

## 청목노상 뽕잎으로부터 *Helicobacter pylori* 억제물질의 정제 및 동정

조영제<sup>1\*</sup> · 이경환<sup>1</sup> · 차원섭<sup>1</sup> · 주인식<sup>1</sup> · 윤동혁<sup>1</sup> · 안봉전<sup>2</sup> · 이선호<sup>3</sup> · 김명옥<sup>4</sup> · 김정환<sup>5</sup> · 천성숙<sup>5</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품공학과, <sup>2</sup>대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>3</sup>안동대학교 해양바이오산업연구소, <sup>4</sup>경북해양바이오 산업연구원, <sup>5</sup>NIP Biotech

### Purification and Identification of Inhibitory Compounds from *Cheongmoknosang* Mulberry Leaves (*Morus alba*. L.) on *Helicobacter pylori*

Young-Je Cho<sup>1\*</sup>, Kyung-Hwan Lee<sup>1</sup>, Woen-Seup Cha<sup>1</sup>, In-Sik Ju<sup>1</sup>, Dong-hyuck Yun<sup>1</sup>, Bong-Jeun An<sup>2</sup>, Seon-ho Lee<sup>3</sup>, Myung-Uk Kim<sup>4</sup>, Jeung-Hoan Kim<sup>5</sup>, Sung-Sook Chun<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea  
<sup>2</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, Korea  
<sup>3</sup>The Institute of Marine Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Korea  
<sup>4</sup>Gyungbuk Institute for Marine Bio-Industry, Ulsjin 767-801, Korea  
<sup>5</sup>NIP Biotech., Munkyeong 745-706, Korea

Received March 27, 2009; Accepted June 9, 2009

In this study, we tried to find the subject to inhibit *H. pylori* from *Cheongmoknosang* mulberry leaves extracts and to purify and identify them. Total phenolic compounds of hot water and 80% ethanol extracts are 17.6 and 16.1 mg/g. The activity of *H. pylori* inhibition at 80% ethanol extracts was determined as 15 mm clear zone. The purification of inhibitory compounds were carried on C<sub>18</sub> column and MCI-gel CHP-20 column chromatography which were used a gradient procedure as increasing ethanol in H<sub>2</sub>O. The chemical structure of purified inhibitory compounds on *H. pylori* were identified chlorogenic acid, caffeic acid, and rosmarinic acid by FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and IR spectrum.

**Key words:** antimicrobial activity, *Cheongmoknosang* mulberry leaves, *Helicobacter pylori*, phenolic compounds, purification

### 서 론

의학기술의 발달로 평균수명이 연장되어 인구가 노령화된 반면, 식습관의 변화와 운동부족으로 각종 암, 고혈압 등 순환기계질환과 당뇨병, 간장 장애 등 만성 퇴행성 질환이 급증하고 있다[NSOK, 2003]. 천연물로부터 생리활성물질을 찾는 연구는 오래전부터 많은 연구자들에 의해 이루어지고 있으며, 이에 따른 질병에 대한 치료제 및 예방대책 또는 건강보조제로써 식물 자원이 널리 이용되고 있는 실정이다. 현재 우리나라의 경우 경제성장의 증대와 더불어 각종 성인병이 증가 추세에 있어 기능성 식품 및 건강식품에 대한 관심이 급증하고 있다. 특히, 약용 식물에 대한 여러 가지 향암 및 생리 활성 기능이 밝혀짐에 따라 이들을 추출, 정제하여 기능성 식품 및 의약품으로 개

발함으로써 많은 관심을 가져오고 있으며[Lee 등, 1999; Hong 등, 2000; Lee and Row, 2004], 뽕나무(*Morus alba*)잎의 GABA( $\gamma$ -amino butyric acid)성분도 골수에 존재하여 acetylcholine이라 불리는 신경전달 물질을 증가시키고, 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 하며, 동맥경화를 없애주는 작용이 있음이 밝혀지고 있다[McClure 등, 1975; Shin 등, 1995; Kim 등, 1995; Cha 등, 2003].

