ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2010** Vol. 20. No. 10. 1511~1518 DOI : 10.5352/JLS.2010.20.10.1511

Isolation and Identification of Inhibitory Compounds on *Helicobacter pylori* from *Rosa multiflora* Thunberg Fruit Extracts

Ki-Tae Park, Jin-Sung Kim, Bun-Sung Jo, Bong-Jeun An[1], Sung-Sook Chun[2], Jeung-Hoan Kim[2] and Young-Je Cho[3]*

Department of Food Engineering, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea
[1]Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan, 712-715, Korea
[2]NIP Biotech. Munkyung 745-706, Korea
[3]School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received July 14, 2010 / Accepted October 6, 2010

The antimicrobial activity of 70% ethanol extracts from *Rosa multiflora* Thunberg fruit against *Helicobacter pylori* was examined. The inhibitory activity of *Rosa multiflora* Thunberg fruit extracts against *H. pylori* was determined to clear a zone of 14 mm with 70% ethanol extracts. Purification of inhibitory compounds was carried on Sephadex LH-20 and C_{18} cartridge column chromatography using a gradient procedure, with increasing ethanol (0→100%) in H_2O. The chemical structure of the purified inhibitory compounds on *H. pylori* was identified to be protocatechuic acid, chlorogenic acid and quercetin by FAB-MS, NMR and IR spectrum.

Key words : *Helicobacter pylori, Rosa multiflora* Thunberg fruit, isolation, identification, inhibitory compounds

서 론

천연 식물자원 중에는 항균활성을 가지는 생리활성 물질을 함유한 종이 많다. 이러한 생리활성물질을 천연 식물자원에서 획득하여 산업에 이용하고자 많은 연구가 진행되고 있는데[3,6,7,12,18], 최근 한방 자원에서 이러한 생리활성 물질을 얻으려는 연구가 진행되어오고 있다[1,4,5,11,20,24]. 이러한 한방 자원들 중에서 영실은 장미과 낙엽관목인 찔레나무의 열매로 한방에서는 관상 동맥을 확장시키고 체내에서 지방과 단백질 대사를 개선시켜주며 죽상동맥경화의 형성을 억제시키고, 설사, 창독, 변비, 콩팥염의 치료에 쓰인다[13]. 알려진 성분으로는 flavonoids의 계열인 quercetin 배당체(multinoside A, multinoside B, quercitrin, *etc.*) 및 kaempferol 배당체(multiflorin A, multiflorin B, afzelin, astragalin, *etc.*)와 탄닌계열의 methyl gallate 및 과실의 홍색색조인 lycopene이 있다.[17,21]

19세기부터 사람의 위에는 구부러진 나선형의 세균이 존재하는 것으로 알려져 왔지만 배양이 불가능하여 오랫동안 무시되어 왔는데, 1983년에 처음으로 순수배양에 성공하여 *Campylobacter*로 명명되었고[10], 그 후 *Campylobacter*와의 차이점이 발견되면서 *Helicobacter pylori*로 분류되었으며[10,22], 현재까지 사람과 동물에서 분리되는 *H. pylori*와 유사한 14종류가 보고되어 있다. 우리나라 성인의 80% 정도가 이 균에 감염되었으나[16,23,25] 임상증상을 나타내지 않고 있다가, 어떠한 발병 촉진 인자에 의하여 만성적 위십이지장 궤양을 유발한다는 보고가 있어[19,22,26], *H. pylori* 자체에 대한 연구와 병행하여 *H. pylori*에 대한 예방이나 치료를 위한 새로운 방법이 시도될 필요가 있으며, 본 연구에 이용된 영실의 항균효과를 활용한 방안도 대안이 될 수가 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 한방자원 중에서 항균력이 우수한 영실을 이용하여 위염과 위궤양의 원인인자로 작용하는 *H. pylori*의 억제물질을 분리, 정제 및 구조 동정하고 정제 compound에 의한 *H. pylori*에 대한 억제효과를 확인함으로써 *H. pylori*에 대한 예방이나 치료를 위한 새로운 방법을 제시하기 위한 자료를 확보하고, 이들 천연물을 활용한 기능성 식품을 산업화 하기위한 소재 개발을 하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 선정

본 실험에 사용한 영실(찔레나무 열매, *Rosa multiflora* Thunberg fruit)은 시중 한약 건재상에서 구입한 것을 사용하였으며, 50°C dry oven에서 건조한 후 40 mesh로 분쇄하여 4°C에서 저온저장하며 시료로 사용하였다.

