

진달래꽃(*Rhododendron mucronulatum* Flos.) 추출물로부터 *Helicobacter pylori* 억제 효과를 가지는 phenol성 물질의 정제 및 동정

주인식 · 조영제*

경북대학교 식품공학과

Received May 4, 2009 / Accepted June 8, 2009

Purification and Identification of Phenol Compounds with Inhibitory Activity on *Helicobacter pylori* from *Rhododendron mucronulatum* Flos. Extracts. In-Sik Ju and Young-Je Cho*. *Department of Food Engineering Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea* - The antimicrobial activities of *Helicobacter pylori* as a functional food source with water and 60% ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers were examined. The total phenol content of 60% ethanol extracts (30.6±0.14 mg/g) from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers was higher than that of water extracts (23.2±0.21 mg/g). The inhibitory activities of *Rhododendron mucronulatum* Turcz. extracts on *H. pylori* was determined to clear zone of 15 mm in 80% ethanol extracts. Purification of inhibitory compounds was carried out in Sephadex LH-20 and MCI-gel CHP-20 column chromatography using a gradient procedure, with increasing ethanol(0→100%) in H₂O. The chemical structure of the purified inhibitory compounds of *H. pylori* was identified to be quercitrin (quercetin-3-O-rhamnopyranoside), myricitrin (myricetin-3-O-rhamnopyranoside), quercetin by FAB-MS, NMR and IR spectra.

Key words : Antimicrobial compounds, *Rhododendron mucronulatum* Turcz., *Helicobacter pylori*, purification

서 론

*H. pylori*는 만성 활동성 위염, 위십이지장 및 소화성 궤양의 원인균 중의 하나로, 위암과 위점막연관 림프 조직형 위 림프종의 중요 인자로 인식되고 있는 균이며[7,12,18,20], 국내 성인의 *H. pylori* 감염률은 60~75% 정도로 서구 여러 나라와 비교하여 매우 높은 보급율을 보이고 있다[15]. 1994년 세계보건기구에서는 *H. pylori*를 위암의 제 1군 발암 인자로 규정된 이후 *H. pylori*의 중요성이 더욱 부각되었으며, *H. pylori*의 병리학적 위장질환에 대한 발병기전을 밝히기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다[13]. 위염 및 위궤양 환자 위점막의 조직학적 연구결과에 의하면 *H. pylori*균은 위상피세포 및 점막층에 주로 부착하는 것으로 밝혀졌으며, *H. pylori*관련성 위염은 위축성 변화를 유도하는데 주도적인 역할을 한다[10]. *H. pylori*의 특징적 성상은 위벽 상피세포에 군락을 형성하고, urease를 생성하여 위내 강산성의 환경에서도 균 주변의 산도를 중성으로 유지하면서 생존할 수 있게 된다[21].

최근 식물에 함유되어 있는 생리활성 성분에 대한 관심이 높아져 이들 생리활성 성분을 함유한 천연식품 소재들을 천연 항산화제와 항진균제의 원료로 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 식품에 존재하는 생리활성 물질의 대부분은 페놀성 화합물이고 이들 페놀성 화합물은 일반적으로 수용성이

며 플라보노이드류가 주를 이루고 단순한 페놀류, 페놀산, 페닐 프로파노이드류, 페놀성 퀴논류들을 포함하는 것으로 항세균, 항알레르기, 항산화, 항종양, 항암, 충치방지, 심장질환 및 당뇨병 예방 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[3,8,9].