*Helicobacter pylori*는 만성 활동성 위염, 위십이지장 및 소화성 궤양의 원인균이며, 위암과 위점막연관 림프 조직형 위 림프종의 중요 인자로 인식되고 있는 균이며[Goodwin and Worsiey, 1993; Suerbaum and Michrtri, 2002; Park 등, 2003; Kang and Lee, 2005], 국내 정상 성인의 *H. pylori* 감염률은 60~75% 정도로 서구 여러나라와 비교하여 매우 높은 보급율을 보이고 있다[Lee 등, 1999]. 1994년 세계보건기구에서는 *H. pylori*를 위암의 제 1군 발암 인자로 규정한 이후 *H. pylori*의 중요성이 더욱 부각되었으며, *H. pylori*의 병리학적 위장질환에 대한 발병기전을 밝히기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다[Kim, 2006]. 위염 및 위궤양 환자 위점막의 조직학적 연구결

\*Corresponding author  
Phone: 82-54-530-1265; Fax: 82-54-530-1269  
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

과에 의하면 *H. pylori*균은 위상피세포 및 점막층에 주로 부착하는 것으로 밝혀졌으며, *H. pylori*관련성 위염은 위축성 변화를 유도하는데 주도적인 역할을 한다[Hunt, 1996]. *H. pylori*의 특징적 성상은 위벽 상피세포에 군락을 형성하고, urease를 생성하여 위내 강산성의 환경에서도 균 주변의 pH를 중성으로 유지하면서 생존할 수 있게 된다[Won 등, 2001]. In vivo에서의 일반적인 *H. pylori*의 계균방법은 크게 4가지로 구분되어, bismuth(BIS)제제를 근간으로 하는 3중 요법, proton pump inhibitor(PPI)를 근간으로 하는 3중 요법, ranitidine bismuth citrate(RBC)를 근간으로 하는 3중 요법, 그리고 BIS를 근간으로 하는 3중 요법에 PPI를 추가하는 4중 요법 등이 사용되고 있는데, 우리나라에서는 1차 치료로 PPI에 기초한 amoxicillin과 clarithromycin을 7일간 투여하는 3제 요법이 가장 널리 쓰이고 있다[Kil 등, 2004]. 이와 같이 약제를 사용한 계균 방법은 좋은 방법일 수 있으나, 항생제의 장기투여 시 항생제 내성균주가 발생하고 약제에 의한 부작용의 우려가 있어 이와 다른 접근법이 요구되는 실정이다[Kim, 2006].

따라서 본 연구에서는 건강식품소재로서의 응용가치가 매우 높다고 볼 수 있는 팽잎으로부터 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성을 가지는 물질을 분리, 정제하고 동정하여 고부가 기능성 식품소재로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시료의 선정.** 실험재료인 청목노상 잎은 2007년 5월 경상북도 상주시 잠사시험장에서 수집한 신선한 잎을 세척한 후 물기를 제거하고 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

**추출물의 제조.** 청목노상팽잎의 알콜추출물은 80% 에탄올 100 mL에 시료 1g을 넣어 24시간 진탕한 후 상징액을 Whatman No. 1 여과지로 여과하였으며 필요에 따라 rotary vacuum evaporator에서 농축하여 사용하였다.

**Phenol 화합물 정량.** 총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법[Folin and Denis, 1912]으로 측정하였으며, 시료 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