추출물의 조제

영실의 알콜 추출액은 70% ethanol 100 ml에 영실 3 g을 넣고 4°C에서 24시간 진탕 추출한 후 2,350 ×*g*로 10분간 원심분리 하였고, 상징액을 Whatman No. 1 여과지로 여과한 여액을 시료로 사용하였다.

***Corresponding author**
Tel : +82-54-530-1265, Fax : +82-54-530-1269
E-mail : yjcho@knu.ac.kr

총 Phenol 화합물 정량

총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법[9]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_2CO_3 1 ml를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

Helicobacter pylori 배양

실험에 사용한 균주는 위, 십이지장궤양 원인균인 *H. pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 사용하였다. *H. pylori*의 배양에는 최적배지(special pepton 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/50 ml)를 사용하여 미호기성 조건을 유지시켜주기 위해서 10% CO_2 incubator를 이용하였으며, incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였고, agar plate상에서 배양은 37°C로 48~72시간 동안 실시하였다.

추출물의 *H. pylori* 항균활성 검색

H. pylori 최적배지 plate에 *H. pylori* 100 μl를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한 다음, 멸균된 disc paper (Φ 8 mm)를 올리고 0.45 μm membrane filter로 제균한 각 추출물 100 μl을 흡수시키고, 대조구로는 멸균수를 흡수시킨 후 37°C의 미호기성 조건에서 24시간 동안 배양한 다음, disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하였다.

영실 추출물의 분리 및 정제

영실 추출물 제조

건조된 영실 5 kg에 70% ethanol을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(4,700× *g*, 15 min)하여 상징액과 침전물을 얻었고 이 침전물에 다시 70% ethanol을 가하여 위와 같은 추출과정을 4회 반복하였다. 각각의 상징액을 모아 rotary evaporator (Eyela N-11, Japan)로 농축한 후 ethanol 추출물로서 정제를 위한 시료로 사용하였다.

Thin layer chromatography

Column에 의해 분리된 용출액을 silica gel plate (5.0×5.0 cm, Merck Co.)로 $CHCl_3$:butanol:H_2O:acetic acid:methanol (10:6:2:1:3, v/v/v/v/v)의 용매를 사용하여 전개한 다음 건조시키고, 10% H_2SO_4를 분무하여 100°C 부근에서 발색시켰다.

Sephadex LH-20 및 C_{18} column chromatography에 의한 정제

Sephadex LH-20 open column (10x120 cm)을 충진한 후 흡착성의 성질에 의해 분리하였다. 용출용매는 reverse phase type으로 ethanol 100%→H_2O로 하여 용출 분취하고, 활성 분획물을 다시 C_{18} cartridge 컬럼을 이용하여 ACE 10%와 formic acid 90%로 하여 용출시켜 분리하였다.

영실 추출물에서 분리한 phenol 화합물의 물리 및 화학적 성질

융해점은 시료 1 mg을 취하여 미량융점 측정 장치를 이용하여 측정하였으며, [α]$_D$는 시료 5 mg을 Me_2O 및 methanol에 용해하여 polarimeter (Jasco DIP-370, Japan)에 의해 측정하였다. IR spectrum은 할로겐화 알칼리 정제법을 이용하여 순수 분리된 시료 1 mg을 KBr 분말 100 mg과 잘 섞어 혼합한 후 압력을 가해 가압 정제를 만들어 측정하였다. NMR spectrum은 FT 방법(Pulse Fourier Transform method)을 이용하여 순수 정제물 10 mg을 측정 용매 $CDCl_3$+DMSO-D_6+D_2O에 5~20% (W/V) 비율로 용해시키고 TMS [Tetramethylsilane; $(CH_3)_4Si$]를 기준 물질로 하여 PMR (300 MHz, Bruker AM-300, Japan)로 측정하였다. Negative FAB Mass spectrum 측정은 고체 시료 1 mg을 감압상태(10^{-4}~10^{-6} mmHg)에서 negative ion FAB-mass spectrum (Jeol JMS-PX 300, Japan)을 이용하여 화학적 분석법에 의해 측정하였다. 이때 측정 용매로서는 thioglycerol을 사용하였으며, 측정조건에서 emitter 전류는 22~28 eV이며, 이온원의 가속가압이 6~7 kV에서 질량분석을 하였다.

