

韓 英 淑 教 授 指 導

博 士 學 位 請 求 論 文

오미자 (*Schizandra chinensis*
Baillon.)를 포함한 생약 소재들의
*Helicobacter pylori*에 대한
항균 활성 연구

2007

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

朴 珠 妍

오미자 (*Schizandra chinensis*
Baillon.)를 포함한 생약 소재들의
*Helicobacter pylori*에 대한
항균 활성 연구

韓 英 淑 教授 指導

이 論文을 博士學位 論文으로 提出함.

2007年 4月

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

朴 珠 妍

감사의 글

『두려워하지 말라 내가 너와 함께 함이라 놀라지 말라 나는 네 하나님이 됨이라 내가 너를 굳세게 하리라 참으로 너를 도와주리라 참으로 나의 의로운 오른손으로 너를 붙들리라. 사41:10』

성신여자대학교 식품영양학과에 설레는 마음으로 첫 발을 내딛은 지 꼬박 10년이 지났습니다. ‘졸업’의 사전적인 의미가 학생이 규정에 따라 소정의 교과 과정을 마치고 어떤 일이나 기술, 학문 따위에 통달하여 익숙해지는 것이라고 하는데 졸업할 자격을 갖추었는지 다시금 돌아보게 됩니다.

먼저 대학원 과정 내내 언제나 한결같이 큰 격려와 따뜻한 사랑을 아끼지 않으신 한영숙 지도교수님께 가슴 깊이 감사드립니다. 이 논문을 쓸 수 있도록 연구의 길을 제시해 주시고 세심하게 지도해주신 한림대학교 신현경 교수님과 바쁘신 와중에도 미약한 논문을 다듬어 주시고 따뜻하게 지도해주신 세종대학교 김우정 교수님께 진심으로 감사드립니다. 저에게 쉽지만은 않았던 논문의 고비마다 교수님들의 지도와 격려가 있었기에 본 논문이 결실을 맺게 되었습니다. 또한 많은 가르침과 조언으로 논문을 심사해주신 김혜영 교수님, 안홍석 교수님께 감사드리며 학부에서부터 대학원 박사과정까지 훌륭히 가르쳐주신 안명수 교수님, 조은자 교수님, 이명숙 교수님께도 감사드립니다.

천연 생약 추출물 분양부터 시료의 추출과 유효 성분 분석에 이르기까지 많은 도움을 주신 한림대학교 RIC 천연물연구팀의 임순성박사님, 10년 만에 돌아온 춘천은 여느 타지와 다를 바 없이 낯설고 어색하였지만 낯선 장소, 낯선 사람들 틈일지라도 마음 편하게 실험할 수 있게 해준 한림대학교 RIC

이연실, 이수경, 김정은 선생님 정말 고맙습니다. 또한 같은 연구실에서 실험하는데 불편함이 없도록 배려 해주신 박소영 박사님을 비롯하여 작은 것 하나라도 흔쾌히 도와준 한림대학교 식품영양학과 대학원생 여러분, 고등학교 선배님으로 친언니처럼 힘들 때마다 위로해주시고 기도해주신 행정실 최윤희 선생님께 지면으로나마 감사드립니다.

그리고, 오랜 시간이 지났지만 그때를 생각하면 힘들었던 기억보다 입가에 잔잔한 미소가 떠오르는 추억을 안겨준 소중한 연구실 선·후배님들에게 감사의 마음을 전합니다. 한결같은 사랑으로 격려해주시는 오지영 선배님, 이현희 선배님, 함께 했었기에 서로 의지하고 도와주며 연구할 수 있었던, 지금은 아이 엄마가 된 든든한 동기 권민경과 잘 따르고 열심히 연구에 매진했던 이해은, 이아영, 성기옥, 김은정 후배에게 고마움을 전합니다.

무사히 학업의 길을 마칠 수 있도록 항상 따뜻한 격려로 힘을 실어준 친구들 춘천여자고등학교 58회 동창모임인 富CC - 김정연, 박우진, 이지은, 이희정, 차혜윤, 최미영, 함영경 - , 그리고 성신여대 식품영양학과 97학번 대학 동기모임 GunF - 김명희, 김혜진, 백지현, 허영지 - 정말 사랑하고 정말 고맙습니다.

끝으로 한없는 사랑과 격려로 큰 딸을 응원해 주시는 사랑하는 부모님과 멋진 20대를 보내고 있는 stylist 동생 소연이에게 감사하며 밤낮으로 기도의 끈을 놓지 않으시고 논문 쓰는 동안 큰 손녀 아침, 저녁 식사를 손수 챙겨주신 외할머니께 이 작은 결실을 바칩니다. 앞으로 더 성실한 모습으로 보답하겠습니다. 사랑합니다.

2007년 6월

박주연 올림

논문개요

*H. pylori*는 사람의 위 점막에 서식하고 있으며 만성 위축성 위염, 십이지장궤양, 위궤양을 비롯하여 위암에 이르기까지 다양한 위십이지장 질환을 유발하는 원인균이다. 최근 *H. pylori* 항생제의 높은 부작용, 제균의 어려움, 내성균의 출현 등으로 인해 천연 재료에서 항균활성을 검토하는 연구들이 보고되고 있다. 그러나 *H. pylori* 치료를 위해서는 어느 한쪽 측면의 효과보다 균 생육 억제, urease 활성 억제, 부착 억제 등의 다각적인 측면에서 접근이 필요하다. 본 연구에서는 기능성 식품 또는 의약품 중간원료로의 용도 개발을 위한 기초연구의 일환으로 오미자를 포함한 188종의 천연식용생물 자원으로부터 추출한 추출물을 대상으로 *H. pylori* 항균활성을 검색하였다. 그 결과 오미자의 ethanol 추출물로부터 *H. pylori*에 대한 항균 활성 물질을 분리 동정하였다. 또한 오미자를 포함한 188종의 천연 생약 추출물의 urease 저해활성과 적혈구 응집반응을 통한 부착억제 실험을 하여 in vitro에서 *H. pylori*에 대한 다각적인 측면의 database를 구축하고자 하였다.

1. 95% EtOH 추출물 55종, 70% EtOH 추출물 73종, 물 추출물 60종, 총 188종의 생약소재 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균활성을 검토하였다. 이들 중 쥐오줌풀(*V. fauriei*), 오미자(*S. chinensis* B.) 95% EtOH 추출물, 흑오미자(*S. nigra* M.) 70% EtOH 추출물, 삼칠근(*P. notoginsengs*) 물 추출물에서 생육저해 환이 확인되었고 인진쑥(*A. capillaris* T.), 사상자(*T. japonica*), 목단피(*P. suffruticosa* A.) 70% EtOH 추출물에서도 비교적 약한 생육저해 환이 확인되었다.

2. 항균력이 있는 천연 생약소재 추출물 중 그 효과가 높은 소재면서 오랫동안

안 한국인이 섭취해 온 오미자(*Schizandra chinensis* Baillon.)를 이용하여 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 조사하였다. 오미자 EtOH 추출물은 1mg/disc, 3mg/disc, 5mg/disc의 농도에서 8.0mm(paper disc ϕ 6.0mm), 15mm, 20mm의 inhibition zone이 확인되었고 EtOAc 분획물에서는 같은 농도에서 각각 9.0mm, 19.0mm, 25.0mm의 inhibition zone을 나타내었다.

3. 오미자를 풍건한 후 분쇄하여 ethanol로 70℃에서 3회 반복 reflux하여 얻은 EtOH 추출물과 순차적으로 용매 분획하여 얻은 분획물의 고형분 수율은 EtOH 추출물이 39.5%, dichlorimechan(MC) 분획물이 8.66%, ethylacetate(EtOAc) 분획물이 17.03%, water 분획물이 4.98%로 나타났다.

4. 오미자 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물의 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물 모두 1.0mg/mL의 농도이었다.

5. 오미자 EtOAc 분획물의 농도를 3mg/disc로 하여 100℃에서 15, 30, 60 분간 열처리 한 후 *H. pylori*의 생육정도를 측정한 결과 모든 열 처리군에서 대조군과 차이가 거의 없는 항균 활성을 확인하였다.

또한, 오미자 EtOAc 분획물의 농도를 3mg/disc로 하고 pH를 2, 4, 6, 8로 조절하여 1시간 처리한 뒤 항균 효과를 조사한 결과 pH가 항균활성에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

6. 오미자 EtOH 추출물로부터 극성에 따라 계통 분획을 실시한 다음 뚜렷한 항균활성을 나타낸 EtOAc 분획을 Middle pressure liquid chromatography (MPLC)를 실시하여 peak에 따라 총 11개의 subfraction으로 분리하였다. Paper disc method에 따른 각 subfraction의 *H. pylori*에 대한 항균활성 결

과 11개의 subfraction 중 2개가 각각 22.0mm, 19.0mm의 저해환을 확인하였다.

이 중 큰 저해활성을 나타낸 첫 번째 화합물은 미황색 오일성 물질로 $C_8H_{16}O_3$ 임이 확인되었다. IR spectrum 결과 hydroxy group(-OH), carbonyl group(C=O), carboxyl group(C-O)이 확인되었다. 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz, δ)과 ^{13}C -NMR spectrum($CDCl_3$, 100 MHz, δ)을 분석하여 종합적으로 compound1(S-EA-3)은 ethyl 3-hydroxyhexanoate로 동정되었다.

두 번째 유효 성분 역시 미황색 오일성 물질로 $C_8H_{16}O_3$ 임이 확인되었다. IR spectrum 결과 hydroxy group(-OH), carbonyl group(C=O), carboxyl group(C-O)이 확인되었으며 1H -NMR spectrum($CDCl_3$, 400 MHz, δ)과 ^{13}C -NMR spectrum($CDCl_3$, 100 MHz, δ)을 분석하여 종합적으로 compound2 (S-EA-5)는 ethyl 5-hydroxyhexanoate로 동정되었다.

7. 188종의 천연 생약 추출물의 urease 저해활성을 검토한 결과 36종의 천연 생약 추출물에서 저해활성 효과가 나타났으며 특히, 쓴박하(*M. vulgare*) 95% EtOH 추출물과 현삼(*S. buergeriana*) 95% EtOH 추출물에서 acetohydroxamic acid를 기준으로 200% 이상의 높은 활성이 나타났으며 인동(*L. japonica*) 70% EtOH 추출물과 눈꽃동충하초(*I. japonica*) water 추출물 등도 비교적 높은 저해 활성을 보였다. 생육억제에서 우수한 활성을 보인 오미자는 EtOH 추출물이 27.85%, EtOAc 분획물이 35.80% 저해하였다.

8. 적혈구 응집 저해 반응으로 188종의 천연 생약 추출물의 *H. pylori*에 대한 부착억제 활성을 조사한 결과 95% EtOH 추출물 54종 중 쓴박하(*M. vulgare*), 마가목(*S. commixta*), 땡땡이덩굴(*C. trilobus*), 황백(*P. amurense*), 선인장(*O. ficus-indica* var. *saboten*), 복분자(*R. coreanus* M.) 6종에서 적혈구 응집 저해 활성이 나타났고 70% EtOH 추출물 74종 중에

서는 진피(*C. unshin*)와 나복자(*R. satirus*)에서 응집저해활성을 나타내었다. 60종의 물 추출물에서는 칩(*P. thunbergiana*), 오가피(*A. sessiliflorum* S.), 구기자(*L. chinense* M.), 백복령(*P. cocos* W.), 토사자(*C. japonica* C.), 석창포(*A. gramineus*), 천궁(*C. officinale*), 쇠비름(*P. oleracea*), 생지황(*R. glutinosa* L.), 수국(*H. macrophylla* for. *otaksa*), 삼칠근(*P. notoginsengs*) 11종에서 적혈구 응집 저해 활성을 확인하였다. 이 중 복분자를 숙성단계별로 미숙, 중숙, 완숙으로 나누어 95% EtOH로 추출하여 적혈구 응집 저해 활성 시험을 실시하였다. 미숙한 복분자 추출물은 1mg/mL의 농도에서 저해 활성을 보였고 중숙 복분자 추출물은 0.5mg/mL의 농도에서 활성을 나타내었다. 완숙 복분자 추출물은 0.1mg/mL의 농도에서도 적혈구 응집 저해 활성을 보여 부착 억제가 매우 우수한 것으로 확인되었다. 한편, 오미자 추출물과 분획물의 적혈구 응집 저해 활성을 조사한 결과 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물 모두 1mg/mL의 농도까지는 응집 저해 활성을 보였으나 0.5mg/mL의 농도에서는 EtOAc 분획물에서 약하게 저해 활성이 나타났고 EtOH 추출물에서는 활성이 나타나지 않았다.

본 연구는 오미자를 포함한 188종의 천연 생약추출물을 가지고 *H. pylori*의 제어를 위하여 생육 억제, urease 활성 억제, *H. pylori* 부착억제의 세 가지의 측면에서 이들 기능성 소재들의 효과를 비교 측정 하였다. *H. pylori*의 생육억제 활성에서는 그 효과가 높은 소재 중 하나이면서 오랫동안 한국인이 섭취해 온 오미자를 선정하여 생육 억제 물질에 대해 분리, 동정하였고 천연 생약 추출물 중 urease 활성 억제 및 *H. pylori* 부착 억제 능력이 우수한 추출물을 선별, 제시하였다. 본 연구 결과는 *H. pylori*의 제어를 위한 in vitro 실험의 database가 되며 오미자를 위시로 우수한 활성이 밝혀진 추출물들을 적절하게 혼합하여 *H. pylori* 억제 활성에 시너지 효과를 기대해 볼 수 있는 훌륭한 자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

목 차

논문개요

I. 서론	1
1. <i>H. pylori</i> 의 미생물학적 특성	2
1) Motility 특성	5
2) Urease 생산능	5
3) Adhesin	6
2. 한국인의 <i>H. pylori</i> 감염	6
3. <i>H. pylori</i> 제균 치료법과 항생제 내성	7
1) Bismuth제제	7
2) Metronidazole	7
3) Tetracycline/Amoxicillin/Clarithromycin	8
4) Proton pump inhibitors	8
4. 천연 추출물의 <i>H. pylori</i> 항균활성에 대한 국·내외 연구동향	10
1) 국내 연구동향	10
2) 국외 연구동향	11
5. 오미자의 생리 활성 기능	14
II. 실험재료 및 방법	19
1. 실험재료	19
1) 천연 생약 추출물	19

2) 시약	19
3) 사용균주 및 배지	19
2. 추출물 및 분획물 조제	28
1) 오미자 추출물 및 분획물의 조제	28
2) 흑오미자 추출물 및 분획물의 조제	28
3. Microbiological assay	30
1) Paper disc method	30
2) Minimum inhibitory concentration (MIC)	30
3) Thermal and pH stability	31
4. HPLC analysis	31
5. MPLC analysis	31
6. 화학구조해석	32
7. Urease 저해 활성 검색	32
1) 조-urease 조제	32
2) Urease 저해 활성 성분 검색용 assay	33
8. <i>Helicobacter pylori</i> 부착억제 활성 조사	34
1) 적혈구의 분리	34
2) 적혈구를 이용한 hemagglutination assay	34
III. 결과 및 고찰	36
1. 188종의 천연 생약 추출물의 항균 활성 탐색	36
2. 오미자 추출물 및 분획물의 항균 활성	44
3. 오미자 추출물 및 분획물의 수율	50
4. 최소저해농도(MIC) 측정	52
5. 오미자 추출물 및 분획물의 안정성	56

6. 오미자의 항균활성 물질의 분리 및 동정	60
1) Compound 1	66
2) Compound 2	74
7. Urease 저해 활성 검색	81
8. <i>H. pylori</i> 부착 억제 활성 조사	91
IV. 결론	102

Reference

Abstract

List of Tables

Table 1. The species of <i>Helicobacter</i> and natural host.	4
Table 2. Lists of 95% ethanol extracts of 55 medical plants used for antimicrobial experiment.	21
Table 3. Lists of 70% ethanol extracts of 73 medical plants used for antimicrobial experiment.	23
Table 4. Lists of water extracts of 60 medical plants used for antimicrobial experiment.	26
Table 5. Anti- <i>H. pylori</i> activities of 95% ethanol extracts of 55 medical plants.	37
Table 6. Anti- <i>H. pylori</i> activities of 70% ethanol extracts of 73 medical plants.	39
Table 7. Anti- <i>H. pylori</i> activities of water extracts of 60 medical plants.	42
Table 8. Anti- <i>H. pylori</i> activities of the fractions obtained from ethanol extracts of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	48
Table 9. Yield of the fractions obtained from ethanol extracts of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	51
Table 10. Minimum inhibitory concentration of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	55
Table 11. Anti- <i>H. pylori</i> activities of the subfractions obtained from ethyl acetate fraction of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	63

List of Figures

Fig. 1. The fruits of <i>Schizandra</i> sp.	15
Fig. 2. Scheme of extraction and solvent fractionation of ethanol extract from <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	29
Fig. 3. Anti- <i>H. pylori</i> activities of the EtOAc fractions from <i>Schizandra</i> <i>nigra</i> Max. and <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	47
Fig. 4. Anti- <i>H. pylori</i> activities of the ethanol extract and EtOAc fractions from <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	49
Fig. 5. Effect of heat treatment on the relative growth inhibition activity of the ethyl acetate fraction obtained form ethanol extracts of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	58
Fig. 6. Effect of pH change of media on the relative growth inhibition activity of the ethyl acetate fraction obtained form ethanol extracts of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	59
Fig. 7. Elution profile of ethyl acetate fractrion obtained from ethanol extracts of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon. by MPLC	61
Fig. 8. Elution profile of ethyl acetate fractrion obtained from ethanol extracts of <i>Schizandra nigra</i> Max. by MPLC	62
Fig. 9. HPLC chromatogram of the subfractions obtained from ethyl acetate fraction of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	64
Fig. 10. HPLC chromatogram of the subfractions obtained from ethyl acetate fraction of <i>Schizandra nigra</i> Max.	66
Fig. 11. The compound 1(S-EA-3) of ethyl acetatye fraction obtained from ethanol extracts of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	67

Fig. 12. IR spectrum of compound 1.	68
Fig. 13. ¹ H-NMR spectrum of compound 1(CDCl ₃)	69
Fig. 14. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1(CDCl ₃)	70
Fig. 15. Edited DEPT spectrum of compound 1(CDCl ₃)	71
Fig. 16. ¹ H- ¹³ C cosy spectrum of compound 1(CDCl ₃)	72
Fig. 17. Structure of compound 1.	73
Fig. 18. IR spectrum of compound 2.	75
Fig. 19. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 (CDCl ₃)	76
Fig. 20. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 (CDCl ₃)	77
Fig. 21. Structure of compound 2.	78
Fig. 22. Urease inhibitory activities of 95% ethanol extracts of medical plants.	83
Fig. 23. Urease inhibitory activities of 70% ethanol extracts of medical plants.	85
Fig. 24. Urease inhibitory activities of water extracts of medical plants.	87
Fig. 25. Urease inhibitory activities of ethyl acetate fractions and ethanol extracts of <i>Schizandra chinensis</i> Baillon and <i>Schizandra nigra</i> Max.	90
Fig. 26. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by <i>Helicobater pylori</i> . Hemagglutination was inhibited by 95% ethanol extrats from 6 medical plants. A positive control(without inhibitor) is shown along with <i>H. pylori</i>	93
Fig. 27. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by <i>Helicobater pylori</i> . Hemagglutination was inhibited by 70%	

ethanol extrats from 2 medical plants. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*.
 94

Fig. 28. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobater pylori*. Hemagglutination was inhibited by water extrats from 11 medical plants. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*. 95

Fig. 29. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobater pylori*. Hemagglutination was inhibited by 95% EtOH extracts of immature *Rubus coreanus* M. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*. [A]: immature, [B]: well-timed, [C]: ripened 98

Fig. 30. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobater pylori*. Hemagglutination was inhibited by EtOH extracts[A] and EtOAc fractions[B] of *Schizandra chnensis* Baillon. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*. 99

Fig. 31. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobater pylori*. Hemagglutination was inhibited by EtOH extracts[A] and EtOAc fractions[B] of *Schizandra nigra* Max. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*. 100

I. 서 론

위암은 발생률과 이로 인한 사망률이 감소하고 있으나 아직도 전 세계에서 두 번째로 많이 발생하는 악성 종양이다[1]. 우리나라에서는 전체 암 발생의 21%가 위암이고 인구 10만 명당 24명이 위암으로 사망하고 있다 [2-3]. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 감염은 사람에서 가장 흔한 만성 감염으로서 전 세계 인구의 50% 이상이 감염되어 있지만 선진국의 감염율은 25%정도로 최근에 감소하고 있고 개발도상국이나 후진국에서는 80% 이상으로 아직도 많은 사람들이 감염되어 있다[4-5]. 우리나라도 예외는 아니어서 전 국민의 46.6%, 성인에서는 69.4%의 감염률로 아직은 감염률이 높다 [6].