**Helicobacter pylori 항균활성 측정.** 실험에 사용한 균주는 위, 십이지장 궤양 원인균인 *H. pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 사용하였다. 균의 배양에는 최적배지(special peptone 0.5 g, agar 0.75 g, NaCl 0.25 g, yeast extract 0.25 g, beef extract 0.2 g 및 pyruvic acid 0.025 g)를 사용하였으며 미호기성 조건을 유지시켜주기 위해서 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 습도는 95% 이상으로 유지하며 배양하였으며, agar plate상에서 배양은 37°C로 48~72시간 동안 실시하였다. 또한 항균 활성 측정은 *H. pylori* 최적배지 plate에 균분산액 100 µL를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한 다음, 멸균된 disc paper(φ 8 mm)를 올리고 0.45 µm membrane filter로 계균한 각 추출물을 vacuum evaporator로 농축한 후 멸균수로 희석하여 phenol 함량이 50~200 µg/100 µL가 되도록 조절한 후 각 추출물 100 µL를 disc paper에 흡수

시키고, 대조구로는 멸균수를 흡수시킨 후 37°C의 미 호기성 조건에서 48시간 동안 incubation한 다음, disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하였다[Chun 등, 2005].

**C<sub>18</sub> column에 의한 정제.** C<sub>18</sub> open column cartridge(Flash cartridge)를 사용하여 에탄올을 0%에서 100%까지 gradient로 분당 20 mL의 유속으로 용출하여 TLC상에서 phenol compound의 분리 정도를 확인 하였다.

**MCI-gel CHP 20P에 의한 정제.** MCI-gel은 다공성 polystyren gel로써 흡착성을 이용하였으므로, 용출용매는 일반적인 revers type인 H<sub>2</sub>O→methanol(0→100%)로 용출하여 TLC상에서 phenol compound의 분리 정도를 확인하였다.

**Thin layer chromatography.** Column에 의해 분리된 용출액을 silica gel plate(50×50 mm)로 CHCl<sub>3</sub>:ethyl formate:ethyl acetic acid:methanol(5:2:5:0.5, v/v/v/v)의 용매를 사용하여 전개한 다음 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 분무하여 100°C 부근에서 발색 시켰다.

**Melting point 측정.** 용해점은 시료 1mg을 취하여 미량용접 측정장치를 이용하여 측정하였다.

**Infrared spectrum(IR) 측정.** IR spectrum은 할로겐화 알칼리 정제법을 이용하였다. 순수 분리된 시료 1mg을 KBr 100 mg 분말과 잘 섞어 배합하고 압력을 가해 가압 정제를 만들어 측정하였다.

**핵자기 공명 분광기(Nuclear Magnetic Resonance: NMR) spectrum 측정.** <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 FT 방법(Pulse Fourier Transform method)을 이용하여 순수정제물 10 mg을 측정 용매 CDCl<sub>3</sub>+DMSO-D<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O에 5~20%(w/v)비율로 용해시키고 TMS(Tertamethylsilane:(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si)를 기준 물질로 하여 PMR(300 MHz)로 측정하였다.

**FAB-mass spectrum 측정.** 고체시료 1mg을 감압상태(10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup> mmHg)에서 negative ion FAB-mass spectrum을 이용하여 화학적 분석법에 의해 측정하였다. 이 때 측정 용매로써는 thioglycerol을 사용하였으며, 측정 조건에서 emitter 전류는 22~28 eV이며, 이온원의 가속가압이 6~7 kV에서 질량분석을 하였다.

