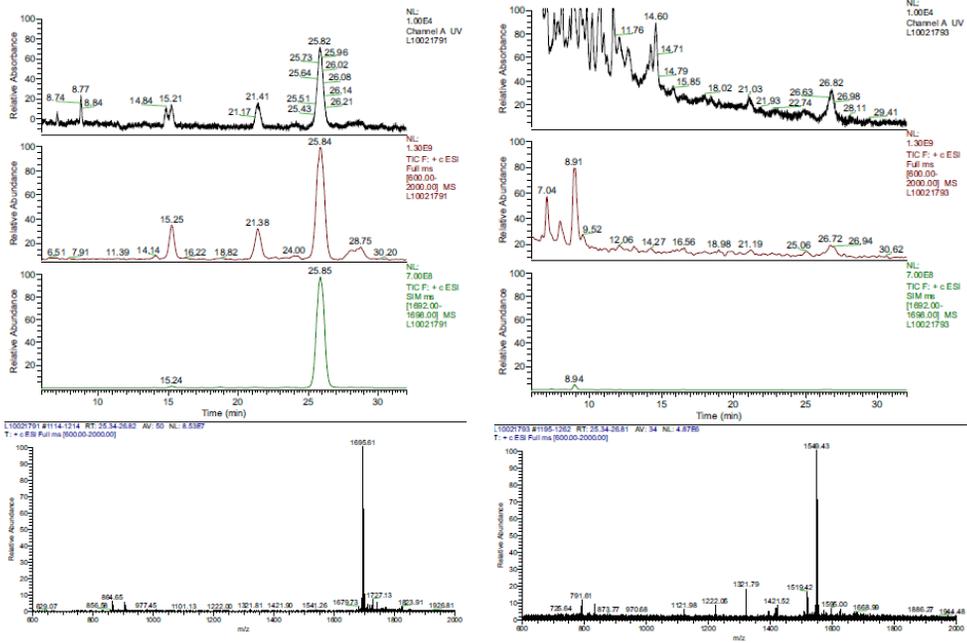


Figure 43. Overlay chromatogram of MSE, *M. charantia* & Spiking
 (Red: *M. charantia*, Blue: MSE, Purple: spiking)

UPLC pattern 및 spiking 분석 결과 여주에 MS I가 존재하지 않는 것으로 확인되었으나, 보다 확실한 결론을 얻기 위해 LC-MS 분석을 진행하였으며, 결과는 아래와 같다.



a. MSE

b. *M. charantia*

Figure 44. LC-MS SIM of MSE and *M. charantia*

MS I의 accurate molecular weight는 1672.7이다. MSE의 HPLC pattern 및 SIM 결과로부터 MS I peak는 25.8 분경에 $[M+Na]^+$ 의 형태로 검출되는 것을 확인하였다. 이를 토대로 여주 추출물을 측정된 결과 25.8 ± 1.5 분경에 SIM에서 확인할 수 있는 peak는 검출되지 않았다. 따라서 여주 추출물에는 MS I이 존재하지 않음을 재확인하였다.

이상의 HPLC-UV와 LC-MS 실험결과로 여주 추출물에는 MS I이 존재하지 않음을 확인할 수 있었으며, MS I이 지표물질로 사용하는 것이 적합함을 알 수 있었다.

8. 목별자 추출물의 분석법 밸리데이션 연구

원료 의약품 내 지표 성분 Momordica saponin I의 함량을 측정하기 위한 분석 기기는 UPLC (Waters, USA)로 결정하였다. UPLC 분석 조건의 확립을 위해 이동상의 pH, buffer의 종류, buffer 내 용매 조성을 결정하는 실험을 수행하였다. 그 결과 0.2% 인산 수용액과 acetonitrile 을 6:4 (v/v)의 비율로 혼합했을 때 지표 성분 피크의 S/N, 대칭성 및 분리능이 우수함을 확인하였다. 이 조건에서 검액의 최적 농도를 찾고자, 검액 내 지표 성분 피크의 S/N 이 100 이상 농도를 기준으로 설정하였고 이 농도는 800 µg/mL 임을 확인하였다.

MSE의 분석법에 대한 밸리데이션은 아래 Table 25의 분석 항목과 그에 대한 기준에 의거하여 수행하였다.

Table 25. The validation items and specifications for the analytical method

Validation 시험항목	정량법/ 함량시험법	기준
특이성		
- 확인	+	적합
- 분리능	+	2.0 이상
- 대칭성	+	1.5 이하
직선성	+	0.999 이상
범위	+	적합
정확성(RSD)	+	2.0% 이하
정밀성(RSD)		
- Repeatability	+	2.0 % 이하
- int. precision	+*	2.0 % 이하
- Reproducibility	(+)	2.0 % 이하
정량한계	-	최소
검출한계	-	최소

* Reproducibility 실험을 했을 경우 불필요

MSE의 분석법에 대한 밸리데이션 결과는 아래와 같다.

8.1 특이성 (Specificity)

아래의 시험결과를 통해 검액, 표준액 및 희석 용액 사이에 간섭이 없음을 확인하였다. 따라서 이 분석법은 특이성이 확보되었다고 판단되었다.

Table 26. The result of standard solution in specificity test

Peaks	Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3	Inj. 4	Inj. 5	Mean	%RSD
RT	3.12	3.12	3.12	3.12	3.11	3.11	0.014
면적	15067	15049	15068	15066	15191	15088	0.384
이론단수	15464	15474	15421	15385	15294	15408	0.472
대칭성	1.05	1.05	1.04	1.04	1.04	1.04	0.525
간섭여부	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음

Table 27. The result of testing solution in specificity test

Peaks	Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3	Inj. 4	Inj. 5	Mean	%RSD
RT	3.11	3.11	3.11	3.11	3.11	3.11	0.014
면적	16645	16723	16629	16728	16736	16692	0.305
이론단수	15469	15488	15572	15450	15442	15484	0.337
대칭성	1.03	1.04	1.03	1.04	1.03	1.03	0.530
분리능	2.41	2.44	2.51	2.45	2.46	2.45	1.486
간섭여부	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음

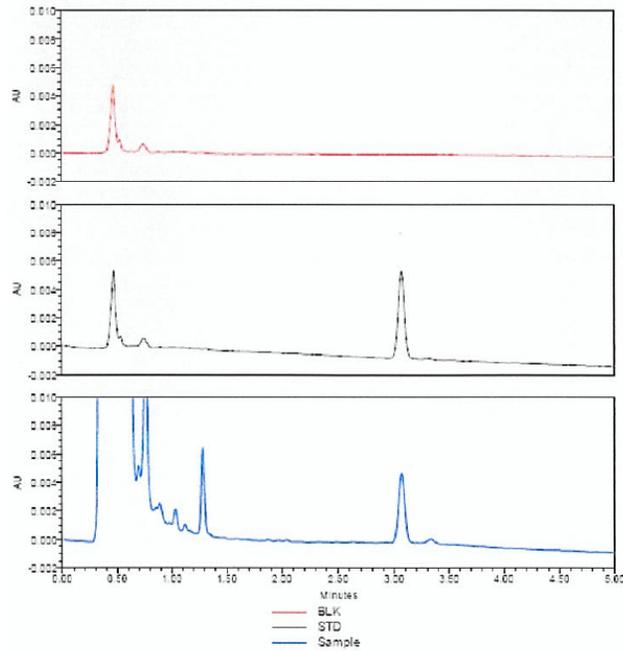


Figure 45. UPLC Chromatogram of MSE

Table 28. The result of purity test by PDA

Purity Angle	0.90
Purity Threshold	1.08

Table 29. Summary of the results in specificity test

No.	Parameter	Acceptance criteria	Observation
1	검액 내 표준품 피크의 RT	2.9 ~ 3.3	3.11
2	검액 내 표준품 피크의 이론단수	2000 이상	15484
3	검액 내 표준품 피크의 대칭성	1.5 이하	1.03
4	검액 내 표준품 피크의 간섭 여부	간섭 없음	간섭 없음
5	검액 내 표준품 피크의 분리능	2.0 이상	2.45
6	검액 내 표준품 피크의 Purity	Angle < Threshold	0.90 < 1.08

8.2 직선성 (Linearity)

아래의 시험결과를 통해 표준액의 직선성 상관계수는 0.999 이상으로 나타나 기준에 적합하였으며, 분석 가능한 범위의 피크 면적 %RSD가 2.0 이하인 4.0 ~ 50.0 µg/mL 이었다. 따라서 이 분석법은 특이성이 확보 되었다고 판단된다.

