

## 로즈마리 (*Rosmarinus officinalis* L.) 추출물로부터 *Helicobacter pylori*에 대한 항균물질 분리 및 동정

윤소정<sup>1</sup> · 김진성<sup>2</sup> · 조분성<sup>2</sup> · 김정환<sup>3</sup> · 이선호<sup>4</sup> · 안봉전<sup>5</sup> · 조영제<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>경진제약, <sup>2</sup>경북대학교 식품공학과, <sup>3</sup>경북대학교 나노소재공학부, <sup>4</sup>안동대학교 해양바이오산업연구소, <sup>5</sup>대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>6</sup>경북대학교 식품공학부

## Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds against *Helicobacter pylori* from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extracts

So-Jung Yoon<sup>1</sup>, Jin-Sung Kim<sup>2</sup>, Bun-Sung Jo<sup>2</sup>, Jeung-Hoan Kim<sup>3</sup>,  
Sun-Ho Lee<sup>4</sup>, Bong-Jeun Ahn<sup>5</sup>, and Young-Je Cho<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Kyungjin Pharmacy, Siheung 429-120, Republic of Korea

<sup>2</sup>School of Food Science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Republic of Korea

<sup>3</sup>School of Nano Materials Engineering, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Republic of Korea

<sup>4</sup>The Institute of Marine Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

<sup>5</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, Republic of Korea

<sup>6</sup>School of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

Received March 22, 2010; Accepted May 4, 2011

*Rosmarinus officinalis* extracts had a significant antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Total phenolic contents and inhibition zone of rosemary extracts were estimated to be 25.7 mg/g and 14 mm at 200 µg/mL of phenolic contents, respectively. The Sephadex LH-20 and MCI-gel CHP-20 column chromatographic separations for the phenolic extracts from *R. officinalis* leaves led to isolation of five acids, whose structures were determined as protocatechuic acid (A), coumaric acid (B), caffeic acid (C), chlorogenic acid (D), and rosmarinic acid (E), from interpretation of spectroscopic data including negative fast atom bombardment (FAB)-mass, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and IR. All isolated compounds were tested for antimicrobial activity against *H. pylori*. The purified single compound showed less antimicrobial activity against *H. pylori* than the mixed purified compounds, which generate A+B, A+E, C+D, C+E (each 200 µg/disc) excellent as large clear zone by synergy effect. These results indicate rosemary extracts are preventive agents against *H. pylori*.

**Key words:** antimicrobial compounds, *Helicobacter pylori*, identification, isolation, rosemary

### 서 론

약용 식물은 높은 약리학적 활성과 약한 독성을 가지는 특 성으로 인해 오래전부터 치료를 위한 목적으로 사용되어 왔다 [Aruoma 등, 1996]. Phytochemicals(약용성분)은 식물이 함유하 는 화합물로서 인간의 신진대사와 생리활성을 촉진하고 개선하 는 효소 활성의 기질로서 사용되는 물질이며, 최근 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[Barnes 등, 1950]. 약용작물 중 허브는(herb)는 잎, 줄기와 뿌리 등이 식품과 음료, 향수나 화

장품 등의 제품에 이용되기도 한다. 허브류는 그 성분이 식품 이나 음료 속에 보존용 향신료 또는 건강증진제로서 첨가되며 식욕 증진작용, 육류나 생선의 냄새 제거작용, 향을 내어 맛을 좋게 하는 부향작용, 착색에 의해 식욕을 향상시키는 착색 작 용 등에 이용되며 기능성으로서 항산화 및 항균활성 등이 알려 져 있다. 식물에 존재하는 항균물질은 그 대부분이 alkaloid류, flavonoid류, terpene류, phenol 화합물, quinone류 및 휘발성 향 기성분 등의 이차 대사산물이거나 그 유도체들로 알려져 있다 [Song 등, 1998].