**원소 분석.** 분석 시료 1mg을 취해 48시간 감압, 건조하여 완전히 수분을 제거하고 자동원소분석기로 시료에 함유된 C 및 H의 양을 분석하였으며, O는 분자량을 기준으로 계산치에 의한 환산하였다.

## 결과 및 고찰

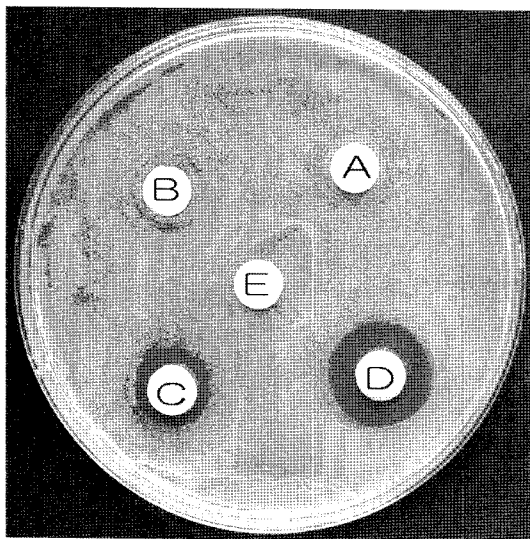
**청목노상 잎의 phenolic 함량 측정.** 페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로써, 다양한 구조와 분자량을 가지며, 이에 따라 이화학적 성질 및 생리적 기능도 매우 다양하게 나타난다. 한 개 또는 두 개 이상의 수산기로 치환된 방향족 고리를 공통적으로 갖는데, 이러한 phenolic hydroxyl group 때문에 단백질, 효소 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질이 있으며, 2가 금속 이온과의 결합력도 갖는다[Lee and Lee, 1994]. 이러한 성질로 인하여 페놀성 화합물은 항 바이러스 작용, 항 종양작용, ACE활성 저해작용, 항균작용 등 많은 생리활성을 가짐이 밝혀지고 있다[Shetty, 1997;

**Table 1. Inhibition activity on *Helicobacter pylori* of purified fractions from *Cheongmoknosang* mulberry leaves by C<sub>18</sub> column**

Fraction	Content of phenolic (µg/mL)	Diameter of clear zone (mm)
1	147.4±0.3	ND <sup>1)</sup>
2	232.3±2.7	ND
3	224.7±1.8	ND
4	235.4±0.2	ND
5	196.1±2.5	ND
6	150.0±0.4	ND
7	126.1±2.5	11
8	81.5±0.4	12
9	68.9±2.5	ND

<sup>1)</sup>Not detected

Each value represents the mean±SD (n=3).



**Fig. 1. Inhibition activity on *Helicobacter pylori* by *Cheongmoknosang* mulberry leaf extracts.** A: phenol contents 50 µg/100 µL. B: phenol contents 100 µg/100 µL. C: phenol contents 150 µg/100 µL. D: phenol contents 200 µg/100 µL. E: Control.

Lee 등, 1998]. 본 연구에 사용된 청목노상 잎 추출물의 페놀성 화합물의 함량을 측정된 결과 Table 1과 같이 16.1 mg/g으로 나타났다.

***Helicobacter pylori* 항균활성 측정.** 만성 위, 십이지장 질병과 관련이 있는 것으로 알려진 *H. pylori*에 대한 저해제로 활용하기 위한 *H. pylori* 항균활성 실험에서, 청목노상 추출물은 Fig. 1과 같이 200 µg/100 µL의 농도에서 15 mm의 clear zone을 형성하여 높은 저해활성을 나타내었다. 이 결과는 위장 내에서 위궤양을 일으키는 원인 균인 *H. pylori*의 억제제로 산업화에 적용시킬 수 있는 우수한 source로 활용이 가능할 것이라 판단된다. 조 등[Cho 등, 2008]은 쇠비름 추출물로부터 13 mm 내외의 clear zone을 얻은 것으로 보고하였으며, 본 연구에 사용된 청목노상의 *H. pylori*에 대한 억제 효과는 방부작용을 하는 것으로 알려진 쇠비름과 크게 차이가 없는 것으로 생각되어, *H. pylori* 저해효과가 우수하였고 항균활성이 우수한 것으로 확인되었다. 따라서 청목노상 뽕잎은 *H. pylori*에 대한 항균제의

**Table 2. Inhibition activity on *Helicobacter pylori* by purified phenolic compounds from *Cheongmoknosang* mulberry leaves**