결과 및 고찰

영실 추출물의 총 페놀화합물 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl (OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하여 항산화효과 등의 생리활성기능을 가지는 것으로 알려져 있어[15] 영실 추출물에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 조사하였다. 영실 추출물을 식품에 적용하기 위하여 인체에 유해하지 않으며 비교적 phenol성 물질 용해도가 높은 ethanol을 추출용매로 하여 Fig. 1에서와 같이 다양한 농도로 phenol성 물질을 추출하였다. 또한 시간에 따른 phenol성 물질의 용출량의 변화에서는 Fig. 2에서와 같이 6시간에서 24시간까지 용출량이 증가하다가 24시간 이후에는 용출량의 변화가 거의 나타나지 않았다. 따라서 영실 추출물의 용출 최적조건은 70% 농도의 ethanol을 용매로 하여 24시간 교반 추출하였을 때이라 할 수 있겠다. Clark 등[8]은 식물체에 함유된 페놀성 물질이 항균활성을 나타낸다고 보고하였는데, 영실을 70% ethanol을 추출용매로 하여 24시간 교반한 추출물에서 비교적 높은 페놀성 물질의 함량이 나타나 천연 항균제 및 생리활성 물질로의 활용가능성을 추측할 수 있었다.

영실 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균활성 측정

영실 추출물을 이용한 *H. pylori*에 대한 항균활성은 70% 에탄올 추출물을 이용하여 측정하였다. 그 결과 Table 1과 같이 100 μg/ml 이하의 저농도에서는 영실의 항균활성이 나타나지

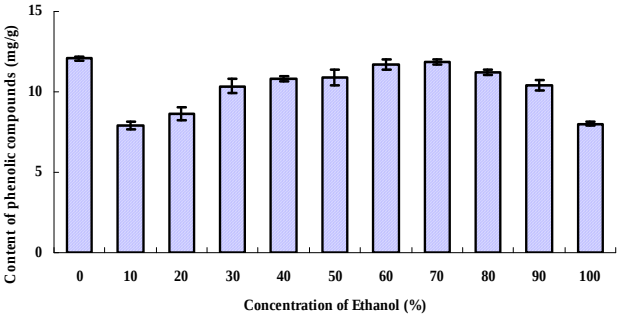


Fig. 1. Effect of ethanol concentration on extraction of phenolic compounds from *Rosa multiflora* Thunberg fruits. Each value represents the mean±SD (n=3).

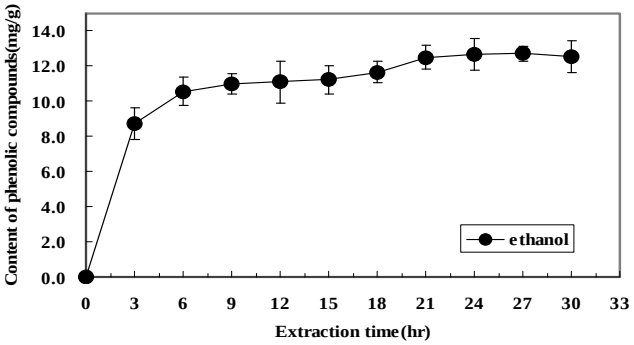


Fig. 2. Effect of extraction time on content of phenolic compounds from *Rosamultiflora* Thunberg fruits. Each value represents the mean±SD (n=3).

않았으며, 추출된 phenol성 물질을 150 μg/ml의 농도로 첨가하였을 때 12 mm, 200 μg/ml의 농도일 때 14 mm의 저해환이 나타났다(Fig. 3).