진달래(*Rhododendron mucronulatum* Turczaninow)는 철쭉과(Rhodoraceae)에 속하고 높이가 2m 정도인 낙엽 관목의 꽃이다. 우리나라를 포함하여 만주, 일본, 중국 등지에 분포한다[4]. 진달래 꽃잎과 찹쌀로 빚는 두견주(진달래술)는 향취가 좋은 술로 하루에 한 두 잔 마시면 혈액순환을 촉진시키고 혈액속의 콜레스테롤을 낮추어 주며 진해(鎭海), 혈압강하, 피로회복, 류마티스 치료에 효과가 있다고 하였다. 또한, 진달래꽃과 잎은 중국 의학에서 강장, 이뇨, 전위와 같은 약리학적 효능을 가진 것으로 알려져 왔다[5]. 진달래꽃에는 flavonoid 성분인 quercetin, myricetin, afzelin, quercitrin, catechin, dihydroflavonol 등이 함유되어 있는 것으로 보고되었다[5]. 식물체의 flavonoid 성분은 항산화, 항암, 항균, 항염증, 심장질환 및 당뇨병 예방 등 여러 가지 생리적 기능을 나타내는 것으로 보고되었다[14,16,17,22]. 진달래꽃에 관한 최근의 연구로는 항산화 및 항암에 관한 연구[22], 화장품 소재 개발에 관한 연구[1], 플라보노이드 성분의 분리 및 항산화 작용에 관한 연구[2] 등이 있다. 진달래꽃은 우리나라에 많이 분포하고 있고 전래적으로 식용으로 이용해왔던 꽃이나 생리활성에 관한 연구는 그리 많지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 건강식품소재로서의 응용가치가 매우 높다고 볼 수 있는 진달래 꽃잎으로부터 *H. pylori*에 대한

*Corresponding author

Tel : +82-54-530-1265, Fax : +82-54-530-1269

E-mail : yjcho@knu.ac.kr

항균활성을 가지는 물질을 분리, 정제하고 동정하여 고부가가치성 식품소재로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 선정

본 실험에 사용한 진달래꽃은 2007년 5월 경북 상주시 갑장산에서 채취하여 4°C 저온저장 하면서 이용하였다.

추출물의 조제

건조된 진달래꽃에 0~100%까지 다양한 농도의 ethanol을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리 (10,000 rpm, 15 min)하여 상정액과 침전물을 얻었고 이 침전물은 다시 최적 추출조건인 60% ethanol을 가하여 위와 같은 추출과정을 2회 반복하였다. 각각의 상정액을 모아 농축하여 rotary evaporator로 농축한 후 ethanol 추출물로서 분획을 위한 시료로 사용하였다.

Phenol 화합물 정량

총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법[6]으로 측정하였으며, 시료 1 ml에 95% ethanol 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1N Folin-ciocalteu reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na₂CO₃ 1 ml를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

H. 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% CO₂ 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 제균한 각 추출물을 vacuum evaporator로 농축한 후 멸균수로 희석하여 phenol 함량이 50~200 µg/100 µl가 되도록 조절한 후 각 추출물 100 µl를 disc paper에 흡수시키고, 대조구로는 멸균수를 흡수시킨 후 37°C의 미 호기성 조건에서 48시간 동안 incubation한 다음, disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하였다[19].

Column chromatography에 의한 정제

Sephadex LH-20 column을 충전한 후 흡착성의 성질에 의

해 분리하였다. 용출용매는 60% EtOH 및 normal phase type으로서 EtOH→H₂O (100→0%)의 순으로 분당 20 ml의 유속으로 용출하여 TLC 상에서 phenol성 물질의 유무 및 종류를 확인하고 농축, 건조하였다. MCI-gel column은 다공성 polystyren gel로써 흡착성을 이용하였으며, 용출용매는 일반적인 revers type인 H₂O→MeOH(0→100%)로 용출하여 TLC 상에서 phenol compound의 분리 정도를 확인하였다.

Thin layer chromatography

Column에 의해 분리된 용출액을 silica gel plate (50×50 mm)로 CHCl₃ : ethyl formate : ethyl acetic acid : methanol (5 : 2 : 5 : 0.5, v/v/v/v)의 용매를 사용하여 전개한 다음 10% H₂SO₄를 분무하여 100°C 부근에서 발색 시켰다.

Melting point 및 [α]^D 측정

용해점은 시료 1 mg을 취하여 미량용점 측정장치를 이용하여 측정하였으며, [α]^D는 시료 5 mg을 Me₂O 및 methanol에 용해하여 polarimeter에 의해 측정하였다.

$$[\alpha]^D = \frac{100 \times A}{B \times L} (^\circ)$$

A : 선광각

B : 1 ml 속에 함유된 시료양

L : 측정 Cell의 크기

Infrared spectrum (IR) 측정

IR spectrum은 할로젠화 알칼리 정제법을 이용하였다. 순수 분리된 시료 1 mg을 KBr 100 mg 분말과 잘 섞어 배합하고 압력을 가해 가압 정제를 만들어 측정하였다.