Compounds	Diameter of clear zone (mm)				
	phenolic content (µg/100 µL)				
	0	50	100	150	200
Comp. A	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-
Comp. B	-	-	-	-	-
Comp. C	-	-	-	-	trace
Comp. D	-	-	-	-	-
Comp. E	-	-	-	-	-
Comp. F	-	-	-	-	trace
Comp. A+Comp. B	-	-	-	-	-
Comp. A+Comp. C	-	-	-	-	-
Comp. A+Comp. D	-	-	-	-	-
Comp. A+Comp. E	-	-	-	-	-
Comp. A+Comp. F	-	-	-	-	-
Comp. B+Comp. C	-	-	-	-	13
Comp. B+Comp. D	-	-	-	-	-
Comp. B+Comp. E	-	-	-	-	-
Comp. B+Comp. F	-	-	-	11	13
Comp. C+Comp. D	-	-	-	-	-
Comp. C+Comp. E	-	-	-	-	-
Comp. C+Comp. F	-	-	-	11	14
Comp. D+Comp. E	-	-	-	-	-
Comp. D+Comp. F	-	-	-	-	-
Comp. E+Comp. F	-	-	-	-	-
Comp. B+Comp. C+Comp. F	-	-	-	12	16

Each value represents the mean±SD (n=3).

원료로써 활용이 가능하다고 판단되었다.

**Column chromatography를 이용한 *Helicobacter pylori* 억제물질의 정제.** 청목노상뽕잎 추출물을 농축하여 C<sub>18</sub> column (Flash cartridge)을 사용하여 revers phase type인 ethanol을 0%에서 100%로 농도를 증가시키며 20 mL/min의 유속으로 detector(UV-VIS, UV-9000, Eyla)를 사용하여 분획하였다. 분리한 결과 9개의 fraction으로 분리되었으며, 각 fraction의 페놀 함량은 Table 1에서와 같이 각 fraction 별로 68.9±2.5~235.4±0.2 µg/mL까지 다양한 페놀 함량을 나타내었다. 또한 각 fraction별로 disc method를 이용한 *H. pylori*의 저해 실험 결과 Table 2에서와 같이 fraction 7과 fraction 8에서 11 mm와 12 mm의 clear zone이 형성되어 단일물질로 분리하기 위해 fraction 7과 8을 다시 MCI-gel CHP-20 column을 이용하여 normal phase type인 ethanol 100%에서 0%로 농도를 감소시키며 10 mL/min의 유속으로 용출한 결과 6개의 단일 물질 분획을 얻을 수 있었으며, 각 분획물은 TLC에 의한 R<sub>f</sub>값에 의해 compound A-F까지 6개의 물질로 분류하였고, 각 단일 분획물은 HPLC로 순도 검정을 하여 단일물질임을 확인하였다.

**정제물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과.** 정제물질인 compound A, B, C, D, E 및 F를 이용하여 *H. pylori*에 대한 항균효과를 알아보기 위해 disc method로 측정된 결과 Table 2에서와 같이 compound A, B, C, D, E 및 F를 단일물질로 *H. pylori*에 처리하였을 때, clear zone이 매우 약하게 형성되었으며, 200 µg/100 µL의 농도로 compound B와 C, compound

Table 3. Spectroscopic data of purified compounds with antimicrobial activity on *Helicobacter pylori*