영실 추출물의 분리 및 정제

영실 추출물의 분리 및 *H. pylori*에 대한 항균활성 측정

건조된 영실 5 kg을 70% ethanol로 추출한 후 Sephadex LH-20 open column chromatography를 이용하여 70% ethanol 용매로 용출시켜, silica TLC plate를 이용하여 전개한 후 10% H_2SO_4로 발색시켜 phenol성 물질의 유무를 확인하고, 1차 분획하여 A, B, C, D, E 5가지 1차 분획물을 획득하고 phenol성

Fig. 3. Antimicrobial activity of 70% ethanol extracts from *Rosa multiflora* Thunberg fruit against *Helicobacter pylori* by disc method. A: 50 μg/ml phenolic content, B: 100 μg/ml phenolic content, C: 150 μg/ml phenolic content, D: 200 μg/ml phenolic content, E: 0 μg/ml phenolic content.

물질의 함량을 측정한 결과 Table 2와 같이 D 분획물에서 3139 μg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. *H. pylori*에 대한 1차 분획물의 항균활성을 측정한 결과 Table 2에서와 같이 D 분획물에서 16 mm의 저해환을 관찰할 수 있었으나, 나머지 분획물에서 저해환을 관찰 할 수 없었다.

영실 추출물의 용매분획

1차 분획물 중 D 분획물을 이용하여 H_2O, ethylacetate, butanol 등으로 용매분획하여 각 분획물의 생리활성을 측정하였다. 그 결과 Table 3과 같이 phenol성 물질의 함량이 ml 당

Table 2. The contents of phenolic compounds fractions isolated from *Rosa multiflora* Thunberg and its inhibitory activity against *Helicobacter pylori*

Fraction	Concentration of phenolic compounds (μg/g)	Clear zone (mm)
A	25.3	ND
B	1657	ND
C	3005	ND
D	3139	16
E	513	ND

ND: not detected

Table 1. Antimicrobial activity of *Rosa multiflora* Thunberg fruit extracts against *Helicobacter pylori*

Sample	Diameter of clear zone (mm)			
	70% Ethanol extracts			
	Concentration of phenolic compounds (μg/ml)			
	50	100	150	200
Rosa multiflora Thunberg	ND	trace	12	14

ND: not detected

Table 3. Concentration of phenolic compounds from solvent fractions from the fraction D

Solvent	Concentration of phenolic compounds (μg/ml)
Aqueous layer	1256±0.14
Butanol layer	375±1.02
Ethylacetate layer	285±1.02

aqueous층에서 가장 높은 것으로 나타났으며, 각 용매 분획물의 *H. pylori*균에 대한 항균활성을 측정한 결과 aqueous층 분획물에서 13 mm의 저해환이 관찰되었다(Table 4).

영실 추출물로 부터 *H. pylori*에 대한 생육저해 물질의 분리 및 정제

영실 추출물에서 *H. pylori*에 대한 비교적 높은 항균 활성을 나타내는 물질을 Fig. 4와 같이 분리하였다. 앞의 실험 결과와 같이 *H. pylori*에 대한 항균활성이 가장 높게 나타난 aqueous층을 Sephadex LH-20을 이용하여 에탄올 100%→H_2O의 용매 조건과 C_{18} cartridge 컬럼을 이용하여 ACE 10%와 formic acid 90%의 조건으로 용출, 정제하여 compound 1~5와 같이 5개의 compound를 얻었으며, 각 compound를 이용하여 *H. pylori*에 대한 항균활성을 측정한 결과, Table 5와 같이 compound 4를 제외한 모든 compound에서 200 μg/ml의 농도에서 8 mm의 저해환을 나타내었다. 정제물의 항균활성이 추출물의 항균활성보다 낮은 결과를 나타내어 각 compound의 시너지 효과를 알아보기 위해 각 compound를 일정비율로 혼합하여 항균활성을 실험하였다. 그 결과 Table 6과 같이 200 μg/ml의 농도에서 두개 이상의 compound가 함께 존재 할 때 8 mm 이상의 저해환을 나타내었으며 3개의 compound를 조합 한 compound 1+2+5 및 compound 1+3+5가 혼합되었을 때 비교적 높은 항균활성을 나타내어(Fig. 5) compound 1,2,3,5의 4가지 물질 구조를 동정하기로 하였다.

