

오매 추출물에 함유된 Ursolic Acid에 의한 *Helicobacter pylori*의 Urease 활성억제

박찬엘* · 박창호†

경희대학교 화학공학과
446-701 경기 용인시 기흥구 서천동 1
*다림 바이오텍
445-746 경기 화성시 향남읍 상신리 907-5
(2013년 5월 22일 접수, 2013년 6월 20일 수정본 접수, 2013년 6월 30일 채택)

Ursolic Acid Isolated from Mume Fructus Inhibits Urease Activity of *Helicobacter pylori*

Chan-El Park* and Chang-Ho Park†

Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, 1 Seocheon-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Korea
*Dalim Biotech, Central Research Center, 907-5 Sangsin-ri, Hyangnam-eup, Hwasung-si, Gyeonggi-do 445-746, Korea
(Received 22 May 2013; Received in revised form 20 June 2013; accepted 30 June 2013)

요 약

전통식물한약재에 대한 데이터베이스, 한국식물자원에 대한 문헌 및 선행연구 결과에 근거해 선정된 6가지의 식물 한약재(연교, 소목, 형개, 황련, 소엽, 오매)의 에탄올(70%) 추출물 중에서 오매 추출물이 *Helicobacter pylori*의 urease 활성에 가장 강한 억제력을 나타내었다. 극성이 다른 용매를 사용한 회분식 용매추출과 칼립 크로마토그래피를 이용한 3단계 분리공정을 통하여 오매 추출물에 함유된 유효성분을 분리·정제하였다. NMR 분석에 의해 정제된 오매 추출물에 함유된 활성성분이 ursolic acid로 확인되었다. 본 실험결과는 오매에 함유된 이 성분이 항생제를 대신하여 *H. pylori* 제거에 활용될 수 있음을 시사하였다.

Abstract – Urease activity of *Helicobacter pylori* was most strongly inhibited by extract of Mume Fructus among ethanol (70%, v/v) extract of 6 herbal materials selected from our previous work, database on traditional herbal materials, and literature data on Korean plant resources. Active compounds in the extract of Mume Fructus were separated by batch extraction, and further purified by chromatography in a silica gel column and an octadecyl silica gel column using solvents of different polarity. By NMR analysis of the last chromatographic fraction we identified ursolic acid as the active compound of urease inhibition. The result suggests that this component in Mume Fructus can possibly be used for the eradication of *H. pylori*.

Key words: Mume Fructus, Urease Activity, *Helicobacter pylori*, Extraction, NMR Analysis

1. 서 론

*Helicobacter pylori*는 위염, 위궤양 및 위암의 원인 균으로 알려져 있으며 한국과 일본 등지에 널리 퍼져있다[1]. *H. pylori*가 다른 세균과 달리 강한 산성조건인 위장에서 서식하며 위염 등의 질병을 일으킬 수 있는 것은 이 균이 생성하는 urease의 활성 때문이다[2]. Urease는 위 점막의 혈장 삼출액이나 조직액 내에 있는 요소를 분해하여 암모니아를 발생시켜 균체 주위를 알칼리성으로 만들어 위장 내부의 강산을 중화하는 작용이 있다[3]. 중화된 pH 환경에서 *H. pylori* 균은 장기간 위에 서식하면서 위염과 위궤양 등을 발병시킬 수 있다[4]. *H. pylori* 균의 감염을 치료하는 방법으로 metronidazole, clarithromycin,

amoxicillin, levofloxacin과 같은 항생제 투여방법이 있으나 부작용이나 항생제에 대한 내성 등의 문제점이 있다[5-7]. 항생제 치료법을 대체할 목적으로 식물추출물에 의한 urease 활성억제에 대한 연구가 진행되고 있으며 문헌에 보고된 식물추출물의 예로는 소목과 황련[8], Cashew apple[9], 중국차[10], 황련과 연교 등[11], 연교[12], 후박과 결명자[13] 등이 있다.