Compound B	Type	A amorphous powder
	FAB-MS (m/z)	[354.0]
	Melting point	208 °C
	<sup>1</sup> H-NMR	2.10(1H, dd, J=10, 12 Hz, 2-H) 2.12(m, 6-H) 2.26(1H, ddd, J=2, 4, 12 Hz, 2-H) 5.38(1H, ddd, J=4, 9, 10 Hz, 3-H) 3.76(1H, dd, J=2, 9 Hz, 4-H) 4.22(m, 5-H) 6.29(1H, d, J=12 Hz, 6-H) 7.18(1H, d, J=2 Hz, 2-H)
<sup>13</sup> C-NMR	176.4, 168.2, 149.3, 146.6, 127.5, 122.9, 116.6, 115.6, 115.3, 76.2, 73.5, 71.7, 71.4, 39.1, 38.0	
Compound C	Type	A amorphous powder
	FAB-MS (m/z)	[180.0]
	Melting point	161~164 °C
	<sup>1</sup> H-NMR	6.08(1H, d, J=16 Hz, alpha-H) 6.73~6.97(3H, m, aromatic-H) 7.39(1H, d, J=16 Hz, beta-H)
<sup>13</sup> C-NMR	113.9, 114.8, 115.3, 120.9, 126.0, 144.5, 144.9, 147.3, 168.4	
Compound F	Type	A amorphous powder
	FAB-MS (m/z)	[360.0]
	Melting point	204 °C
	<sup>1</sup> H-NMR	2.18(2H, 5.08, 11-H) 6.52(1H, m, 10-H) 6.14(1H, d, J=16 Hz, 8-H) 6.52(1H, d, J=8 Hz, 17=H) 6.63(1H, d, J=8 Hz, 17=H) 6.69(1H, s, 13-H) 6.74(1H, 5-H) 6.83(1H, d, J=8 Hz, 6-H) 6.98(1H, s, 2-H) 7.42(1H, d, J=16 Hz, 7-H)
<sup>13</sup> C-NMR	36.2, 72.6, 113.2, 114.2, 115.1, 115.4, 116.4, 119.9, 121.2, 125.4, 127.3, 143.6, 144.5, 145.2, 145.5, 148.1, 165.8, 170.9	

C와 F, compound B와 F를 혼합하여 처리했을 경우에 *H. pylori*에 대한 항균력은 각각 13, 14, 13 mm의 clear zone을 형성하는 것을 관찰할 수 있었고, compound B, C 및 F 3가지를 혼합하여 처리할 경우 16 mm에 가까운 clear zone이 형성되어 저해활성이 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 compound A와 E의 단일물질로 처리했을 경우와, compound A와 E의 혼합물을 투여할 때도 clear zone은 형성되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 청목노상 뿔잎추출물에서는 단일 물질에 의한 *H. pylori*의 저해를 일으키기 보다는 2종 이상의 혼합물질에 의한 synergistic effect에 의해서 *H. pylori*에 대한 저해가 나타난다고 판단되었다. 또한 이 결과는 Chun 등[Chun 등, 2005]이 Oregano 등의 spice의 추출물에 존재하는 simple phenol들이 단일 물질에 의한 *H. pylori* 저해보다는 synergy effect에 의해 그 효과가 발현된다고 보고한 것과 유사하였다. 이러한 현상에 대해서는 분리된 simple phenol들이 *H. pylori*균의 세포벽에 어떤 mechanism으로 공격을 하는지 추후 보충 연구가 필요하다고 판단되었다.

***Helicobacter pylori* 억제물질의 구조 동정.** 정제물의 항균효과가 가장 높은 세가지 물질에 대한 구조 동정 결과는 각각 Table 3과 같이 나타났다. Compound B는 melting point가 208°C이며, negative FAB-MS에서 354의 분자량을 얻었다. IR spectrum은 3250에서 OH기가, 1710에서 COO기가 확인되었으며, 선광도는 -35.2를 나타내었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 2.10 ppm(dd, J=10, 12 Hz), 2.12 ppm(m), 2.26 ppm(ddd, J=2, 4, 12 Hz), 3.76 ppm(dd, J=2, 9 Hz-H), 4.22 ppm(m) 및 5.38 ppm(ddd, J=4, 9, 10 Hz), 6.29 ppm(d, J=16 Hz), 6.87 ppm(d, J=8 Hz), 7.02 ppm(d, J=12 Hz) 및 7.18 ppm(d, J=2 Hz) 등으로 Barnes 등[Barnes 등, 1950]이 보고한 결과와 같아 purified compound B는 chlorogenic acid로 동정하였다(Fig. 2). Compound C는 melting point가 161~164°C이며, negative FAB-MS에서 분자량 180을 얻었다. IR spectrum은 3440에서 OH기가, 1646에서 COOH기가 확인되었으며, 또한 6.08 ppm(d, J=16 Hz), aromatic 영역에서 3H분의 6.73~6.97 ppm(m) 및 7.39 ppm(d, J=16 Hz) 등의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum은 Kwon 등[Kwon 등, 2000]의 보고와 같아 compound C는