정제 활성 물질의 구조 동정

정제물질의 구조동정 결과 Table 7과 같이 Compound 1은

Table 4. Inhibitory activity of solvent fractions from fraction D against *Helicobacter pylori*

Fraction	Clear zone (mm)				
	Concentration of phenolic compounds (μg/ml)				
	control	50	100	150	200
Ethylacetate layer	ND	ND	ND	ND	ND
Butanol layer	ND	ND	ND	ND	ND
Aqueous layer	ND	ND	ND	ND	13

ND: not detected

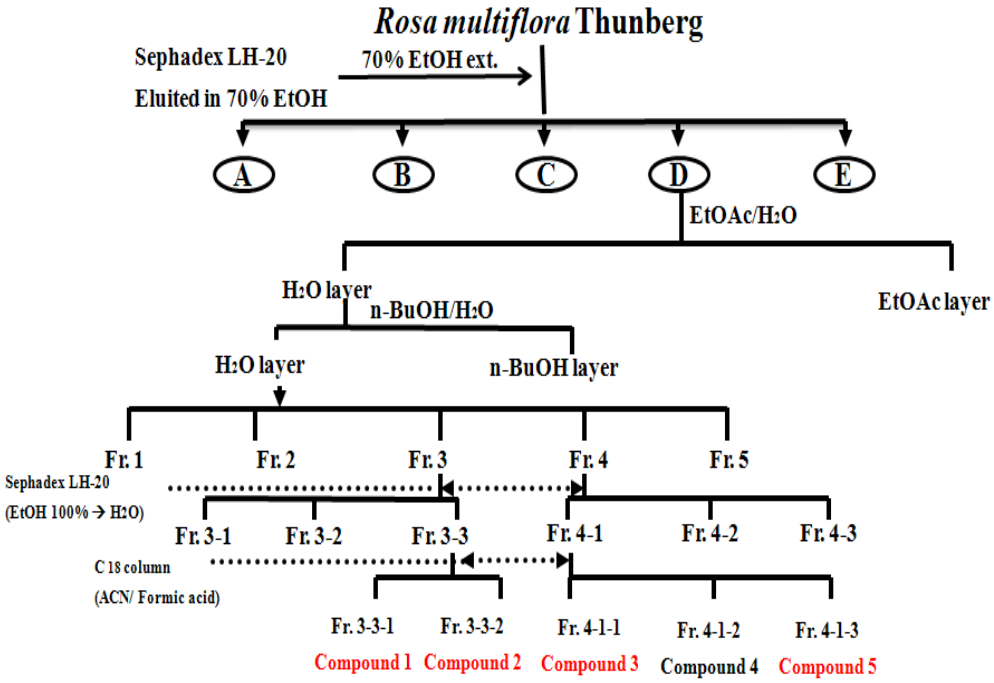


Fig. 4. Isolation procedure of 70% ethanol extracts from *Rosa multiflora* Thunberg fruit.

Table 5. Inhibitory activity of phenolic compounds from *Rosa multiflora* Thunberg fruit extracts against *Helicobacter pylori*

Fraction	Clear zone (mm)				
	Concentration of phenolic compounds (μg/ml)				
	control	50	100	150	200
Compund 1	ND	ND	ND	ND	8
Compund 2	ND	ND	ND	ND	8
Compund 3	ND	ND	ND	ND	8
Compund 4	ND	ND	ND	ND	ND
Compund 5	ND	ND	ND	ND	8

Table 6. Inhibitory activity of purified compounds from *Rosa multiflora* Thunberg fruit extracts against *Helicobacter pylori*

Compounds	Clear zone (mm)				
	Concentration of phenolic compounds (μg/ml)				
	control	50	100	150	200
Compund 1+2	ND	ND	ND	ND	9
Compund 1+3	ND	ND	ND	ND	9
Compund 1+4	ND	ND	ND	ND	8
Compund 1+5	ND	ND	ND	ND	9
Compund 2+3	ND	ND	ND	ND	8
Compund 2+4	ND	ND	ND	ND	8
Compund 2+5	ND	ND	ND	ND	9
Compund 3+4	ND	ND	ND	ND	8
Compund 3+5	ND	ND	ND	ND	9
Compund 4+5	ND	ND	ND	ND	8
Compund 1+2+3	ND	ND	ND	8	9
Compund 1+2+4	ND	ND	ND	8	9
Compund 1+2+5	ND	ND	10	16	20
Compund 1+3+4	ND	ND	ND	ND	8
Compund 1+3+5	ND	ND	10	16	19
Compund 2+3+4	ND	ND	ND	ND	8
Compund 2+4+5	ND	ND	ND	ND	8
Compund 3+4+5	ND	ND	ND	ND	8