본 연구에서는 urease 활성억제 작용이 강한 물질을 선정하기 위하여 전통동양약물 데이터베이스[14], 한국의 자원식물에 대한 문헌자료[15] 등에 위를 보호하거나 항균효과가 있는 한약재를 검토하였다. 일차 선정된 한약재 17가지는 본 연구팀의 선행연구[12] 대상이었던 16가지 한약재에 오매가 추가된 것이다. 오매와 선행연구에서 urease 활성 억제능이 좋았던 약재 5가지(연교, 소목, 형개, 황련, 소엽)를 비교하였는데 오매 추출물의 urease 활성 억제 능력이 가장 우수하였다. 본 연구는 오매 추출물의 분리정제 및 NMR 분석을 통하

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: chpark@khu.ac.kr

‡ 이 논문은 경희대학교 정석진 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

여 오매에 함유된 urease 활성 억제물질이 ursolic acid임을 밝혔다. 문헌보고에 의하면 오매 추출물은 항산화[16] 및 항균[17]효과가 있으며, ursolic acid는 대장암, 피부암 및 간암세포에 대한 항종양 및 세포자살 효과가 있는 것으로 보고되었다[18-20].

2. 실험

2-1. 사용 균주 및 배양

실험에 사용된 *Helicobacter pylori*는 경상대학교 의과대학에서 분양받은 ATCC 43504였다. 이 균주의 계대배양을 위한 액체배지로는 10 vol% horse serum (JRH Bioscience, USA)을 첨가한 brucella broth (Difco, USA) 배지를 이용하였다. 이상적인 배양조건을 맞추기 위하여 anaerobic jar (3 L, Difco, USA)에 혼합가스(10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂)를 주입하면서 진탕배양기에 고정하여 회전속도(120 rpm)와 온도(37 °C)를 유지하였다.

균주보존에 사용된 고체배지 또한 10 vol% horse serum (JRH Bioscience, USA)을 첨가한 brucella agar (Difco, USA) 배지를 이용하였으며, 이 균주는 혼합가스(10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂)가 공급된 CO₂ 배양기(MCO-175, Sanyo, Japan) 내에서 37 °C, 95%의 습도상태에서 유지되었다.

2-2. 대상 한약재의 선정 및 용매추출

대상 한약재는 전통동양약물 데이터베이스와 한국의 자원식물에 관한 문헌자료, 전문가와의 상의를 거쳐 위를 보호하거나 항균효과가 있는 한약재 17종(소엽, 연교, 치자, 백출, 창출, 건강, 황금, 형개, 애엽, 갈근, 계피, 소목, 정향, 황련, 양강, 오수유, 오매)을 일차 선정하였다. 이 중에서 오매를 제외한 16종의 한약재 추출물의 urease 활성억제 작용에 대한 비교결과는 선행연구[12]에서 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 선행연구에서 상위 5위까지였던 약재(연교, 소목, 형개, 황련, 소엽)에 오매를 추가한 6가지 한약재에 대한 실험을 수행하였다.

각 한약재는 경동시장에서 구매하여 60 mesh 크기의 분말로 만들어 각 한약재 10 g에 에탄올(70%) 100 ml에 넣고 80 °C에서 1시간 동안 추출하였다. 각 추출물은 여과지(Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과하여 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)에서 농축하였다. 각 추출액은 오염균을 제거하기 위하여 0.2 µm의 주사기 필터로 여과하였고, NaOH와 HCl을 사용하여 pH를 7로 조정하였고, 농축액의 최종농도는 100 mg/ml로 하였다.

2-3. 한약재 추출물의 urease 활성억제 효과검색

Urease 활성 억제능을 측정하기 위해 한약재 추출 분획물 20 µL (100 mg/ml 농도)와 *H. pylori* bacterial suspension (20 µL)을 urea broth (yeast extract 0.1 mg/mL, monopotassium phosphate 9.1 mg/mL, dipotassium phosphate 9.5 mg/mL, urea 20 mg/mL, and phenol red 0.01 mg/mL) 7 mL가 들어있는 cuvette에 넣었다. Urea의 분해에 따른 phenol red의 color intensity의 변화를 spectrophotometer (Spectronic 20 D+, Milton Roy, USA)를 이용하여 560 nm에서 측정하였다. Urease의 작용에 대한 한약재 추출물의 억제효과가 강할수록 urea가 암모니아로 분해되는 정도가 낮아지게 되며 broth의 pH 증가도 적을 것이다. 이러한 pH 조건에서 phenol red는 황색으로 남아있게 되어 O.D. 값이 상대적으로 낮게 된다. 오매로부터 활성성분을 분

리정제하고자 하는 batch 추출과 column chromatography 실험에서도 동일한 방법을 사용하여 각 분획의 urease 활성을 측정하였다. 모든 실험은 두 번 반복하였고 각 경우에 대하여 2개의 sample을 분석하였다.