핵자기 공명 분광기(Nuclear Magnetic Resonance: NMR) spectrum 측정

¹H 및 ¹³C-NMR spectrum은 FT 방법(Pulse Fourier Transform method)을 이용하여 순수정제물 10 mg을 측정 용매 CDCl₃+DMSO-D₆-D₂O에 5~20%(w/v)비율로 용해시키고 TMS (Tertamethylsilane: (CH₃)₄Si)를 기준 물질로 하여 H-NMR (300 MHz), C-NMR (75 MHz)로 측정하였다.

FAB-mass spectrum 측정

고체시료 1 mg을 감압상태(10⁻⁴~10⁻⁶ 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, 이온 원의 가속가압이 6~7 kV에서 질량분석을 하였다.

원소 분석

분석 시료 1 mg을 취해 48 시간 감압, 건조하여 완전히 수분

을 제거하고 자동원소분석기로 시료에 함유된 C 및 H의 양을 분석하였으며, O는 분자량을 기준으로 계산치에 의해 환산하였다.

결과 및 고찰

Ethanol 농도에 따른 phenol성 물질의 용출량

진달래꽃 추출물의 추출 조건을 확립하기 위하여 0~100% 까지 다양한 농도의 ethanol을 추출용매로 하여 phenol성 물질의 용출량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 60% ethanol 농도에서 용출량이 가장 높게 나타났다. 이는 가든세이지의 phenol성 물질의 추출수율이 60% 에탄올에서 가장 높았다는 Cho 등의 보고[24]와 유사하였다.

Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 *H. pylori* 항균활성 측정

H. pylori 평판 최적배지 plate에서 항균활성을 측정한 결과 Table 1에서와 같이 0~30% ethanol 추출물에서 clear zone이 나타나지 않았으며 40% ethanol 추출물 200 µg/ml을 주입하였을 때부터 13 mm의 저해환이 나타나기 시작하였으며, 60% ethanol 추출물 200 µg/ml를 주입 하였을 때 가장 높은 항균력 (22 mm)을 나타내었다.

진달래꽃 추출물의 정제 및 분획물의 항균효과

진달래꽃 500 g을 60% 에탄올로 추출한 후, Sephadex LH-20 column chromatography (Pamarcia. Co)를 이용하여 ethanol : distilled water (1:6, v/v)로 용출시키고, 용출액은 silica TLC plate를 이용하여 전개시킨 후 10% H₂SO₄로 발색시켜 확인한 결과 Table 2와 같이 A, B, C, D, E, F로 6개의 분획물을 얻었으며, fraction D에서 *H. pylori*균에 대한 억제효과가 확인되었다(Fig. 2). 항균활성성분인 D fraction을 모아 농축, 동결건조 한 후 ethyl acetate, butanol, aqueous를 이용하여 용매 분획한 결과 Table 3, Fig. 3과 같이 ethyl acetate 층과

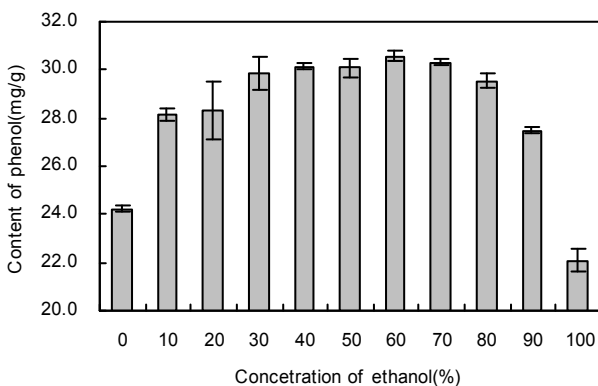


Fig. 1. Effect of ethanol concentration on extraction of phenol from *Rododendron mucronulatum* Flos.

Table 1. Antimicrobial activity of *Rododendron mucronulatum* Flos. extracts with according to ethanol concentration against *Helicobacter pylori*

Concentration of ethanol (%)	Inhibitory activity	
	Clear zone (mm)	
0	ND ¹⁾	
10	ND	
20	ND	
30	ND	
40	13	
50	16	
60	22	
70	19	
80	20	
90	21	
100	20	

Content of phenol compounds was 200 µg/ml.

¹⁾Not detected.