Table 30. The result of standard solution in linearity test

검액내 함량	0.50%	0.75%	1.00%	1.50%	1.75%	2.00%	2.50%	4.17%	6.25%
표준품 농도 (µg/mL)	4.0	6.0	8.0	12.0	14.0	16.0	20.0	33.4	50.0
Inj. 1	4262	6329	8504	12759	15093	17011	21133	36173	54347
Inj. 2	4239	6447	8385	12705	14931	17004	21155	35855	54172
Inj. 3	4244	6317	8454	12823	15074	16859	21136	36073	54187
Inj. 4	4141	6325	8451	12896	14988	16923	21045	36030	53962
Inj. 5	4164	6371	8371	12806	15039	16998	21152	36131	53925
Mean	4210.0	6357.8	8433.0	12797.8	15025.0	16959.0	21124.2	36052.4	54118.6
%RSD	1.28	0.85	0.65	0.56	0.44	0.39	0.21	0.34	0.32
RF	1052.5	1059.6	1054.1	1066.5	1073.2	1059.9	1056.2	1080.7	1082.4
				Range 설정	4.0 ~ 50.0				
				Ave. (RF)	1065.0				
				%RSD (RF)	0.0106				
				R ²	0.9999				
				직선식	Area = 1086 * Conc. (µg/mL) - 258.23				

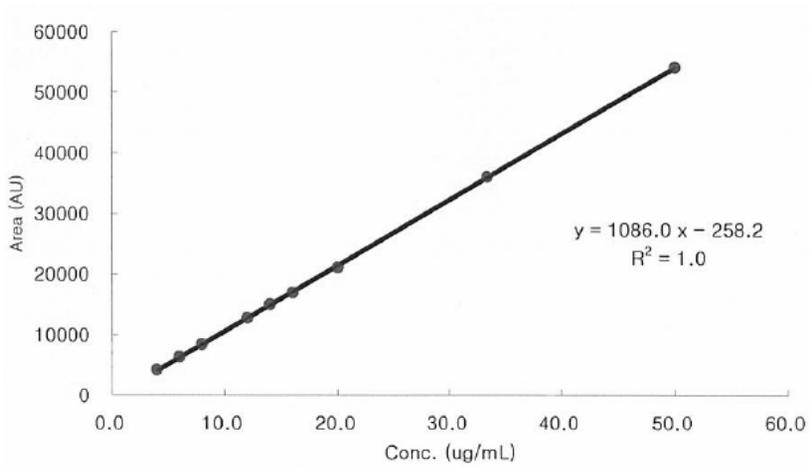


Figure 46. Linearity graph of standard (Momordica saponin I)

Table 31. Summary of the results in linearity test

No.	Parameter	Acceptance criteria	Observation
1	표준액 직선 상관 계수	0.999 이상	0.9999
2	표준액 직선 범위	-	4.0 ~ 50.0 ($\mu\text{g/mL}$)
3	범위 내 피크 면적 RSD	2.0 이하	< 1.28

8.3. 정확성 (Accuracy)

시험결과, 각 회수율의 RSD는 2.0% 이하이며, 각 농도에서의 회수율은 모두 기준에 적합하였다. 검액 내 표준액의 농도에 관계없이 정확성이 있음을 두 종류의 정확성 실험 방법에서 확인하였다. 그러므로 이 분석법은 정확성이 있는 결과를 확보할 수 있는 분석법으로 판단된다.

Table 32. The result of standard solution in accuracy test

Weight ($\mu\text{g/mL}$)	8.0	14.0	20.0	14.4	15.84	8.52	8.76
Inj. 1	8451	14856	20934	15023	16711	9172	9487
Inj. 2	8472	14991	20882	15006	16844	9027	9493
Inj. 3	8318	15006	20953	15031	16693	9220	9576
Inj. 4	8328	14999	21141	14917	16673	9189	9544
Inj. 5	8369	15103	21121	15043	16749	9113	9491
Mean	8387.6	14991	21006.2	15004	16734	9144.2	9518.2
Calculated ($\mu\text{g/mL}$)	7.96	14.04	19.58	14.05	15.65	8.66	9.00
%Recovery	99.5	100.3	97.9	97.3	98.8	101.6	102.8
				Ave. (%Recovery)		99.7	
				%RSD (%Recovery)		1.97	

Table 33. The result of testing solution in accuracy test - spiking (검액:표준액 = 1:1 (v/v))

Sample	저농도 검액 + 8.0 μg/mL			중농도 검액 + 14.0 μg/mL			고농도 검액 + 20.0 μg/mL		
검액내 함량 (μg/mL)	9.0			15.5			21.4		
#	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
Calculated (μg/mL)	7.96	8.00	7.97	14.12	14.07	14.18	19.70	19.77	19.70
Inj. 1	8883	8946	9032	15777	15665	15696	21850	21753	21810
Inj. 2	8887	8907	8988	15792	15830	15652	21899	21770	21806
Inj. 3	8817	8876	8949	15642	15656	15605	21775	21910	21793
Mean	8862	8910	8990	15737	15717	15651	21841	21811	21803
Calculated (μg/mL)	8.40	8.44	8.52	14.73	14.71	14.65	20.35	20.32	20.31
%Recovery	99.04	99.29	100.38	99.43	99.49	98.70	99.02	98.73	98.85
				Ave. (%Recovery)			99.22		
				%RSD (%Recovery)			0.53		

Table 34. The result of testing solution in accuracy test – addition

Sample	저농도 검액				중농도 검액				고농도 검액			
Added Conc. (μg/mL)	0	2.75	3.70	5.80	0	2.75	3.70	5.80	0	2.75	3.70	5.80
Inj. 1	9569	12455	13396	15792	16660	19573	20767	23087	23032	26037	27038	29326
Inj. 2	9539	12457	13552	15660	16625	19677	20690	22948	23100	25951	27168	29177
Inj. 3	9403	12449	13444	15699	16602	19699	20818	23085	22889	26063	26961	29249
Mean	9504	12454	13464	15717	16629	19650	20758	23040	23007	26017	27056	29251
Calculated (μg/mL)	8.99	11.71	12.64	14.71	15.55	18.33	19.35	21.45	21.42	24.19	25.15	27.17
%Recovery	-	98.8	98.6	98.6	-	101.1	102.8	101.8	-	100.8	100.8	99.1
					Ave. (%Recovery)				100.3			
					%RSD (%Recovery)				1.53			

Table 35. Summary of results in accuracy test

No.	Parameter	Acceptance criteria	Observation
1	표준액 회수율 %RSD	2.0 이하	1.97
2	검액 내 회수율 %RSD (Spiking)	2.0 이하	0.53
3	검액 내 회수율 %RSD (Addition)	2.0 이하	1.53

8.4 정밀성 (Precision)

1) Repeatability

시험결과, 각 정밀성의 %RSD는 2.0% 이하이므로 모두 기준에 적합하다. 그러므로 이 분석법은 정밀성이 있는 결과를 확보할 수 있는 분석법으로 판단된다.