2-4. 오매의 회분식 추출

분쇄한 오매(1.2 kg)를 80% methanol (6 L)로 30 °C, 120 rpm으로 72시간 동안 2회 추출한 후 여과지(Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과하여 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)로 감압 농축하여 메탄올 추출물 333.8 g을 얻었다. 이 메탄올 추출물을 비극성 용매인 ethyl acetate와 극성 용매인 물로 분배 추출하였고, 물 층을 다시 물보다 극성이 낮은 n-부탄올로 추출하였다(Fig. 1). 각 층을 농축하여 물 층, n-부탄올 층, ethyl acetate 층에서 각각 155.3, 132.6, 36.8 g을 얻었다. 농축하여 얻어진 세 분획(물, n-부탄올, ethyl acetate)에 대하여 100 mg/mL 농도의 분획물 20 µL를 *H. pylori* bacterial suspension (20 µL)에 첨가하여 urease 활성 억제능력을 측정하였다.

2-5. Column chromatography를 이용한 분리정제 및 NMR 분석

회분식 용매추출에서 urease 활성 억제효과가 가장 크게 나타난 ethyl acetate 분획물에 대하여 실리카겔을 이용하여 두 단계 그리고 이어서 octadecyl 실리카겔을 이용하여 한 단계, 총 세 단계에 걸쳐서 column chromatography를 수행하였다(Fig. 1). Silica gel column chromatography (이하 SGCC라고 함)에는 silica gel 60 (63~200 µm, Merck)을 사용하였다. Octadecyl silica gel chromatography(이하 Octadecyl SGCC라고 함)에는 LiChroprep RP-18 (40~63 µm, Merck)을 사용하였다. Thin-layer chromatography (TLC)에는 silica gel 60 F₂₅₄ plate (0.2 mm Aluminum sheet, Merck)를 사용하였고 octadecyl silica gel TLC는 DC-Fertigplattem RP-18 F_{254S} (Merck)를 사용하였다. 용매 선정을 위해 thin layer chromatography (TLC)로 흡착제 및 전개용매를 여러 가지로 바꾸어서 R_f 값의 이동, spot 형의 변화를 검토하였다. 분획에 사용된 용매(메탄올, 에틸아세테이트, n-부탄올, n-헥산 및 클로로포름)는 시약등급이었다(Ducksan Pharmaceutical Co., Ltd, Korea).

Ethyl acetate 분획이 비극성이므로 전개용매를 비극성으로부터 극성 쪽으로 점차 높여가면서 silica gel column chromatography를 수행하였다. 1단계 추출에서 사용한 전개용매의 비율은 n-hexane/ethyl acetate=15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:2과 chloroform/methanol=10:1, 5:1, 2:1이었다. 9개의 분획물 중 urease 활성이 가장 낮은 n-hexane/ethyl acetate=3:1 분획에 대하여 chloroform/methanol/water=20:3:1 전개용매를 사용하여 2단계 silica gel column chromatography를 실시하고 5개의 분획으로 분리하였다. 5개의 분획물(cmw1~cmw5) 중 urease 활성이 가장 낮은 cmw3 분획에 대하여 methanol/water=10:1의 전개용매를 사용하여 3단계 column chromatography를 실시하고 3개의 분획물(mw1~mw3)을 얻었다. 이 3단계 분리에서는 TLC 분석 결과 silica gel로는 분리가 어렵다고 판단되어 resin을 octadecyl silica gel로 교체하여 사용하였다. 얻어진 3개의 분획물 중 urease 활성이 가장 낮은 3번 분획(mw3)을 NMR로 분석하여 urease 활성 억제 성분의 구조를 확인하였다. 각 분획에 대한 urease 활성은 이전 section(2.-3)에서 설명한 방법을 사용하여 측정하였다.