로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.)는 꿀풀과(Labiatae)에 속 하는 상록성 다년초이며 지중해 지역이 그 원산지로 전체적인 연령층 선호도가 가장 좋은 허브로써 라벤더와 함께 널리 활용 되며, 식용은 물론 약용, 미용, 향료 및 관상용 등 모든 부분에서 유용하게 이용되고 있으며, 향기가 오래 남고 머리를 맑게

\*Corresponding author

Phone: +82-53-950-7755; Fax: +82-53-950-7762

E-mail: yjcho@knu.ac.kr

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.027>

하여 기억을 새롭게 해 준다는 약효가 있어 장례식, 결혼식, 교회 등의 성스러운 행사에 쓰였다[Kelley 등, 1976]. 국내에서는 제주도를 비롯한 남부지역에서 월동이 가능하며 식품의 향신료나 향수의 원료로 산업적인 생산이 되고 있다. 잎과 줄기 전체에 독특한 향기성분이 함유되어 있는데 이는 cineol과 camphor가 주성분이며[Chung 등, 2001] 이 성분들은 산화방지제로도 이용되고 있고[Cuvelier와 Richard, 1998], 이탈리아 요리에는 필수인 것으로 우스타 소스의 주성분이다[Dorman와 Deans, 2000]. 또한, 로즈마리는 강력한 항산화 효과[Fang 등, 2006], 골다공증 예방 효과[Hirayama 등, 1996], 항암효과[Irwin와 Pearl, 1946], anti-acquired immune deficiency syndrome (AIDS) 효과[Kelley 등, 1976] 뿐만 아니라 그람양성균에 대한 항균활성[Kil 등, 2004]을 가지며, 농도 의존적으로 혈중 알콜 농도를 감소시키는 효과 등의 여러 기능이 보고되고 있다[Kim 등, 1998].

*Helicobacter pylori*는 소화성 궤양과 만성 전정부 위염, 위암이나 점막연관 림프조직형 위림프종 등의 원인으로 알려져 있으며[Kuhnu, 1976; Kouchi, 1992], 1994년 세계보건기구(WHO)에서는 *H. pylori*를 위암의 제 1군 발암 인자로 규정한 이후 *H. pylori*의 중요성이 더욱 부각 되고 있다. *H. pylori* 감염으로 유발되는 임상 표현형은 경미한 부증상 위염에서 위암에 이르기까지 다양하며, *H. pylori*는 인위적으로 제균을 시도하지 않는 한 대부분에서 평생 감염이 지속된다[Lee와 Lee, 1994; Lee, 2003]. 1983년 Warren과 Marshall에 의해 처음으로 분리 동정된 나선형 몸통과 편모를 가지고 있는 그람음성 세균인 *H. pylori*는 방어인자를 변경시켜 산을 생성함으로써 위염과 위궤양을 발생시킨다고 알려져 이 균의 박멸이 임상에서 다양하게 시도되어 왔으며[Marshall, 1994], Hirayama 등[1996]이 *H. pylori* ATCC 43504 strain을 *Mongolian gerbil*에 감염시켜 100%의 감염율과 그 병리소견도 사람의 것과 유사하다는 것을 보고한 이후로 현재 *H. pylori*의 *in vivo* 실험은 *M. gerbil*을 사용하여 주로 수행되고 있다. *In vivo*에서의 일반적인 *H. pylori*의 제균 방법은 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 3제 요법에 PPI를 추가 하는 4중 요법 등이 사용되고 있다[Monica 등, 2007]. 이와 같이 1983년 *H. pylori*가 보고 된 후 지난 20여 년간 *H. pylori*에 관한 역학 및 병인에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있고, 약제를 사용한 제균 방법이 어느 정도 성공을 거두고 있는 등의 *H. pylori* 제균 치료가 널리 시행되고 있으나, 항생제를 장기간 투여하는 것에 따른 항생제 내성을 갖는 새로운 균주가 나타나고 사용한 약물에 의한 부작용이 있을 수 있기 때문에 다른 접근 방식이 요구되고 있으며, 국내에서는 1998년의 전국적인 역학 조사 이후, *H. pylori* 감염의 변화 및 감염 관련 인자에 관한 연구가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 허브식물 중 로즈마리에 대한 *H. pylori* 저해능을 입증하기 위해 에탄올로 추출한 후, *H. pylori*에 대한 항균활성을 조사하고, 그 물질을 동정하여 고부가가치의 생리 기능을 갖는 천연의 기능성 소재로의 활용하기 위한 자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시료의 선정.** 본 실험에 사용한 로즈마리는 경북 구미시에 소재하는 Herb 농원에서 재배되고 있는 로즈마리(*R. officinalis*)의 잎을 채취하여 50°C dry oven에서 건조한 후 40 mesh로 분쇄한 후 4°C에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

**추출물의 제조.** 시료 추출은 60% 에탄올 용액 100 mL에 시료 1 g을 가하여 24시간 동안 진탕 추출하였으며, 추출액은 whatman No. 1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 사용하였다.

**Phenol 화합물 정량.** 총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법[Moon 등, 2007]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.