*H. pylori*가 세상에 알려진 지도 20년이 넘었으며 그동안 상부위장관 질환 특히 소화성궤양과 위암에서의 병태 생리, 진단과 치료에 큰 변화를 초래하였다. *H. pylori* 감염에 대한 높은 관심은 당연하며, 무엇보다도 가장 큰 관심의 대상은 위암일 것이다. 1994년 세계보건기구는 *H. pylori*를 확실한 발암인자(class I carcinogen)로 규정하였다[7]. 따라서 위암이 발생할 위험성이 있는 사람을 미리 알아내는 것과 이 과정 중에 관여하는 인자를 규명하는 것은 국민 보건에 중요하며 위암을 예방하기 위한 검사의 필수 요건이기도 하다.

1970년대 초 호주의 병리학자 Warren과 Strickland는 위염을 악성빈혈을 동반하는 자가면역질환의 일종인 A형과 병변분포가 A형과 다르고 악성빈혈에서 관측되는 여러 소견이 없는 B형으로 분류하였다. B형 위염 환자의 위점막에는 나선형의 세균이 존재한다는 사실이 밝혀져 위장병의 원인이 세균일 수 있다는 새로운 학설이 대두되었다. Warren과 내과의사인 Marshall은 미생물학자인 Goodwin의 도움으로 1982년 이 나선균의 순수분리 및 배

양에 성공하였다. 이 세균이 B형 위염의 원인균이라는 확신을 갖게 된 Marshall은 자신이 직접 분리·배양한 세균을 먹어보는 인체실험을 하였고 Nicholson & Morris라는 뉴질랜드 학자들도 동일한 인체실험을 하여 이 세균은 인체에 무해하게 서식하는 정상 세균총의 일원이 아닌 B형 날문방(antral) 위염의 원인균으로서 Koch의 가설을 충족시키는 병원성 세균임이 확인되었다[8-9].

이 세균은 사람의 위 점막에 서식하고 있으며 다른 동물이나 인체의 다른 장기에서는 분리되지 않는다[8]. 이 세균의 미생물학적 특성이 *Campylobacter*와 유사하여 처음에는 *Campylobacter pylori*로 명명되었으나 이 세균의 16s rRNA 염기서열, 세포막의 지방산 구성, 효소생성능, 생화학적 및 배양 특성이 *Campylobacter*와 다르다는 것이 인정되어 *Helicobacter*라는 새로운 Genus로 분류되었다[10]. *H. pylori*는 사람의 위점막에 장기간 서식하면서 만성 위축성 위염, 십이지장궤양, 위궤양을 비롯하여 위암에 이르기까지 다양한 위십이지장 질환을 유발한다는 사실이 밝혀져[11-14] 과거 소화성 궤양의 발병 원인이 acid-pepsin의 공격인자와 점막 방어간의 불균형으로 설명되어 왔으나 *H. pylori*의 발견은 소화성궤양의 병인론과 발병기전에 대한 이제까지의 개념을 크게 변화시킨 전환점이 되었다[15].

1. *H. pylori*의 미생물학적 특성

*H. pylori*가 처음 보고된 이후 지난 20여년 간 전 세계적으로 이 세균에 대한 각종 연구가 활발히 이루어져 왔다. 우선 이 세균의 분리, 배양 및 동정에 대한 연구가 행하여졌으며 아울러 이 병원균의 자연 서식처에 대한 연구 결과들이 다수 발표되었다. *H. pylori*는 사람의 위점막을 제외한 다른 장기나 또는 다른 동물에서는 분리되지 않지만 사람과 다른 동물에서 분리되는 이와 유사한 균종은 현재까지 20여종이 보고되었으며(Table 1) 계속하여

많은 새로운 균종이 분리, 배양, 동정될 것으로 예상되고 있다[16].

*H. pylori*는 만곡형 그람 음성 세균으로 크기는 $2-7 \times 0.4-1.2 \mu\text{m}$ 정도이며 미호기성(microaerophilic)으로 최적 산소분압은 2-8%이고, 10% CO_2 조건에서 배양이 가능하다. 배양배지에는 혈청 성분이나 이를 대신할 수 있는 활성탄 또는 cyclodextrin 같은 고분자화합물을 첨가해야하며, 배양 최적 pH는 7.0 근처로 자연 서식처인 사람의 위점막의 강한 산성조건과는 다르다. 대기 중에서는 실온에서 6시간 이내에 모두 사멸하기 때문에 배양자체가 까다로울 뿐만 아니라 일반 세균학적 방법으로 연구하기는 어렵다. 균주의 보관은 액체질소에서만 가능하며 배양조건이 좋으면 만곡형의 형태로 성장하지만 배양 조건이 나빠지면 형태가 구형으로 전환되면서 급격히 사멸된다. 이 세균은 특히 강력한 운동성과 urease 효소 생성능을 갖고 있으며 이러한 생태학적 특성은 *H. pylori* urease(urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5)에 의해 생성된 암모니아가 위점막의 서식처를 중화시키기 때문으로 밝혀져 있고, *H. pylori*는 균체의 생산 단백질 중 약 6%를 차지할 정도로 urease 생성능이 매우 강할 뿐 아니라 이 균의 urease는 기질인 요소에 대한 친화도가 다른 세균이나 식물의 urease 보다 20배 이상 높다[9, 17].

Table 1. The species of *Helicobacter* and natural host.

Species	Natural host	Urease	Habitation
<i>H. pylori</i>	human	+	gastric mucous membrane
<i>H. mustelae</i>	ferret	+	gastric mucous membrane
<i>H. felis</i>	dog, cat	+	gastric mucous membrane
<i>H. nemestrinae</i>	pig-tailed macaque monkey	+	gastric mucous membrane
<i>H. acinonyx</i>	cheeth	+	gastric mucous membrane
<i>H. muridarum</i>	mice, rat	+	intestine, gastric mucous membrane
<i>H. cinaedi</i>	human, rodents	-	intestine mucous membrane
<i>H. fenneliae</i>	human	-	intestine mucous membrane
<i>H. rappini</i>	sheep, dog, human	+	intestine, gastric mucous membrane
<i>H. hepaticus</i>	mice	+	liver, intestine mucous membrane
<i>H. canis</i>	dog	-	intestine mucous membrane
<i>H. helimannii</i>	human, dog, cat, pig	+	gastric mucous membrane
<i>H. trogontun</i>	rat	+	intestine mucous membrane
<i>H. bilis</i>	interbred mice	+	liver, intestine mucous membrane
<i>H. pullorum</i>	human, chicken	-	liver, intestine mucous membrane
<i>H. salomonis</i>	dog	+	gastric mucous membrane
<i>H. bizzozeroni</i>	dog	+	gastric mucous membrane
<i>H. cholecrystus</i>	hamster	-	gallbladder
<i>H. pametensis</i>	wild birds, pig, cat	-	gastric mucous membrane
<i>H. rodentium</i>	mice	-	gastric mucous membrane

1) Motility 특성

*H. pylori*는 *E. coli* 보다 20배 이상의 높은 점도에서도 운동성을 나타낸다. 이와 같은 강력한 운동성으로 *H. pylori*는 salicylate나 ethanol 같은 몇 가지 화합물 외에는 수소이온 같은 간단한 화합물도 침투하기 어려운 위점액층을 뚫고 들어갈 수 있고 위점막 상피세포의 접합부에 부착하여 살아갈 수 있는 것으로 추정된다. 신생 무균자돈을 이용한 감염을 조사에서도 운동성이 약한 균주는 17-40%의 감염율을 보인 반면 운동성이 강한 균주는 100%의 감염율을 나타내었다. *H. pylori*의 강한 운동성은 이 세균이 갖는 특이한 구조의 편모와 나선형의 형태 때문이다. 이 세균은 단극 또는 양극성의 편모를 하나씩 또는 5-6개의 다발로 보유하고 있으며 특히 다른 세균 편모에서는 관찰되지 않는 sheath와 terminal bulb라는 독특한 구조물을 갖고 있다. 한편 세균의 나선형 형태는 강력한 회전 운동을 가능하게 한다 [18-19].

2) Urease 생산능

이 균의 가장 중요한 생리적 특성 중 하나는 강력한 urease 생산능이다 [20]. Urease 효소 단백질은 전체 단백질의 약 6%를 차지하며 위점막 생검 절편 시료에서 이의 검출은 *H. pylori* 감염 여부를 추정하게 하고 균 배양에서 urease 양성반응은 진단 및 동정에 이용되고 있다. Urease는 요소를 암모니아와 CO₂로 분해하여 세균 주위환경을 중화하여 위내강의 염산에 의한 공격을 방어하는 것으로 추측된다. 최근 urease 생산능이 소실된 변이주는 신생 무균자돈에 감염되지 못한다는 사실이 확인되었다[21-22].

이러한 urease 작용은 위내강의 위산이 점막층 아래로 역류하게 되어 위산이 위점막 상피세포를 광범위하게 손상하여 위염과 위궤양이 발생하는 요인으로 작용할 것으로 추정된다. 또한 urease에 의해 위점막에 축적된 암모니아 자체가 직접 위점막 상피세포에 세포독성을 나타내어 위점막 손상이

유발된다는 설명도 제시되었다[23].

3) Adhesin

Adhesin은 점막 표면에 감염을 일으키는 많은 종류의 세균에서 관찰되는 세포벽 구조물이다. *H. pylori*에서는 sialic acid-specific hemagglutinin (hpa A)과 lipid-binding adhesin 등이 보고되어 있으며 이들이 *H. pylori*의 정착과 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[24].

2. 한국인의 *H. pylori* 감염

1998년 대한 *H. pylori* 연구회에서 상부위장관 증상이 없는 사람 5,732명을 대상으로 시행한 전국 역학조사 결과에 따르면 *H. pylori* 감염률은 전국민에서 46.6%였으며 16세 이상의 성인에서 69.4%, 특히 40대에서 78.5%라는 높은 감염률을 보였다[6]. 위암이 여자보다 남자에서 많이 발생하므로 [25] *H. pylori* 감염률도 남자에서 높을 것으로 예상하였으나 전체 남녀 감염률에는 차이가 없었다[26-27]. 그러나 성인에서는 남자와 여자의 *H. pylori* 감염률이 각각 69.4%와 64.2%로 차이가 있어 우리나라에서 위암 발생이 남자에서 많다는 사실과 무관하지 않았다. *H. pylori* 감염이 있는 사람이 상부위장관 질환, 특히 위암이 발생할 수 있는 고위험군[28]에 속함을 감안한다면 한국인에서 *H. pylori* 감염률이 높다는 것은 위암 발생 가능성이 높음을 의미한다[29]고 할 수 있다.

소화성 궤양 환자 1,031명을 대상으로 *H. pylori* 감염률을 조사한 Jung 등[30]의 보고에 따르면 위궤양 66%, 십이지장궤양 79%, 위 및 십이지장 동반궤양 71%의 감염률을 확인하였다. 또한 Kim 등[31]은 *H. pylori* 감염 환자의 배우자가 *H. pylori* 감염률이 높았고 이들 배우자가 상부위장관 질환이 있을 가능성이 있다고 보고하였고, Chang 등[32]의 300명의 위암 환

자 가족과 426명의 대조군을 조사하여 위암 환자 가족에서 *H. pylori*에 의한 위암 발생 가능성이 높다는 보고는 한국인에서 *H. pylori* 감염의 중요성을 보여준다.

3. *H. pylori* 제균 치료법과 항생제 내성

H. pylori 감염은 만성 전정부 위염, 소화성궤양, 점막연관림프조직형 위림프종 등의 가장 중요한 원인으로 알려져 *H. pylori* 제균이 이들 치료에 필수 요건이 되었다[33]. *H. pylori*의 제균 치료에는 몇 가지 약물들을 복합 처방하여 사용하는 것이 일반적이다. 각 치료약물의 특징을 살펴보면 다음과 같다[34-39].

1) Bismuth제제

이 약물은 *H. pylori*의 세포벽의 전기밀도를 변화시키고 이 약물의 콜로이드성 성질로 인해 균표피에 대한 흡착력을 약화시키며 균내용물의 응축과 액상화로 균자체의 구조를 변형시킨다. 또한 궤양부위, 점액, 담즙산과 결합하여 pepsin의 생산 및 활성을 감소시키며 점액의 점성과 탄력성을 향상시키는 등의 세포 보호작용을 갖는다.

2) Metronidazole

혐기성 세균에 의한 감염증, 트리코모나스 감염증, 아메바증 등의 치료에 사용하는 항생제로 in vitro에서 항균력이 pH에 비의존적이므로 in vivo에서 위액의 영향을 받지 않을 것으로 판단되며 위액에서 고농도로 축적될 수 있다. 그러나 이 약물에 대한 *H. pylori*의 내성이 매우 높다.

3) Tetracycline/Amoxicillin/Clarithromycin

Tetracycline은 세균의 단백질 합성을 억제하며 낮은 pH에서도 활성을 유지한다. 이 항생제에 대한 *H. pylori*의 내성은 아직 문제되지 않는다.

Amoxicillin은 세균의 세포벽 합성을 억제하며 in vitro와 in vivo에서 *H. pylori*에 대한 항균활성이 높고 산성 조건에서도 안정하다. Ampicillin과 달리 혈중에서 위액으로 잘 분비되며 이 약물에 대한 내성은 거의 보고되지 않았다.

Clarithromycin은 단백질 합성을 억제하는 macrolide계 항생제로 erythromycin과 항균범위는 비슷하지만 산성 조건에서 보다 안정하고 흡수율이 더 높다.

4) Proton pump inhibitors

궤양치료에 널리 이용되고 있는 omeprozole과 lansoprozole은 H⁺/K⁺-ATPase(proton pump) 저해제로써 직접 proton pump를 저해함으로써 벽세포의 H⁺ 이온 분비를 감소시켜 위산 분비를 억제시킨다. In vitro에서 *H. pylori*에 대한 항균활성을 보이지만 in vivo에서는 단지 균의 성장 억제작용만 하는 것으로 알려져 있다. 위 내의 pH를 증가시킴으로 다른 약물의 항균력을 상승시킨다는 보고도 있다. 이 약물은 산에 의해 빠르게 불활성화될 수 있으므로 장요피정으로 만들어야 효과적이다.

현재 가장 널리 쓰이는 *H. pylori* 제균 요법은 강력한 위산 분비 억제제인 proton pump inhibitor(PPI)에 2개의 항생제(amoxicillin, clarithromycin)를 추가하는 PPI 삼제 병합요법이다[40]. 이 요법의 제균율은 초창기에는 효과적으로 인정받았지만 항생제 내성률의 증가와 함께 그 제균율이 70-95%로 감소하여 상당수의 환자들에게 2차 치료가 필요한 경우가 빈번해졌다[41-43]. 1차 제균 치료에 실패하는 경우 2차 치료가 중요하며 이 때

원칙 중의 하나는 1차에서 사용한 항생제를 사용하지 않는 것이다. 그 이유는 선행 치료 실패가 항생제 내성 획득의 가장 큰 원인의 하나이기 때문이다[44-45]. 이러한 제균 치료 후 내성 획득에는 내성 유전자의 획득과 함께 선택 현상이라는 개념이 있다[46]. 선택 현상이란 항생제에 내성 유전자의 변이를 지닌 *H. pylori*가 삼제 병합요법에 들어있는 항생제에 의해 제균되지 않고 오히려 증식하기 좋은 조건이 되면서 더욱 증식하는 현상이다. 이러한 이유로 하여 1차 치료에 clarithromycin과 metronidazole을 같이 넣는 조합을 쓰지 않는 것이 바람직한데[47-48] 이는 두 항생제 조합에 의해 제균되지 않는 경우 대개 1개 내지 이들 두 개 항생제 모두에 내성을 지니게 되어[44, 49] 2차 치료로 선택할 수 있는 항생제 선택이 쉽지 않기 때문이다.

1차 치료 실패 시 선택할 수 있는 항생제 조합으로 PPI와 bismuth가 포함된 사제요법[50]이 있는데 이들 방법에 의한 제균 성적은 57-95%까지 다양하나 평균값이 77.2%로[51-60] 제균 실패율이 20%를 상회하고 있다. 이처럼 사제요법의 실패율이 높은 것은 복용 방법이 복잡하며 36.4%의 높은 부작용[61]으로 인한 환자 순응도 저하가 원인으로 나타났다.

2차 요법이 실패했을 때 3차 요법으로 rifabutin[43, 62]이 사용되고 있으나 Perri 등[57]은 제균율이 기존의 사제요법과 유사하다고 보고하였고, 가격이 비싸며 Canducci 등[63]이 백혈구와 혈소판 감소증과 골수 부작용에 대해 보고한 바 있으며, Wong 등[64]의 결핵균에 대한 내성 출현 가능성의 보고가 있어 결핵 발생률이 높은 우리나라에서는 rifabutin 사용에 주의할 필요가 있다. 따라서, 부작용이 없고 복용하기 간편한 새로운 구제요법 개발이 절실하다.

4. 천연 추출물의 *H. pylori* 항균활성에 대한 국·내외 연구동향

1) 국내 연구동향

국내의 선행연구들을 살펴보면, 1,990년대 후반부터 천연 생약 소재 추출물로부터 *H. pylori* 제균을 위한 소재 탐색에 대한 연구가 시작되어 지금에 이르렀다.

Bae 등[65]은 황련, 정향, 대황, 후박, 오배자 추출물들이 *H. pylori* 생육 억제 효과를 보였고 이 중 silica gel column chromatography로 분리된 decursin과 decursinol angelate의 MIC가 6-20ug/mL로 가장 우수하였으며, 반면 urease에 대해서는 오배자만이 활성 효과가 있다고 보고하였다. 또한 인삼[66]으로부터 분리한 polyacetylene과 protopanaxatriol이 *H. pylori* 생육을 억제하며 in vivo에서 proton pump를 약하게 저해하였다고 발표하였다. 칩[67]에서 분리한 isoflavones 중 aglycone, irisolidone, tectorigenin, genistein등이 *H. pylori* 생육을 억제하였고 이 때 효과가 가장 좋았던 irisolidone의 MIC는 12.5-25ug/mL 이었으며 genistein만이 약하게 urease와 proton pump 저해 활성이 확인되었다고 보고하였다. 한편, ponciretin, hesperetin, naringenin, diosmetin 등의 flavonoid에 대해서도 연구[68]하였는데 ponciretin이 MIC 10-20ug/mL로 *H. pylori* 항균활성이 높았지만 이러한 flavonoid는 *H. pylori* urease 활성을 저해하지 못하였다.

41종의 약용식물을 열수추출하여 위궤양 원인균으로 보고된 *H. pylori*에 대한 항균활성을 검색한 Lee[69]등의 보고에 의하면 백련초, 어성초, 방기, 황련, 백두옹, 연교, 중대황, 소엽, 사간, 우방자, 결명자, 굴피, 회침, 소목이 2-fold dilution법에 의해 항균활성이 나타났고 이 중 소목, 황련 소엽 3가지 추출물이 disc법을 통해 항균활성이 재확인되었다. *H. pylori*의 urease 활성은 소목, 소엽, 황련에 의해 80% 이상 억제되었으며 특히 소목이 urease 활성을 95%이상 억제시켰다는 것을 알 수 있다.

Lee 등[70]과 Ha[71]는 우리나라 자생 버섯류를 대상으로 *H. pylori* 항균 활성을 조사하였다. 소나무잣나무버섯, 아카시아목재버섯, 동충하초, 상황버섯, 운지버섯, 꽃송이버섯, 영지버섯, 말굽버섯, 흰들버섯의 열수추출물과 methanol 추출물을 얻어 *H. pylori* 항균효과를 검토한 Lee 등의 결과 소나무버섯 열수 및 methanol 추출물이 우수한 효과를 보였고 pH에 따른 영향은 없는 것으로 확인되었다. Ha의 연구에서는 저령 water fraction 에서 항균효과가 우수하였으며 저령 methanol 추출물이 50%의 urease 저해 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

Yoon 등[72]은 14종의 한약재 추출물의 urease 활성 억제를 측정하였는데 이 중 연교, 소목, 형개, 황련 4종의 한약재 추출물에서 강한 urease 활성을 확인하였고 또한 애엽[73]도 90%이상 강한 urease 활성이 있음을 보고하였다.