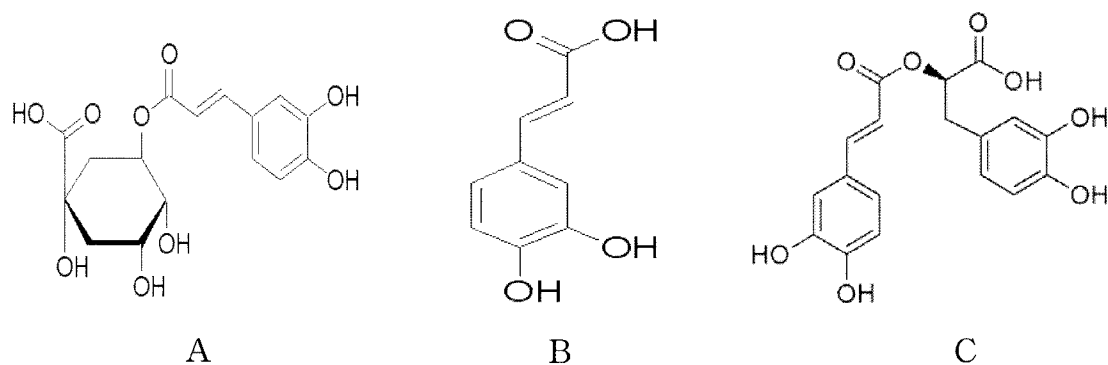


Fig. 2. Chemical structure of purified compounds with antimicrobial activity on *Helicobacter pylori*. A: Chlorogenic acid. B: Caffeic acid. C: Rosmarinic acid

caffeic acid로 동정하였다(Fig. 2). Compound F는 melting point가 204°C이고 선광도는 +145°이며, negative FAB-MS에서 360의 분자량을 얻었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 2.18 ppm(d, J=8 Hz), 5.08 ppm(m), 6.14 ppm(d, J=16 Hz), 6.52 ppm(d, J=8 Hz), 6.63 ppm(d, J=8 Hz), 6.69 ppm(s), 6.74 ppm(d, J=8 Hz), 6.83 ppm(d, J=8 Hz), 6.98 ppm(s) 및 7.42 ppm(d, J=16 Hz) 등으로 Kelly 등[1976]이 보고한 결과와 같아 compound F는 rosmarinic acid로 동정하였다(Fig. 2).

## 초 록

본 연구에서는 청목노상 추출물로부터 *Helicobacter pylori*를 억제하는 물질을 정제 및 동정을 실시하였다. 80% 에탄올 추출물의 페놀성 물질의 함량은 16.1 mg/g으로 측정되었으며, *H. pylori* 저해활성은 clear zone이 15 mm로 나타났다. 저해물질의 분리는 C<sub>18</sub> column을 이용하여 분리한 결과 9개의 fraction으로 분리되었으며, *H. pylori* 저해활성을 나타낸 fraction 7과 8을 MCI-gel CHP-20 column을 이용하여 normal phase type인 ethanol 100%에서 0%로 농도를 감소시키며 10 mL/min의 유속으로 용출한 결과 6개의 단일 물질 분획을 얻을 수 있었다. 그 중 세 가지의 물질이 *H. pylori*저해활성을 보여 FAB-Mass, <sup>1</sup>H와 <sup>13</sup>C NMR과 IR spectrum을 사용하여 구조 동정한 결과 chlorogenic acid, caffeic acid 및 rosmarinic acid인 것으로 확인되었다.