Table 36. The result of injection repeatability - 100% standard solution (14.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ten times injection)

Inj. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
면적	14911	14924	14910	14978	14947	14954	14953	15019	14883	14896
이론단수	15310	15333	15411	15340	15424	15488	15417	15337	15414	15386
대칭성	1.04	1.04	1.05	1.04	1.05	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04
Calculated ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	13.97	13.98	13.97	14.03	14.00	14.01	14.01	14.07	13.94	13.95
%Recovery	99.8	99.9	99.8	100.2	100.0	100.1	100.0	100.5	99.6	99.7
Ave. (%Recovery)								14937.5		
%RSD (%Recovery)								0.275		
Ave. (이론단수)								15386		
Ave. (대칭성)								1.042		
Ave. (%Recovery)								99.9		
%RSD (%Recovery)								0.271		

Table 37. The result of method repeatability - 100% standard solution (800 $\mu\text{g/mL}$)
(After making 6 samples, five times inject.)

날짜	2008-10-16					
실험실	Lab 1					
기기	UPLC LS1					
컬럼	ACQUITY UPLC [®] BEH C18 1.7 μm					
분석자	KWS					
Vial #	1	2	3	4	5	6
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	802.8	804.2	797.6	802.0	802.8	796.4
Inj. 1	16439	16348	16326	16441	16302	16418
Inj. 2	16296	16255	16205	16332	16312	16287
Inj. 3	16385	16348	16233	16525	16326	16300
Inj. 4	16318	16310	16359	16448	16345	16399
Inj. 5	16401	16299	16202	16544	16259	16209
Mean	16350	16314	16265	16458	16309	16323
% Assay	1.81	1.81	1.82	1.83	1.81	1.82
이론단수 (inj. 3)	15306	15399	15331	15313	15341	15284
대칭성 (inj. 3)	1.03	1.04	1.03	1.04	1.04	1.03
분리능 (inj. 3)	2.38	2.49	2.52	2.43	2.43	2.46
Ave. (% Assay)					1.82	
%RSD (% Assay)					0.47	
Ave. (이론단수)					15329	
Ave. (대칭성)					1.04	
Ave. (분리능)					2.45	

2) Reproducibility

Table 38. The result of injection reproducibility - 100% standard solution (14.0 $\mu\text{g/mL}$) (Ten times injection)

Inj. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
면적	17056	17078	17125	16712	16556	16701	16881	16637	16763	16657
이론단수	15109	14921	14876	14864	15039	14886	14758	14982	14812	14968
대칭성	0.99	0.98	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	1.00	0.99	0.99
Ave. (면적)								16817		
%RSD (면적)								1.22		
Ave. (이론단수)								14922		
Ave. (대칭성)								0.99		

Table 39. The result of method reproducibility. 100% standard solution (800 $\mu\text{g/mL}$) (After making 6 samples, five times injection)

날짜	2008-10-21					
실험실	Lab 2					
기기	UPLC NP1					
컬럼	ACQUITY UPLC [®] BEH C18 1.7 μm					
분석자	JKW					
Vial #	1	2	3	4	5	6
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	802.8	804.2	797.6	802.0	802.8	796.4
Inj. 1	19210	19291	19565	18877	18820	19010
Inj. 2	18826	18901	19347	19133	18995	18768
Inj. 3	19183	19339	19031	19044	19020	18961
Inj. 4	19095	18827	18931	18598	19468	19129
Inj. 5	19071	188000	19085	19088	19170	18867
Mean	19077	19032	19192	18948	19095	18947
% Assay	1.88	1.87	1.90	1.87	1.88	1.88
이론단수 (inj. 3)	14705	14526	14656	14948	15063	14874
대칭성 (inj. 3)	0.98	0.98	0.97	0.98	0.98	0.99
분리능 (inj. 3)	2.53	2.30	2.30	2.26	2.27	2.28
Ave. (% Assay)					1.88	
%RSD (% Assay)					0.64	
Ave. (이론단수)					14795	
Ave. (대칭성)					0.98	
Ave. (분리능)					2.32	

Table 40. Cumulative Results

%Assay	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Lab 1	1.81	1.81	1.82	1.83	1.81	1.82
Lab 2	1.88	1.87	1.90	1.87	1.88	1.88
Cumulative Ave. (% Assay)					1.85	
Cumulative %RSD (% Assay)					1.91	

Table 41. Summary of the results in precision test

No.	Parameter	Acceptance criteria	Observation
1	Repeatability 중 Injection의 %RSD	2.0 이하	0.27
	Repeatability 중 %Assay의 %RSD	2.0 이하	0.47
2	Reproducibility 중 %Injection의 %RSD	2.0 이하	1.22
	Reproducibility 중 %Assay의 %RSD	2.0 이하	0.64
3	각 %Assay의 cumulative %RSD	2.0 이하	1.91

8.5. 결과 종합

MSE 함량 시험법의 시험 농도인 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서 위의 시험법 밸리데이션 결과를 보아 목별자 추출물의 함량 분석법의 특이성, 정밀성, 정확성, 직선성 등을 확인할 수 있었다 (Table 42). 그러므로 본 시험법이 목별자 추출물의 함량시험에 사용하기에 적합하다고 판단된다.

Table 42. Summary of results in validation for analytical method

Analytical Content		Acceptance criteria	Results
특이성	확인	MSE 확인	확인
	분리능	> 2	2.45
	대칭성	< 1.5	1.03
직선성		$R^2 > 0.999$	0.9999
범위 ($\mu\text{g/mL}$)		Range of Standard	4.0 ~ 50.0
정확성	Spiking	%RSD of % Recovery	0.53%
	Addition	< 2.0%	1.53%
정밀성	Repeatability	Injection	0.27%
		Method	0.47%
	Reproducibility	Injection	1.22%
		Method	0.64%
	Cumulative		1.91%

IV. 결 론

본 연구의 목적은 급성 및 만성 위염치료 효능을 지닌 물질 또는 추출물을 찾기 위함이며, 이를 위해 1차적으로 각종 한의서와 문헌 검색 등을 통하여 위점막 보호 (급성 및 만성 위염치료) 효능을 나타낼 가능성이 있는 생약 후보를 검색하였다. 그 결과 50종의 생약을 선별하였으며, 선별된 50종 생약에 대해 신규성이나 학문적 가치의 기준으로 추가 검토하여 15 종의 스크리닝 후보생약을 최종 선정하였다. 1차 스크리닝을 위해 디클로페낙 유발 위염 모델을 수행하였으며, 실험 결과에 따라 3종의 후보생약 (목별자, 백작약, 만형자)을 선별하였다. 이 후 2차 스크리닝을 실시하였으며, 이를 위해 사용된 모델은 에탄올 유발 위염 모델이었다. 실험 결과 목별자 (木鱉子, seed of *Momordica cochinchinensis*) 추출물이 가장 우수한 활성을 나타내었고, 목별자를 본 연구를 위한 최종 후보생약으로 선정하였다.

선정된 목별자에 대한 분획 연구를 실시하였으며, 분획물에 대해 에탄올 유발 위염 모델을 수행하여 약효 유의성을 검증하였다. 실험 결과 유의성을 보이지는 않았지만 *n*-BuOH 층이 활성이 높았으며, MPLC 및 HPLC를 이용하여 *n*-BuOH 층에 대한 성분 분리를 시도하였다. 그 결과 3종의 사포닌을 분리하였고 (화합물 **1**, **2** 및 **3**), 각종 분석광학적 데이터를 활용하여 구조분석을 실시한 결과, 화합물 **1**은 gypsogenin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside, 화합물 **2**는 quillaic acid-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside, 그리고 화합물 **3**은

gysogenin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosido-28-*O*- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopyranoside로 구조를 결정하였다. 화합물 **1**은 천연물에서 처음 분리된 물질이었으며, 화합물 **2**는 *Momordica* 속에서 처음 분리된 물질이었고, 화합물 **3**은 목별자에서 이미 분리, 보고된 *Momordica saponin I*이었다.