***H. pylori* 항균활성 측정.** 실험에 사용한 균주는 위, 십이지장 궤양 원인균인 *H. pylori*로서 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 위해 10% CO<sub>2</sub> incubator (Mettler, Schwabach, Germany)에서 습도는 95% 이상으로 유지하며 배양하였으며, agar plate상에서 배양은 37°C로 48~72시간 동안 실시하였다. 또한 Disc method에 의한 항균 활성 측정은 *H. pylori* 최적배지 plate에 *H. pylori* 균 배양액 100 µL를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한 다음, 멸균된 disc paper (φ 8 mm)를 올리고 0.45-µm membrane filter (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)로 제균한 추출물을 vacuum evaporator로 농축한 후 멸균수로 희석하여 phenol 함량이 50~200 µg/100 µL가 되도록 조절 한 후 각 추출물 100 µL를 disc paper에 흡수시키고, 대조구로는 로즈마리 추출물 대신 멸균수를 흡수시킨 후 37°C의 미 호기성 조건에서 24시간 동안 incubation한 다음, disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하였다[Gavidson과 Parish, 1989].

**Sephadex LH-20 및 MCI-gel CHP 20에 의한 정제.** 건조된 로즈마리 잎에 60% 에탄올 용액을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(5,000 rpm, 30 min)하여 상정액과 침전물을 얻었고 같은 추출과정을 3회 반복하였다. Rotary evaporator로 농축여과한 농축액은 Sephadex LH-20 (5×45 cm, Sigma Chemical Co.) column에 loading 하고 60% 에탄올을 용출용매로 하여 A~G로 분획하고 농축한 다음 *H. pylori* 저해 활성을 측정하여 저해력이 높은 분획물을 선택하여 다시 Sephadex LH-20 (5×45 cm)과 MCI-gel (3×45 cm, Sigma Chemical Co.) column을 이용하여 normal phase type인 ethanol→H<sub>2</sub>O와 reverse phase type인 H<sub>2</sub>O→methanol로 gradient 방식으로 분당 2.2 mL의 유속으로 용출하여 순수 물질로 정제하였다.

**Thin layer chromatography.** Column에 의해 분리된 용출액을 silical gel TLC plate (5.0×5.0 cm)로 benzen : ethylformate

: formate (1:7:1, v/v/v)의 용매를 사용하여 전개한 다음, FeCl<sub>3</sub>/K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 발색시약을 분무한 후 70°C 부근에서 발색시켜 phenolic compound의 분리 정도를 확인하였다[Nakatani와 Inatani, 1984].

**Melting point 측정.** 용해점은 시료 1 mg을 취하여 미량용점 측정 장치를 이용하여 측정하였다.

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

**핵자기 공명 분광기(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 Tertamethylsilane (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si를 기준 물질로 하여 proton magnetic resonance (300 MHz) (Bruker AM-300, Osaka, Japan)로 측정하였다.

**Fast Atom Bombardment (FAB)-Mass Spectrum 측정.** 고체시료 1 mg을 감압상태(10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup> mmHg)에서 negative ion FAB-mass spectrum (Jeol JMS-PX 300, Tokyo, Japan)을 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 1 mg을 취해 48시간 감압, 건조하여 완전히 수분을 제거하고 자동원소분석기로 시료에 함유된 C 및 H의 양을 분석하였으며, O는 분자량을 기준으로 계산치에 의한 환산하였다.

### 결과 및 고찰

**로즈마리 추출물의 phenolic 물질 함량 측정.** phenolic 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 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 금속이온과의 결합력도 갖는다. 이러한 성질로 인하여 phenolic 화합물은 항바이러스 작용, 항종양 작용, angiotensin converting enzyme (ACE)활성 저해 작용, 항균작용 등의 많은 생리활성을 가짐이 밝혀지고 있다[Blois, 1958]. 본 연구에 사용된 로즈마리 추출물의 phenolic 물질의 함량을 측정된 결과 Table 1과 같이 25.7 mg/g으로 나타났다. 녹차(10.9 mg/g), 상항버섯(17.9 mg/g), 인진쑥(6.7 mg/g) 등에 함유된 phenolic 물질의 함유량[Moon 등, 2004]과 비교하여 보았을 때, 로즈마리 추출물의 phenolic 화합물의 함량이 상당히 높음을 알 수 있었다. Shetty 등[1996], Mina 등[1999]은 Thyme과 Cinnamon 추출물이 *H. pylori*에 대한 항균력을 가지며 이는 추출물 속에 존재하는 phenol 성분에 의한 것이라고 보고 하였으며, 로즈마리 추출물의 추출된 phenolic 화합물의 농도가 비교적 높게 나타나 항균능력이 우수할 것이라 추측되었다.