Cho 등[74-75]은 40종의 herb를 추출하여 phenol 화합물을 정량하였으며 phenol 화합물 농도별로 *H. pylori*에 대한 항균활성을 조사한 결과 예루살렘세이지, 크리핑로즈마리, 레몬그라스, 로즈마리, 체리세이지, 세인트존스워트, 루, 타임, 오레가노 및 세이지 등 10종의 herb가 억제효과가 높은 것을 확인하였다.

2) 국외 연구동향

천연 생약추출물로부터 *H. pylori*에 대한 항균활성 효과를 검색하여 기능성 소재를 탐색하려는 국외의 연구들은 2,000년대에 들어서면서 활발히 시작되었다. 우리 나라의 연구들이 국내 자생 천연 추출물을 주요 대상으로 연구한 바와 같이 국외 연구들도 각 지역 특산 천연 추출물을 실험 소재로 이용한 것이 특징적이라 할 수 있다.

먼저 지중해 연안의 허브 추출물의 *H. pylori* 항균활성에 대해 보고한 연구를 살펴보면, Stamatis 등[76]은 그리스 지역 13종의 허브 추출물의 *H.*

pylori 항균활성을 MIC로 측정하였는데 그 중 *Anthemis melanolepsis*, *Chamomiilla recurita*, *Corzya albida*, *Origenum vulgare*, *Stachys alopecuros* 등 5종의 허브 추출물의 MIC가 0.625mg/mL로 우수한 활성을 나타낸다고 보고하였다. Nostro 등[77]은 이탈리아 지역 17종의 허브 추출물의 *H. pylori* 활성을 MIC로 측정한 결과 페퍼민트는 항균활성이 없었고 펜넬이 10mg/mL, 진저와 고수가 5mg/mL, 치커리, 카리다몸, 주니퍼베리, 프로폴리스, 오래가노, 양버찌, 로즈마리, 세이지, 백리향, 계피, 툴리아프라 티필로스 11개 추출물이 1.25mg/mL이었으며 쿠민, 아티초크는 0.3mg/mL로 확인되었다고 보고하였다.

Li 등[78]은 중국 지역 30종의 생약 추출물의 *H. pylori* 항균활성을 검토하여 계골초, 목향, 정향의 MIC가 40ug/mL로 매우 우수하였으며 비타민나무, 배모, 후박, 오미자, 방하꽃, 만다린, 시호, 천궁 등이 MIC 60ug/mL로 *H. pylori*에 우수한 소재임을 보고하였다.

Ibrahim 등[79]은 파키스탄 지역에 서식하는 *Sapindus mukorossi*와 *Rheum emodi* 추출물의 *H. pylori* 항균활성을 조사하였는데 두 추출물은 10ug/mL의 농도에서 각각 20.0mm, 19.0mm의 생육저해환을 나타내었으며 각각 2.5mg/mL, 3.0mg/mL의 농도로 *H. pylori* 감염을 사전에 예방할 수 있을 것이라고 기대하였다.

소재별로 보았을 때, *H. pylori*에 대한 마늘의 항균 활성에 대해 Jonkers 등[80]과 O' Gara 등[81]의 보고가 있다. Jonkers 등은 allicin 함량이 12.3mg/g인 생마늘의 *H. pylori*에 대한 MIC가 10.0mg/mL이었으며 네덜란드에서 다져진 채로 유통되고 있는 3 회사의 다진마늘은 allicin 함량을 기준으로 하였을때 MIC가 40.0mg/mL로 결정되었다고 보고하였다. O' Gara 등은 마늘 파우더(GP)의 MIC인 0.5mg/mL에 allicin이 4ug/mL 함유되어 있으며 GP 1.0g, 약 마늘 2.5g이 위장내에서 *H. pylori* 제균에 적절한 분량이라고 보고하였고 마늘 정유성분(GO)에 함유되어있는 DATS(diallyl

trisulfide), DATTS(diallyl tetrasulfide)가 *H. pylori*에 대한 강한 항균활성을 가진다고 설명하였다.

또한, Berry류에 대한 연구보고들도 있다. Chatterjee 등[82]은 raspberry, strawberry, cranberry, elderberry, blueberry, bilberry, Optiberry[®] 를 *H. pylori* 생육에 0.25%, 0.5%, 1.0%의 농도로 각각 첨가하여 저해활성을 조사하였는데 1% 농도로 첨가하였을 때 모든 berry류가 *H. pylori* 생육을 80% 이상 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다. 특히 Optiberry[®], blueberry, bilberry, elderberry가 세 농도에서 모두 우수하였다. Shetty 등[83]은 cranberry를 base로 하여 wild blueberry, grape seed extract를 적절히 혼합하여 phenol 농도에 따라 synergy효과를 확인하였다. 페놀 함량 200ug/disc에서 생육저해 환이 가장 크게 조사되었으며 cranberry juice extract(75%) + wild blueberry extract(10%) + grape seed extract(15%) 혼합한 샘플이 가장 우수한 효과를 보여주었다.

Gadhi 등[84]은 모로코의 전통적인 생약 식물인 *Aristolochia paucinervis* Pomel 뿌리와 잎 MeOH 추출물의 *H. pylori*에 대한 MIC가 각각 0.128mg/mL, 0.032mg/mL라고 보고하였고 Stege 등[85]은 미국 남서부 사막지대에서 서식하는 관목인 *Larrea divaricata* Cav.의 물 추출물이 항생제 내성 *H. pylori*에 대해서도 0.04-0.1ug/mL의 높은 항균활성을 보인다고 발표하였다. 이 외에 계피[86], 겨자[87], sulforaphane[88], myrobalan[89], Taheebo[90], olive oil[91]등에서도 우수한 *H. pylori* 항균활성이 보고되었다.

국외에서 *H. pylori* 항균 활성에 대한 많은 소재 개발 연구가 이루어지고 있으나 앞서 언급하였듯이 브라질 아마존 일부 지역, 서남아시아 지역 등 지역 특산 천연 소재를 중심으로 행해지고 있어 채취 지역별 차이를 고려해야 할 뿐만 아니라 한국인을 위한 건강기능식품 개발의 소재로 사용하기에는 경제적, 관능적 측면에서 다소 어려울 것으로 예상되며 특히, 지중해 연안의

향신료 중 몇 가지는 자체의 특이적인 향기 성분을 가지고 있으므로 섭취 않을 것으로 사료된다. 또한 *H. pylori*에 대하여 우수한 항균활성을 보이는 *Larrea divaricata* Cav.를 조사한 Stege 등[85]은 *L. divaricata* Cav. 잎 표면에 존재하는 NDGA(nordihydro guaiar etic acid)를 주요한 항균 물질로 소개하였으나 phenol계 화합물인 NDGA는 독성 때문에 사용이 전면금지된 물질[92]이므로 식품으로서의 소재 탐색에 있어 더욱 신중해야 할 것이다.

5. 오미자의 생리 활성 기능

오미자(*Schizandra chinensis* Baillon)는 목련과에 속하는 낙엽성, 목본식물로서 시계방향으로 감고 올라가는 덩굴성이며 주로 중국과 우리나라 태백산, 지리산 등 산속에 많이 자생하고 있다. 줄기는 자갈색을 띠고 잎은 어긋나고 난형이며 표면은 짙은 녹색, 뒷면은 담록색을 띤다. 잎맥은 깃털모양의 그물맥이고 잎질은 두꺼운 막질로 윤기가 있으며 잎자루는 자색을 띠고 길이는 2.5cm 정도이다. 꽃은 단성화(單性花)인 자웅동주의 이가화(二家花)로 5월경에 새가지 밑부분에 가늘고 긴 꽃자루에 홍백색의 꽃이 피는데 암꽃 꽃자루의 길이는 수꽃보다 2배정도 길다. 과실은 8-9월경에 붉은 장과(漿果)가 이삭모양(種狀)으로 여러개 달린다. 1과립의 크기는 지름이 1cm 정도의 붉은 색을 띤 공모양이고 그 속에는 홍적색의 장즙(漿汁)과 2개의 홍갈색 종자를 갖고 있다. 오미자에는 오미자 (북오미자), 남오미자(*Kadsura japonica*), 흑오미자(*S. nigra*) 등의 종으로 분류되고 있다(Fig. 1). 오미자는 주로 태백산 지역에 많이 자생하고 남오미자는 상록성 덩굴로 남부 도서지방에 자라며 약용으로 이용하지 않는 것으로 알려져 있고 흑오미자는 제주도에서 자라고있는 낙엽성 덩굴식물이다[93-94].



Fig. 1. The fruits of *Schizandra* sp.

A: *Kadsura japonica* (남오미자)

B: *Schizandra chinensis* (오미자)

C: *Schizandra nigra* (흑오미자)

오미자의 생산은 과거에 강원도가 전국 생산량을 좌우할 정도로 편중되어 있었으나 그 재배 면적 약 3,000ha 정도 산지가 개발되면서 거의 없어지고 경북 및 전북에 생산량이 증가되고 있다. 장수군농업기술센터, 온양농업기술센터, 호남작물시험장 등의 현지 사례 고찰을 보면, 경북 지역에는 문경시 동로면 지역에서 새로운 오미자의 조성지가 새로 형성되고 있으며 재배면적은 약 1,000ha에 100가구 정도가 참여하고 있다. 또한 전북지역은 무주군 안성면 지역과 장수군 지역에서 생산단지가 조성되었고 장수지역은 조성면적이 점점 확대되고 있는 실정이다.

생산된 오미자가 한약 재료로서만 국한된다면 과잉 생산으로서 부작용이 발생되지만 차와 음료수로서 품질개발과 보급이 확대되면서 재료활용의 범위가 넓어짐으로 인하여 오미자의 생산이 본격화 되고 있다. 이렇게 오미자의 소비량은 계속 증가되고 있는 추세로 생산되는 오미자 물량은 앞으로도 지속적으로 부족할 것으로 판단된다고 관련업계측에서는 추정하고 있다 [95].

현재까지 알려진 오미자 성분에 관한 연구를 살펴보면 다음과 같다.

Ikeya 등[96-100]은 오미자의 약리기능을 나타내는 주요 성분으로 알려진 lignan 화합물로 gomisin A, B, C, F, G와 deoxyschizandrin, schizandrin, Wuweizisu A, B, C, angeloylgomisin H, Q, tigloylgomisin H, benzoylgomisin H 등을 분리 확인하였다. Shon 등[101]은 유기산 citric acid, malic acid, succinic acid를 보고하였고 1973년 Kim 등[102]이 47종류의 휘발성 정유 성분을 확인한 이래 Kim 등[103]이 47종류의 휘발성 성분을 분리하여 관능적 특성을 특징적으로 발현하는 4개의 분획에 대해 관능검사를 실시하여 오미자 국산차로의 개발 가능성을 보고한 바 있고 Li 등[104]은 여섯 종류의 각기 다른 추출법을 통해 오미자 추출물을 얻어 88종의 휘발성 성분을 보고하였다.

오미자 추출물의 항균활성에 관한 연구들도 발표되어 있다. Chung 등

[105], Lee 등[106] 및 Lee 등[107]이 각기 오미자 ethanol 추출물, methanol 추출물을 얻어 항균활성을 보고하였는데, 그 대상 균주는 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 *bacteria*, *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* 등의 yeast 그리고 *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. 등의 mold 등 대표적인 병원성 미생물들을 대상으로 하였고 Jung 등[108]은 병원성 미생물에 대한 오미자 종자 추출물의 항균활성을 보고하였다. Baek 등[109]은 오미자 methanol 추출물로부터 항경련 활성 물질을 분리하였다. 이들의 연구에서 분리 동정된 활성 물질은 gomisin A, C, H, N, schizandrin[107, 109] 등의 lignan계 화합물과 trimethylcitrate[107]의 정유 성분 이었다. 이 밖의 생리활성 연구로 Rho 등[110]이 간암세포 증식 억제 효과를 보고하였으며 Min 등[111]이 13종의 구강내 세균의 성장 억제에 미치는 효과에 대해 발표하였다.

오미자는 한방과 민간에서는 과실을 음경, 단독, 자양 등의 약재로 사용하며[93] 식품으로서는 오미자를 물에 담가 우려 나온 색소를 이용하여 녹말 다식과 녹말편으로 만들기도 하고[112] 기호식품인 오미자차, 오미자술, 오미자화채 등의 제조에도 이용하고 있는[113] 우리나라 전통적인 식품 소재이다. 오미자의 생리 활성 및 식품위해 미생물에 대한 항균 활성에 효과적인 여러 선행연구들이 있으나 *H. pylori* 항균 활성에 대한 연구는 Li 등[78]이 중국의 30종류 천연 생약 추출물에 대하여 screening한 보고 외에는 알려진 바가 없다. 뿐만 아니라, 2,000년대에 들어와 시작된 천연 추출물에서 *H. pylori* 조절 물질을 찾으려는 연구의 움직임은 현재 생육 억제 측면(paper disc method, MIC 측정)에서 많이 시도 되고 있을 뿐, *H. pylori*의 미생물적 특징인 urease 활성이나 특징적인 adhesion 특성을 억제하는 측면에서 *H. pylori*를 종합적으로 제어할 수 있는 천연 추출물 소재 탐색에

대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 오미자의 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 조사하고 활성 물질을 분리 동정 하고자 하였으며 생육 억제 활성 뿐만 아니라 urease 저해 활성과 적혈구 응집 반응을 통한 부착억제 실험도 병행하여 기능성 식품 또는 의약품 중간원료의 용도로 오미자의 우수성을 확인하고자 하였다. 또한, 오미자를 위시로 하여 188종의 천연 생약 소재 추출물로부터 생체 내 제균에 도움을 줄 수 있는 urease 억제 활성 및 위 점막 부착 억제 활성을 조사 연구하고자 하였다. 본 연구 결과는 *H. pylori*의 제어를 위한 in vitro 실험의 database가 되며 우수한 활성이 밝혀진 추출물들을 혼합하여 *H. pylori* 억제 활성에 시너지 효과를 기대해 볼 수 있는 훌륭한 자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 천연 생약추출물

본 실험에 사용한 188종의 천연생약소재 추출물은 한림대학교 RIC 천연물연구소에서 분양받아 실험에 사용하였다(Table 2-4).

오미자는 춘천 소재 한약상에서 건조된 상태의 것을 구입하여 50℃ 온도에서 건조시킨 후 분쇄기(HMF-340, Hanil, Korea)로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2) 시약

추출에 사용한 발효주정(EtOH)은 대한주정판매(주)(Korea)에서, dichloro-methane(MC), ethyl acetate(EA), hexane(Hex)은 SK chemical(Korea)에서 구입하였다. Paper disc는 Whatman(England)사의 6.0mm용 AA discs를, filter paper는 Advantec(USA)의 제품을, MPLC 및 HPLC 용매는 J.T. Baker(USA)사 HPLC용 특급품을 사용하였다. 기타 분석에 사용된 시약은 Sigma(USA)사의 제품을 사용하였다.

3) 사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 위, 십이지장 궤양 원인균인 *H. pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 사용하였다. 배지는 Trypticase Soy Agar(TSA)와

Trypticase Soy Broth(TSB) (BBL, Becton Dickinson, MD, USA)를 사용하였으며 agar에는 5% sheep blood를 첨가하여 제조하였고 혐기적 조건을 유지시켜주기 위하여 10% CO₂ incubator에서 37℃로 48시간 배양하였다. Incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였다.

Table 2. Lists of 95% ethanol extracts of 55 medicinal plants used for antimicrobial experiment.

Korean name	Botanical name
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>
건강	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe
계피	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume
고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>
구기자	<i>Lycium chinense</i> Miller
금불초	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i>
노린재나무	<i>Symplocos chinensis</i> for. <i>pilosa</i>
눈꽃동충	<i>Isaria japonica</i>
단삼	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai
대복피	<i>Areca catechu</i> L.
댕댕이덩굴	<i>Coculus trilobus</i>
도인	<i>Prunus persica</i> Batsch
돌배	<i>Pyrus pyrifolia</i>
동충하초	<i>Cordyceps sinensis</i>
돌배나무	<i>Pyrus uyematsuana</i>
마가목	<i>Sorbus commixta</i> Koehne
목과	<i>Chaenomeles sinensis</i> (Thouin)
백복령	<i>Poria cocos</i> Wolf.
복령	<i>Poria cocos</i>
복분자	<i>Rubus coreanus</i> Miquel
비자	<i>Torreya nucifera</i>
빙하	Glacial Clay
뽕나무	<i>Morus</i>
사철쭉	<i>Artemisia capillaris</i>
산감	<i>Japanese persimmon</i>
산수국	<i>Hydrangea serrata</i> for. <i>acuminata</i>
생지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libo
석창포	<i>Acorus gramineus</i>
선인장	<i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i>

Table 2. - contineud

Korean name	Botanical name
소나무(줄기)	<i>Pinus densiflora</i> (stem)
소나무(잎)	<i>Pinus densiflora</i> (leaf)
속단	<i>Phlomis umbrosa</i>
속지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i> L.
쓴박하	<i>Marrubium vulgare</i>
어성초	<i>Houttuynia cordata</i> Thunberg
오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman
오리나무	<i>Alnus japonica</i>
오미자	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon
운지버섯	<i>Coriolus versicolor</i>
원지	<i>Polygala tenuifolia</i>
쥐오줌풀	<i>Valeriana fauriei</i>
천년초	<i>Opuntia humifusa</i>
치커리	<i>Cichorium intybus</i>
쑥	<i>Pueraria thunbergiana</i>
토시호	<i>Bupleurum falcatum</i>
팔손이	<i>Fatsia japonica</i>
하수오	<i>Pleuropterus multflorus</i>
호마인	<i>Sesamum indicum</i>
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>
황백	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht
현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>
홍경천	<i>Rhodiola rosea</i>

Table 3. Lists of 70% ethanol extracts of 73 medicinal plants used for antimicrobial experiment.

Korean name	Botanical name
감자	<i>Solanum tuberosum</i>
강송향	<i>Pinus densiflora</i> (pine resin)
고삼	<i>Sophora flavescens</i>
괘향	<i>Teucrium veronicoides</i>
계피	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume
귀판	<i>Testudinis Plastrum</i>
금앵자	<i>Rosa laevigata</i>
나복자	<i>Raphanus sativus</i> L.
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i>
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>
등나무	<i>Japanese wistaria</i>
땅두릅	<i>Aralia contientalis</i>
마가목	<i>Sorbus commixta</i>
마황	<i>Ephedra sinica</i>
만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i>
만삼	<i>Codonopsis pilosula</i>
목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews
민가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i> for. <i>inermis</i>
방풍	<i>Ledebouriella seseloides</i>
백작약	<i>Paeonia japonica</i>
백편두	<i>Dolichos lablab</i> L.
사상자	<i>Torilis japonica</i>
사인	<i>Amomum xanthioides</i> Wallich
산딸기나무	<i>Rubus crataegifolius</i>
산사나무	<i>Crataegus pinnatifida</i>
산수유	<i>Cornus officinalis</i>
산조인	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller
산청목	<i>Acer tegmentosum</i> Maxim.
삼주뿌리	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi
상기생	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>

Table 3. - continued

Korean name	Botanical name
소나무(잎)	<i>Pinus densiflora</i> (leaf)
소백피	<i>Ailanthus altissima</i> (bark)
속새	<i>Equisetum hyemale</i>
송화분	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.
쇠뜨기	<i>Equisetum arvense</i>
시엽	<i>Diospyros kaki</i>
아까시나무	<i>Robinia pseudoacacia</i>
애엽	<i>Artemisia princeps</i> Pamp.
양강	<i>Alpinia officinarum</i> Hance
엄나무껍질	<i>Kalopanax pictus</i> (bark)
영경귀	<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>ussuriense</i>
연자육	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner (seed)
연잎	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner (leaf)
연화예	<i>Nelumbo nucifera</i> (stamens & pistils)
옥발	<i>Zea mays</i> (Corn silk)
우슬	<i>Acyranthes bidentata</i> Blume
유근피	<i>Ulmus macrocarpa</i> Hance
유피	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> (bark)
익지	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miquel
인동	<i>Lonicera japonica</i>
인삼화	<i>Panax ginseng</i> (flower)
인진쑥	<i>Artemisia capillaris</i> Thunberg
자초	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
잣나무잎	<i>Pinus koraiensis</i> (leaf)
잣나무줄기	<i>Pinus koraiensis</i> (stem)
저령	<i>Grifola umbellata</i>
적작약	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas
지각	<i>Citrus aurantium</i> Linne
지구자	<i>Hovenia dulcis</i> Thunb.
진피	<i>Citrus unshiu</i> Markovich

Table 3. - continued

Korean name	Botanical name
천마	<i>Gastrodia elata</i>
치자	<i>Gardenia jasminoides for. grandiflora</i>
토사자	<i>Cuscuta japonica</i> Chois.
토시호	<i>Bupleurum falcatum</i>
토현삼	<i>Scrophularia koraiensis</i>
포공령	<i>Taraxacum platycarpum</i>
해바라기씨	<i>Helianthus annuus</i> (seed)
향유	<i>Elsholtzia ciliata</i>
호로파	<i>Trigonella foenum-graecum</i>
황궁	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi
회양	<i>Foeniculum vulgare</i>
흑오미자	<i>Schizandra nigra</i>
희렴	<i>Siegesbeckia orientalis</i>

Table 4. Lists of water extracts of 60 medicinal plants used for antimicrobial experiment.