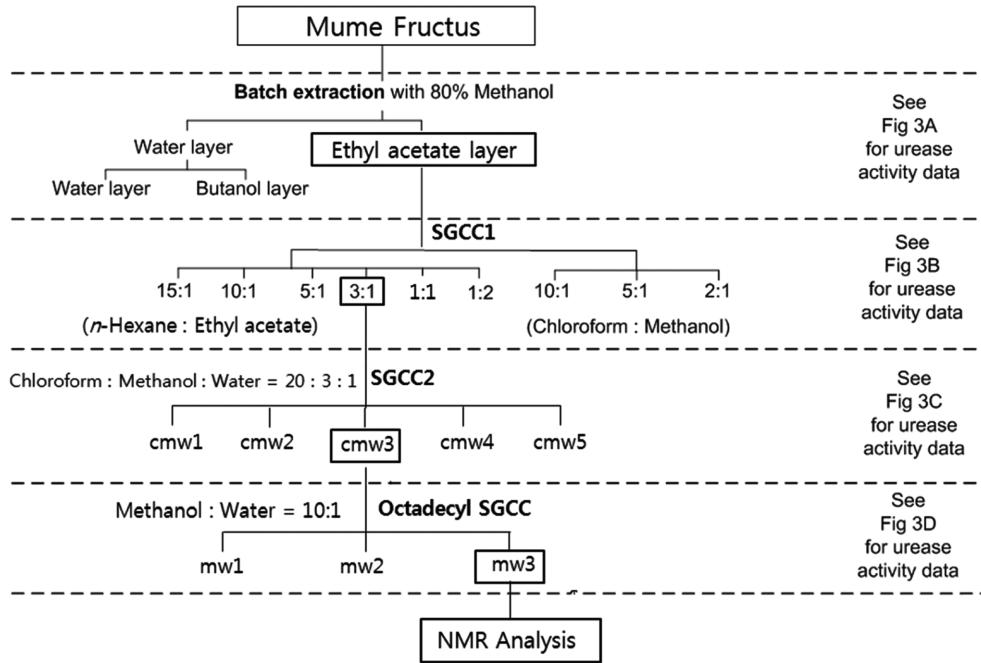


Fig. 1. Process diagram for the isolation of urease-inhibiting compounds from Mume Fructus.

3. 결과 및 고찰

3-1. 한약재 추출물의 urease 활성 억제 효과

연교, 소목, 형개, 황련, 소엽, 오매의 에탄올(70%, 80 °C) 추출물을 urease 활성 억제 능력이 큰 것부터 나열하면 다음과 같다: 오매 (Mume Fructus) (0.03) > 소목(*Caesalpinia sappan* L.) (0.096) > 연교 (*Forsythiae suspensa* Vahl) (0.127) > 형개(*Schizonepeta tenuifolia* Briq) (0.163) > 황련(*Coptis japonica* Makino) (0.189) > 소엽(*Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo) (0.216) (Fig. 2). 여기서 괄호 안의 숫자는 72시간 후 최종 O.D. 값을 나타내며 이 값이 작을수록 *H. pylori*의 urease 작용에 대한 한약재 추출물의 억제효과가 큰 것이다. 오매 추출물의 O.D. 값(0.03)은 한약재를 넣지 않은 대조군(이하 control 이라고 함)의 O.D. 값 대비 7.5%에 불과하였다. O.D. 값을 기준으로 비교하였을 때 다른 다섯 가지 한약재 추출물보다 오매 추출물의 urease 활성 억제 능력이 월등히 강하였다.

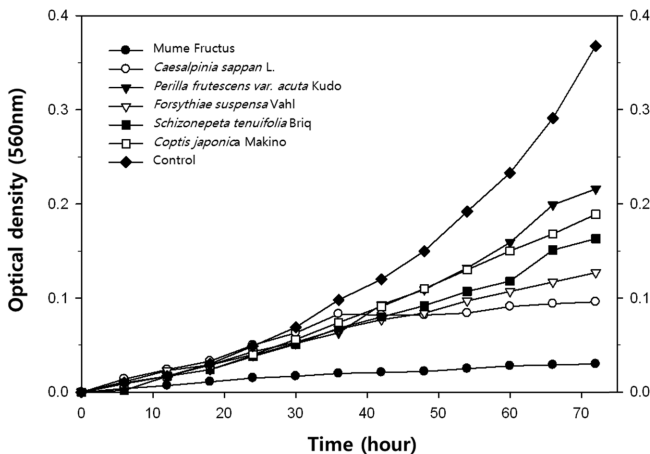


Fig. 2. Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by medicinal plant extracts.