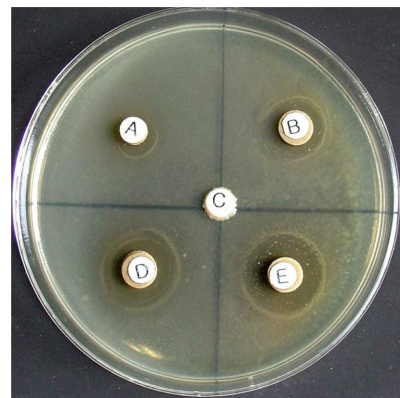
**Table 1. Content of total phenolics in 60% ethanol extracts from *R. officinalis* L**

Name	Content of phenolics (mg/g)
Rosemary ( <i>R. officinalis</i> L.)	25.7

**Table 2. Inhibitory activity against *H. pylori* by 60% ethanol extracts from *R. officinalis* L**

Name	Diameter of clear zone (mm)				
	phenolics content (μg/disc)				
	0	50	100	150	200
Rosemary ( <i>R. officinalis</i> L.)	-	-	11	12	14

-: Not detected



**Fig. 1. Inhibitory activity on *H. pylori* by extracts from *R. officinalis* L.** A: phenolic contents 50 μg/disc, B: phenolic contents 100 μg/disc, C: control (sterilization water 100 μL), D: phenolic contents 150 μg/disc, E: phenolic contents 200 μg/disc

***H. pylori*에 대한 항균활성 측정.** *H. pylori* 평판 최적배지 plate에서 disc 주위의 clear zone 크기를 측정하여 *H. pylori* 균에 대한 항균효과를 살펴보았다. Table 2와 Fig. 1에서와 같이 100~200 μg/100 μL의 농도에서 각각 11, 12, 14 mm의 clear zone을 형성하여 높은 저해활성을 나타내었으며, 추출물의 농도가 증가할수록 clear zone이 크게 형성되어 *H. pylori*에 대한 저해 효과가 큰 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 rosemary가 향신료로서의 역할 뿐만 아니라 *H. pylori*의 억제제로서도 산업화에 적용시킬 수 있는 우수한 source로의 활용이 가능할 것이라 판단되었다.

**Column chromatography를 이용한 *H. pylori* 억제물질의 분획 및 정제.** Rosemary 추출물로부터 *H. pylori* 억제물질을 정제하기 위하여 Sephadex LH-20 column (4.5×40 cm)을 사용하여 60% ethanol을 elution solvent로 하여 분획한 결과 Table 3에서와 같이 A~G의 7개 fraction으로 분리되었다. 각 fraction의 분획물을 모아 disc method를 이용한 *H. pylori*의 저해활성을 측정된 결과 fraction A, B, C, D, F에서는 clear zone이 형성되지 않았으며, fraction E에서 10 mm, fraction G에서 14 mm의 clear zone이 관찰되어(Table 3, Fig. 2) Sephadex LH-20 dextrin gel과 구조적 이성체 phenol류 분리가 용이한 MCI-gel (Sigma Chemical Co.)을 이용하여 normal phase type인 ethanol→H<sub>2</sub>O와 reverse phase type인 H<sub>2</sub>O→methanol로 용액

**Table 3. Inhibitory activity against *H. pylori* by fraction from *R. officinalis* L**

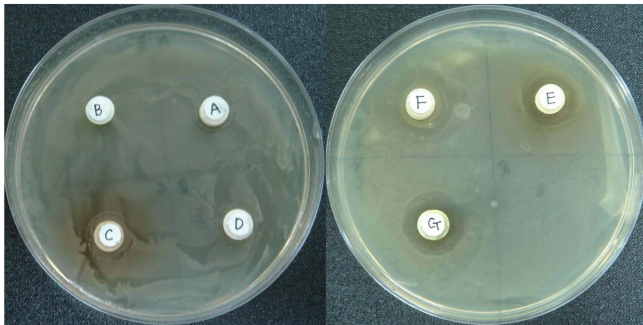
Fraction	Content of phenolics (µg/µL)	Detector of clear zone (mm)
A	9.3±0.3	-
B	65.8±2.7	-
C	88.9±1.8	trace
D	104.1±0.2	-
E	175.4±2.5	10
F	19.5±0.4	-
G	15.8±0.8	14