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

Table 2. Inhibitory activity of *Rododendron mucronulatum* Flos. extracts fraction with Sephadex LH-20 against *Helicobacter pylori*

Fraction of Jindalae extracts	Inhibitory activity	
	Clear zone (mm)	
A	ND ¹⁾	
B	ND	
C	11	
D	18	
E	13	
F	ND	

Content of phenol compounds was 200 µg/ml.

¹⁾Not detected.

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

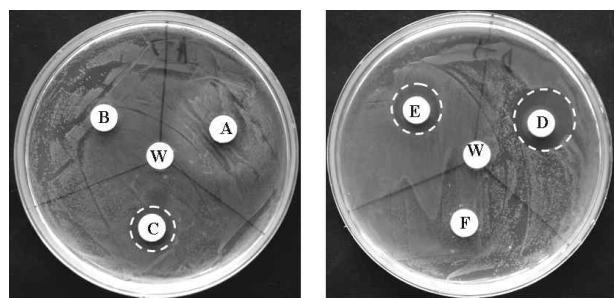


Fig. 2. Inhibitory activity of *Rododendron mucronulatum* Flos. extracts fraction with Sephadex LH-20 against *Helicobacter pylori*. A~F: fraction from Jindalrae extracts, W: control

butanol층에서 각각 14, 18 mm의 *H. pylori*균에 대한 저해환을 나타내었다. 이 분획물들을 CHCl₃ : BuOH : H₂O : Acetic acid : MeOH = 50 : 30 : 10 : 5 : 15 전개용매 조건으로 thin

Table 3. Inhibitory activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos. extracts fraction with solvent against *Helicobacter pylori*

Solvent	Inhibitory activity	
	Clear zone (m)	
Control	ND ¹⁾	
Ethyl acetate layer	14	
Butanol layer	18	
Aqueous	ND	

Content of phenol compounds was 200 µg/ml.

¹⁾Not detected.

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

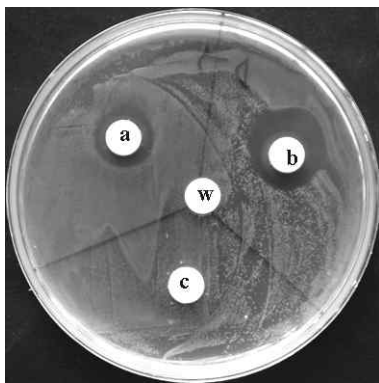


Fig. 3. Inhibition activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos. extracts fraction. a: Ethylacetate layer, b: Butanol layer, c: Aqueous layer, w: Control.

layer chromatography를 한 결과 ethyl acetate와 butanol 층에서 동등한 RT값을 나타내는 물질이 활성 물질인 것으로 추정되었으며, butanol 층의 항균활성이 가장 높아 butanol 층을 Sephadex LH 20 column으로 100% ethanol에서 0%까지 추출 용매로 하여 gradient로 elution 하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 fraction 1에서 fraction 5까지 5가지 분획물을 얻을 수 있었으며, 각 분획물을 농축하여 항균활성을 측정 한 결과 fraction 3과 fraction 4에서 항균활성을 나타내어 이 두 분획물을 선택하여 구조적 이성질체 phenol류 분리가 용이한 MCI-gel을 이용하여 reverse phase type인 H₂O→EtOH로 농도를 증가 시키며 용출한 결과 compound A, B 및 C 등 3 종류의 compound를 분리하였으며, CHCl₃ : BuOH : H₂O : Acetic acid : MeOH = 50:30:10:5:15 전개용매 조건으로 thin layer chromatography를 한 결과 Fig. 5와 같이 단일 물질로 확인되었다.

정제 활성 물질의 구조 동정

Compound A는 연한 황색의 분말상이었으며, melting point는 240°C였고, FAB-MS spectrum 상에서 분자량 449를 나타내었다. IR spectrum에서는 3455(OH), 1657(C=O), 1611(conjugated diene), 1512(phenyl), 1455(rhamnosyl CH₃) 및 1060(ether) 등이 확인되었으며, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR

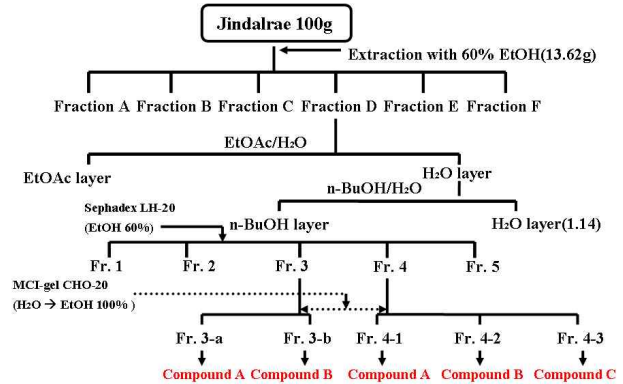


Fig. 4. Isolation procedure of 60% ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

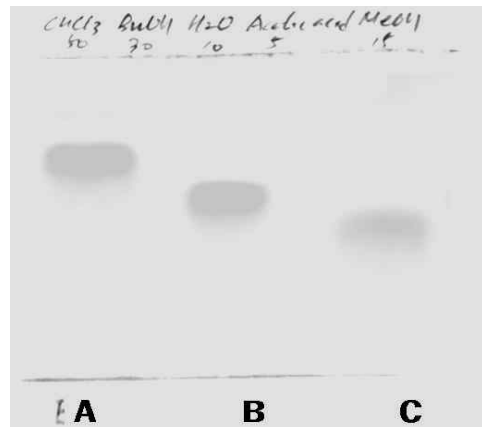


Fig. 5. Thinlayer chromatography of compounds isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos. Developing solvent: CHCl₃:BuOH:H₂O:Acetic acid:MeOH (10:6:2:1:3, v/v/v/v) Detector reagent: 10% H₂SO₄

Table 4. Inhibition activity on *Helicobacter pylori* by phenol compounds from *Rhododendron mucronulatum* Flos

Compounds	Inhibitory activity	
	Diameter of clear zone (mm)	
Compound A	ND ¹⁾	
Compound B	ND	
Compound C	ND	
Compound A + Compound B	ND	
Compound A + Compound C	ND	
Compound B + Compound C	ND	
Compound A + Compound B + Compound C	18	

Content of phenol compounds was 200 µg/ml.

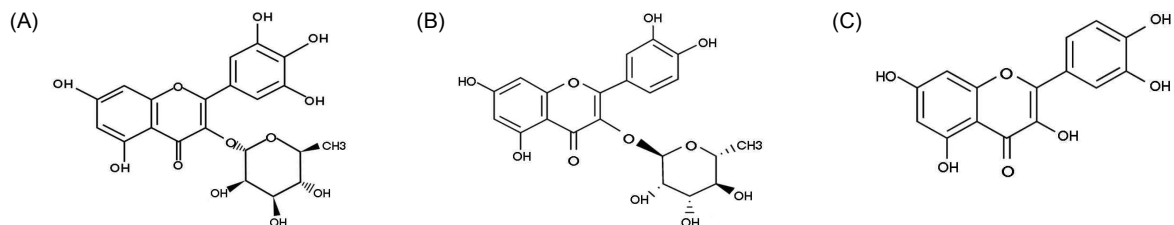
¹⁾Not detected.

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

spectrum은 Table 5에서와 같이 관찰되어, 정 등[5]의 분석결과와 비교한 결과 compound A는 quercitrin (quercetin-3-O-

Table 5. Spectroscopic data of purified compound A with antimicrobial activity on *Helicobacter pylori*

Type		Amorphous yellow powder	
FAB-MS		449 (m/z)	
Melting point		240°C	
IR	3455 (OH),	1657 (C=O)	
	1611 (conjugated diene), 1455 (rhamnosyl CH ₃),	1512 (phenyl) 1060 (ether)	
¹ H-NMR	7.39 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-2')		
	7.36 ppm (1H, dd, J=2, 8 Hz, H-6')		
	6.92 ppm (1H, d, J=8 Hz, H-5')		
	6.41 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-8)		
	6.25 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-6)		
	5.36 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-1'')		
	4.25 ppm (1H, dd, J=2, 3 Hz, H-2'')		
	3.75 ppm (1H, dd, J=3, 9 Hz, H-3'')		
	3.42~3.46 ppm (1H, m, H-4'')		
	3.38~3.32 ppm (1H, m, H-5'')		
0.96 ppm (3H, d, J=6 Hz, H-6'')			
¹³ C-NMR	158 ppm (s, C-2),	137 ppm (s, C-3)	
	179 ppm (s, C-4),	169 ppm (s, C-5)	
	101 ppm (d, C-6),	167 ppm (s, C-7)	
	95 ppm (d, C-8),	158 ppm (s, C-9)	
	106 ppm (s, C-10)		
	123 ppm (s, C-1'),	117 ppm (d, C-2')	
	146 ppm (d, C-3'),	149 ppm (s, C-4')	
	117 ppm (d, C-5'),	122 ppm (d, C-6')	
	104 ppm (d, C-1''),	73 ppm (d, C-2'')	
	72 ppm (d, C-3''),	74 ppm (d, C-4'')	
	71 ppm (d, C-5'')	18 ppm (q, C-6'')	