이후 3종 화합물에 대해 에탄올 유도 위염 모델에서 활성을 측정하였으며, 실험 결과 유의성은 없었으나 화합물 **1**, **2** 및 **3** 모두 활성이 있었고, 화합물 **3** (*Momordica saponin I*)이 상대적으로 가장 좋은 효능을 보였다. 이러한 결과로 볼 때, 위점막 보호 활성이 사포닌에 기인할 가능성이 높음을 알 수 있었다. 하지만, 분리된 사포닌 경우 수율이 낮고 (0.025% 이하), 활성이 추출물 대비 뛰어나지 않으며, 합성 자체도 거의 불가능하기 때문에 단일 성분이 아닌 목별자 에탄올 추출물 (MSE; *Momordicae Semen Extract*)을 이용하여 이후 연구를 수행하였다. 단, *Momordica saponin I*의 경우 목별자 추출물의 지표성분으로서의 가치가 있다고 판단되었다.

최종적으로 선택된 목별자 추출물 (MSE)에 대한 위점막 보호 활성을 검증하기 위해 각종 동물 모델 및 기전과 관련된 실험을 수행하였다. 에탄올 및 디클로페낙으로 유발된 급성 위염 모델, 그리고 *H. pylori*로 유발된 만성 위염 모델을 수행하였으며, 실험 결과 급·만성 위염 모델 모두에서 우수한 활성을 보였다. 이러한 결과들은 MSE가 위점막 손상을 억제할 수 있다는 명백한 증거를 보여 주었다.

이러한 우수한 급·만성 위염 모델에서의 약효를 뒷받침하기 위하여

위점액 분비 촉진 모델, 상처치료 (wound-healing) 모델, croton oil 유발 ear edema 모델, formalin test 모델에서 MSE에 대한 효능을 실험하였으며, 그 결과 우수한 위점액 (Gastric mucus) 분비 촉진 효과, 상처치료 효과, 항염증 및 진통 효과를 확인할 수 있었다. 참고로 궤양 부근에서의 혈관신생성이 위궤양 치료를 촉진시키는 데 있어 중요한 역할을 하며 (Szabo *et al.*, 1995), 홍삼으로부터 분리된 사포닌류가 VEGF 생성 촉진을 통해 혈관신생을 일으켜 상처치료를 효과적으로 나타내는 것이 보고되었는데 (Kimura *et al.*, 2006), 이와 같은 문헌적 근거를 종합해 볼 때, MSE에 존재하는 사포닌 성분들이 상처치료 효과를 보일 가능성이 높으며, 이러한 상처치료 효능이 결과적으로 MSE의 위점막 보호 활성화에 기여할 수 있음을 보여준다고 할 수 있겠다.

또한, 이러한 약리작용의 기전을 밝히기 위해, 위점막 보호 활성을 지닌 neuropeptide 중 하나인 CGRP와 가스트린 분비를 억제하는 인자로 알려진 somatostatin와 관련된 기전 실험을 수행하였다. CGRP가 위궤양 치료를 촉진시킬 뿐만 아니라 에탄올로 유발된 위점막 손상을 예방할 수 있음이 기존의 문헌에서 보고되었는데 (Hayashi *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 2008), 본 연구 결과 MSE가 CGRP 수용체 특이적 조직 assay에서 positive inotropic 효능을 나타내었고, 이러한 효능이 CGRP 수용체의 antagonist인 α -CGRP₍₈₋₃₇₎에 의해 억제되는 것으로 보았을 때, CGRP가 MSE의 위염치료 효과에 있어 중요한 매개체 역할을 할 가능성을 보여준다고 할 수 있다. Somatostatin의 경우 SSR2를 경유하여 가스트린 방출을 억제하고 위점막의 혈류 속도를 저하시켜 위궤양 출혈을 막는 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며 (Li *et al.*, 1996), 최근에 위점막

보호활성이 somatostatin과 연관되어 있음이 보고 되었고 (De Almeida *et al.*, 2012), 합성 somatostatin analogue인 octreotide가 만성 스트레스로 유발된 랫드의 위병변을 억제하는 것으로 보고 되었다 (Nassar *et al.*, 2011). 본 연구에서 MSE를 somatostatin 수용체 특이적 조직 assay에 적용한 결과, 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 농도 의존적으로 기닉픽 회장의 수축을 증가시켰는데, 기존 문헌의 내용으로 유추해 보았을 때 MSE가 somatostatin 수용체를 경유하여 위점막 보호 활성을 나타낼 가능성이 높다고 할 수 있다.

MSE의 안전성을 증명하기 위해 급성 및 반복 경구투여 독성시험을 실시하였다. 단회 경구투여 독성시험 결과, MSE의 최소치사량 (MLD)은 2,000 mg/kg/day였으며, 4주 반복 경구투여 독성시험 결과 무해용량 (NOAEL)이 2,000 mg/kg이었다. 이러한 결과는 MSE가 임상적으로도 매우 안전한 약물일 가능성을 보여 준다.

목별자 원생약의 안정적인 수급을 위하여 LC-MS Similarity Analysis를 수행하였으며, 분석 결과 중국 운남성 산지의 목별자가 기준에 적합함을 알 수 있었다. 이와 더불어 목별자 원생약을 수급하는 과정 중에 동속 식물과의 혼용 가능성에 대해 문헌적 연구를 실시하였는데, 그 결과 동속 식물과 혼재될 가능성이 희박하고, 만약 혼재되어 있다고 하더라도 다른 동속 식물과 육안으로 쉽게 구분이 가능함을 알 수 있었다. 또한, MSE의 함량 분석법에 대한 신뢰성을 확보하기 위해 밸리데이션 연구를 수행하였고, 이를 통해 현 분석법에 대한 신뢰성을 확보할 수 있었다. 이러한 결과들은 목별자의 GCAP (Good Collecting & Agricultural Practice)를 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, MSE는 다양한 급성 및 만성 위염 모델에서 현재 표준 치료제로 사용하고 있는 레바미피드와 비교했을 때 우수한 효능을 보였고, 다양한 *in vivo* 및 *in vitro* 기전 모델에서도 뛰어난 효과를 나타냈으며, 단회 및 반복 경구투여 독성시험에서 우수한 안전성을 보였다. 또한, 원생약에 대한 문헌적 연구, *similarity analysis*, 분석법 밸리데이션 연구를 통해 MSE를 개발하는데 있어 GCAP를 위한 다양한 기초 데이터를 확보할 수 있었다. 본 연구를 통해 얻어진 이러한 결과들을 종합해 볼 때, MSE를 위점막 보호 활성을 갖는 신규 천연물의약품으로 개발할 경우 성공 가능성이 충분하다고 판단된다.

V. 참고문헌

식품의약품안전청, 대한약전외한약(생약) 규격집, 신일북스, 2007.

정답편집부, 중약대사전, 정답, 2006.

Akiba, Y., Furukawa, O., Guth, P.H., Engel, E., Nastaskin, I., Kaunitz, J.D. Sensory pathways and cyclooxygenase regulate mucus gel thickness in rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 2001, **280**, G470–G474.

Akiba, Y., Guth, P.H., Engel, E., Nastaskin, I., Kaunitz, J.D. Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest, Liver Physiol*. 2000, **279**, G437–G447.

Amaral, M.C., Favas, C., Alves, J.D., Riso, N., Riscado, M.V. Stress-related mucosal disease: incidence of bleeding and the role of omeprazole in its prophylaxis. *Eur J Intern Med*, 2010, **21**, 386-388.

Avgerinos, A., Sgouros, S., Viazis, N., Vlachogiannakos, J., Papaxoinis, K., Bergele, C., Sklavos, P., Raptis, S.A. Somatostatin inhibits gastric acid secretion more effectively than pantoprazole in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol*, 2005, **40**, 515-522.

Bell, N.J., Hunt, R.H. Progress with proton pump inhibition. *Yale J Biol Med*, 1992, **65**, 649-657.