-: Not detected

\*Column: Sephadex LH-20 (4.5×40 cm)

\*Solvent: 60% ethanol

\*Elution time: 1.0 mL/min



**Fig. 2. Inhibitory activity on *H. pylori* of phenol fractions by Sephadex LH-20 from 60% ethanol extracts of *R. officinalis* L.**

\*Phenolic contents was 200 µg/disc

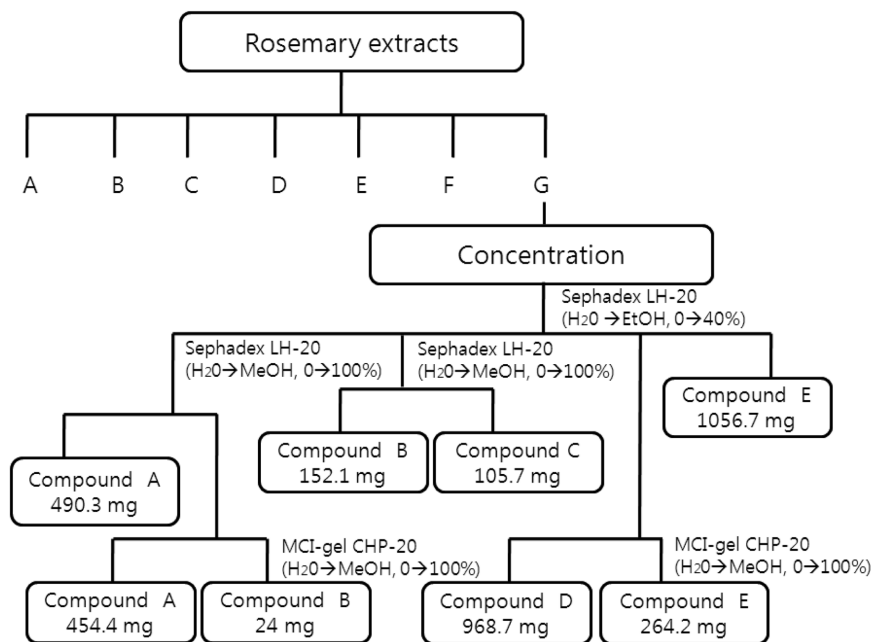
의 농도를 증가시키면서 용출한 결과 5 종류(Compound A~E)의 단일 물질로 분리하였고(Fig. 3), simple phenol에 해당하는 compounds 3종류, diphenol compounds 2종류가 분리되었다.

**Table 4. The synergy effect on inhibitory activity against *H. pylori* with mixed phenolic compounds from *R. officinalis* L**

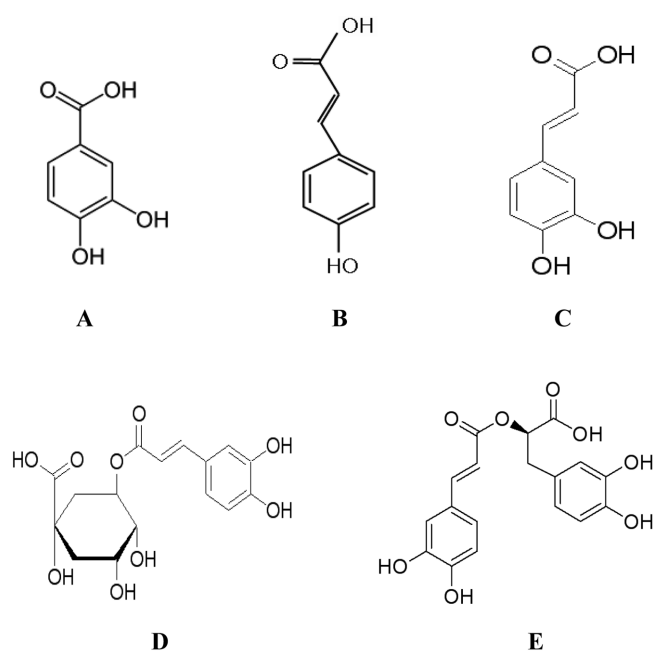
Compounds	Diameter of clear zone (mm)				
	compound content (µg/disc)				
	0	50	100	150	200
Compound A	-	-	-	-	trace
Compound B	-	-	-	-	trace
Compound C	-	-	-	-	trace
Compound D	-	-	-	-	trace
Compound E	-	-	-	-	trace
Compound A+Compound B	-	-	-	-	13
Compound A+Compound C	-	-	-	-	-
Compound A+Compound D	-	-	-	-	-
Compound A+Compound E	-	-	-	-	13
Compound B+Compound C	-	-	-	-	-
Compound B+Compound D	-	-	-	-	-
Compound B+Compound E	-	-	-	-	-
Compound C+Compound D	-	-	-	-	14
Compound C+Compound E	-	-	-	-	13
Compound D+Compound E	-	-	-	-	-
Compound A+Compound B+Compound C+Compound D+Compound E	-	10	11	14	16