3-2. 오매로부터 urease 억제성분의 분리-정제 ① <회분식 추출 단계>

오매에 들어있는 urease 활성 억제 물질을 분리-정제하는 첫 단계로 메탄올(80%)로 추출한 후 비극성 용매인 에틸아세테이트와 극성 용매인 물로 분배추출하였다. 물 층은 다시 물보다 극성이 낮은 n-부탄올로 추출하였다(Batch extraction in Fig. 1). 이렇게 얻어진 세 개의 분획 중 물과 n-부탄올 분획에서는 한약재 추출물을 넣지 않은 대조군(control)과 비교하여 O.D. 값이 각각 20.0% 및 14.5% 낮았으며 이는 urease 활성 억제가 크지 않았음을 나타낸다. 이와 달리 에틸아세테이트 분획의 O.D.는 control보다 88.8% 낮았다. 이는 에틸아세테이트 분획 중에 urease 활성 억제물질이 많이 포함되어 있음을 의미한다(Fig. 3A).

3-3. 오매로부터 urease 억제성분의 분리-정제 ② <Column Chromatography 1단계>

회분식 추출에서 urease 활성 억제 물질이 가장 많이 포함된 에틸아세테이트 분획을 대상으로 silica gel column chromatography를 수행하였다. 추출용매(eluent)는 9가지로서 n-hexane/ethyl acetate 혼합용매 또는 chloroform/methanol의 혼합용매를 사용하였다(SGCC1 in Fig. 1). Fraction collector로 300 drop씩 모아서 분리한 9개 분획을 비교하니 n-hexane/ethyl acetate=3:1을 eluent로 사용한 분획의 urease 활성 억제 효능이 가장 좋았고 urease의 상대활성도가 control 대비 3.5%에 불과하였다(Fig. 3B).

3-4. 오매로부터 urease 억제성분의 분리-정제 ③ <Column Chromatography 2단계>

Silica gel column chromatography 2 단계는 hexane/ethyl acetate=3:1 분획을 대상으로 하였다. TLC 분석을 통하여 chloroform/methanol/water=20:3:1을 eluent로 선정하였다(SGCC2 in Fig. 1). Fraction collector로 300 drop씩 모으고 TLC를 이용하여 유사한