Berardi, R.R., Savitsky, M.E., Nostrant, T.T. Maintenance therapy for prevention of recurrent peptic ulcers. *Drug Intell Clin Pharm*, 1987, **21**, 493-501.

Bouguet-Bonnet, S., Rochd, M., Mutzenhardt, P., Henry, M. Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of three triterpene saponins from roots of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2002, **40**, 618–621.

Brzozowski, T., Konturek, P.C., Drozdowicz, D., Konturek, S.J., Zayachivska, O., Pajdo, R., Kwiecien, S., Pawlik, W.W., Hahn, E.G. Grapefruit-seed extract attenuates ethanol-and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**, 6450-6458.

Chan, L.Y., Wang, C.K., Major, J.M., Greenwood, K.P., Lewis, R.J., Craik, D.J., Daly, N.L. Isolation and characterization of peptides from *Momordica cochinchinensis* seeds. *J Nat Prod*, 2009, **72**, 1453-1458.

Cheung, S.C., Li, N.H. Chinese Medicinal Herbs of Hong Kong. Hong Kong: Commercial Press, 1985, 146.

Chuethong, J., Oda, K., Sakurai, H., Saiki, I., Leelamanit, W. Cochinin B, a novel ribosome-inactivating protein from the seeds of *Momordica cochinchinensis*. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**, 428-432.

D'Amour, F.E., Smith, D.L. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*, 1941, **72**, 74-79.

De Almeida, A.B., Luiz-Ferreira, A., Cola, M., Di Pietro Magri, L., Batista, L.M., de Paiva, J.A., Trigo, J.R., Souza-Brito, A.R. Anti-Ulcerogenic Mechanisms of the Sesquiterpene Lactone Onopordopicrin-Enriched Fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): Role of Somatostatin, Gastrin, and Endogenous Sulphydryls and Nitric Oxide. *J Med Food*, 2012, **15**, 378-383.

De Shan, M., Hu, L.H., Chen, Z.L. A new multiflorane triterpenoid ester from *Momordica cochinchinensis* Spreng. *Nat Prod Lett*, 2001, **15**, 139-145.

Dennis, T., Fournier, A., St. Pierre, S., and Quirion, R. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, **251**, 718-725.

Dror, N., Tveria, L., Meniv, I., Ben-Shmuel, S., Filipovich, T., Fleisher-Berkovich, S. Inhibitory effect of somatostatin on prostaglandin E2 synthesis by primary

neonatal rat glial cells. *Regul Pept*, 2008, **150**, 21-25.

Evangelista, S., Tramontana, M., Panerai, C., Surrenti, C., Renzi, D. Gastric lesions induced by concentrated ethanol are associated with a decrease in gastric calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in rats. *Scand J Gastroenterol*, 1993, **28**, 1112-1114.

Feldman, M., Burton, M.E. Histamine₂-receptor antagonists. Standard therapy for acid-peptic diseases. *N Eng J Med*, 1990, **323**, 1672-1680.

Feniuk, W., Dimech, J., Humphrey, P.P. Characterization of somatostatin receptors in guinea pig isolated ileum, vas deferens and right atrium. *Br J Pharmacol*, 1993, **110**, 1156-1164.

Frezza, M., Gorji, N., Melato, M. The histopathology of non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastroduodenal damage: correlation with *Helicobacter pylori*, ulcers, and haemorrhagic events. *J Clin Pathol*, 2001, **54**, 521-525.

Frobert, Y., Nevers, M.C., Amadesi, S., Volland, H., Brune, P., Geppetti, P., Grassi, J., Créminon, C. A sensitive sandwich enzyme immunoassay for calcitonin gene-related peptide (CGRP): characterization and application. *Peptides*, 1999, **20**, 275-284.

Fullarton, G.M., McLauchlan, G., Macdonald, A., Crean, G.P., McColl K.E. Rebound nocturnal hypersecretion after four weeks treatment with an H₂ receptor antagonist. *Gut*, 1989, **30**, 449-54.

Gabor, M. Mouse Ear Inflammation Models and Their Pharmacological Applications Akademiai Kiado, USA, 2000.

Gao, X.M., Mu Bie Zi (Semen momordicae). In: Gao X.M., ed. Chinese Materia Medica. Beijing: Traditional Chinese Materia Medica Press 2005: 601-602.

Guo, S., Kenne, L., Lundgren, L.N., Rönnerberg, B., Sundquist, B.G. Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry*, 1998, **48**, 175-180.

Hayashi, H., Ohno, T., Nishiyama, K., Boku, K., Katori, M., Majima, M. Transient prevention of ethanol-induced gastric lesion by capsaicin due to release of endogenous calcitonin gene-related peptide in rats. *Jpn J Pharmacol*, 2001, **86**, 351-354.

Helyes, Z., Pintér, E., Németh, J., Sándor, K., Elekes, K., Szabó, A., Pozsgai, G., Keszthelyi, D., Kereskai, L., Engström, M., Wurster, S., Szolcsányi, J. Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *Br J Pharmacol*, 2006, **149**, 405-415.

Higuchi, K., Watanabe, T., Tanigawa, T., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Arakawa, T. Sofalcone, a gastroprotective drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori*: A randomized controlled comparative trial with cimetidine, an H₂-receptor antagonist. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, **25**, S155-160.

Holzer, P. Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology*, 1998, **114**, 823–839.

Holzer, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, **7**, 563–569.

Holzer, P., Livingston, E.H., Saria, A., Guth, P.H. Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. *Am J Physiol*, 1991, **260**, G363–G370.

Hsu, D.Z., Chu, P.Y., Li, Y.H., Liu, M.Y. Sesamol attenuates diclofenac-induced acute gastric mucosal injury via its cyclooxygenase-independent antioxidative effect in rats. *Shock*, 2008, **30**, 456-462.

Hunskar, S., Fasmer O.B. and Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Meth*, 1985, **14**, 69-76.

Ichikawa, T., Ishihara, K., Kusakabe, T., Hiruma, H., Kawakami, T., Hotta, K. CGRP modulates mucin synthesis in surface mucus cells of rat gastric oxyntic mucosa. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 2000, **279**, G82–G89.

Inaba, N., Shibata, M., Onodera, S., Tanaka, M., Suzuki, T., Kase, N., Yamaura, T. Capsaicin-induced calcitonin gene-related peptide release from isolated rat stomach measured with a new chemiluminescent enzyme immunoassay. *Jpn J Pharmacol*, 1996, **72**, 223-229.

Inoue, K., Motonaga, A., Nishimura, T., Yokota, M., Miki, N., Fujisawa, H., Ueda, F., Shibata, Y., Kimura, K. Mechanism of Anti-inflammatory Action of Etodolac. *Arzneimittelforschung*, 1991, **41**, 235-239.

Iwamoto, M., Okabe, H., Yamauchi, T., Tanaka, M., Rokutani, Y., Hara, S., Mihashi, K., Higuchi, R. Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* Spreng. I. Isolation and characterization of the seed saponins, Momordica saponin I and II. *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**, 464-478.

Iwamoto, M., Okabe, H., Yamauchi, T. Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* Spreng. II. Isolation and characterization of the root saponins, Momordins I, II and III. *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**, 1-7.

Jia, Z., Koike, K., Nikaido, T. Major triterpenoid saponins from *Saponaria officinalis*. *J Nat Prod*, 1998, **61**, 1368-1373.

Joseph J.K. Studies on Ecogeography and Genetic Diversity of Genus *Momordica* L. In India. Ph.D. Thesis, Mahatma Gandhi University, Kerala, India. 2004.

Kan, L.D., Hu, Q., Chao, Z.M., Song, X., Cao, X.L. Chemical constituents of unsaponifiable matter from seed oil of *Momordica cochinchinensis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2006, **31**, 1441-1444.