-: Not detected

**정제물의 *H. pylori*에 대한 항균효과.** 정제한 물질 compound A, B, C, D, E 를 사용하여 *H. pylori*에 대한 항균효과를 알아보기 위해 disc method로 항균효과를 측정된 결과 Table 4에서와 같이 각 compound를 단일물질로 실험하였을 때, clear zone이 매우 약하게 형성되었으며, compound의 함량이 200 µg/disc일 때, compound A와 C, compound A와 D, compound B와 C, compound B와 D, compound B와 E, compound D와 E를 혼합하여 측정하였을 경우에는 *H. pylori*에 대한 항균력이 미



**Fig. 3. A procedure for isolation of phenolic compounds from *R. officinalis* L.**



**Fig. 4.** Chemical structure of purified compounds from *R. officinalis* L. with antimicrobial activity on *H. pylori*. A: Protocatechuic acid, B: Coumaric acid, C: Caffeic acid, D: Chlorogenic acid, E: Rosmarinic acid

약하게 나타났습니다. 그러나 compound A와 B, compound A와 E, compound C와 D, compound C와 E를 혼합한 경우 13, 13, 14, 13 mm의 clear zone을 관찰할 수 있었다. 본 실험의 결과로 볼 때 정제된 단일 물질에 의해 *H. pylori*의 저해를 일으키기 보다는 2종류 이상의 다중 물질에 의해서 *H. pylori*에 대해 더욱 높은 저해가 나타나 compound 물질을 2가지 이상 섞었을 때 *H. pylori*에 대한 항균 시너지 효과가 있는 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 Chun 등[2005]이 *Oregano* 등의 spice추출물에 존재하는 simple phenol들이 단일 물질에 의한 *H. pylori* 저해보다는 synergy effect에 의해 그 효과가 발현된다고 보고한 것과 같은 결과를 얻었다.

***H. pylori* 억제 물질의 구조 동정.** 정제물질에 대한 구조 동정 결과는 Table 5와 같이 purified compound A는 백색분말로서 IR spectrum에서 수산기와 카보닐기가 확인되었고, <sup>1</sup>H-NMR spectrum과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum은 Table 5와 같이 Irwin과 Pearl[1946]의 보고와 일치하여 compound A는 protocatechuic acid로 동정하였다. Compound B는 melting point가 210~213 °C, 분자량이 165이며, IR spectrum은 OH (3250 cm<sup>-1</sup>), CO (1605 cm<sup>-1</sup>)가 확인되었으며, <sup>1</sup>H-NMR 과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum 이 Table 5와 같이 Wheeler와 Covarrubias의 연구[1963]보고와 일치하여 compound B는 coumaric acid로 동정하였다.

**Table 5.** Spectroscopic data of purified compounds from *R. officinalis* L. with antimicrobial activity against *H. pylori*