Fig. 6. Structure of purified compounds from *Rhododendron mucronulatum* Flos. A: Myricitrin (myricetin-3-O-rhamnopyranoside), B: Quercitrin (quercetin-3-O-rhamnopyranoside), C: Quercetin.

rhamnopyranoside)으로 동정하였다. Compound B는 연한 황색의 분말 형태이었고, melting point는 270°C 정도였고, FAB-MS spectrum 상에서 분자량 465를 나타내었다. IR spectrum 상에서 3400(OH), 1662(C=O), 1605(conjugated diene), 1508(phenyl), 1463(rhamnosyl CH₃) 및 1063(ether) 등이 확인되었고, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum은 Table 6에서와 같이 관찰되어, 정 등[5]의 분석결과와 비교한 결과 compound B는 myricitrin (myricetin-3-O-rhamnopyranoside)로 동정하였다. Compound C는 황색의 crystal을 형성하였고 melting point는 313~314°C였으며, FAB-MS spectrum상에서 분자량이 303을 나타내었다. IR spectrum에서는 3382에서 OH기가, 1667에서 unsaturated ketone기가 검출되

었으며, 1615 및 1509에서 aromatic C=C가 관찰되었다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum은 Table 7에서와 같이 관찰되어 Chung 등[5]과 treatise on asian herbal medicines에 나오는 분석결과[11]와 일치하여 compound C는 quercetin으로 동정하였다.

정제된 compound의 *Helicobacter pylori* 저해 효과

정제한 물질 compound A, B, C를 사용하여 *H. pylori*에 대한 항균효과를 알아보기 위해 disc method로 측정된 결과 Table 4와 같았다. Compound A, B, C 단일물질로 실험하였을 때, disc method에 의한 clear zone이 형성 되지 않았으며, phenol함량이 200 µg/100 µl일 때 compound A와 B, com-

Table 6. Spectroscopic data of purified compound B with antimicrobial activity on *Helicobacter pylori*

Type		Amorphous yellow powder	
FAB-MS		465 (m/z)	
Melting point		270°C	
IR	3400 (OH),	1662 (C=O)	
	1605 (conjugated diene), 1463 (rhamnosyl CH ₃),	1508 (phenyl) 1063 (ether)	
1H-NMR	7.18 ppm (2H, s, H-2', H-6'),		
	6.41 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-8),		
	6.20 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-6),		
	5.36 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-1"),		
	4.20 ppm (1H, dd, J=2, 3 Hz, H-2"),		
	3.76 ppm (1H, dd, J=3, 9 Hz, H-3"),		
	3.38~3.31 ppm (2H, m, H-4", H-5") 1.01 ppm (3H, d, J=6 Hz, H-6")		
13C-NMR	159 ppm (s, C-2, C-9),	136 ppm (s, C-3),	
	181 ppm (s, C-4),	163 ppm (s, C-5),	
	100 ppm (d, C-6),	166 ppm (s, C-7),	
	95 ppm (d, C-8),	105 ppm (s, C-10),	
	122 ppm (s, C-1'),	108 ppm (d, C-2', C-6'),	
	146 ppm (d, C-3', C-5),	135 ppm (s, C-4'),	
	103 ppm(d, C-1"),	74 ppm (d, C-2"),	
	72 ppm(d, C-3"),	73 ppm (d, C-4"),	
	71 ppm(d, C-5"),	17 ppm (q, C-6")	

Table 7. Spectroscopic data of purified compound C with antimicrobial activity on *Helicobacter pylori*