Kang, J.M., Kim, N., Kim, B., Kim, J.H., Lee, B.Y., Park, J.H., Lee, M.K., Lee, H.S., Kim, J.S., Jung, H.C., Song, I.S. Enhancement of gastric ulcer healing and angiogenesis by cochinchina *Momordica* seed extract in rats. *J Korean Med Sci*,

2010, **25**, 875-881.

Kang, J.M., Kim, N., Kim, B., Kim, J.H., Lee, B.Y., Park, J.H., Lee, M.K., Lee, H.S., Jang, I.J., Kim, J.S., Jung, H.C., Song, I.S. Gastroprotective action of Cochinchina momordica seed extract is mediated by activation of CGRP and inhibition of cPLA(2)/5-LOX pathway. *Dig Dis Sci*, 2009, **54**, 2549-2560.

Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Kawahira, K., Sakanaka, M. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. *Br J Pharmacol*, 2006, **148**, 860-870.

Kitagawa, H., Takeda, F., Kohei, H. A simple method for estimation of gastric mucus and effects of antiulcerogenic agents on the decrease in mucus during water-immersion stress in rats. *Arzneimittelforschung*, 1986, **36**, 1240–1244.

Konturek, S.J., Konturek, P.C., Konturek, J.W., Plonka, M., Czesnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T., Bielanski, W. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J Physiol Pharmacol*, 2006, **57**, 29-50.

Kubota, K., Sato, M., Murakami, T., Yamagishi, T. Pharmacological studies on the saponin isolated from the seed of *Momordica cochinchinensis* Sprenger. *Yakugaku Zasshi*, 1971, **91**, 174-179.

Lambrecht, N., Burchert, M., Respondek, M., Muller, K.M., Peskar, B.M. Role of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin in the rat. *Gastroenterology*, 1993, **104**, 1371–1380.

Lauwers, G.Y. Gastric epithelial dysplasia. *Gut*, 1999, **45**, 784-790.

Lawson, D.C., Mantyh, C.R., Pappas, T.N. Effect of CGRP antagonist, alpha-CGRP 8–37, on acid secretion in the dog. *Dig Dis Sci*, 1994, **39**, 1405–1408.

Li, M.K., Sung, J.J., Woo, K.S., Sanderson, J., Leung, N.W., Yu, L.M., Tsui, C.P., Chung, S.C., Leung, F.W. Somatostatin reduces gastric mucosal blood flow in patients with portal hypertensive gastropathy. *Dig Dis Sci*, 1996, **41**, 2440-2446.

Li, Y., Wu, T., Zhu, J., Wan, L., Yu, Q., Li, X., Cheng, Z., Guo, C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, **52**, 597-602.

Luo, J.G., Kong, L.Y., Takaya, Y., Niwa, M. Two new monodesmosidic triterpene saponins from *Gypsophila oldhamiana*. *Chem Pharm Bull*, 2006, **54**, 1200-1202.

Manela, F.D., Ren, J., Gao, J., McGuigan, J.E., Harty, R.F. Calcitonin gene-related peptide modulates acid-mediated regulation of somatostatin and gastrin release from rat antrum. *Gastroenterology*, 1995, **109**, 701-706.

Marchetti, M., Arico, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R. and Ghiara, P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*, 1995, **267**, 1655-1658.

Mark, F., Michael E.B. Histamine₂-receptor antagonists - Standard therapy for acid-peptic diseases. *N Engl J Med*, 1990, **323**, 1672-1680.

Markovics, A., Szöke, E., Sándor, K., Börzsei, R., Bagoly, T., Kemény, A., Elekes, K., Pintér, E., Szolcsányi, J., Helyes, Z. Comparison of the Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-14 in Distinct *In Vitro* and *In Vivo* Model Systems. *J Mol Neurosci*, 2012, **46**, 40-50.

Matsuda, H., Li, Y., Murakami, T., Yamahara, J., Yoshikawa, M. Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci*, 1998, **63**, PL245-PL250.

Mills, J.G., Wood, J.R. The pharmacology of histamine H₂-receptor antagonists. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 1989, **11**, 87-95.

Mizuno, T. Easy ulcer tendency of the stomach in hypotensive patients. *Yokohama Med Bull*, 1987, **38**, 87-97.

Mok, D.K.W., Chau, F.T. Chemical information of Chinese medicines: A challenge

to chemist. *Chemom Intell Lab Syst*, 2006, **82**, 210-217.

Montesinos, M.C., Yangi, P., Longaker, M., Sung, J., Levine, J., Nilsen, D., Reibman, J., Li, M., Jiang, C.K., Hirschhorn, R., Recht, P.A., Ostad, E., Levin, R.I., Cronstein, B.N. Wound healing is accelerated by agonists of Adenosine A2 receptors (Gas-Linked) Receptors. *J Exp Med*, 1997, **186**, 1615-1620.

Nam, S.Y., Kim, N., Lee, C.S., Choi, K.D., Lee, H.S., Jung, H.C., Song, I.S. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. *Dig Dis Sci*, 2005, **50**, 2110-2120.

Nassar, N.N., Schaalán, M.F., Zaki, H.F., Abdallah, D.M. Octreotide ameliorates gastric lesions in chronically mild stressed rats. *World J Gastroenterol*, 2011, **17**, 1135-1142.

Nawamura, N., Watanabe, H., Oshio, H. Saponins from roots of *Momordica cochinchinensis*. *Phytochemistry*, 1998, **27**, 3585-3591.

Nishihara, K., Nozawa, Y., Nakano, M., Ajioka, H., Matsuura, N. Sensitizing effects of lafutidine on CGRP-containing afferent nerves in the rat stomach. *Br J Pharmacol*, 2002, **135**, 1487-1494.

Ohno, T., Hattori, Y., Komine, R., Ae, T., Mizuguchi, S., Arai, K., Saeki, T., Suzuki, T., Hosono, K., Hayashi, I., Oh-Hashi, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., Amagase, K., Okabe, S., Saigenji, K., Majima, M. Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. *Gastroenterology*, 2008, **134**, 215-225.

Park, J.H., Son, K.H., Kim, S.W., Chang, H.W., Bae, K., Kang, S.S., Kim, H.P. Antiinflammatory activity of *Synurus deltoides*. *Phytother Res*, 2004, **18**, 930-933.

Park, S., Hahm, K.B., Oh, T.Y., Jin, J.H., Choue, R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci*, 2004, **49**, 384-394.

Perry, L.M. "Medicinal Plants of East and Southeast Asia, Attributed Properties and Uses". The MIT Press, Cambridge. 1980, p. 117.

Pharmacopoeia of the People's Republic of China Vol. 1, English Edition, 1997.

Pintér, E., Helyes, Z., Szolcsányi, J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther*, 2006, **112**, 440-456.

Schaefer, H., Renner, S.S. A three-genome phylogeny of Momordica (Cucurbitaceae) suggests seven returns from dioecy to monoecy and recent long-distance dispersal to Asia. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, **54**, 553-560.

Schunack, W. Pharmacology of H₂-receptor antagonists: an overview. *J Int Med Res*, 1989, **17**, 9A-16A.

Shan, M.D., Hu, L.H., Chen, Z.L. A new multiflorane triterpenoid ester from Momordica cochinchinensis Spreng. *Natural Product Letters*, 2001, **15**, 139-145.

Shimatani, T., Inoue, M., Kuroiwa, T., Xu, Jing., Nakamura, M., Tazuma, S., Ikawa, K., Morikawa, N. Lafutidine, a Newly Developed Antiulcer Drug, Elevates Postprandial Intra gastric pH and Increases Plasma Calcitonin Gene-Related Peptide and Somatostatin Concentrations in Humans: Comparisons with Famotidine. *Digestive Diseases and Sciences*, 2006, **51**, 114-120.

Stemmermann, G.N. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer*, 1994, **74**, 556-564.

Suzuki, M., Miura, S. Role of ammonia-monochloramine system in *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal injury. *Nippon Rinsho*, 1993, **51**, 3154-3158.