**Key words:** 항균활성, 청목노상 뿌잎, 헬리코박터파이로리, 페놀성물질, 정제

## 참고문헌

- Barnes HM, Reldman JR and White WV. (1950) Isochlorogenic acid. Isolation from Coffee and Structure Studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4178-4183.
- Cha JY, Lee JY, Hoang IS, Whangbo D, Choi PW, Lee WC, Kim JW, Kim SY and Rhee SJ (2003) Analysis of functional components of leaves of different mulberry cultivars. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 15-21.
- Cho YJ, Kwon OJ, Chun SS, An BJ and Kim JH (2008) Biological and antimicrobial activity of *Portulaca oleracea*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 49-54.
- Chun SS, Vatterm DA, Lin YT and Shetty K (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano(*Origamum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, **40**, 809-816.
- Folin O and Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, **12**, 239-249.
- Goodwin CS and Worsley BW (1993) *Helicobacter pylori*: Biological and clinical ratice. CPC press, Inc. USA.
- Hong YL, Kim NH, Ahn C, Lee HY and Kim JD (2000) Studies on the biological activities of the extracts from *Hovenia dulcis* THUNB. *Inst. Agr. Sci., Kangwon Nat'l. Univ.* **11**, 1-11.
- Hunt RH (1996) Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Med.* **100**, 42S-50S.
- Kang JH and Lee MS (2005) In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by *Enterococcus faecium* GM-1. *Can. J. Microbiol.* **51**, 629-636.
- Kelly CJ, Harruff CR and Carmack M (1976) The Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderale*. 11. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosemarinic acids. *J. Org. Chem.*, **41**, 449-455.
- Kil JH, Jung KO, Lee HS, Hwang IK, Kim YJ and Park KY (2004) Effects of kimchi on stomach and colon health of *Helicobacter pylori*-infected volunteers. *J. Food. Sci. Nutr.* **9**, 161-166.
- Kim NY (2006) The effect of antibiotic resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Kor. J. Gastroenterol.* **47**, 82-86.
- Kim JS, Kang SS, Lee MW and Kim OK (1995) Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentalis*. *Korean J. Pharmacogn.* **26**, 239-243.
- Kwon YS, Won HM and Kim CM (2000) Flavonoids from *Indigofera psedo-tinctoria* stem. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**, 280-283.
- Lee JH and Lee SR (1994) Some physiological activity of phenolic substance in plant foods. *Korean J. Food Sci, Technol.* **26**, 317-323.
- Lee KJ and Row KH (2004) Comparison of extraction methods form aglycone isoflavones from Korean Soybean, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 421-426.
- Lee MJ, Chang YR and Yim NH (1998) Chemical structure of Polyphenols isolated from cacao bean and their inhibitory effect on ACE. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **41**, 110-117.
- Lee MK, Kim YG, An SW, Kim MH, Lee JH and Lee HY (1999) Biological activities of *Hovenia dulcis* THUNB. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **7**, 185-192.
- Lee SH, Lim CY, Lee KH, Yeo SJ, Kim BJ, Kim SJ, Cho MJ, Rhee KH and Kook YH (1999) rpoB Gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J. Korean Soc. Microbiol.* **34**, 401-408.
- McClure WJ, Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H (1975) The flavonoids (part 2), In : Physiology and Functions of Flavonoids. *Academic Press Inc., New york, USA.* 1033-1035.
- NSOK (2003) Annual report on the cause of death statistics. National Statistical Office of Korea, Seoul, Korea.
- Park JG, Yun SY, Oh S, Shin JG and Baek YJ (2003) Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from Korean breast-fed infant. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**, 1244-1247.
- Shetty K (1997) Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics: Focus on *Laminaceae*, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **6**, 162-171.
- Shin KH, Young HS, Lee TW and Choi JS (1995) Studies on the chemical component and antioxidant effects of *Solanum lyratum*. *Korean J. Pharmacogn.* **26**, 130-138.
- Suerbaum S, Michetri P (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl. J. MED.* **347**, 1175-1186.
- Won BR, Song EH, Kang GH, Chang MW and Yoon YH (2001) Inhibition effect of *Lactobacillus heiviticus* CU631 on urease and vacuolating toxin activity of *Helicobacter pylori*. *J. Anim. Sci. Technol.* **43**, 931-940.