Compound A	FAB-MS ( <i>m/z</i> )	153
	Melting point (°C)	195~196
	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	6.70 (1H, d, <i>J</i> =1.7 Hz, H-5), 7.38 (1H, dd, <i>J</i> =1.7 and 8.2 Hz, H-6), 7.69 (1H, d, <i>J</i> =1.7 Hz, H-2)
	<sup>13</sup> C-NMR	115.1 (C-2), 117.1 (C-5), 122.5 (C-1,6), 144.8 (C-3), 149.9 (C-4), 168.1 (CO)
Compound B	FAB-MS ( <i>m/z</i> )	163
	Melting point (°C)	210~213
	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	6.13 (1H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-8), 6.74 (2H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-3,5), 7.42 (2H, d, <i>J</i> =8.4 Hz, H-2,6), 7.48 (1H, d, <i>J</i> =8.2 Hz, H-7)
	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	114.7 (C-1), 115.7 (C-8), 116.9 (C-3), 121.0 (C-2), 125.5 (C-5), 129.4 (C-6), 144.5 (C-7), 159.3 (C-4), 168.9 (C-9)
Compound C	FAB-MS ( <i>m/z</i> )	179
	Melting point (°C)	161~179
	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	6.08 (1H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-8), 7.04 (1H, d, <i>J</i> =1.8 Hz, H-2), 6.97 (1H, dd, <i>J</i> =8.1 and 2.1 Hz, H-6), 6.77 (1H, d, <i>J</i> =8.1 Hz, H-5), 7.39 (1H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-7)
	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	113.9 (C-2), 114.8 (C-8), 115.3 (C-5), 120.9 (C-6), 126.0 (C-1), 144.5 (C-7), 144.9 (C-3), 147.3 (C-4), 168.4 (CO)
Compound D	FAB-MS ( <i>m/z</i> )	353
	Melting point (°C)	208
	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	210 (2H, br d, H-5), 2.12 (2H, m, H-6), 2.26 (1H, br dd, <i>J</i> =2.9 and 8.3 Hz, H-4), 3.76 (1H, br s, H-5), 5.08 (1H, br, H-3), 6.29 (1H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-8), 6.77 (1H, d, <i>J</i> =8.2 Hz, H-5), 6.98 (1H, dd, <i>J</i> =1.7 and 8.2 Hz, H-6), 7.03 (1H, d, <i>J</i> =1.7 Hz, H-2), 7.42 (1H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-7)
	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	176.4 (CO), 168.2 (C-9'), 149.3 (C-8'), 146.6 (C-7'), 127.5 (C-6'), 125.8 (C-5'), 122.9 (C-5'), 116.6 (C-4'), 115.6 (C-3'), 115.3 (C-2'), 76.2 (C-1), 73.5 (C-3), 71.7 (C-4), 71.4 (C-5), 39.1 (C-6), 38.0 (C-2)
Compound E	FAB-MS ( <i>m/z</i> )	359
	Melting point (°C)	204
	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	2.89~3.08 (2H, m, H-7'), 5.12 (1H, dd, <i>J</i> =4.5 and 8 Hz, H-8'), 6.52 (1H, dd, <i>J</i> =1.5 and 7.7 Hz, H-6'), 6.14 (1H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-8), 6.63 (1H, d, <i>J</i> =8 Hz, H-5'), 6.69 (1H, d, <i>J</i> =1.5 Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, <i>J</i> =8 Hz, H-5), 6.83 (1H, dd, <i>J</i> =1.5 and 8 Hz, H-6), 6.98 (1H, d, <i>J</i> =1.5 Hz, H-2), 7.42 (1H, d, <i>J</i> =16 Hz, H-7)
	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	36.2 (C-7'), 72.6 (C-8'), 114.2 (C-2), 115.1 (C-8), 115.4 (C-5'), 116.4 (C-5), 117.5 (C-2'), 119.9 (C-2'), 121.2 (C-6'), 123.2 (C-6), 125.4 (C-1'), 127.3 (C-1), 129.3 (C-1'), 143.6 (C-3'), 144.5 (C-4'), 145.2 (C-3), 145.5 (C-4), 146.1 (C-3'), 148.1 (C-7), 165.8 (C-9), 170.9 (C-9')

Compound C는 melting point가 208°C, 분자량이 181이며, IR spectrum은 OH (3250 cm<sup>-1</sup>), CO (1710 cm<sup>-1</sup>)가 확인되었으며, 선광도는 -35.2°를 나타내었다. <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum은 Table 5와 같이 Barnes 등[1950]이 보고한 결과와 같이 purified compound C는 chlorogenic acid로 동정하였다. Compound D는 melting point가 208°C, 분자량이 355이며, IR spectrum은 OH (3440 cm<sup>-1</sup>), CO (1646 cm<sup>-1</sup>)가 확인되었으며, <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum은 Table 5와 같이 Kelley 등 [1976]의 보고와 같이 compound D는 caffeic acid로 동정하였다. Compound E는 melting point가 204°C였으며, 분자량이 361이었고, <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR의 spectrum이 Table 5와 같이 Kelly 등[1976]이 보고한 결과와 같이 compound E는 rosmarinic acid로 동정하였다.