Type		Yellow crystal	
FAB-MS		303 (m/z)	
Melting point		313~314°C	
IR	3382 (OH),	1667 (unsaturated C=O)	
	1615 (aromatic C=C),	1509 (aromatic C=C)	
1H-NMR	12.71 ppm (1H, br s, C-5-OH)		
	7.71 ppm (1H, d, J=8 Hz, H-2')		
	7.56 ppm (1H, dd, J=2, 8 Hz, H-6')		
	6.82 ppm (1H, d, J=16 Hz, H-5')		
	6.39 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-8)		
	6.16 ppm (1H, d, J=2 Hz, H-6)		
13C-NMR	148 ppm (C-2),	136 ppm (C-3)	
	178 ppm (C-4),	160 ppm (C-5)	
	98 ppm (C-6),	164 ppm (C-7)	
	94 ppm (C-8),	156 ppm (C-9)	
	103 ppm (C-10)		
	122 ppm (C-1'),	115 ppm (C-2'),	
	145 ppm (C-3'),	146 ppm (C-4'),	
	116 ppm (C-5')		

pound A와 C, compound B와 C를 혼합처리 한 경우에도 *H. pylori*에 대한 저해는 관찰되지 않았으며, compound A, B, C 세 가지 물질을 혼합하고 disc paper에 200 µg/0.1 ml의 농도로 하여 항균활성을 측정된 결과 첨가 농도별로 18 mm의 저해 환을 나타내었다. Rosemary를 분리 정제하여 *H. pylori*에 대한 항균활성 물질을 동정한 Yoon [23]의 연구 결과에서는

단일 물질로 분리 하였을 때 *H. pylori*에 대한 항균활성이 높지 않고 여러 가지 물질이 혼합되었을 때 synergy effect에 의해 *H. pylori*에 대한 항균활성을 나타낸다고 보고 하였고, Shetty 등[19]은 Oregano 등 spice의 추출물에 존재하는 simple phenol 등이 단일 물질에 의한 *H. pylori* 저해보다는 synergy effect에 의해 그 효과가 높다고 보고하였으며, 본 연구의 결과

또한 compound A, B, C 3가지가 혼합되어야지만 synergy effect에 의해 *H. pylori*에 대한 항균 효과가 나타나는 것으로 판단되었다. 따라서, 진달래꽃 추출물로부터 단일물질로 분리하여 *H. pylori* 억제효과를 얻기는 어려우므로 추출물 그 자체를 활용하는 것이 항균효과와 가공비용의 절감 면에서 훨씬 유용할 것이라 사료되었다.

요 약

진달래꽃을 60% ethanol로 추출하여 추출물의 *H. pylori*에 대한 저해활성의 측정과 저해물질의 분리 및 동정을 시행하였다. 또한 *H. pylori*에 대한 항균활성은 60% ethanol 추출물에서 phenol 화합물을 200 µg/ml 이상 주입하였을 때부터 22 mm이상의 clear zone이 관찰되어 *H. pylori*에 대한 높은 항균력을 나타내었다. 저해물질의 분리는 Sephadex LH-20 column을 이용하여 분리한 결과 6개의 fraction으로 분리되었으며, *H. pylori*저해활성을 나타낸 fraction D를 MCI-gel CHP-20 column을 이용하여 normal phase type인 ethanol 100%에서 0%로 농도를 감소시키며 용출한 결과 5개의 단일 물질 분획을 얻을 수 있었다. 그 중 세 가지의 물질에 대해 *H. pylori*저해활성이 나타나 FAB-MS, ¹H와 ¹³C NMR 및 IR spectrum을 사용하여 구조 동정한 결과 quercitrin (quercetin-3-O-rhamnopyranoside), myricitrin (myricetin-3-O-rhamnopyranoside) 및 quercetin인 것으로 확인되었다.