Korean name	Botanical name
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i>
계피	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume
구기자	<i>Lycium chinense</i> Miller
구상나무	<i>Abies koreana</i>
금불초	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i>
노루궁뎅이	<i>Hericium erinaceum</i>
노루귀	<i>Hepatica asiatica</i>
노린재나무	<i>Symplocos chinensis</i> for. <i>pilosa</i>
녹차	<i>Camelia sinesis</i>
눈꽃동충하초	<i>Isaria japonica</i>
다릅나무	<i>Maackia amurensis</i>
당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i>
동충하초	<i>Cordyceps sinensis</i>
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>
독활	<i>Aralia contientalis</i>
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>
들쭉	<i>Vaccinium uliginosum</i>
머루씨	<i>Vitis coignetiae</i> (seed)
메밀	<i>Fagopyrum esculentum</i>
목과	<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne
백굴채	<i>Chelidonium majus</i> Linné
백복령	<i>Poria cocos</i> Wolf.
복분자	<i>Rubus coreanus</i> Miquel
복수초	<i>Adonis amurensis</i>
사철쭉	<i>Artemisia capillaris</i>
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>
삼칠근	<i>Panax notoginsengs</i> (root)
삼주뿌리	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi

Table 4. continued

Korean name	Botanical name
생지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libo
석창포	<i>Acorus gramineus</i>
선인장	<i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i>
설녹차	<i>Camelia sinesis</i> (Jeju island)
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i>
수국	<i>Hydrangea macrophylla</i> for. <i>otaksa</i>
숙지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>
쓴박하	<i>Marrubium vulgare</i>
어성초	<i>Houttuynia cordata</i> Thunberg
오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman
오리나무	<i>Alnus japonica</i>
운지버섯	<i>Coriolus versicolor</i>
원지	<i>Polygala tenuifolia</i>
유근피	<i>Ulmus macrocarpa</i> Hance
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i>
자감초	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
쥐오줌풀	<i>Valeriana fauriei</i>
지구자	<i>Hovenia dulcis</i> Thunb.
질경이	<i>Plantago asiatica</i>
차가버섯	<i>Inonotus obliquus</i>
천궁	<i>Cnidium officinale</i>
측백엽	<i>Thuja orientalis</i> L. (leaf)
취	<i>Pueraria thunbergiana</i>
토사자	<i>Cuscuta japonica</i> Chois.
팔손이	<i>Fatsia japonica</i>
하수오	<i>Pleuropterus multflorus</i>
홍경천	<i>Rhodiola rosea</i>
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>

2. 추출물 및 분획물 조제

1) 오미자 추출물 및 분획물의 조제

오미자 추출물은 시료와 95% ethanol을 1:3(w/v)의 비율로 혼합하여 70°C에서 4시간동안 3회 반복하여 reflux 하였다. 이 추출액을 filter paper (Advantec No.1)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)로 감압 농축하였다.

Ethanol 추출물은 극성에 따라 dichloromethane(MC), ethly acetate(EeOAc)로 Fig. 2에 나타난 바와 같이 순차적으로 용매 분획하였다. 즉, 농축된 ethanol 추출물을 10배의 증류수로 치환한 후 동일한 양의 MC를 첨가하여 분획하였고, 같은 방법으로 EtOAc 분획물과 water층을 얻었다. 추출물과 분획물은 4°C 냉장고에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 흑오미자 추출물 및 분획물의 조제

흑오미자의 추출물과 분획물은 2-1)과 동일한 방법으로 실시하였다.

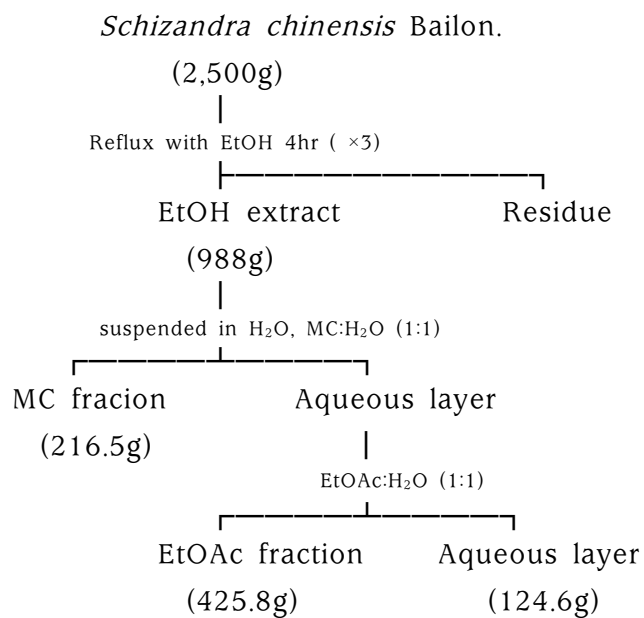


Fig. 2. Scheme of extraction and solvent fractionation of ethanol extract from *Schizandra chinensis* Baillon.

3. Microbiological assay

1) Paper disc method

*H. pylori*의 항균 활성을 실험하기 위하여 paper disc method[114]를 이용하였다. 즉, *H. pylori*를 5% sheep blood를 첨가한 TSA에서 37°C, 48시간 배양시킨 후 colony 1백금이를 TSB에 현탁하여 1.0×10^6 cfu/mL의 농도로 희석하였다. 188종의 천연 생약 ethanol/water 추출물은 1mg/disc의 농도로 멸균된 paper disc (6.0mm diameter and 1.0mm thickness, Whatman AA disc, England)에 분주하고 30분 이상 방치하여 휘발시켰다. 이 disc들은 균주 현탁액 0.1mL을 주입한 후 spreader로 균일하게 펼친 5% sheep blood가 첨가된 TSA plate 표면 위에 놓아 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후 disc 주위의 inhibition zone의 직경(mm)을 측정하였다.

오미자, 흑오미자 추출물과 분획물은 1, 3, 5mg/disc의 농도로 위와 동일한 방법으로 측정하였다. 대조군으로 ethanol을 같은 부피로 흡수시켜 휘발시킨 disc와 *H. pylori* 항생제인 amoxicillin을 흡수시킨 disc를 사용하였다.

2) Minimum inhibitory concentration(MIC)

최소저해농도(MIC)는 broth dilution method[115]로 측정하였다. 멸균한 test tube에 TSB를 990uL씩 분주하고 시료를 다양한 농도 (2,000 - 3.90 ug/mL)가 되도록 two-fold dilution하였다. 미리 배양하여 1.0×10^6 의 농도로 희석한 *H. pylori* 10uL를 첨가하여 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양한 후 5% sheep blood가 첨가된 TSA에 100uL씩 분주, 도말 후 다시 37°C의 CO₂ incubation에서 48시간 동안 배양하였다. 육안으로

균의 생육이 관찰되지 않는 농도를 MIC로 하였다.

3) Thermal and pH stability

시료의 열 안정성을 측정하기 위해 100℃에서 30분, 1시간 동안 열처리 한 후 온도별로 1, 3, 5mg/disc로 농도를 맞추어 paper disc method로 항균 활성을 측정하였다. pH 안정성은 0.1N HCl과 0.1N NaOH로 ethanol을 2, 4, 6으로 조정 한 후 실온에서 30분간 방치한 다음 오미자 추출물 및 분획물의 pH인 4로 조절하여 paper disc method로 항균 활성을 측정하였다.

4. HPLC analysis

HPLC (High pressure liquid chromatography)는 Agilent 1100 series를 사용하였고 UV detector 측정 파장은 254nm, flow rate은 0.8mL/min, 컬럼은 Eclipse XDB C-18 (4.6 × 250mm, 5µm, Agilent, USA)을 사용하였다. 분석 용매는 0.05% TFA/1L DW와 acetonitrile로 60분 동안 100%로 gradient 하였다.

5. MPLC analysis

MPLC (Middle pressure liquid chromatography)는 Büchi system (Büchi pump manager C-615, Büchi pump module C-605, Büchi UV monitor C-630, Büchi fraction collector C-660, Switzerland)을 사용하였고 UV detector 측정 파장은 254nm, 감도는 0.2, flow rate은 10mL/min이었으며, 컬럼은 C18 coating-RP-18 open column (Büchi, Switzerland)을 사용하였

다. 분석용매는 methanol로 7시간 동안 5%에서 55%까지, 1시간동안 55%에서 100%까지 gradient 하였다.

6. 화학구조 해석

NMR은 400MHz FT-NMR spectrometer (Bruker DPX 400MHz, German)으로 측정하였고, MS는 Mass Spectrometer autospec M363 series (Micromass, Euroscience, Manchester, U.K.)로 측정하였다. 이때 N₂를 nebulizing gas로 사용하였고 source block과 desolvation temperature는 150 및 250℃를 각각 유지하였다. Mass의 조건은 electrospray ionization으로서 cone voltage ramp를 10-50V; acceleration lens potential 0.5kV; scan rate 0.4 scan s⁻¹, multiplier voltage 650V였다. 강원대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 결과를 분석하였다.

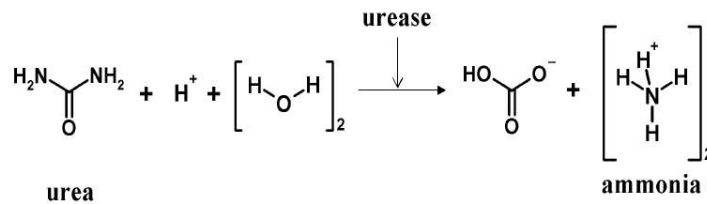
7. Urease 저해 활성 검색

1) 조-Urease 조제

TSB에 배양된 *H. pylori*를 110 ×g로 원심분리 (Union 55R, Hanil, Korea)하여 배지와 균체를 분리하였다. 분리된 균체를 phosphate-buffered saline (PBSE: 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, and 2mM EDTA, pH 7.4)에 현탁시키고 2회 세척한 다음 4℃에서 5분간 sonication 시킨 후, 300 ×g에서 10분간 원심분리하고 상등액만 분리하여 조-urease를 분리하였다.

2) Urease 저해 활성 성분 검색용 assay

Urease 저해활성은 urea로부터 방출된 암모니아가 phenol nitroprusside와 alkaline hypochlorite에 의해 indophenol로 전환되는 양을 정량하는 assay를 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, urea($\text{H}_2\text{NC}=\text{ONH}_2$) 1분자와 물(H_2O) 1분자가 urease에 의해 ammonia(NH_3) 2분자와 CO_2 1분자로 바뀐다.



여기서 발생한 ammonia(NH_3)는 sodium nitroprusside($\text{Na}_2\text{Fe}[\text{CN}]_5\text{NO}$) 측매에 의해 phenol 2분자와 alkaline hypochlorite와 반응해서 indophenol 1분자를 형성한다. 이와 같은 반응에 의해 생성된 indophenol은 ammonia의 양과 정비례하므로 파란색을 나타내는 indophenol을 590nm에서 흡광도를 재면 발생한 ammonia의 양을 환산할 수 있는 정량적인 방법이 된다.

0.5M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 10uL, 시료 추출물 (1mg/mL) 10uL와 조-urease solution 20uL를 37°C에서 5분간 preincubation 시킨 후 0.5mM urea solution 40uL를 가하여 37°C에서 20분간 incubation 한 다음 phenol nitroprusside reagent 1mL와 alkaline hypochlorite 1mL를 가하여 동일 온도에서 30분간 반응시켜 A_{590} 에서 흡광도를 측정하고 식에 따라 % 저해활성으로 환산하였다[116].

$$\text{Inhibition activity of } H. \text{ pylori urease (\%)} = \left[1 - \frac{As - As'}{Ac - Ac'} \right] \times 100$$

As: 시료 추출물을 첨가한 표준반응계의 흡광도

As': As의 효소액을 열변성 효소로 대체한 반응계의 흡광도

Ac: 시료 추출물을 첨가하지 않은 표준반응계의 흡광도

Ac': Ac의 효소액을 열변성 효소로 대체한 반응계의 흡광도

실험은 urease inhibitor로 통상적으로 사용되는 acetohydroxamic acid (AHA) (Sigma, MO, USA)를 양성 대조군으로 사용하여 그 결과를 비교하였다. 그리고, 통계적 유의성을 검증하기 위해 각 농도별로 n을 3회 이상 실험하여 얻는 결과로부터 평균과 표준오차를 계산하였다.

8. *H. pylori* 부착억제 활성 조사

1) 적혈구의 분리

실험 당일 보건소에서 채혈한 A형 혈액을 heparin 처리하였으며 Fairbank 등[117]이 기술한 방법으로 분리하였다. 즉, 4℃에서 300 ×g로 10분간 원심분리하여 혈장을 제거하였다. 침전된 적혈구를 4℃, pH 7.4의 PBSE와 현탁하여 가볍게 교반, 세척하고 위와 같이 원심분리 하여 상층액을 버렸다. 상층액이 맑아질 때까지 3회 이상 반복하고 매 원심분리 마다 상층액이 맑아질때까지 제거하여 백혈구의 혼입을 방지하였다.

2) 적혈구를 이용한 Hemagglutination assay

위와 같이 처리된 적혈구는 PBSE와 2%(w/v)가 되도록 현탁하여 실험하였다[118]. 적혈구와 *H. pylori* 현탁액을 항응집반응의 positive control로

사용하였고 균을 첨가하지 않은 적혈구 희석액을 negative control로 사용하였다.

실험에 사용한 천연 추출물의 최종농도는 0.5mg/mL이었으며 오미자, 흑오미자, 복분자 추출물은 0.1 - 3mg/mL의 농도로 응집저해반응을 확인하였다. U형 96 microwell plate에 *H. pylori* 현탁액과 각각의 추출물을 섞어 실온에서 30분간 방치시킨 후 A형 적혈구를 동량첨가하여 1시간 교반하며 반응시켰다. 적혈구 응집은 현미경으로 검경하여 그 결과를 비교, 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 188종의 천연 생약소재 추출물의 항균 활성 탐색

95% EtOH 추출물 55종, 70% EtOH 추출물 73종, 물 추출물 60종, 총 188종의 생약소재 추출물을 사용하여 *H. pylori*에 대한 항균활성을 조사하였으며 그 결과를 Table 5-7에 나타내었다. 쥐오줌풀(*V. fauriei*), 오미자(*S. chinensis* B.) 95% EtOH 추출물, 흑오미자(*S. nigra* M.) 70% EtOH 추출물, 삼칠근(*P. notoginsengs*) 물 추출물에서 각각 10.0mm, 8.0mm, 9.0mm, 9.0mm의 inhibition zone이 확인되었고 인진쑥(*A. capillaris* T.), 사상자(*T. japonica*), 목단피(*P. suffruticosa* A.) 70% EtOH 추출물에서 7.5mm의 약한 inhibition zone이 확인되었다.

Bae 등[67]은 칩의 isoflavones 중 aglycone, irisolidone, tectorigenin, genistein등이 *H. pylori*에 항균효과가 있다고 보고하였고 Park 등[73]은 애엽이 *H. pylori* 생육을 억제하였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 칩(*P. thunbergiana*) 95% EtOH 추출물, 물 추출물과 애엽 70%(*A. princeps* Pamp.) EtOH 추출물은 1mg/disc 농도에서 *H. pylori*에 대한 inhibition zone을 보이지 않았다. 이는 채취 시기, 추출 부위, 시험에 사용된 농도 등 여러 요인에 의한 차이 때문이라 생각된다.

한편, 생육 억제 활성을 보인 쥐오줌풀(*V. fauriei*)[119], 오미자(*S. chinensis* B.)[107], 인진쑥(*A. capillaris* T.)[120], 사상자(*T. japonica*)[121], 목단피(*P. suffruticosa* A.)[122] 등은 그 정유 성분들의 항균 및 항염 효과에 대한 연구들이 보고되어 있어 본 연구에서 나타난 *H. pylori* 생육 억제 활성이 이들의 정유 성분에 의한 것이라고 사료된다.

Table 5. Anti-*H. pylori* activities of 95% ethanol extracts of 55 medicinal plants.

Korean name	Botanical name	Inhibition zone diameter (mm)
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	- ¹⁾
건강	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	-
계피	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	-
고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	-
구기자	<i>Lycium chinense</i> Miller	-
금불초	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i>	-
노린재나무	<i>Symplocos chinensis</i> for. <i>pilosa</i>	-
눈꽃동충	<i>Isaria japonica</i>	-
단삼	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	-
당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai	-
대복피	<i>Areca catechu</i> L.	-
댕댕이덩굴	<i>Coculus trilobus</i>	-
도인	<i>Prunus persica</i> Batsch	-
돌배	<i>Pyrus pyrifolia</i>	-
동충하초	<i>Cordyceps sinensis</i>	-
들배나무	<i>Pyrus uyematsuana</i>	-
마가목	<i>Sorbus commixta</i> Koehne	-
목과	<i>Chaenomeles sinensis</i> (Thouin)	-
백복령	<i>Poria cocos</i> Wolf.	-
복령	<i>Poria cocos</i>	-
복분자	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	-
비자	<i>Torreya nucifera</i>	-
빙하	Glacial Clay	-
뽕나무	<i>Morus</i>	-
사철쭉	<i>Artemisia capillaris</i>	-
산감	<i>Japanese persimmon</i>	-
산수국	<i>Hydrangea serrata</i> for. <i>acuminata</i>	-
생지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libo	-
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	-
선인장	<i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i>	-

Table 5. - contineud

Korean name	Botanical name	Inhibition zone diameter (mm)
소나무(줄기)	<i>Pinus densiflora</i> (stem)	-
소나무(잎)	<i>Pinus densiflora</i> (leaf)	-
속단	<i>Phlomis umbrosa</i>	-
속지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	-
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i> L.	-
쓴박하	<i>Marrubium vulgare</i>	-
어성초	<i>Houttuynia cordata</i> Thunberg	-
오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman	-
오리나무	<i>Alnus japonica</i>	-
오미자	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon	8.0
운지버섯	<i>Coriolus versicolor</i>	-
원지	<i>Polygala tenuifolia</i>	-
쥐오줌풀	<i>Valeriana fauriei</i>	10.0
천년초	<i>Opuntia humifusa</i>	-
치커리	<i>Cichorium intybus</i>	-
칠향	<i>Pueraria thunbergiana</i>	-
토시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	-
팔손이	<i>Fatsia japonica</i>	-
하수오	<i>Pleuropterus multflorus</i>	-
호마인	<i>Sesamum indicum</i>	-
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	-
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	-
황백	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	-
현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	-
홍경천	<i>Rhodiola rosea</i>	-

¹⁾ -: not detected

Table 6. Anti-*H. pylori* activities of 70% ethanol extracts of 73 medicinal plants.