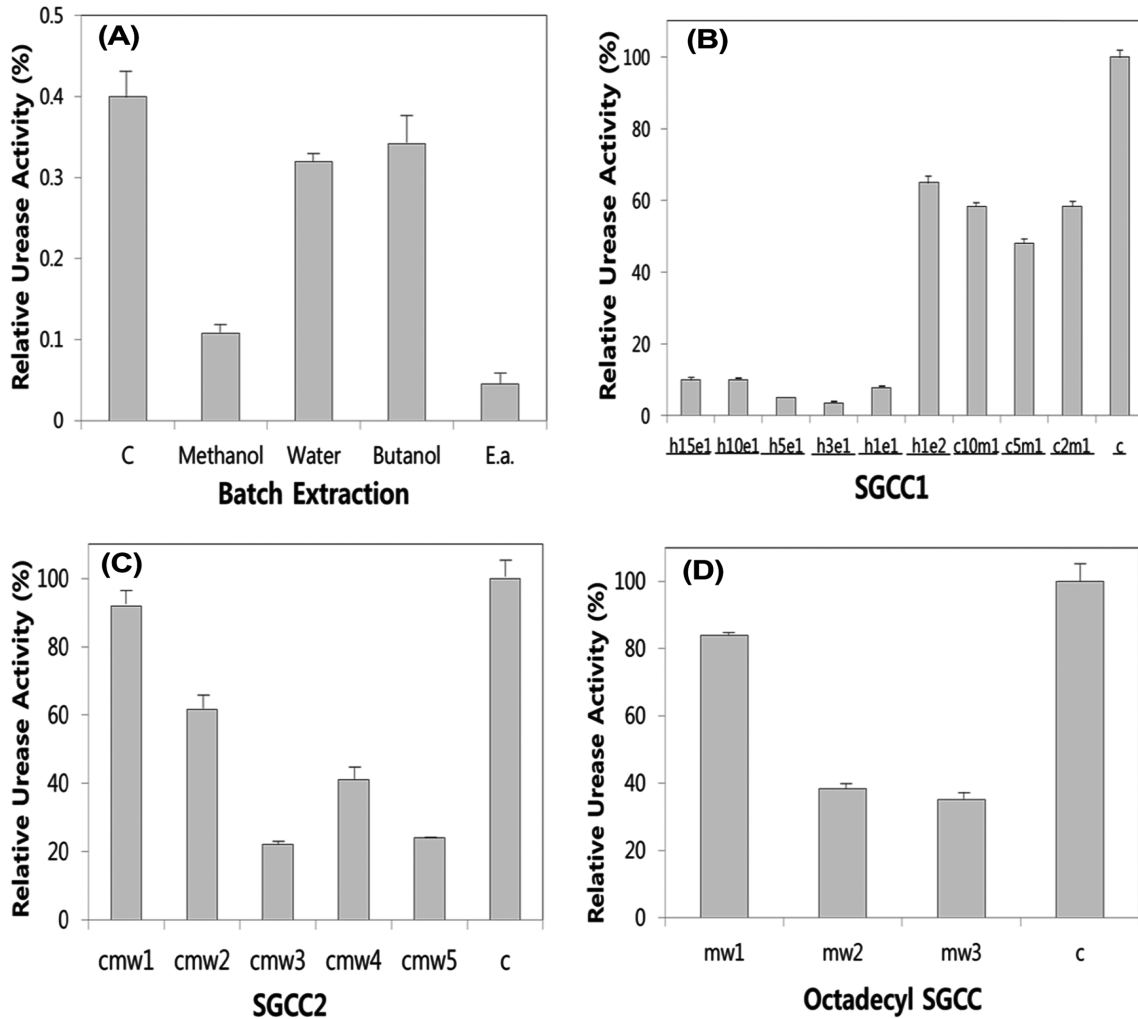


Fig. 3. Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity; (A) by various solvent extracts of Mume Fructus obtained by batch extraction. MeOH, BuOH, and E.a stand for Methanol, Butanol, and Ethyl acetate, respectively.; (B) by eluents of nine solvent mixtures of n-hexane/ethyl acetate and chloroform/methanol in silica gel column chromatography (SGCC1). For example, h15e1, h1e2, and c10m1 stand for eluents composed of n-hexane/ethyl acetate (15:1, v/v), n-hexane/ethyl acetate (1:2, v/v), and chloroform/methanol (10:1, v/v), respectively.; (C) by fractions of silica gel column chromatography (SGCC2) using chloroform:methanol:water (= 20:3:1, v/v) as eluent.; (D) by fractions of octadecyl silica gel column chromatography using methanol:water (=10:1, v/v) as eluent. In Figures (A), (B), (C), and (D), C stands for control.

성분을 포함하는 것으로 판단되는 5개의 분획을 얻었다 (cmw1~cmw5). 5개의 분획 중 cmw3 분획의 urease 활성 억제 효능이 가장 좋았고 urease의 상대 활성도가 control 대비 22.0%에 불과하였다(Fig. 3C).

3-5. 오매로부터 urease 억제성분의 분리정제 ④ <Column Chromatography 3단계>

Silica gel column chromatography 3단계에서는 TLC 결과 silica gel로는 분리가 어렵다고 판단되어 octadecyl silica gel을 이용하였다. 3단계 실행에 앞서 octadecyl silica gel TLC (ODS-TLC)로 분석하여 methanol/water=10:1을 eluent로 선정하였다(Octadecyl SGCC in Fig. 1). 얻어진 3개의 분획(mw1~mw3) 중 mw3 분획의 urease 활성 억제효능이 가장 좋았고 urease의 상대 활성도가 control 대비 35.2% 이었다(Fig. 3D). 이 mw3 분획에 함유되어있는 물질의 구조를 핵자기 공명 장치(NMR)를 이용하여 분석하였다.

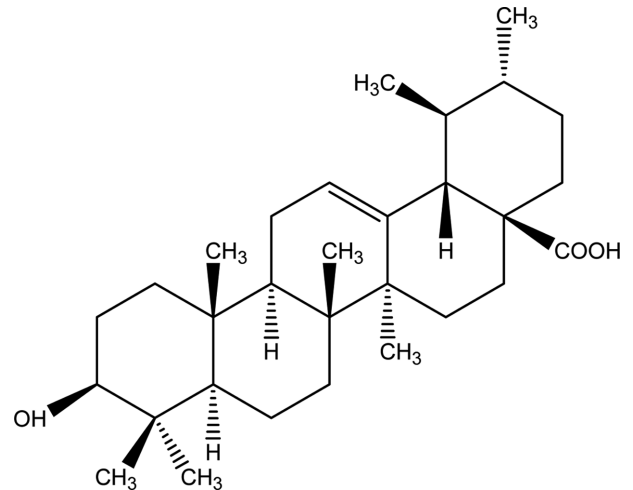


Fig. 4. Chemical structure of ursolic acid.