Szabo, S., Bynum, T.E. Alternatives to the acid-oriented approach to ulcer disease: does 'cytoprotection' exist in man? A new classification of antiulcer agents. *Scand. J Gastroenterol*, 1988, **23**, 1-6.

Szabo, S., Kusstatscher, S., Sakoulas, G., Sandor, Z., Vincze, A., Jadus, M. Growth

factors: new 'endogenous drugs' for ulcer healing. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1995, **210**, 15-18.

Takei, M. The development of polaprezinc research. *Yakugaku Zasshi*, 2012, **132**, 271-277.

Terano, A., Arakawa, T., Sugiyama, T., Suzuki, H., Joh, T., Yoshikawa, T., Higuchi, K., Haruma, K., Murakami, K., Kobayashi, K. Rebamipide, a gastro-protective and anti-inflammatory drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori* in a Japanese population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Gastroenterol*, 2007, **42**, 690-693.

Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 1992, **51**, 5-17.

Tsoi, A.Y., Ng, T.B., Fong, W.P. Antioxidative effect of a chymotrypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae) seeds in a primary rat hepatocyte culture. *J Pept Sci*, 2005, **11**, 665-668.

Tsoi, A.Y., Wong, R.C., Ng, T.B., Fong, W.P. First report on a potato I family chymotrypsin inhibitor from the seeds of a Cucurbitaceous plant, *Momordica cochinchinensis*. *Biol Chem*, 2004, **385**, 185-189.

Urushidani, T., Okabe, S., Takeuchi, K., Takai, K. Effects of various amino acids on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Japan J Pharmacol*, 1977, **27**, 316-319.

Waterman, P.G., Hasan, C.M., Jabbar, A. Columbin from the Root of *Momordica cochinchinensis*: High-field NMR Studies. *Planta medica*, 1985, **51**, 181-182.

Wong, R.C., Fong, W.P., Ng, T.B. Multiple trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* seeds, the Chinese drug mubiezhi. *Peptides*, 2004, **25**, 163-169.

Xiao, C., Rajput, Z.I., Liu, D., Hu, S. Enhancement of serological immune responses to foot-and-mouth disease vaccine by a supplement made of extract of

- cochinchina momordica seeds. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, **14**, 1634-1639.
- Xie, B., Gong, T., Tang, M., Mi, D., Zhang, X., Liu, J., Zhang, Z. An approach based on HPLC-fingerprint and chemometrics to quality consistency evaluation of Liuwei Dihuang Pills produced by different manufactures. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, **48**, 1261-1266.
- Yamasaki, K., Arakawa, T., Takaishi, O., Higuchi, K., Kobayashi, K., Kuroki, T. Influence of rebamipide on indometacin-induced gastric hemorrhage in rats under restraint stress. *Arzneimittelforschung*, 1999, **49**, 359-365.
- Yamasaki, K., Ishiyama, H., Imaizumi, T., Kanbe, T., Yabuuchi, Y. Effect of OPC-12759, a novel antiulcer agent, on chronic and acute experimental gastric ulcer, and gastric secretion in rats. *Jpn J Pharmacol*, 1989, **49**, 441-448.
- Yang, Z.J., Tang, J.S., Jia, H. Morphine microinjections into the rat nucleus submedius depress nociceptive behavior in the formalin test. *Neurosci Lett*, 2002, **328**, 141-144.
- Yoon, K.D., Jeong, D.G., Hwang, Y.H., Ryu, J.M., Kim, J. Inhibitors of osteoclast differentiation from *Cephalotaxus koreana*. *J Nat Prod*, 2007, **70**, 2029-2032.
- Zheng, Q., Li, W., Han, L., Koike K. Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from *Gypsophila oldhamiana*. *Chem Pharm Bull*, 2007, **55**, 646-650.

Abstract

Momordicae cochichinensis Seed Extract as a Therapeutic Agent for Acute & Chronic Gastritis and Its Constituents

Jung, Kiwon

College of Pharmacy (Pharmacognosy)

The Graduate School

Seoul National University

The gastric mucosa is the mucous membrane layer that protects the stomach against harsh acidic conditions. A mounting body of research has shown that this protective layer can be damaged by various factors, including excessive alcohol consumption, use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), exposure to *Helicobacter pylori*, disturbance of microcirculation of gastric mucosa, and stress-induced hypotension. The damaged mucosal layer becomes susceptible to inflammation, such as flare, hemorrhage, and edema, which ultimately results in ulceration in the stomach.

Over the past decades, H₂ receptor antagonists and proton pump inhibitors (PPIs), which prevent the secretion of gastric acid, have been used for the treatment of gastric ulcer. However, these drugs have a severe drawback of frequent relapse upon the cessation of administration. Recently, a novel class of drugs, known as mucosal protective agents, such as rebamipide, polaprezinc, and sofalcone, has been introduced to clinical practices. Unlike the H₂ receptor antagonists and PPIs, the mucosal protective drugs can promote the regeneration of the mucosal tissue to ensure protection against the recurrence of gastritis. However, the mucosal

protective drugs' clinical value is limited due to the requirement of high dose and slow onset. Many attempts have been made to obtain a novel class drug with improved therapeutic efficacy and safety.

In this study, to develop a new herbal gastroprotective agent, we referred a variety of references, for example traditional Chinese medicine archives, journal papers, commercial DBs, and consultants' opinions so that we chose 15 candidates and performed *in vivo* models as tools for the screening. After two steps of *in vivo* screening, we have achieved a final herbal candidate, *Momordica cochinchinensis* seed, *Momordica cochinchinensis* Springer (Cucurbitaceae), which has long been known in traditional Chinese medicine for its various therapeutic benefits including effective relief of boils, rheumatic pain, muscular spasm, hemorrhoids, and hemangiomas.

We conducted bioactivities-guided fractionation and revealed that *n*-BuOH fraction showed a most potent anti-gastritis activity. The *n*-BuOH fraction was separated by column chromatography to yield three saponins, compounds **1**, **2**, and **3** which showed gastroprotective effects in rat model of ethanol-induced gastritis. On the basis of spectroscopic evidences, compound **1** was assigned as gypsogenin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside, compound **2** as quillaic acid-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside, and compound **3** as a known ingredient, *Momordica* saponin I. Compound **1** was isolated for the first time from natural resources. To the best of our knowledge, compound **2** was firstly determined from Genus *Momordica*.

Although the compound **3** (*Momordica* saponin I) have shown the relative gastroprotective effect in gastritis model, due to the very low separating yield and

difficulties in isolating or synthesizing, we decided to investigate ethanol extract of *Momordica cochinchinensis* seed (MSE) instead of pure compound in the remaining part of our study. Nevertheless, even though further explorations are needed, momordica saponin I might be used as an active marker for MSE.

One of the most prevalent methods to assess the efficacy of gastritis treatment using the animal model is to induce damage on the gastric mucosa, which uses NSAID, ethanol or *H. pylori*. In the animal models that use ethanol, diclofenac, and *H. pylori*, the gastric damage indexes of MSE-treated group were found to be lower than those values of the positive control, rebamipide which has been commercially used for mucosal protection and treatment of gastritis. Therefore, it is evident that MSE is able to protect the damage of the gastric mucosa effectively. In addition, MSE not only increased secretion of gastric mucus, but it showed wound-healing effect, anti-inflammatory effect, and analgesic effect, which presumably are responsible for increasing the gastroprotective effects of MSE.

To investigate the mechanism of gastroprotective effects induced by MSE, we conducted calcitonin gene-related peptide (CGRP) and somatostatin-specific tissue assays. CGRP, a 37-amino acid neuropeptide, plays strong gastroprotective role by either promoting secretion of gastric mucus and bicarbonate, or stimulating gastric mucosal blood circulation. On the other hand, somatostatin has been known to inhibit gastrin release *via* somatostatin receptor 2 and thus, attenuate gastric acid secretion. From the results of our studies, CGRP and somatostatin most likely plays a role in the ulcer healing by MSE in gastritis models.