ND: not detected

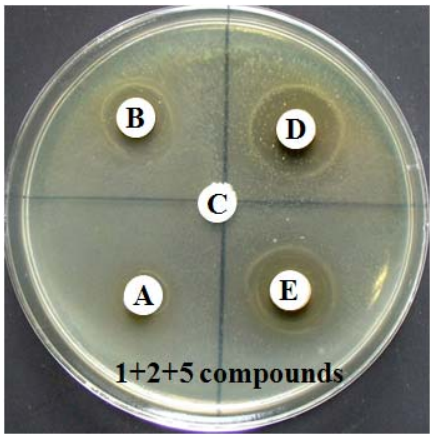
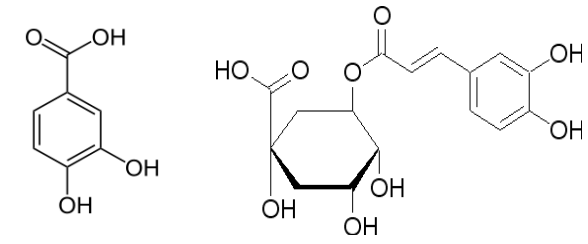
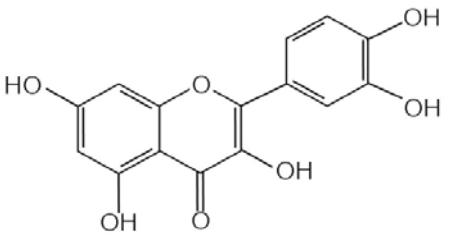


Fig. 5. Inhibitory activity against *Helicobacter pylori* of purified compounds from *Rosa multiflora* Thunberg fruit extracts. A: 50 μg/ml of phenolic compounds, B: 100 μg/ml of phenolic compounds, C: 0 μg/ml of phenolic compounds, D: 150 μg/ml of phenolic compounds, E: 200 μg/ml of phenolic compounds.



Protocatecuic acid Chlorogenic acid



Quercetin

Fig. 6. The structure of purified compounds.

Table 7. Spectroscopic data of purified compounds with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*

Compound 1	Type	A amorphous powder
	FAB-MS (m/z)	[154]
	Melting point	195~196°C
	^{1}H-NMR	6.80 ppm (d, J=8 Hz, aromatic 5-H) 7.32 ppm (dd, J=2, 8 H, zaromatic 6-H) 7.38 ppm (d, J=2 Hz, aromatic 2-H) 7.70 ppm (brs, aromatic-H)
	^{13}C-NMR	168, 150, 145, 123, 122, 117, 115
Compound 2,3	Type	A amorphous powder
	FAB-MS (m/z)	[354]
	Melting point	208°C
	^{1}H-NMR	2.10 (2H. br d, 5-H) 2.12 (2H, m, 6-H) 2.26 (1H, br dd, J=3, 8 Hz, 4-H) 3.76 (1H. br s, 5-H) 5.08 (1H, br d, 3-H) 6.29 (1H, d, J=16 Hz, 8-H) 6.77 (1H, d, J=8 Hz, 5-H) 6.98 (1H, dd, J=2, 8 Hz, 6-H) 7.03 (1H, d, J=2 Hz, 2-H) 7.42 (1H, d, J=16 Hz, 7-H)
	^{13}C-NMR	176, 168, 149, 147, 128, 123, 117, 116, 115, 76, 74, 72, 71, 39, 38
Compound 5	Type	Yellow crystal
	FAB-MS (m/z)	[303]
	Melting point	313~314°C
	^{1}H-NMR	6.16 ppm (1H, d, J=2 Hz, 6-H) 6.39 ppm (1H, d, J=2 Hz, 8-H) 6.82 ppm (1H, d, J=16 Hz, 3′-H) 7.56 ppm (1H, dd, J=2, 8 Hz, 6′-H) 7.71 ppm (1H, d, J=8 Hz, 2′-H) 12.71 ppm (1H, brs, aromatic-H)
	^{13}C-NMR	178, 164, 160, 156, 146, 148, 145, 136, 122, 116, 115, 103, 98, 94