Korean name	Botanical name	Inhibition zone diameter (mm)
감자	<i>Solanum tuberosum</i>	- ¹⁾
강송향	<i>Pinus densiflora</i> (pine resin)	-
고삼	<i>Sophora flavescens</i>	-
괘향	<i>Teucrium veronicoides</i>	-
계피	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	-
귀판	<i>Testudinis Plastrum</i>	-
금앵자	<i>Rosa laevigata</i>	-
나복자	<i>Raphanus sativus</i> L.	-
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i>	-
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	-
등나무	<i>Japanese wistaria</i>	-
땅두릅	<i>Aralia contientalis</i>	-
마가목	<i>Sorbus commixta</i>	-
마황	<i>Ephedra sinica</i>	-
만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i>	-
만삼	<i>Codonopsis pilosula</i>	-
목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews	7.5
민가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i> for. <i>inermis</i>	-
방풍	<i>Ledebouriella seseloides</i>	-
백작약	<i>Paeonia japonica</i>	-
백편두	<i>Dolichos lablab</i> L.	-
사상자	<i>Torilis japonica</i>	7.5
사인	<i>Amomum xanthioides</i> Wallich	-
산딸기나무	<i>Rubus crataegifolius</i>	-
산사나무	<i>Crataegus pinnatifida</i>	-
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	-
산조인	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	-
산청목	<i>Acer tegmentosum</i> Maxim.	-
삼주뿌리	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	-
상기생	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>	-

Table 6. - continued

Korean name	Botanical name	Inhibition zone diameter (mm)
소나무(잎)	<i>Pinus densiflora</i> (leaf)	-
소백피	<i>Ailanthus altissima</i> (bark)	-
속새	<i>Equisetum hyemale</i>	-
송화분	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	-
쇠뜨기	<i>Equisetum arvense</i>	-
시엽	<i>Diospyros kaki</i>	-
아카시나무	<i>Robinia pseudoacacia</i>	-
애엽	<i>Artemisia princeps</i> Pamp.	-
양강	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	-
엄나무껍질	<i>Kalopanax pictus</i> (bark)	-
영경퀴	<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>ussuriense</i>	-
연자육	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner (seed)	-
연잎	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner (leaf)	-
연화예	<i>Nelumbo nucifera</i> (stamens & pistils)	-
옥발	<i>Zea mays</i> (Corn silk)	-
우슬	<i>Acyranthes bidentata</i> Blume	-
유근피	<i>Ulmus macrocarpa</i> Hance	-
유피	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> (bark)	-
익지	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miquel	-
인동	<i>Lonicera japonica</i>	-
인삼화	<i>Panax ginseng</i> (flower)	-
인진쑈	<i>Artemisia capillaris</i> Thunberg	7.5
자초	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	-
잣나무잎	<i>Pinus koraiensis</i> (leaf)	-
잣나무줄기	<i>Pinus koraiensis</i> (stem)	-
저령	<i>Grifola umbellata</i>	-
적작약	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	-
지각	<i>Citrus aurantium</i> Linne	-
지구자	<i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	-
진피	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	-

Table 6. - continued

Korean name	Botanical name	Inhibition zone diameter (mm)
천마	<i>Gastrodia elata</i>	-
치자	<i>Gardenia jasminoides for. grandiflora</i>	-
토사자	<i>Cuscuta japonica</i> Chois.	-
토시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	-
토현삼	<i>Scrophularia koraiensis</i>	-
포공령	<i>Taraxacum platycarpum</i>	-
해바라기씨	<i>Helianthus annuus</i> (seed)	-
향유	<i>Elsholtzia ciliata</i>	-
호로과	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	-
황궁	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	-
회양	<i>Foeniculum vulgare</i>	-
흑오미자	<i>Schizandra nigra</i> Max.	9.0
희렴	<i>Siegesbeckia orientalis</i>	-

¹⁾ -: not detected

Table 7. Anti-*H. pylori* activities of water extracts of 60 medicinal plants.

Korean name	Botanical name	Inhibition zone diameter (mm)
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	- ¹⁾
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i>	-
계피	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	-
구기자	<i>Lycium chinense</i> Miller	-
구상나무	<i>Abies koreana</i>	-
금불초	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i>	-
노루궁뎅이	<i>Hericium erinaceum</i>	-
노루귀	<i>Hepatica asiatica</i>	-
노린재나무	<i>Symplocos chinensis</i> for. <i>pilosa</i>	-
녹차	<i>Camelia sinesis</i>	-
눈꽃동충하초	<i>Isaria japonica</i>	-
다릅나무	<i>Maackia amurensis</i>	-
당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai	-
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i>	-
동충하초	<i>Cordyceps sinensis</i>	-
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	-
독활	<i>Aralia contientalis</i>	-
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	-
들쭉	<i>Vaccinium uliginosum</i>	-
머루씨	<i>Vitis coignetiae</i> (seed)	-
메밀	<i>Fagopyrum esculentum</i>	-
목과	<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	-
백굴채	<i>Chelidonium majus</i> Linné	-
백복령	<i>Poria cocos</i> Wolf.	-
복분자	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	-
복수초	<i>Adonis amurensis</i>	-
사철쭉	<i>Artemisia capillaris</i>	-
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	-
삼칠근	<i>Panax notoginsengs</i> (root)	9.0
삼주뿌리	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	-

Table 7. continued

Korean name	Botanical name	Inhibition zone diameter (mm)
생지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libo	-
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	-
선인장	<i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i>	-
설녹차	<i>Camelia sinesis</i> (Jeju island)	-
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i>	-
수국	<i>Hydrangea macrophylla</i> for. <i>otaksa</i>	-
숙지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	-
쓴박하	<i>Marrubium vulgare</i>	-
어성초	<i>Houttuynia cordata</i> Thunberg	-
오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman	-
오리나무	<i>Alnus japonica</i>	-
운지버섯	<i>Coriolus versicolor</i>	-
원지	<i>Polygala tenuifolia</i>	-
유근피	<i>Ulmus macrocarpa</i> Hance	-
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i>	-
자감초	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	-
쥐오줌풀	<i>Valeriana fauriei</i>	-
지구자	<i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	-
질경이	<i>Plantago asiatica</i>	-
차가버섯	<i>Inonotus obliquus</i>	-
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	-
측백엽	<i>Thuja orientalis</i> L. (leaf)	-
취	<i>Pueraria thunbergiana</i>	-
토사자	<i>Cuscuta japonica</i> Chois.	-
팔손이	<i>Fatsia japonica</i>	-
하수오	<i>Pleuropterus multflorus</i>	-
홍경천	<i>Rhodiola rosea</i>	-
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	-
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>	-
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	-

¹⁾ -: not detected

2. 오미자 추출물 및 분획물의 항균 활성

항균력이 있는 천연 생약소재 추출물 중 한국인에게 가장 친숙한 오미자의 한 종류인 흑오미자(*Schizandra nigra* Max.)를 시료로 선정하여 흑오미자 EtOH 추출물은 극성에 따라 dichloromethane(MC), ethyl acetate (EtOAc)로 순차적으로 용매 분획하였다. 즉, 농축된 EtOH 추출물을 10배의 증류수로 치환한 후 동일한 양의 MC를 첨가하여 분획하였고, 같은 방법으로 EtOAc 분획물과 water 분획물을 얻었다. 추출물과 분획물은 4℃ 냉장고에서 보관하면서 실험에 사용하였으며 paper disc method로 흑오미자 ethyl acetate 분획물에서 *H. pylori* 항균활성을 확인하였다.

흑오미자는 제주 한라산 해발 600m 이상의 고지대에서만 서식하는 희귀종으로 채취가 제한되어 있으며 제주도 난대 산림연구소에서 7년여간 연구하고 있으나 아직 실험재배 수준에 머물고 있다. Thin layer chromatography 분석 결과(생략) 흑오미자와 오미자의 TLC 패턴이 비슷하였으며 항균활성의 차이도 크게 나타나지 않음이 확인되었다(Fig. 3). 따라서 오미자(*Schizandra chinensis* Baillon)를 이용하여 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 조사하였으며 흑오미자와 같이 활성 물질을 분리 동정하여 비교 분석하였다.

H. pylori 최적배지 plate에서 disc 주위의 inhibition zone 크기를 측정하여 오미자 추출물과 분획물의 항균효과를 살펴본 결과는 Table 8과 같다. EtOH 추출물 1mg/disc, 3mg/disc, 5mg/disc 각각의 농도에서 8.0mm (paper disc ϕ 6.0mm), 15.0mm, 20.0mm의 inhibition zone이 확인되었고 EtOAc 분획물에서는 각각의 농도에 대해 각각 9.0mm, 19.0mm, 25.0mm의 inhibition zone을 나타내었다. 대조군으로 실험한 ethanol은 생육 저해에 영향을 미치지 않았으며, *H. pylori* 항생제인 amoxicillin을 positive control로 하였다. Fig. 4에는 inhibition zone이 보이는 plate만 나

타내었다.

이탈리아 지역의 17종 herb 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균활성을 보고한 Nostro 등[77]은 아티초크 물 추출물이 18.0mm, 오레가노 물 추출물이 25.0mm의 inhibition zone을 보였으며 계피, 아티초크, 프로폴리스, 로즈마리, 백리향, 진저 EtOH 추출물이 20.0mm 이상의 inhibition zone을 보였다고 보고하였다. 이 때 disc에 분주된 추출물의 농도는 8mg/disc 였으며 9.0mm 직경의 paper disc를 사용하였으므로 본 연구 결과와 절대적으로 비교하기에는 무리가 있다.

Herb 식물로부터 *H. pylori*에 대한 항균효과를 탐색한 Cho[74]등은 각 허브추출물의 phenol 화합물을 정량하여 그 phenol 화합물의 농도 200ug/disc에서 가든세이지를 포함한 10종의 허브 추출물이 평균 14.0mm의 inhibition zone이 나타나 *H. pylori*에 대한 억제 효과가 높다고 보고하였다. 허브 추출물에 따라 phenol 화합물의 농도는 134.13-533.33ug/mL로 다양하였으나 *H. pylori* 항균활성이 높게 나타난 10종의 허브 추출물의 phenol 화합물의 농도는 평균 약 400ug/mL였으며 paper disc에 분주한 phenol 화합물 200ug/disc를 추출물의 농도로 환산하면 약 500mg/disc이 된다. 이 값은 본 연구에서 사용한 추출물의 농도 1, 3, 5mg/disc와는 상당한 차이가 있다. Cranberry와 wild bluberry, grape seed 추출물의 시너지 효과를 검색한 Shetty 등[83] 역시 추출물을 각각 혼합하여 그 혼합물의 phenol 함량을 정량하였으며 200ug/disc의 농도에서 혼합물들이 약 20.0mm 내외의 inhibition zone을 나타내었고 이 값은 추출물 약 2.5mg/disc의 농도로 환산된다. 이들의 연구에서 사용한 추출물 농도는 본 연구에서 사용한 농도와 상당한 차이를 보여주고 있으며 역시 사용한 paper disc의 직경이 다르거나 기재되어 있지 않아 절대값을 비교하여 우수성을 논하기에는 무리가 있었다.

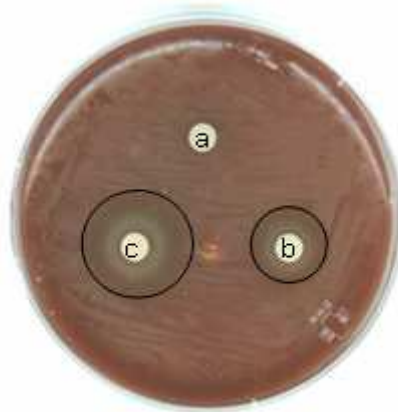
한편, 병원성 미생물에 대한 오미자의 항균활성을 보고한 Chung 등[105]

의 연구를 살펴보면 오미자 EtOH 추출물은 yeast, mold에 대해서는 항균 활성을 나타내지 않았고 *B. subtilis*를 포함한 6종의 bacteria에 대해 평균 23.0mm의 inhibition zone을 나타낸다고 보고하였는데 이 때 항균활성을 검색한 추출물의 농도는 12.5mg/disc 였으며 사용한 paper disc의 직경은 8.0mm였다. Lee 등[107] 오미자를 MeOH로 추출하여 순차적으로 용매분획한 것을 항균활성 시료로 사용하였다. *B. subtilis*를 포함한 7종의 병원성 미생물에 대하여 오미자 EtOAc 분획물에서 큰 inhibition zone을 나타내었고 실험에 사용한 대상 균주는 다르지만 활성을 나타낸 분획물은 본 연구 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었으나 8.0mm paper disc에 확인하고자 하는 시험용액을 30uL 분주하였다고만 설명되어 있어 항균 활성을 나타낸 시료의 농도를 알수 없었다.

이상의 연구 결과들과 비교해 볼 때 오미자 EtOAc 분획물이 *H. pylori*에 대하여 강한 항균활성을 가지고 있는 것으로 사료된다.



[A] *Schizandra nigra* Max.



[B] *Schizandra chinensis* Baillon.

Fig. 3. Anti-*H. pylori* activities of the EtOAc fractions from *Schizandra nigra* Max. [A] and *Schizandra chinensis* Baillon. [B]

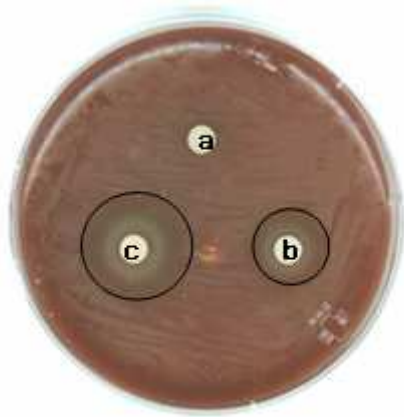
a: 1mg/disc, b: 3mg/disc, c: 5mg/disc

Table 8. Anti-*H. pylori* activities of the fractions obtained from ethanol extracts of *Schizandra chinensis* Baillon.

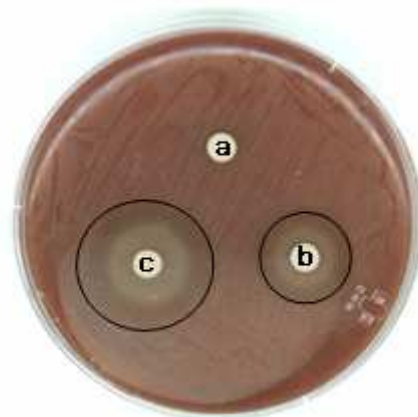
samples	Inhibition zone diameter (mm)			
	sample contents (mg/disc)			
	1	3	5	
EtOH extract	8	15	20	
MC fraction	- ¹⁾	-	-	
EtOAc fraction	9	19	25	
water fraction	-	-	-	
Control ²⁾	sample contents (mg/disc)			
	0.1	0.25	0.5	1.0
	25	40	45	45

¹⁾ -: not detected

²⁾ amoxicillin



[A] EtOH extract



[B] EtOAc fraction

Fig. 4. Anti-*H. pylori* activities of the EtOH extract[A] and EtOAc fractions[B] from *Schizandra chinensis* Baillon.

a: 1mg/disc, b: 3mg/disc, c: 5mg/disc

3. 오미자 추출물 및 분획물의 수율

오미자를 풍건한 후 분쇄하여 ethanol로 70℃에서 3회 반복 reflux하여 얻은 EtOH 추출물과 순차적으로 용매 분획하여 얻은 분획물의 수율은 Table 9와 같다. EtOH 추출물이 39.5%, MC 분획물이 8.66%, EtOAc 분획물이 17.03%, water 분획물이 4.98%로 나타났다.

Table 9. Yield of the fractions obtained from ethanol extracts of *Schizandra chinensis* Baillon.

Fractions	Yield (% w/w) ¹⁾
Ethanol extract	39.50
Dichloromethane fraction	8.66
Ethyl acetate fraction	17.03
Water fraction	4.98

¹⁾ Extraction yield (%) = $\frac{\text{solid in extract (g)}}{\text{raw material (g)}} \times 100$

4. 최소저해농도 (Minimum inhibitory concentration) 측정

최소저해농도(MIC)는 broth dilution method[115]로 측정하였으며 2mg/mL부터 two-fold dilution 하여 육안으로 균의 생육이 관찰되지 않는 농도를 MIC로 하였다.

항균활성을 나타낸 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물의 최소저해농도를 측정한 결과는 Table 10과 같이 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물 모두 1.0mg/mL의 농도로 결정되었다. Paper disc method로 항균활성을 조사한 Table 8의 결과를 보면 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물은 1mg/disc의 농도에서 항균활성이 크게 차이나지 않았으며 two-fold dilution이라는 희석 방법이 농도를 세분화하는데에는 한계가 있으므로 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물의 MIC가 같은 농도에서 결정된 것으로 추측된다.

그리스 지역 13종의 허브 추출물의 *H. pylori* 항균활성을 MIC로 측정한 Stamatis 등[76]은 *Anthemis melanolepsis*, *Chamomilla recurita*, *Corzya albida*, *Origenum vulgare*, *Stachys alopecuros* 등 5종의 허브 추출물의 MIC가 0.625mg/mL로 우수한 활성을 나타낸다고 보고하였다. Gadhi 등[84]은 모로코의 전통적인 생약식물인 *Aristolochia paucinervis* Pomel 뿌리와 잎의 MeOH 추출물의 MIC가 각각 0.128mg/mL, 0.032mg/mL라고 보고하였고 Lee 등[69]은 41개의 국내 약용 식물 열수추출물의 항균활성을 검토한 결과 소목, 소엽, 황련 3가지에서만 항균효과를 발견하였고 그 MIC는 각각 0.35mg/mL, 0.19mg/mL, 0.06mg/mL로 보고하였다. 특히 Li 등[78]은 중국 지역 30종의 생약 추출물의 *H. pylori* 항균활성을 검토하였는데 이중 오미자의 MIC가 60ug/mL로 *H. pylori*에 우수한 소재임을 보고하였다. 이는 본 연구의 오미자와 비교하였을때 상당히 적은량의 MIC로 보고

되었는데 이것은 각 추출물의 분리, 정제 상태, 사용균주에 따른 차이, 배양 조건의 차이에 따른 것이라 생각된다.

반면, Nostro 등[77]이 17종의 지중해연안 허브 EtOH 추출물을 대상으로 *H. pylori*에 대한 MIC를 측정된 결과 페퍼민트는 항균활성이 없었고 펜넬이 10mg/mL, 진저와 고수가 5mg/mL, 치커리, 카리다몸, 주니퍼베리, 프로폴리스, 오래가노, 양버찌, 로즈마리, 세이지, 백리향, 계피, 티리아프라티필로스 11개 추출물이 1.25mg/mL이었으며 쿠민, 아티초크는 0.3mg/mL로 확인되었다. Shin 등[87]은 한국과 일본의 와사비 뿌리, 줄기 잎 열수추출물의 *H. pylori* 항균활성을 비교분석하였고 그 결과 한국 겨자 뿌리, 줄기, 잎의 MIC는 각각 2.61mg/mL, 5.21mg/mL, 1.05mg/mL이었으며 일본 와사비 뿌리, 줄기 잎의 MIC는 각각 2.09mg/mL, 5.21mg/mL, 1.31mg/mL이었다고 보고하였다. *H. pylori*에 대한 마늘의 항균 활성에 대해 연구한 Jonkers 등[80]은 allicin 함량이 12.3mg/g인 생마늘의 *H. pylori*에 대한 MIC가 10.0mg/mL이었으며 네덜란드에서 다져진 채로 유통되고 있는 3 회사의 다진마늘은 allicin 함량을 기준으로 하였을때 MIC가 40.0mg/mL로 결정되었다고 보고하였고 O' Gara 등[81]은 마늘 파우더(GP)의 MIC가 0.5mg/mL였다고 보고하였다.

식품위해균에 대한 오미자의 항균활성을 연구한 Chung 등[105]은 오미자 EtOH 추출물의 MIC가 Gram(+)균에 대해서는 3.2mg/mL, Gram(-)균에 대해서는 12.5mg/mL의 농도로 결정되었다고 보고하였다. 이들의 연구 결과와 비교해 볼 때 본 연구의 오미자 추출물과 분획물의 MIC는 비교적 적은 양으로 *H. pylori*에 항균 활성을 나타낸다고 판단할 수 있겠다.

한편, *H. pylori*에 대하여 우수한 항균활성을 보인 *Larrea divaricata* Cav. 를 조사한 Stege 등[85]은 *L. divaricata* Cav. 잎 표면에 존재하는 NDGA(nordihydro guaiar etic acid)를 주요한 항균 물질로 소개하였으나 phenol계 화합물인 NDGA는 독성 때문에 사용이 전면금지된 물질[92]이므

로 식품으로서의 소재 탐색에 있어 더욱 신중해야 할 것이다.

Table 10. Minimum inhibitory concentration(MIC) of *Schizandra chinensis* Baillon.

	MIC (mg/mL)
EtOH extract	1.0
EtOAc fraction	1.0
Control ¹⁾	<0.002

¹⁾ amoxicillin

5. 오미자 추출물 및 분획물의 안정성

오미자 EtOH 추출물 및 분획물의 paper disc method 결과 항균력이 강한 EtOAc 분획물을 3mg/disc의 농도로 하여 100℃에서 15분, 30분, 60분 동안 열처리 한 후 *H. pylori*의 생육정도를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

모든 열처리군에서 대조군과 차이가 거의 없는 항균 활성을 확인하였으며 오미자 EtOAc 분획물은 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다. 이는 Chung 등[105]의 결과와 일치하는 것으로 오미자 EtOAc 분획물은 열에 의한 가공 적성에서 *H. pylori*에 대한 항균 활성이 실활 되지 않는 것으로 판단된다.