3-6. 2D-NMR을 이용한 구조 확인

분리-정제된 물질의 NMR 분석결과 ¹H-NMR (400 MHz, pyridine) spectrum에서 한 개의 olefin methine (δ_H 5.49, br s) 및 한 개의 oxygenated methine signal (δ_H 3.46, dd, J=10.0, 5.6 Hz)이 관측되었다. 그리고 고자장 영역에서 methine 및 methylene에서 비롯한 다수의 signal을 비롯하여 5개의 singlet methyl (δ_H 1.24, δ_H 1.22, δ_H 1.05, δ_H 1.02 및 δ_H 0.88) signal과 2개의 doublet methyl proton δ_H 1.00 (d, J=6.4 Hz) 및 δ_H 0.95 (d, J=4.8 Hz) signal이 관측되었다. 따라서 triterpenoid에서 보여지는 전형적인 pattern임을 알 수 있었으며, methyl signal의 특징으로부터 ursane 골격의 triterpenoid임을 추측할 수 있었다.

¹³C-NMR (100 MHz, pyridine) spectrum을 보면, 모두 30개의 탄소 signal이 관측되었다. 이중결합의 영역에서 한 개의 carbonyl carbon (δ_C 179.8)과 한 쌍의 이중결합을 이루는 olefinic quaternary (δ_C 139.2) 및 methine carbon (δ_C 125.6) signal이 관측되었다. 산소가 치환된 oxygenated methine signal (δ_C 78.2) 1개가 관측되었으며, 고자장 영역에서 다수의 signal이 관측되었다. 고자장 영역에 대해서 DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) spectrum과 비교 분석한 결과 5개의 4급탄소, 5개의 methine signal과 9개의 methylene signal 그리고 7개의 methyl signal을 각각 확인하였다. 따라서 1개의 carboxylic acid와 이중결합 1개 및 hydroxyl기를 가진 ursane 골격으로서 이와 같은 결과를 문헌과 비교한 결과, 이 화합물을 ursolic acid로 결정하였다(Fig. 4).

4. 결 론

위궤양, 위염 등의 질병을 일으키는 *Helicobacter pylori* 균이 강산성 조건인 위장에서 서식할 수 있는 것은 이 균이 생산하는 urease의 활성 때문으로 알려져 있다. 본 연구에서 대상으로 한 한약재(연교, 소목, 형개, 황련, 소엽, 오매)의 에탄올(70%) 증에서 오매(Mume Fructus) 추출물이 가장 강력한 urease 활성억제 능력을 보였다. 이 오매에 함유된 urease 활성 억제성분을 극성이 다른 여러 가지 용매를 사용하여 회분식으로 추출하였고 이어서 실리카 겔 칼럼과 octadecyl 실리카겔 칼럼을 이용한 크로마토그래피로 분리-정제하였다. NMR 분석을 통하여 이 정제된 오매 추출물에 함유된 활성성분이 ursolic acid임을 규명하였다. Ursolic acid는 이미 의학문헌에 항균 및 항암효과가 보고되고 있는 물질이며 본 실험결과는 오매에 함유된 이 성분이 항생제를 대신하여 *H. pylori* 제거에 활용될 수 있음을 시사하였다.

감 사

본 연구는 2010년도 경희대학교 지원에 의한 결과입니다.