## 초 록

로즈마리 추출물의 phenol 함량은 25.7 mg/g으로 매우 높게 나타났다. *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과를 측정된 결과, clear zone이 100~200 µg/disc의 phenol 농도에서 각각 11, 12, 14 mm의 clear zone을 형성하여 추출물의 농도가 증가할수록 *H. pylori*에 대한 저해효과가 농도 의존적으로 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. Sephadex LH-20과 MCI-gel CHP-20 column을 이용하여 normal phase type인 ethanol→H<sub>2</sub>O와 reverse phase type인 H<sub>2</sub>O→methanol로 용액의 농도를 증가시키면서 용출한 결과 *H. pylori*에 대한 탁월한 저해활성을 나타낸 5종류(compound A~E)의 단일 물질로 분리하였다. 5가지 각각의 물질은 *H. pylori*에 대한 항균력이 미약하였으나, 2종류 이상의 다중 물질의 항균 시너지 효과에 의해 각각 10~16 mm의 clear zone을 형성하여 우수한 항균력을 나타내었으며, fast atom bombardment (FAB)-Mass, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR과 IR spectrum을 사용하여 구조 동정한 결과 protocatechuic acid, coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid 및 rosmarinic acid인 것으로 확인되었다.

**Key words:** 동정, 로즈마리, 분리, 항균물질, 헬리코박터파이로리

## 참고문헌

- Aruoma OI, Spencer JP, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N, Munoz A, Murcia A, Butler J, and Halliwell B (1996) An evaluation of the antioxidant and antiviral activity of extracts of rosemary and Provençal herbs. *Food Chem Toxicol* **34**, 449-456.
- Barnes HM, Reldman JR, and White WV (1950) Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies. *J Am Chem Soc* **72**, 4178-4183.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* **26**, 1198-1199.
- Chun SS, Vattam DA, Lin YT, and Shetty K (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* **40**, 809-816.
- Chung DO, Park ID, and Jung HO (2001) Evaluation of functional properties of onion, rosemary, and thyme extracts in Onion Kimchi. *Korean J Food Cookery Sci* **17**, 218-223.
- Cuvelier ME and Richard H (1998) Antioxidative activity of phenolic composition of polot plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am oil Chem Soc* **73**, 645-652.
- Dorman HJD and Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* **88**, 308-316.
- Fang L, Qi M, Li T, Shao Q, and Fu R (2006) Headspace solvent microextraction gaschromatography mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. *J Pharm Biomed Anal* **41**, 791-796.
- Gavidson PH and Parish ME (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol* **43**, 148-150.
- Hirayama F, Takagi S, Yokiyama Y, Iwao E, and Ikeda Y (1996) Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* **31**, 24-28.
- Irwin BY and Pearl A (1946) Reactions of vaillin and its derived compounds. IV, The Caustic fusion of vaillin. *J Am Chem Soc* **68**, 2180-2184.
- Kelley CJ, Harruff CR, and Carmack M (1976) The polyphenolic acids of *Lithospermum ruderale*. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of Lithospermic and rosmarinic acids. *J Org Chem* **41**, 449-453.
- 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 KS, Shim SH, Jeong GH, and Cheong CS (1998) Antidiabetic activity of constituents of *Lycii fructus*. *J Appl Pharmacol* **6**, 378-382.
- Kouchi Y (1992) Physiological actions of spices. *J Food Sci* **11**, 48-58.
- Kuhnau J (1976) The flavonoids class of semiessential food components; their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**, 117-200.
- Lee JH and Lee SR (1994) Some physiological activity of phenolic substance in plant foods. *Korean J Food Sci Technol* **26**, 317-323.
- Lee SJ (2003) Quality characteristics according to preparatory and storage conditions of spice-added beef jerky addition to the kinds of spices during storage. Ph D thesis, Daegu Catholic University, Daegu, Korea.
- Marshall BJ (1994) *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* **89**, 116-128.
- Mina T, Robert A, and Isak N (1999) Cinnamon extracts inhibition effect on *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharm* **67**, 269-277.
- Monica MP, Natalia LC, and Clara AC (2007) Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem* **104**, 585-592.
- Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, and Kim EH (2004) Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and the content of phenolic compounds. *Korean J Food Pre* **11**, 207-213.
- Nakatani N and Inatani R (1984) Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. *Agric Biol Chem* **48**, 2081-2085.
- Shetty K, Thomas LC, Denise K, Otis FC, and Thomas LP (1996) Selection of high phenolics-containing clones of thyme (*Thymus*

- vulgaris* L.) using *Pseudomonas* sp. *J Agric Food Chem* **44**, 3408-3411.
- Song JH, Kwon HD, Lee WK, and Park IH (1998) Antimicrobial activity and composition of extract from *Smilax china* Root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **27**, 574-584.
- Wheeler OH and Covarrubias CB (1963) Ultraviolet spectra and polarographic reduction potentials of some cinnamic acids. *J Org Chem* **28**, 2015-2019.