References

- An, B. J., C. E. Lee, J. H. Son, J. Y. Lee, G. H. Choi, and T. S. Park. 2005. Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem **48**, 280-284.
- An, B. J., J. T. Lee, C. E. Lee, J. H. Son, J. Y. Lee, and T. S. Park. 2005. A study on the development cosmeceutical ingredient, *Rhododendron mucronulatum* and the application of rheology properties. J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem **48**, 273-279.
- Azuma, K., M. Nakayama, M. Koshika, K. Ippoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H. Ito, and H. Higashio. 1999. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. J. Agric. Food Chem **47**, 3963-3966.
- Chung, T. Y. and S. E. Lee. 1991. Volatile flavor components of Jindalae flower (Korean azalea flower, *Rhododendron mucronulatum* Turczaninow). J. Kor. Agric. Chem Soc. **34**, 344-352.
- Chung, T. Y., M. A. Kim, and J. Daniel. 1996. Antioxidative activity of phenolic acids isolated from Jindalae Flowers (*Rhododendron mucronulatum* Turczaninow). Agric. Chem. Biotechnol. **39**, 506-511.
- Folin, O. and W. Denis. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem., **12**, 239-249.
- Goodwin, C. S. and B. W. Worsley. 1993. *Helicobacter pylori* : Biological and clinical ratice. CPC press, Inc. USA.
- Ham, S. S., J. K. Hong, and J. H. Lee. 1997. Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. J. Food Sci. Nutr. **2**, 155-161.
- Huang, M. T., C. T. Ho, and C. Y. Lee. 1992. Phenolic compounds in food. In *phenolic compounds in food and their effects on health II*. Maple Press, New York. **99**, 2-7.
- Hunt, R. H. 1996. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. Am. J. Med **100**, 42-50.
- Institute of Natural Product in Seoul National University. 2003. Treatise on asian herbal medicines, Daewon, Seoul, Korea.
- Kang, J. H. and M. S. Lee. 2005. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by *Enterococcus faecium* GM-1. Can. J. Microbial. **51**, 629-636.
- Kim, N. Y. 2006. The effect of antibiotic resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. Kor. J. Gastroenterol. **47**, 82-86.
- Lee, O. H., H. B. Lee, and J. Y. Son. 2004. Antimicrobial activities and nitrite-scavenging ability of olive leaf fractions. Kor. J. Soc. Food Cookery Sci. **20**, 204-210.
- Lee, S. H., C. Y. Lim, K. H. Lee, S. J. Yeo, B. J. Kim, S. J. Kim, M. J. Cho, K. H. Rhee, and Y. H. Kook. 1999. Gene analysis of *Helicobacter pylori*. J. Kor. Soc. Microbial. **34**, 401-408.
- Moon, T. C., J. O. Park, K. W. Chung, K. H. Son, H. P. Kim, S. S. Kang, and H. W. Chang. 1999. Anti-inflammatory activity of the flavonoid components of *Lonicera japonica*. Yakhak Hoeji **43**, 117-123.
- Park, J. C., J. M. Hur, and J. G. Park. 2002. Biological activities of Umbelliferae family plants and their bioactive flavonoids. Food Industry and Nutrition **7**, 30-34.
- Park, J. G., S. Y. Yun, S. Oh, J. G. Shin, and Y. J. Baek. 2003. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from Korean breast-fed infant. Kor. J. Food Sci. Technol. **35**, 1244-1247.
- Shetty, K., O. F. Curtis, R. E. Levin, R. Witkowsky, and G. Ang. 1995. Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of Oregano(*Oreganum vulgare*) by *Pseudomonas* spp., J. Plant Physiol. **147**, 447-451.
- Suerbaum, S. and P. Michetri. 2002. *Helicobacter pylori* infection. N. Engl. J. Med **347**, 1175-1186.
- Won, B. R., E. H. Song, G. H. Kang, M. W. Chang, and Y. H. Yoon. 2001. Inhibition effect of *Lactobacillus heiviticus* CU631 on urease and vacuolating toxin activity of *Helicobacter pylori*. J. Anim. Sci. Technol. **43**, 931-940.
- Yang, J., K. J. Meyers, J. Heide, and R. H. Lui. 2004. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and anti-proliferative activities of onions. J. Agric. Food Chem **52**, 6787-6793.
- Yoon, S. J. 2006. The Antimicrobial activity on *Helicobacter pylori* of Herb extracts. pp. 35-37, Master thesis.
- Cho, Y. J., I. S. Ju, D. H. Yun, S. S. Chun, B. J. Ahn, J. H. Kim, and M. W. Kim. 2008. Biological activity of extracts from Garden Sage (*Salvia officinailis* L.). J. Appl. Biol. **51**, 296-301.