또한 오미자 EtOAc 분획물의 농도를 3mg/disc로 하여 pH를 2, 4, 6, 8로 조절하고 1시간 동안 처리하여 항균 효과를 조사한 결과는 Fig. 6과 같이 항균활성에 pH가 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되었다.

오미자에는 다량의 유기산이 존재하며 이들은 오미자의 독특한 맛과 향을 결정할 뿐만 아니라 오미자의 보존성에도 기여되고 있다. 오미자 추출물 중의 유기산이 배지의 pH를 저하시켜 미생물의 생육이 억제된다고 보고한 Park[123]의 결과와 오미자 추출물 중의 fumaric acid, citric acid, malic acid, itaconic acid를 배지에 첨가하여 대조구와의 생육억제 능력을 비교하여 보고한 Lee 등[106]의 결과 등으로 미루어보아 오미자의 식품위해균에 대한 항균활성은 오미자 추출물 중에 존재하는 유기산에 의해 크게 좌우되는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 본 연구에 사용된 *H. pylori*는 위 점막과 점액의 강한 산성 환경에서 서식하면서 생육최적 pH는 7.0 내외에 위치하고 있다. 이러한 생태학적 특성은 *H. pylori* urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5)에 의해 생성된 암모니아가 위점막의 서식처를 중화시키기 때문[20]으로 밝혀져 있으므로 오미자 EtOAc 분획물 고유의 pH(pH 4) 및 실험에

사용된 pH 처리도 *H. pylori* 항균활성에 영향을 미치지 않았으리라고 생각된다.

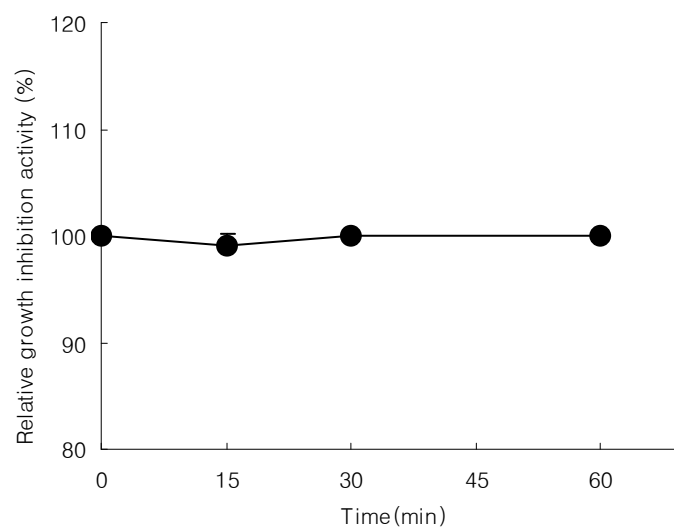


Fig. 5. Effect of heat treatment on the relative growth inhibition activity of the ethyl acetate fraction obtained from ethanol extracts of *Schizandra chinensis* Baillon.

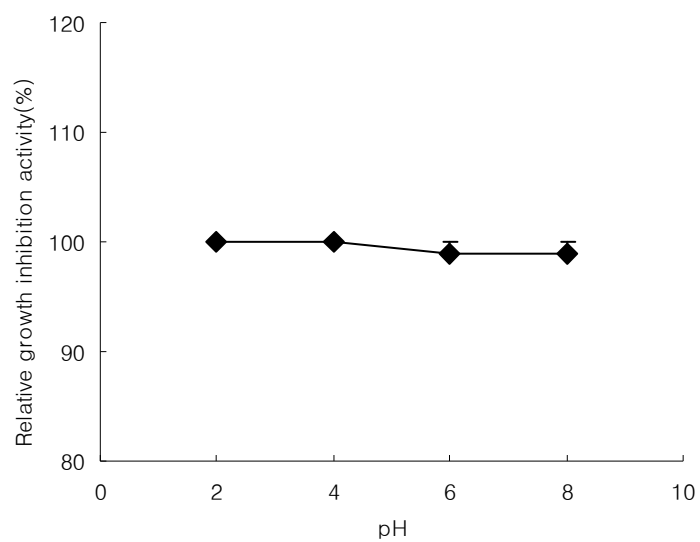


Fig. 6. Effect of pH change on the relative growth inhibition activity of the ethyl acetate fraction obtained from ethanol extracts of *Schizandra chinensis* Baillon.

6. 오미자의 항균활성물질의 분리 및 동정

오미자 ethanol 추출물로부터 각 용매별 계통 분획을 하여 분리한 결과 뚜렷한 항균활성을 나타낸 ethyl acetate 분획으로 MPLC를 실시하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. (흑오미자 ethyl acetate 분획의 MPLC 결과는 Fig. 8에 나타내었다.)

Peak에 따라 총 11개의 subfraction으로 분리하였으며 각각 감압농축하여 paper disc method에 따라 각 subfraction의 *H. pylori*에 대한 항균활성을 검토하였다. Table 11에서 알 수 있듯이 11개의 subfraction 중 ③번(S-EA-3)과 ⑤번(S-EA-5) 2개의 subfraction에서 각각 22.0mm, 19.0mm의 inhibition zone을 보였으며 다른 subfraction에서는 항균활성이 나타나지 않았다.

Fig. 9에서 오미자 EtOAc fraction의 main peak가 S-EA-3임을 확인할 수 있었으며 흑오미자(Fig. 10)의 main peak는 오미자의 S-EA-5과 같은 물질임을 HPLC chromatogram을 통하여 확인할 수 있었다.

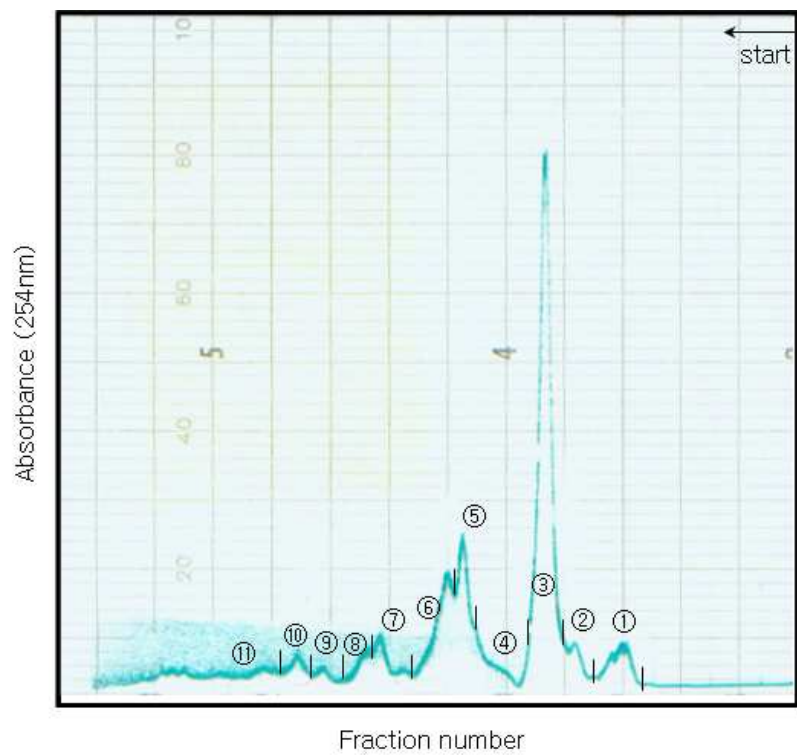


Fig. 7. Elution profile of ethyl acetate fraction obtained from ethylacetate fraction of *Schizandra chinensis* Baillon. by MPLC

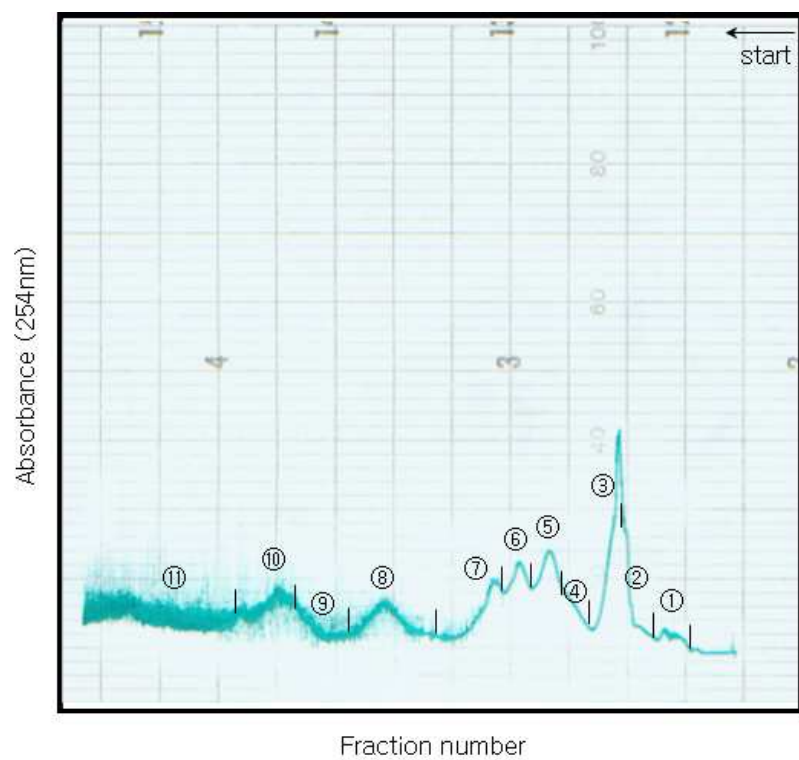


Fig. 8. Elution profile of ethyl acetate fraction obtained from ethylacetate fraction of *Schizandra nigra* Max. by MPLC

Table 11. Anti-*H. pylori* activities of the subfractions obtained from ethyl acetate fraction of *Schizandra chinensis* Baillon.

No.	subfractions (3mg/disc)	Inhibition zone diameter (mm)
①	S-EA-1	- ¹⁾
②	S-EA-2	-
③	S-EA-3	22.0
④	S-EA-4	-
⑤	S-EA-5	19.0
⑥	S-EA-6	-
⑦	S-EA-7	-
⑧	S-EA-8	-
⑨	S-EA-9	-
⑩	S-EA-10	-
⑪	S-EA-11	-

¹⁾ -: not detected

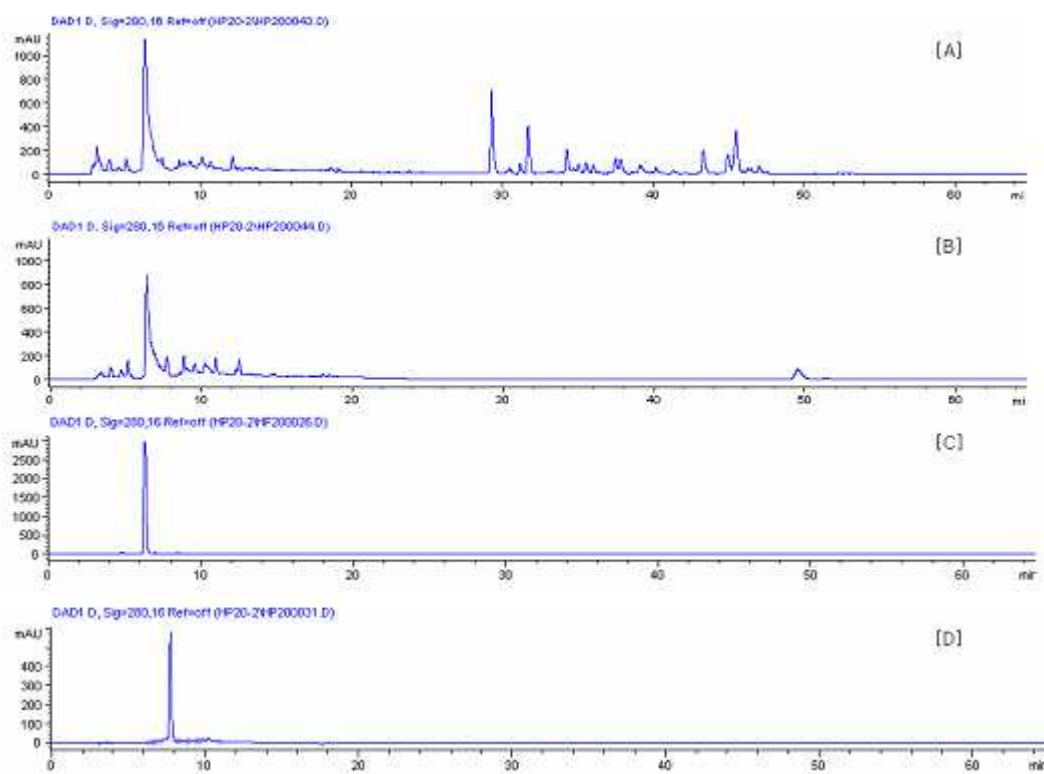


Fig. 9. HPLC chromatogram of the subfractions obtained from ethyl acetate fraction of *Schizandra chinensis* Baillon.

- [A] EtOH extract
- [B] EtOAc fraction
- [C] S-EA-3
- [D] S-EA-5

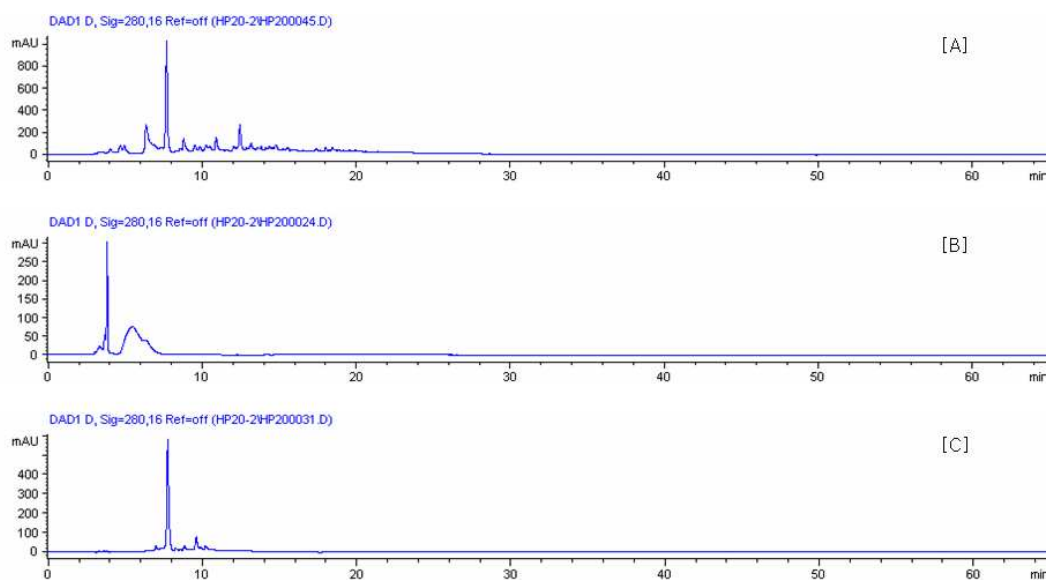


Fig. 10. HPLC chromatogram of the subfractions obtained from ethyl acetate fraction of *Schizandra nigra* Max.

[A] EtOAc fraction

[B] S-EA-3

[C] S-EA-5

NMR/MS를 통하여 2개의 compound를 분리 동정 하였다.

1) Compound 1: S-EA-3

Compound1은 EtOAc fraction에서 얻은 미황색 오일성 물질(Fig. 11)로 $C_8H_{16}O_3$ 임이 확인되었다.

IR spectrum (Fig. 12) 결과 hydroxy group(-OH)은 $3218.61cm^{-1}$, carbonyl group(C=O)은 $1718.26cm^{-1}$, carboxyl group(C-O)은 $1179.26cm^{-1}$ 에서 확인하였다. 1H -NMR spectrum($CDCl_3$, 400 MHz, δ)(Fig. 13)에서 1.24ppm(*s*, 1H), 1.26ppm(*s*, 1H), 1.27ppm(*s*, 1H), 1.28ppm(*s*, 1H), 1.29ppm(*s*, 1H), 1.30ppm(*s*, 1H), 2.85ppm(*q*, 2H, $J=6.5$), 2.89ppm(*q*, 2H, $J=4.1$), 4.17ppm(*q*, 2H, $J=7.1$), 4.24ppm(*q*, 2H, $J=2.01$), 4.54ppm(*d*, 1H, $J=1.38$), 4.59ppm(*s*, 1H)의 결과를 얻었다. ^{13}C -NMR spectrum($CDCl_3$, 100 MHz, δ)(Fig. 14)에서 173.404(C-1), 38.505(C-2), 67.172(C-3), 62.238(C-4), 61.385(C-5), 14.016(C-6), 38.458(C-1'), 14.016(C-2')의 결과를 얻었다(Fig. 15-16). 종합적으로 compound1(S-EA-3)은 ethyl 3-hydroxyhexanoate(Fig. 17)로 동정되었다.



Fig. 11. The compound 1(S-EA-3) of ethyl acetate fraction obtained from ethanol extracts of *Schizandra chinensis* Baillon.

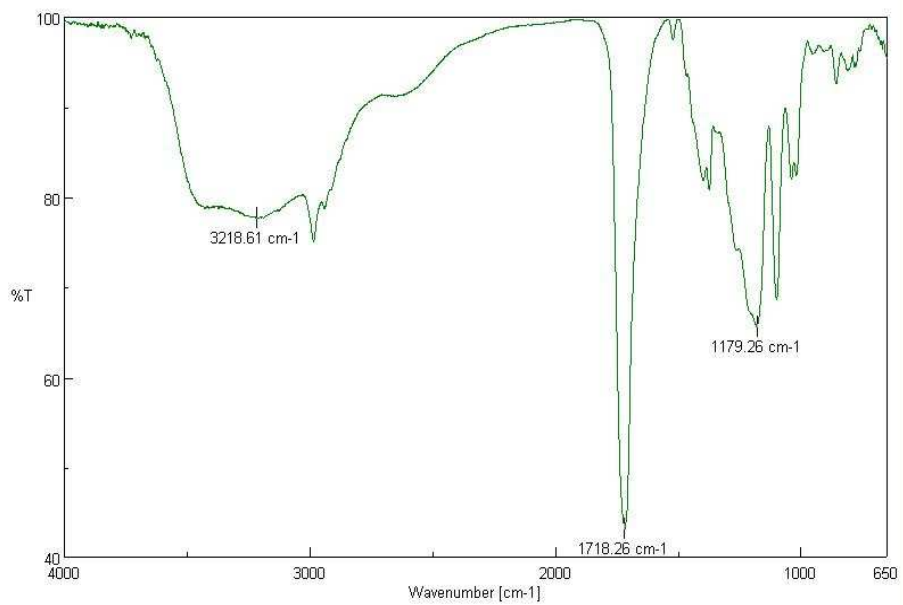


Fig. 12. IR spectrum of compound 1.