melting point가 195~196°C 이며, negative FAB-MS에서 분자량 154를 얻었다. IR spectrum은 3240 cm^{-1}에서 OH기가 1680 cm^{-1}에서 C=O 및 1600에서 aromatic의 C=C가 확인되었으며, 또한 6.80 ppm (d, J=8 Hz), aromatic 영역의 7.32 ppm (dd, J=2, 8 Hz), 7.38 ppm (d, J=2 Hz) 및 7.70 ppm (brs, aromatic-H) 등의 ^{1}H-NMR spectrum과 ^{13}C-NMR의 spectrum은 Irwin과 Pearl의 보고[15]와 같아 protocatechuic acid로 동정하였다(Fig. 6). Compound 2는 melting point가 208°C 이며, negative FAB-MS에서 354의 분자량을 얻었다. IR spectrum은 3250 cm^{-1}에서 OH기가 1710 cm^{-1}에서 COO기가 확인되었으며, 선광도는 -35.2를 나타내었다. ^{1}H-NMR spectrum은 2.10 ppm (br), 2.12 ppm (m), 2.26 ppm (dd, J=3, 8 Hz), 3.76 ppm (br), 5.08 ppm (br), 6.29 ppm (d, J=16 Hz), 6.77 ppm (d, J=8 Hz), 6.98 ppm (dd, J=2, 8 Hz), 7.03 ppm (d, J=2 Hz) 및 7.42 ppm (d, J=16 Hz) 등으로 Barnes 등이 보고[2]한 결과와 같아 chlorogenic acid로 동정하였다(Fig. 6). Compound 3은 compound 2의 구조 분석 data와 일치하여서 동일물질로 규명하였다. Compound 5는 황색의 crystal을 형성하였고 melting point는 313~314°C였으며, FAB-MS spectrum상에서 분자량이 303을 나타내었다. IR spectrum에서는 3382 cm^{-1}에서 OH기가, 1667 cm^{-1}에서 unsaturated ketone기가 검출되었으며, 1615 cm^{-1} 및 1509 cm^{-1}에서 aromatic C=C가 관찰되었다. ^{1}H-NMR spectrum에서는 6.16 ppm (d, J=2 Hz), 6.39 ppm (d, J=2 Hz), 6.82 ppm (d, J=16 Hz), 7.56 ppm (dd, J=2, 8

Hz), 7.71 ppm (d, J=8 Hz) 및 12.71 ppm (brs)이 확인되었고, ^{13}C-NMR에서 178 ppm (C-4), 164 ppm (C-7), 160 ppm (C-5), 156 ppm (C-9), 146 ppm (C-4′), 148 ppm (C-2), 145 ppm (C-3′), 136 ppm (C-3), 122 ppm (C-1′), 116 ppm (C-5′), 115 ppm (C-2′), 103 ppm (C-10), 98 ppm (C-6) 및 94 ppm (C-8) 등이 관찰되었다. 이상의 결과가 treatise on asian herbal medicines [14]에 나오는 분석결과와 일치하여 compound C는 quercetin으로 동정하였다(Fig. 6).