To assure the safety of MSE, single and repeated oral dose toxicity studies were conducted. The minimal lethal dose of MSE was determined to be 2,000 mg/kg/day in a single oral dose toxicity study. The NOAEL was set to be 2,000

mg/kg/day from the repeated oral dose toxicity study. These results clearly demonstrate that MSE might have a high therapeutic index.

For the purpose of setting up basic data for Good Collection and Agricultural Practice (GCAP), we performed LC-MS Similarity Analysis of sourced herbal materials from various regions, literature studies of *Momordica* species, and validation of analytical method. The results demonstrated i) *Momordica cochichinensis* seed of Yunnan Sheng in China was suitable for the specification, ii) there may be little chances of adulteration in sourcing the raw material, and iii) the quantitative method of MSE has been well validated.

In conclusion, we demonstrated that MSE has reduced progressing acute and chronic gastrointestinal disorders, such as gastritis and gastric ulcer, when compared to that of the current standard therapy in various *in vivo* and *in vitro* models. In addition, MSE showed good safety profiles in the oral dose toxicity studies. These results warrant that MSE could be a promising herbal medicine for the treatment of gastric disorders.

Keywords : *Momordica cochichinensis* Sprenger, Gastroprotective, Calcitonin gene-related peptide, Somatostatin, *Momordica* saponin

Student Number : 2004-31145

감사의 글

8년이란 긴 박사학위 과정을 마치고 감사의 글을 적고 있는 지금, 정신 없이 보낸 세월을 핑계로 고마운 분들에 대한 감사의 마음을 잊고 살았다는 느낌이 듭니다. 어릴 때는 모든 일이 저로 인해 이루어지는 줄만 알고 어줍잖은 자만에 빠졌었으나, 이제는 제 주위에 계신 모든 분들의 손길 덕에 제 인생이 더욱 값지게 된다는 생각에 하루하루를 감사히 살고 있습니다. 이러한 교훈이 본 논문으로 얻게 되는 학위보다 더욱 값진 것이라 생각합니다.

언제나 저를 믿어 주시고, 올바른 길로 인도하여 주신 김진웅 교수님께 가장 먼저 감사의 말씀을 드리고자 합니다. 지금 와서 생각해 보니 박사학위 기간 동안 교수님께 많은 어려움을 드렸던 것 같습니다. 부디 철들지 못했던 지난 날의 저의 행동과 생각들을 용서하여 주시기 바랍니다. 이에 대한 보답의 길은 더욱 열심히, 그리고 의미 있게 사는 것이라고 생각합니다. 교수님, 진심으로 감사 드립니다. 그리고 한결같은 인자하심으로 부족한 저에게 신뢰와 용기를 주신 김영중 교수님께 진심으로 감사 드리며, 학위 기간 동안 많은 조언과 도움을 아끼지 않으셨던 성상현 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 비록 설익은 논문이지만 좋은 논문이 될 수 있도록 많은 조언을 아끼지 않으신 박정일 교수님과 김선여 교수님, 강건욱 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

이번 박사학위를 위해 많은 도움을 주신 선후배님들과 동기분들이 있습니다. 청춘이 꽃 필 무렵부터 같이 생활하였고, 이제는 정신적인 멘토가 되어 주신 진영원 교수님과 못난 동기 때문에 귀한 시간을 희생해 주었고 걱정을 같이한 박규환 교수, 윤기동 교수, 김철영 교수, 정윤희 교수, 허태희 교수에게 지면으로나마 감사를 말을 전합니다. 그리고 선배를 위해 고생해 준 후배 종혜와 동영이에게 감사 드리며,

바쁘신 와중에도 내일처럼 도움을 주신 채희성 박사님께도 감사드립니다. 일일이 이름을 나열하진 못했으나 저의 학위 논문을 위해 도움을 주신 모든 학교 선후배, 동기 여러분께도 깊은 감사를 드립니다.

또한, 제 마음의 고향을 만들어 준 나의 영원한 잡사 친구, 효일이, 재학이, 순재, 태식이, 현이, 희상이, 일균이, 흥득이, 석민이, 창림이, 명우 그리고 지금은 하늘에 있는 소중한 친구 성태에게도 깊은 감사를 드립니다. 모두들 힘든 시기를 겪고 있지만 앞으로도 우리들의 영원한 우정을 지켰으면 합니다. 그리고 우리 아이들을 위해 항상 즐겁게 봉사하시는 조아모 회원, 양진환 아버님, 김태균 아버님, 이창래 아버님, 김형태 아버님, 오제민 아버님, 남동훈 아버님께도 감사의 말씀을 드립니다. 박사학위 준비하느라 신경을 많이 못 쓴 것 같아 죄송합니다.

벌써 SK케미칼에 근무한지 15년이 되었습니다. 회사 업무를 하면서 박사학위를 준비한다는 것이 쉬운 일이 아니었으나 많은 분께서 도와 주셔서 여기까지 오게 되었습니다. 김훈택 실장님, 민동선 팀장님, 류근호 팀장님, 김재선 팀장님, 오준교 팀장님, 박양혜 차장님, 서정민 과장님, 신호철 차장, 유현승 과장 덕분에 무사히 박사학위를 마칠 수 있게 되었습니다. 특히, 김재선 팀장님께서 많은 도움을 주셨으며 어려운 시기를 잘 극복할 수 있도록 커다란 의지가 되어 주셨습니다. 진심으로 감사합니다. 그리고 저의 상사셨던 한국해양연구원 신희재 박사님께도 감사 드립니다. 박사님의 따뜻한 마음과 열정이 제 인생에 있어 커다란 길잡이가 되고 있습니다. 비록 언급되지 않았으나 여러모로 도움을 주신 회사 분들에게도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

무엇보다도 어려운 환경 속에서도 바른 사람이 되도록 가르쳐 주시고 한결 믿음으로 저를 길러주신 아버지, 어머니께 깊은 감사를 드립니다. 마냥 철부지였던 막내가 드디어 박사가 되었습니다! 그리고 먼 발치에서도 항상 든든한 후원자가 되시는 누나와 매형, 형과 형수님께도 감사 드립니다. 또한, 첫째, 둘째, 셋째 형님께도 감사의

말씀을 드립니다. 바쁘다는 핑계로 자주 연락 드리지 못해 죄송한 마음뿐입니다.

지금은 비록 하늘 나라에 계시지만 진심으로 존경하는 장모님과 장인어른께 이 부족한 논문을 바치고자 합니다. 지금이라도 “정서방, 축하하네~”라고 말씀하실 것 같아 눈시울이 뜨거워 지지만, 지난 날의 기억들이 되새기며 따뜻한 마음으로 살고자 합니다. 항상 하늘에서 인자하신 모습으로 저를 지켜봐 주실 거라 믿고 열심히 그리고 성실하게 살겠습니다. 이제는 더 이상 저희 걱정은 마시고 편안히 쉬시기 바랍니다.

마지막으로 지금 이 순간에도 곁에 있는, 현재까지 그랬고 앞으로도 믿음과 사랑으로 같이 할 사랑스러운 저의 아내 혜경이와 하나뿐인 우리 딸 수현이에게 진심으로 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 긴 박사학위 과정 중에 힘든 일이 많았을 텐데 잘 견뎌줘서 고맙고, 솔직히 미안한 마음이 큼니다. 앞으로는 행복하고 좋은 일들만 가득할 것이며, 오늘보다 더 행복한 우리 가족이 될 수 있도록 최선을 다하겠습니다. 더욱 사랑하겠습니다.

다시 한번 저의 박사학위를 위해 도움을 주신 모든 분들께 진심으로 감사를 말씀을 드리며, 부족하지만 이 논문을 바칩니다. 항상 행복하시길 기원!하겠습니다.