References

- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., MacConnell, W. and Harper, W. E. S., "Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 397-405(1989).
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R. and Krakowka, S., "Essential Role of Urease in Pathogenesis of Gastritis Induced by *Helicobacter pylori* in Gnotobiotic Piglets," *Infect. Immun.*, **59**, 2470-2475(1991).
- Sachs, G., Scott, D. and Weeks, D., "The Compartment Buffered by the Urease of *Helicobacter pylori*: Cytoplasm or Periplasm," *Trends Microbiol.*, **10**, 217-218(2002).
- Ferrero, R. L., Hazell, S. L. and Lee, A., "The Urease Enzymes of *Campylobacter pylori* and a Related Bacterium," *J. Med. Microbiol.*, **27**, 33-40(1988).
- Jenks, P. and Edwards, D. I., "Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori*," *Int. J. Antimicrob. Agents*, **19**, 1-7(2002).
- Wong, B. C.-Y., Lam, S. K., Wong, W. M., Chen, J. S., Zheng, T. T., Feng, R. E., Lai, K. C., Hu, W. H. C., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Fong, D. Y. T., Ho, J., Ching, C. K. and Chen, J. S., "*Helicobacter pylori* Eradication to Prevent Gastric Cancer in a High-Risk Region of China: A Randomized Controlled Trial," *JAMA*, **291**, 187-194(2004).
- Chey, W. D. and Wong, B. C. Y., "American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection," *Am. J. Gastroenterol.*, **102**, 1808-1825(2007).
- Lee, J. J., Kim, S. H., Chang, B. S., Lee, J. B., Huh, C. S., Kim, T. J. and Baek, Y. J., "The Antimicrobial Activity of Medicinal Plant Extracts against *Helicobacter pylori*," *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **31**, 764-770(1999).
- Kubo, J., Lee, J. R. and Kubo, I., "Anti-*Helicobacter pylori* Agents from the Cashew Apple," *Agric. Food Chem.*, **47**, 533-537(1999).
- Yee, Y. K., Koo, M. W. L. and Szeto, M. L., "Chinese Tea Consumption and Lower Risk of *Helicobacter* Infection," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**, 552-555(2002).
- Yoon, Y.-S., Lee, S.-H., Baek, N. I., Kim, H. Y. and Park, C.-H., "Inhibition of Cell Growth and Urease Activity of *Helicobacter pylori* by Medicinal Plant Extracts," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 187-191(2004).
- Shin, S.-J., Park, C.-E., Baek, N.-I., Chung, I. S. and Park, C.-H., "Betulinic and Oleanolic Acids Isolated from *Forsythia suspensa* Vahl Inhibit Urease Activity of *Helicobacter pylori*," *Bio-tech. Bioproc. Eng.*, **14**, 140-145(2009).
- Shi, D. H., Liu, Y. W., Liu, W. W. and Gu, Z. F., "Inhibition of Urease by Extracts Derived from 15 Chinese Medicinal Herbs," *Pharm Biol.*, **49**, 752-755(2011).
- Seoul National University Natural Products Research Institute, *TradiMed - Traditional Oriental Medicines Database* (in Korean), Seoul Systems Co., Ltd., Seoul(1996).
- Kim, T. J., "*Korean Resources Plants*" (in Korean), Seoul National University Press, Seoul, Korea(1996).
- Debnath, T., Bak, J. P., Samad, N.B., Jin, H.-L., Lee, B. R. and Lim, B. O., "Antioxidant Activity of Mume Fructus Extract," *J. Food Biochem.*, **36**, 224-232(2012).
- Chen, Y., Wong, R. W. K., Seneviratne, C. J., Hägg, U., Mcgrath, C., Samaranyake, L. P. and Kao, R., "The Antimicrobial Efficacy of Fructus Mume Extract on Orthodontic Bracket: A Mono species-Biofilm Model Study *in vitro*," *Arch. Oral Biol.*, **56**, 16-21(2011).
- Li, J., Guo, W.-J. and Yang, Q.-Y., "Effect of Ursolic Acid and Oleanolic Acid on Human Colon Carcinoma Cell Line HCT 15," *World J. Gastroenterol.*, **8**, 493-495(2002).

19. Harmand, P.-O., Duval, R., Delage, C. and Simon, A., "Ursolic Acid Induces Apoptosis through Mitochondrial Intrinsic Pathway and Caspase-3 Activation in M4Beu Melanoma Cells," *Int. J. Cancer*, **114**, 1-11(2005).
20. Yan, S.-L., Huang, C.-Y., Wu, S.-T. and Yin, M.-C., "Oleanolic Acid and Ursolic Acid Induces Apoptosis in Four Human Liver Cancer Cell Lines," *Toxicol. Vitro*, **24**, 842-848(2010).