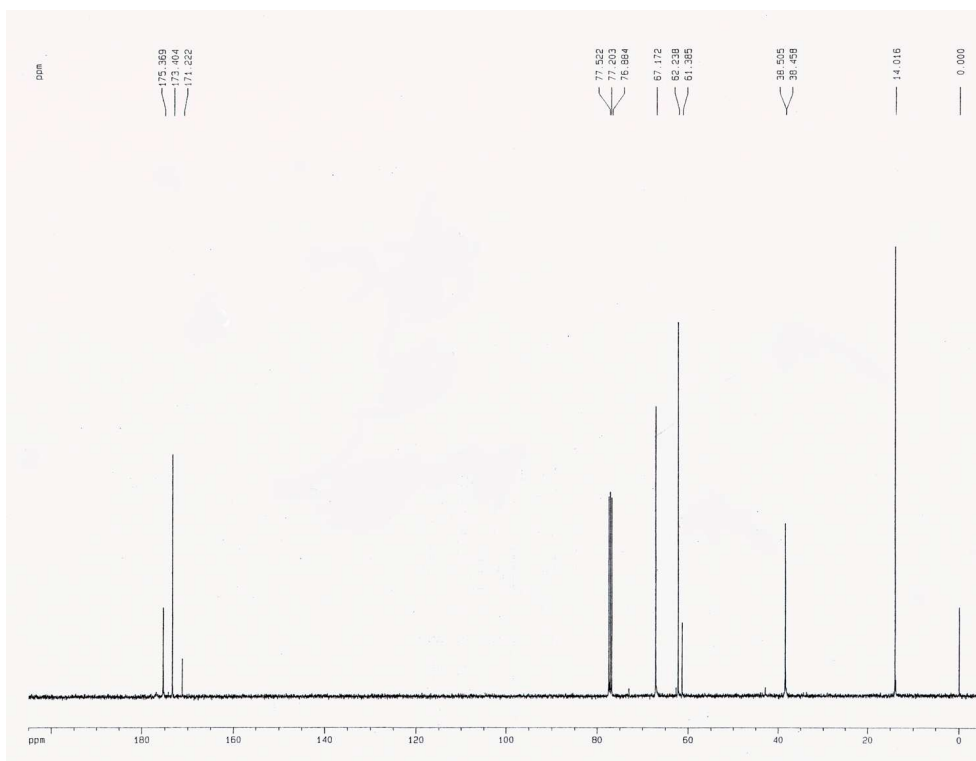


Fig. 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (CDCl_3)

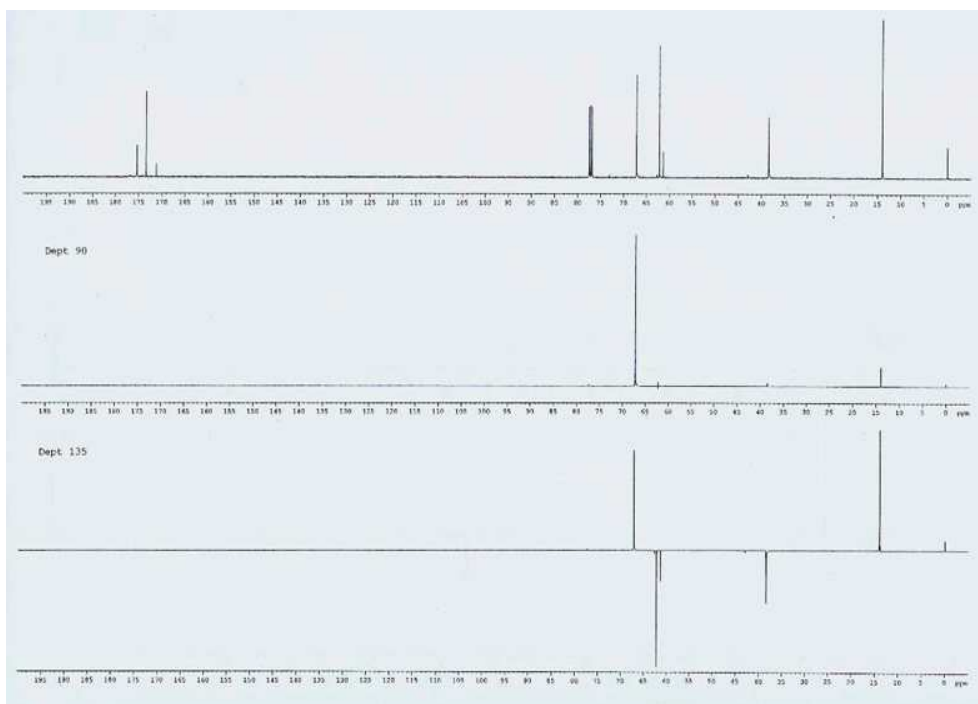


Fig. 15. Edited DEPT spectrum of compound 1 (CDCl₃)

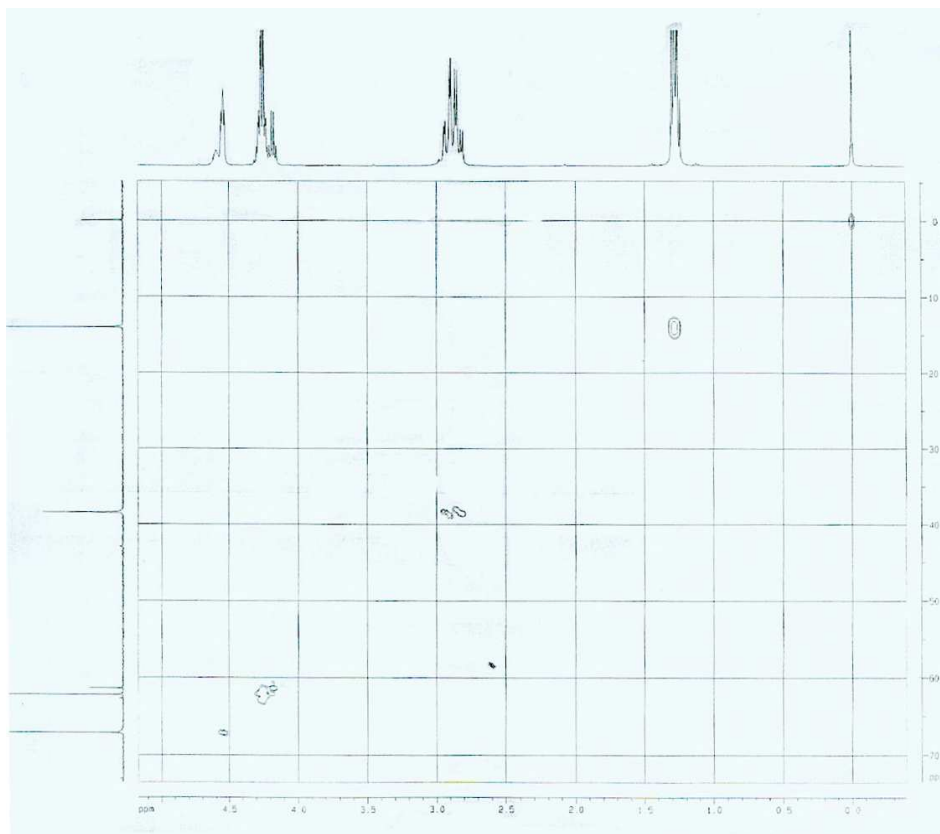


Fig. 16. ^1H - ^{13}C cosy spectrum of compound 1 (CDCl_3)

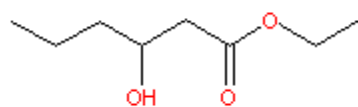


Fig. 17. Structure of compound 1

2) Compound 2: S-EA-5

Compound 2는 EtOAc fraction에서 얻은 미황색 오일성 물질로 $C_8H_{16}O_3$ 임이 확인되었다.

IR spectrum (Fig. 18) 결과 hydroxy group(-OH)은 3197.4cm^{-1} , carbonyl group(C=O)은 1712.48cm^{-1} , carboxyl group(C-O)은 1190.83cm^{-1} 에서 확인되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(CDCl_3 , 400 MHz, δ)(Fig. 19)에서 1.74ppm(*d*, 3H, $J=6.61$), 1.20ppm(*d*, 3H, $J=7.02$), 2.69ppm(*d*, 2H, $J=8.34$), 2.75ppm (*d*, 2H, $J=8.28$), 2.80ppm(*d*, 2H, $J=5.98$), 4.04ppm(*d*, 1H, $J=7.1$), 4.11ppm(*d*, 2H, $J=7.11$), 4.13ppm(*s*, 1H)의 결과를 얻었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(CDCl_3 , 100 MHz, δ)(Fig. 20)에서 172.034(C-1), 61.457(C-2), 43.704(C-3), 79.696(C-4), 73.675(C-5), 40.383 (C-6), 60.732(C-1'), 40.383(C-2')의 결과를 얻었다. 종합적으로 compound 2 (S-EA-5)는 ethyl 5-hydroxyhexanoate로 동정되었다(Fig. 21).

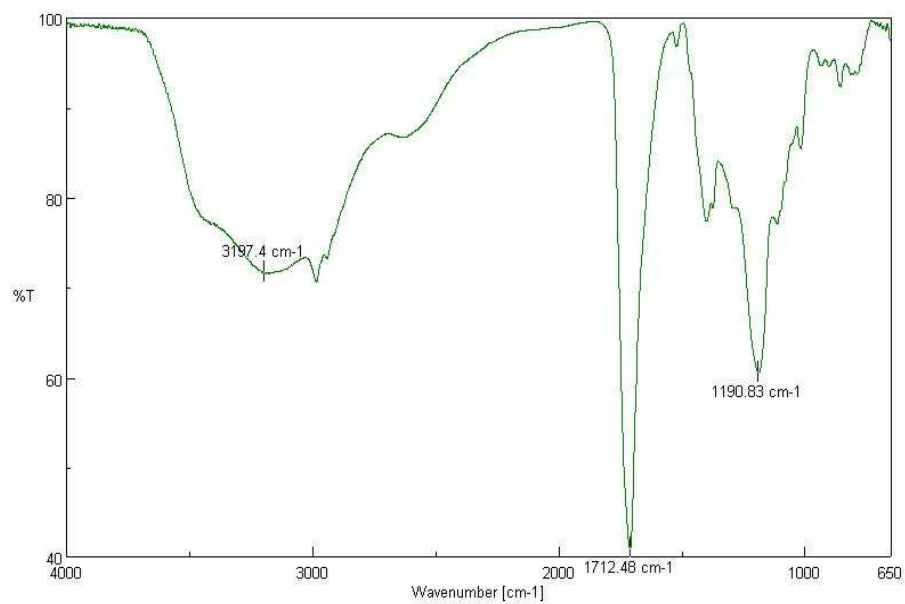
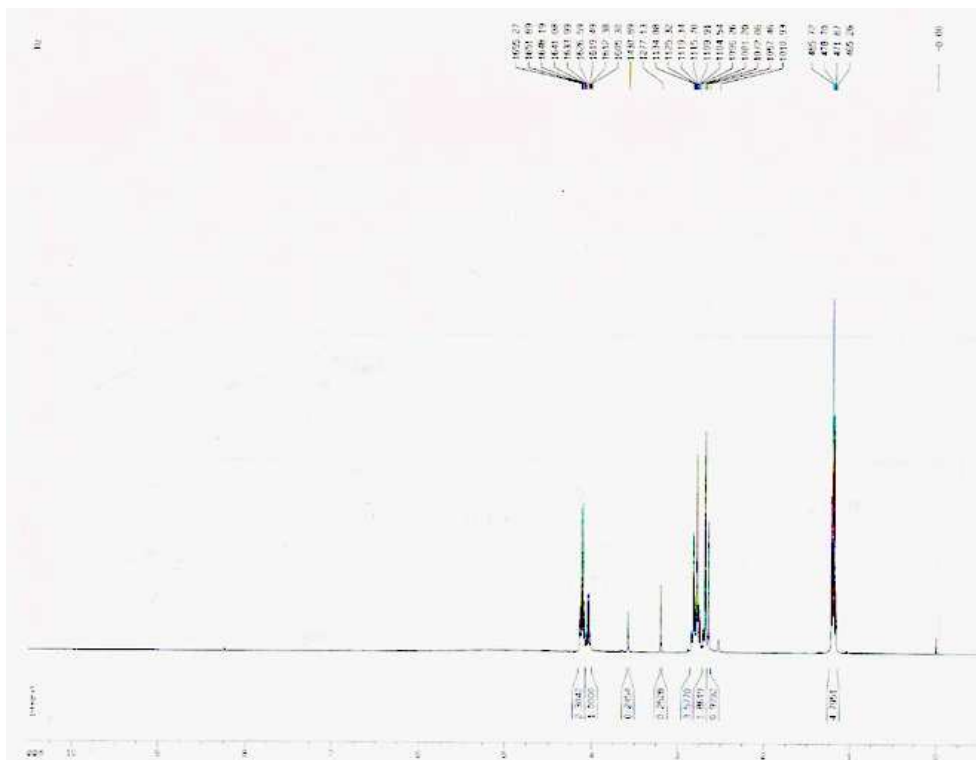


Fig. 18. IR spectrum of compound 2.



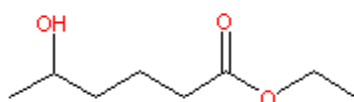


Fig. 21. Structure of compound 2

Compound 1은 ethyl 3-hydroxyhexanoate로 Cas no. (Chemical Abstract Service number) 2305-25-1이며 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ 의 구조를 갖고(Fig. 18) 분자량은 160.21g이었다. 물에 불용이며 알코올에 잘 녹는 특징이 있다. Compound 2는 ethyl 5-hydroxyhexanoate로 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ 의 구조를 갖으며(Fig. 22) 분자량은 160.21g이었다. 결과적으로 compound 1과 2는 C, H, O의 수가 동일하여 분자량이 같으며 -OH기가 붙어있는 위치만 다른 휘발성 화합물로 확인되었다.

본 실험은 구입한 건 오미자를 그대로 분쇄하여 오미자의 과육과 종자를 한번에 추출하였으므로 어디에 함유되어 있는 물질인지 확인하기 위하여 과육과 종자를 분리하여 EtOH 추출물을 얻어 paper disc method로 *H. pylori*에 대한 생육 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 종자에서는 inhibition zone이 나타나지 않았고 오미자 과육의 EtOH 추출물에서 inhibition zone이 나타나 동정된 ethyl 3-, ethyl 5-hydroxyhexanoate은 오미자 과육에 존재하는 정유 성분임을 알 수 있었다(결과 생략).

오미자의 휘발성 성분을 분석한 Kim 등[103]은 47개의 오미자 향기성분을 확인하였고 Li 등[104]은 88개의 오미자 향기 성분을 보고하였으나 ethyl 3-hydroxyhexanoate과 ethyl 5-hydroxyhexanoate은 본 연구에서 오미자로부터 처음 분리 동정되었다. Ethyl 3-hydroxyhexanoate는 천연물에서 감귤류[124], 딸기, 딸기잼[125], mombin[126], caja fruits (mango, cashew nut, pistachia nut etc.)[127], 바나나[128], malay apple[129], papaya[130] 등의 volatile compounds 혹은 aromatic essential oil 성분으로 분리 동정 되어있고 ethyl 5-hydroxyhexanoate은 Nanduri 등[131]의 연구에서 ethyl 5-oxohexanoate으로부터 *Pichia methanolica*, *Candida utilis*, *Kleocckera sp.* 등의 미생물에 의해 생합성된다고 보고되어 있다.

정유의 기능적이고 긍정적인 측면의 연구로 면역성 증가[132], 신경계 안정 효과 및 항암효과, 노화억제 및 피부병균에 대한 항균력[133] 등 약리적 특성

이 실험적 증거와 함께 보고됨에 따라 천연 정유를 산업적으로 응용할 수 있는 범위가 증가하게 되었다[134]. 식물성 천연 정유는 독특한 향기와 향미를 지닌 향수, 향신료 및 의약품 등 매우 광범위하고 다양한 산업분야에 응용되고 있으며 식품 및 화장품업계에서는 천연향신료, 천연방부제 및 감미료가 갖는 항균작용과 항산화 활성에 관한 연구에 관심이 집중되면서 다양한 균주에 광범위하게 효과를 나타내는 천연항균제와 항산화제로서 식물성 정유를 이용하려는 시도가 이루어지고 있어 식물성 천연 정유는 본래 향미 기능 외에 부가가치가 상승되고 있다[135].

병원성 미생물을 대상으로 국내 자생 생약 식물인 쪽[120], 어성초[136], 사상자[121], 구상나무[137] 등으로부터 정유 성분을 추출하여 항균활성을 연구한 보고들이 있으며 Yoo 등[138]은 생강, 마늘, 겨자, 정향 등의 천연 향신료 정유의 *Vibrio* sp.에 대한 항균활성을 보고하였다. 그리고, Bergonzeli 등[139]이 60종의 herb 정유 성분의 *H. pylori*에 대한 항균활성을 조사하였으며 그중 15종의 정유 성분이 강한 항균활성을 보인다고 보고하였다.

일반적으로 정유성분이 세포막에 손상을 주는 것은 그들의 친유성 성질 때문인 것으로 알려져 있으며[140-141] 이외에도 분자 내의 functional group에 의해서도 손상효과가 나타난다고 알려져 있다. 또한 이들 정유성분의 향미생물 활성은 분자 내의 기능성기가 막에 결합되어 있는 효소에 작용하여 활성을 나타낸다고 보고되었다[142].

7. Urease 저해 활성 검색

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 특이한 점은 강력한 urease 활성을 가지고 있다는 것이다[20]. *H. pylori*의 urease 생산능력은 *Proteus* 균종의 생산능에 비해 100배 이상이며 균체 단백질의 약 6% 정도가 urease로 알려져 있다[143-144]. Urease는 urea를 ammonia와 CO₂로 분해하는 효소이며 K_m값이 0.8mM로 *Proteus* 균종의 urease에 비해 10-20배 낮은 정도로 요소와의 친화력이 높다. *H. pylori*의 urease는 위액의 강산성 조건에서도 *H. pylori*가 살아갈 수 있도록 도와주는 물질이거나 특이한 발병결정인자로 추정한다[143]. 따라서 *H. pylori*의 urease 활성을 억제하는 것이 *H. pylori*의 감염 예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있으리라 생각한다.

Urea(H₂NC=ONH₂) 1분자와 물(H₂O) 1분자가 urease에 의해 ammonia(NH₃) 2분자와 CO₂ 1분자로 바뀌며 발생한 ammonia(NH₃)는 sodium nitroprusside(Na₂Fe[CN]₅NO) 촉매에 의해 phenol 2분자와 alkaline hypochlorite와 반응해서 indophenol 1분자를 형성한다. 이와 같은 반응에 의해 생성된 indophenol은 ammonia의 양과 정비례하므로 파란색을 나타내는 indophenol을 590nm에서 흡광도를 재어 발생한 ammonia의 양을 환산하였다. 즉, *H. pylori*의 생육과 urease 산물인 암모니아에 의한 위점막 손상을 억제함으로써 위염 및 위궤양을 예방할 수 있는 천연 urease 저해 활성 물질을 소재화시키고자 오미자 추출물을 포함한 188종의 천연 생약 추출물의 urease 저해 활성을 측정하였다.

그 결과 95% EtOH 추출물 55종 중 16종의 천연 생약 추출물이 저해활성을 나타내었다(Fig. 22). 쓴박하(허하운드, *M. vulgare*)가 231.25%, 현삼(*S. buergeriana*)이 200.56%로 urease 저해 기준물질로 사용한 acetohydroxamic acid(AHA)[103] 보다 매우 높은 저해활성을 보였으며 치커리(*C. intybus*)가 92.04%, 홍경천(*R. rosea*)이 71.02273%로 뒤를 이어 우수한 저해

활성을 나타낸 것으로 확인되었다.

이 중 쓴박하와 현삼에 대해 살펴보면, 쓴박하(허하운드)는 중앙아시아와 서아시아, 유럽 중부, 아프리카 남부 등이 원산지인 허브의 한 종류로서 고대 이집트와 고대 로마 때부터 약용으로 사용했으며 야생쓴박하라고도 한다. 고대 이집트와 로마의 사람들은 과자의 향료, 감기 치료제 등으로 이용했고 고대 그리스 사람들은 해독 작용이 있다고 하여 뱀이나 개에게 물렸을 때 사용했다고 한다. 그 뒤에도 유럽에서는 감기와 천식 등 호흡기질환에 효능이 있다고 해서 시럽으로 만들어 가정상비약으로 이용해오고 있다. 국내에는 항인플루엔자 효과적이라는 특허가 등록되어 있으며[145], tyrosinase inhibitor[146], pharmacological activity[147], antinociceptive property[148] 등에 관한 연구가 보고되어 있다. 현삼은 현삼과에 속하는 다년생 초본으로 뿌리를 생약재로 이용하는 주요 약용작물 중의 하나이며 종자와 종근으로 번식하고 한방에서는 해열제, 인후염, 중기·림프선염에 사용한다[149]. Anti-amnestic activity[150]과 neuroprotective effect[151-153], hepatoprotective effect[154] 등에 대한 연구가 보고되어 있다.