References

1. Azuma, K., M. Nakayama, M. Koshika, K. Lppoushi, 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.
2. Barnes, H. M., J. R. Reldman, and W. V. White. 1950. Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4178-4183.
3. Bunney, S. 1992. The Illustrated encyclopedia of herbs. Chancellor Press. London, England.
4. Cho, Y. J., I. S. Ju, O. J. Kwon, S. S. Chun, B. J. An, and J. H. Kim. 2008. Biological and antimicrobial activity of *Portulaca oleracea*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 49-54.
5. Cho, Y. S., S. S. Chun, H. J. Kwon, S. J. Yoon, and K. H. Lee. 2005. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanum* F.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 790-796.
6. Choi, H. R. and E. H. Choi. 2003. Screening of antimicrobial and antioxidative herb. *J. Natural Science* **15**, 123-131.
7. Chun, S. S., D. A. Vattem, Y. T. Lin, and K. Shetty. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* **40,** 809-816.
8. Clark, A. M. and F. S. Tl-Feraly. 1981. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *J. Pharm. Sci.* **70**, 951-952.
9. Folin, O. and W. Denis. 1912. On phosphotungastic-phosphomolybetic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249.
10. Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, D. Collins, L. Sly, W. MacConnell, and W. E. S. Harper. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelue* comb. nov. respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **39**, 397-402.
11. 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.
12. 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*. pp. 2-7, Maple Press, New York.
13. Hubue, G., V. Wray, and A. Nahrstedt. 1999. Flavonol Oligosaccharides from the Seeds of *Aesculus Hippocastanum*. *Planta Med.* **65**, 638-640.
14. Institute of Natural Product in Seoul National University. 2003. Treatise on asian herbal medicines, Daewon, Seoul, Korea.
15. Irwin, B. Y. and A. Pearl. 1946. Reactions of vaillin and its derived compounds. Ⅳ, The Caustic fusion of vaillin. *J. Am. Chem. Soc*. **68,** 2180-2184.
16. Jones, D. M. and A. Curry. 1990. The genesis of coccal forms of *Helicobacter pylori*, pp. 29, in *Helicobacter pylori* gastritis and peptic ulcer. In Malfertheiner, P. and H. Ditschumeit. (eds.), Springer-Verlh, Berlin.
17. Masakazu, A. 1962. Components of the flower petals of *Rosa multiflora* and *Rubus hirsutus*. *Yakugaku Zasshi* **82**, 771-773.
18. 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.
19. Park, C. K., H. J. Choi, H. S. Youn, W. K. Lee, M. J. Cho, K. H. Kang, S. C. Baik, and K. H. Rhee. 1994. Chemotherapy of *Helicobacter pylori* infection. *J. Korean Soc. Microbiol.* **80**, 667-672.
20. 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.
21. Park, J. H. 2002. Encyclopedia of Chinese crude drugs. pp. 557.
22. Rauws, E. A., W. Langenberg, J. Houthoff, and D. Moore-jones. 1990. Is doxycycline more effective than tetracycline HCI in triple therapy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*. **98**, 24-27.
23. Rhee, K. H., H. S. Youn, S. C. Baik, W. K. Lee, M. J. Cho, H. J. Choi, K. Y. Maeng, and K. W. Ko. 1990. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korea. *J. Korean Soc. Microbiol.* **25**, 475-490.
24. Ryoo, J. W. and B. C. Cha. 1998. Mineral content and antioxidative activity in some herb plant. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. **6,** 28-32.
25. Steer, H. W. 1975. Ultraststructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J. Clin. Path*. **28**, 639-646.
26. Suerbaum, S. and P. Michetri. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1175-1186.

초록 : *Rosa multiflora* Thunberg fruit 추출물로부터 *Helicobacter pylori* 억제물질의 분리 및 동정

박기태 · 김진성 · 조분성 · 안봉전[1] · 천성숙[2] · 김정환[2] · 조영제[3]*
(경북대학교 식품공학과, [1]대구한의대학교 화장품약리학과, [2]엔아이피 바이오텍, [3]경북대학교 응용생명과학부)

영실에 존재하는 페놀성 화합물의 추출 최적 조건을 알아보고자 추출용매를 달리하여 phenol성 물질의 함량을 비교한 결과, 70% ethanol을 용매로 하여 24시간 교반 추출하였을 때 phenol성 물질의 용출량이 13.8 mg/g 이상으로 가장 높았다. *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과는 영실추출물을 150 μg/ml의 농도로 첨가하였을 때 생육 저해환이 12 mm, 200 μg/ml 일 때 14 mm의 생육저해환이 나타나 항균활성이 우수한 것을 알 수 있었다. *H. pylori*에 대한 저해물질을 정제하기 위하여 영실을 70% 에탄올로 추출한 후 Sephadex LH-20 column과 C_{18} cartridge column을 이용하여 항균활성을 가지는 물질을 순수 정제하고 구조를 동정한 결과 protocatechuic acid, chlorogenic acid 및 quercetin으로 동정하였으며, 단일물질에 의한 *H. pylori*에 대한 저해효과 보다 혼합물질에 의한 synergy 효과에 의해 저해 효과가 높아지는 것을 알 수 있었다.