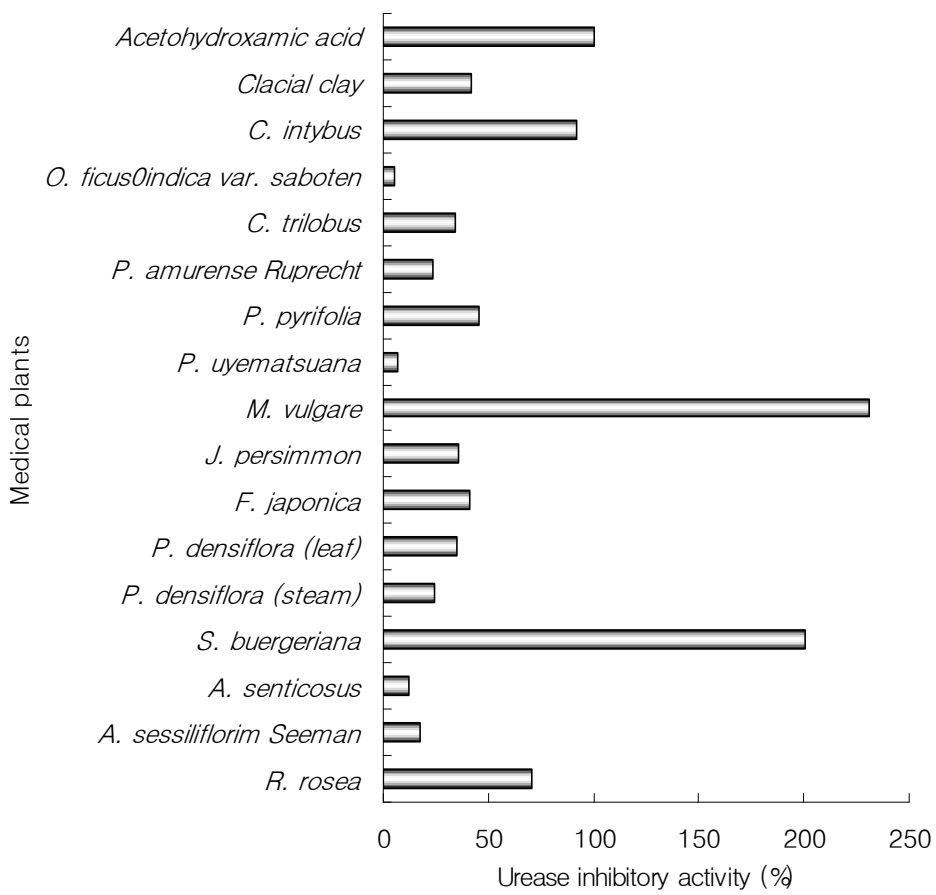


Fig. 22. Urease inhibitory activities of 95% ethanol extracts of medicinal plants.

70% EtOH 추출물 73종 중에서는 9종의 생약 추출물에서 urease 저해 활성을 나타내었다(Fig. 23). 그 중 인동(*L. japonica*)이 164.54%로 높은 저해 활성을 보였고 마황(*E. sinica*), 지구자(*H. dulcis* T.), 산수유(*C. officinalis*)가 각각 61.36%, 56.25%, 55.11%의 저해 활성을 나타내었다.

인동은 인동과에 속하는 다년생 식물로 줄기와 가지는 인동등(*Lonicera Folium*)이라 하며 인동의 꽃은 금은화(*Lonicera Flos*)라고 한다. 한방에서는 항균, 항바이러스, 항내독소, 소염, 해열작용이 있다고 알려져 있다[155]. 주요 성분으로는 chlorogenic acid, isochlorogenic acid가 있으며 그 외에 luteolin, luteoiln-7-glycosides, lonicerin과 같은 flavonoid와 saponin 등이 함유되어 있다. 금은화 및 인동등에 관한 연구로는 여러 종류의 서분을 분리하여 항염증작용[156-157], 항암작용[158] 및 성장호르몬 유발효과[159] 등이 보고된 바 있다.

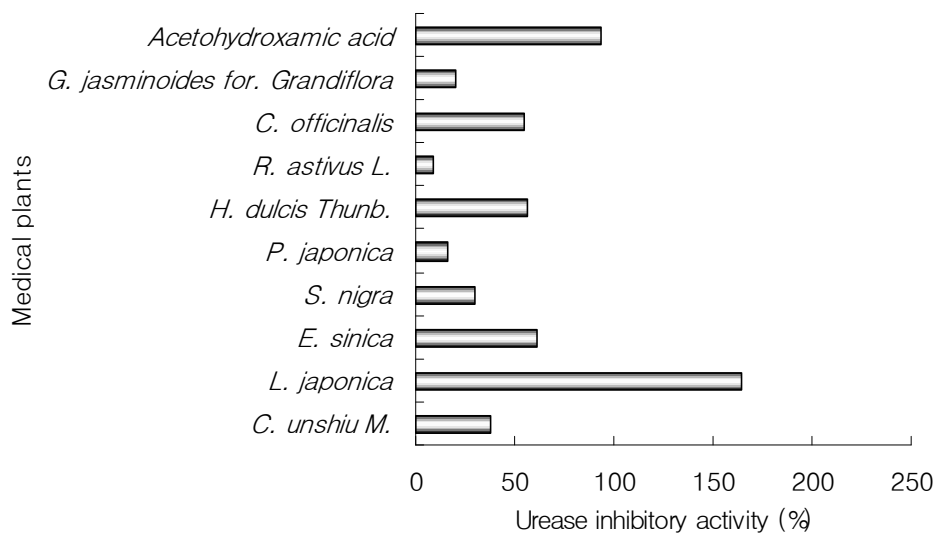


Fig. 23. Urease inhibitory activities of 70% ethanol extracts of medicinal plants.

60종의 물 추출물 중에서 11종의 생약 추출물에서 urease 저해 활성을 나타내었다(Fig. 24). 눈꽃동충하초(*I. japonica*)가 137.5%로 높은 저해 활성을 보였으며 운지버섯(*C. versicolor*)이 97.72%로 urease 저해 기준물질로 사용할 acetohydroxamic acid의 저해활성과 유사한 활성을 보였다. 또한 계피(*C. cassia* B.), 쇠비름(*P. oleracea*), 차가버섯(*I. obliquus*)도 각각 74.43%, 71.02%, 53.97%의 우수한 저해활성을 나타낸 것으로 확인되었다.

동충하초는 다양한 곤충기생성 균류가 주로 곤충에 침입하여 이를 기주로 자실체를 형성하거나 충체상에 포자과를 형성하는 버섯의 일종으로 곤충과 거미 이외에도 일부 균류에 기생하여 발생한 자실체도 포함하여 동충하초라고 한다[160]. 전세계적으로 약 100속, 750여종이 분포되어 있으며[161] 그 중 대표적인 동충하초속으로는 완전세대의 유성생식기관으로 자낭균류(*Ascomycetes*)의 맥각균(*Clavicipitaceae*)과에 속하는 *Cordyceps* 속과 불완전균류의 *Paecilomyces* 속, *Torrubiella* 속 및 *Podonectria* 속 등이며 자실체를 형성하는 대표적인 *Cordyceps* 속은 전세계적으로 300여종이 분포되어 있는 것으로 알려져 있다. 자실체를 형성하는 일부 동충하초는 고대로부터 중국에서 인체의 활력을 보하는 불로장생의 비약으로 인식되어 왔으며 특히 전통적으로 한방에서 이용되고 있는 대표적인 동충하초는 박쥐나방의 유충을 기주로 자실체를 형성하는 *Cordyceps sinensis*로서 매우 다양한 약물활성을 발현한다는 사실이 입증되고 있다[162-164].

또한 운지버섯은 항암 성분[165-167]이 발견된 약용버섯으로 항암제로 이용되고 있으며 전세계에 분포한다.

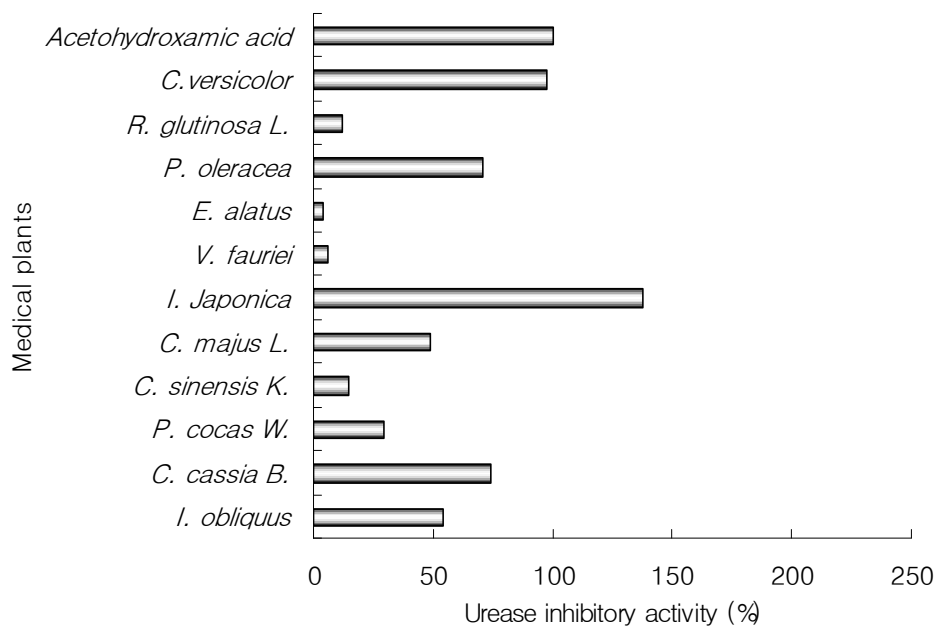


Fig. 24. Urease inhibitory activities of water extracts of medicinal plants.

오미자 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물의 urease 저해활성은 Fig. 25에 흑오미자와 비교하여 나타내었다. 오미자 EtOH 추출물[A]은 27.85%, EtOAc 분획물[B]은 35.80%의 저해활성을 나타내었고 흑오미자의 EtOH 추출물[C] 29.85%와 EtOAc 분획물 38.80%[D]의 저해활성보다 약간 낮은 활성을 보였다.

복분자를 포함한 173종의 식용 생물자원으로부터 추출한 추출물을 대상으로 urease 저해 활성을 검색한 Yang 등[116]의 결과를 보면 복분자 MeOH 추출물이 20.4% 저해하였고 ion exchange chromatography를 통해 5개의 분획을 얻어 각각의 저해활성을 측정하였을 때 RCW2-III(1M NaCl fraction)이 약 60% 정도 urease 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 그리고, 같은 연구에서 오미자의 cold water(냉수) 추출물이 10.5%, MeOH 추출물이 8.0%, hot water(열수) 추출물이 6.7%의 urease 저해 활성을 갖는다고 보고하였는데 이에 비해 본 실험에서 오미자 EtOH 추출물 및 EtOAc 분획물의 urease 저해활성이 높게 나타났다. 이는 추출 용매 및 조건이 다르기 때문으로 판단된다.

한편, Lee 등[69]은 소목, 소엽, 황련 추출물이 80%이상 urease를 저해한다고 보고하였고 Yoon 등[72]은 연교 EtOAc 분획물이 92%의 urease 활성 저해 효과를 가지며 Park 등[73]은 애엽 EtOAc 분획물이 urease 활성을 90% 저해한다고 보고하였다. 그러나, 위의 세 연구들은 상대적으로 비교할 positive control이 설정되어 있지 않았으며 본 연구에서 urease 활성 억제를 측정하는 방법과 다른 방법을 사용하였으므로 저해 효과의 절대값을 서로 비교하기에는 무리가 있다고 판단된다.

종합적으로 188종의 천연 생약 추출물의 urease 저해 활성을 검토한 결과 썬박하(*M. vulgare*, 95% EtOH ex.) 231.25%, 현삼(*S. buergeriana*, 95% EtOH ex.) 200.56%, 인동(*L. japonica*, 70% EtOH ex.) 164.54%, 눈꽃동충하초(*I. japonica*, water ex.) 137.5%, 운지버섯(*C. versicolor*, water ex.) 97.72% 순으로 저해 활성이 검색되어 paper disc method로 생육저해환을 검색한 결과

와 다른 소재들이 urease 저해에 활성이 있는 것으로 드러났다.

H. pylori urease 저해제는 flurorofamide[103, 168], acetohydroxamic acid [103, 169] 등의 urease 저해기능만을 가진 물질과 rabeprazole[170], lansoprazole[171] 등의 proton pump 저해기능을 동시에 갖는 물질들로 구분할 수 있으나 이들 모두 합성물질이고 천연 urease 저해 활성물질은 *Euphorbia decipiens*로부터 1종만이 보고되어 있다[171]. 따라서 본 연구가 천연 urease 저해제를 개발하는데 훌륭한 database를 구축하였으며 우수한 효과를 보인 쓴박하, 현삼, 인동, 눈꽃동충하초, 운지버섯 등은 비교적 urease 억제 활성이 미약한 오미자와 혼합하여 시너지 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

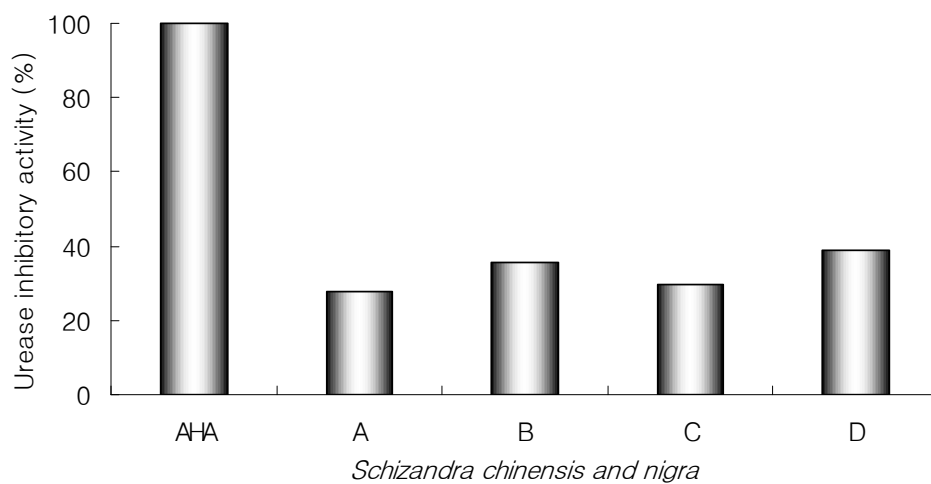


Fig. 25. Urease inhibitory activities of ethyl acetate fractions and ethanol extracts of *Schizandra chinensis* Baillon and *Schizandra nigra* Max.

AHA: Acetohydroxamic acid

[A]: EtOH extract of *Schizandra chinensis* Baillon.

[B]: EtOAc fraction of *Schizandra chinensis* Baillon.

[C]: EtOH extract of *Schizandra nigra* Max.

[D]: EtOAc fraction of *Schizandra nigra* Max.

8. *H. pylori* 부착 억제 활성 조사

일반적으로 미생물, 특히 병원균이 pathogenecity를 가지기 위해서는 숙주에 colonization을 해야한다[172]. 이와 같이 colonization의 첫 단계가 바로 숙주 세포에 대한 부착이라고 할 수 있다. 병원성 미생물들이 숙주내의 특정한 부위에 주로 colonization 하는 것도 이러한 미생물이 가지는 부착에 관여하는 adhesin과 숙주 세포의 표면에 존재하는 adhesion receptor의 모델로 잘 설명될 수 있다. *H. pylori*의 조직학적 연구 결과, 위 상피세포 및 점막층에 주로 결합하는 것이 밝혀졌으며[173] *H. pylori*의 표면단백질은 특정 탄수화물을 인식하여 위점막에 부착하는데 적혈구와 위점막 세포의 탄수화물 조성이 유사하므로 *H. pylori*의 생체 내 위벽 부착 억제 실험을 in vitro에서 적혈구 응집활성을 통하여 확인하였다[118]. 배양된 *H. pylori*와 동량의 희석된 적혈구 용액을 혼합하여 실온에서 1시간 동안 약하게 교반시켜서 이를 양성 적혈구 응집반응으로 하였으며 188종의 천연 생약 추출물은 0.5mg/mL의 농도로 부착 억제 활성을 측정하였다.

적혈구와 *H. pylori*를 반응시킨 양성 적혈구 응집반응 결과(control)를 보면 염색된 적혈구가 단위면적당 셀 수 없이 응집되어 있다. 반면, Fig. 28-30에 나타난 부착억제 효과가 있는 천연 생약 추출물들은 염색된 적혈구가 단위면적 당 현저히 적게 보이는 것을 확인할 수 있다. 이러한 현상을 적혈구 응집 반응을 저해했다고 평가하였으며 응집 반응을 저해하지 못한 기타 천연 생약 추출물들은 control과 동일한 적혈구 응집 현상을 보였다.

95% EtOH 추출물 55종 중 쓴박하(*M. vulgare*), 마가목(*S. commixta*), 땡땡이덩굴(*C. trilobus*), 황백(*P. amurense*), 선인장(*O. ficus-indica var. saboten*), 복분자(*R. coreanus* M.) 6종에서 부착 억제 활성을 확인하였다 (Fig. 26). 70% EtOH 추출물 73종 중에서는 진피(*C. unshin*)와 나복자(*R. satirus*)에서 응집저해활성을 나타내었다(Fig. 27). 60종의 물 추출물에서는

쑥(*P. thunbergiana*), 오가피(*A. sessiliflorum* S.), 구기자(*L. chinense* M.), 백복령(*P. cocos* W.), 토사자(*C. japonica* C.), 석창포(*A. gramineus*), 천궁(*C. officinale*), 쇠비름(*P. oleracea*), 생지황(*R. glutinosa* L.), 수국(*H. macrophylla* for. *otaksa*), 삼칠근(*P. notoginsengs*) 11종에서 부착 억제 활성을 확인하였다(Fig. 28).

실험에 사용한 추출물은 모두 0.5mg/mL의 농도였으며 이것은 O'Mahony 등[174]이 25종류의 천연 생약 추출물 중 tumeric, borage, parsley가 *H. pylori* 부착 억제에 효과가 있다고 발표한 보고에서 그 억제 농도가 50mg/mL인 것과 비교해 볼때 상당히 낮은 농도 범위에서 부착 억제 효과를 확인한 것이며 Lee 등[118]이 인삼에서 추출한 다당체의 효과적인 응집 저해활성의 범위라고 설명한 0.1-0.5mg/mL에 해당되는 농도이므로 본 실험에서 확인된 총 20종의 천연 생약 추출물은 *H. pylori*의 부착 억제에 큰 효과가 있는 것이라 생각된다.

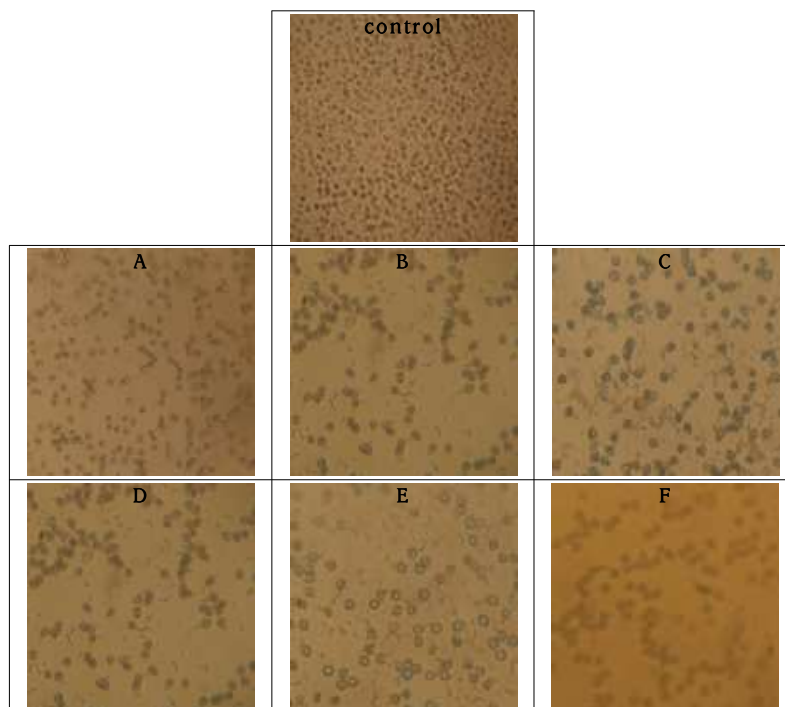


Fig. 26. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobacter pylori*. Hemagglutination was inhibited by 95% ethanol extrats from 6 medicinal plants. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*.

A: *M. vulgare*

B: *S. commixta*

C: *C. trilobus*

D: *P. amurense* R

E: *O. ficus-indica* var. *saboten*

F: *R. coreanus* M.

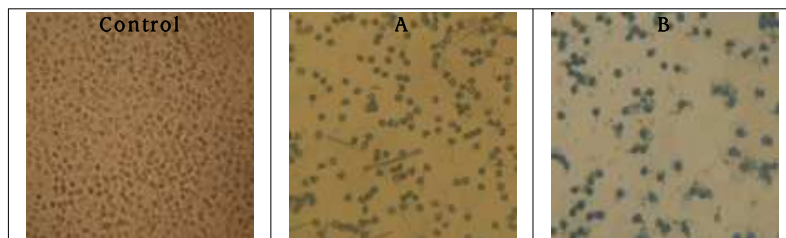


Fig. 27. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobacter pylori*. Hemagglutination was inhibited by 70% ethanol extracts from 2 medicinal plants. A positive control (without inhibitor) is shown along with *H. pylori*.

A: *C. unshin*

B: *R. satirus*

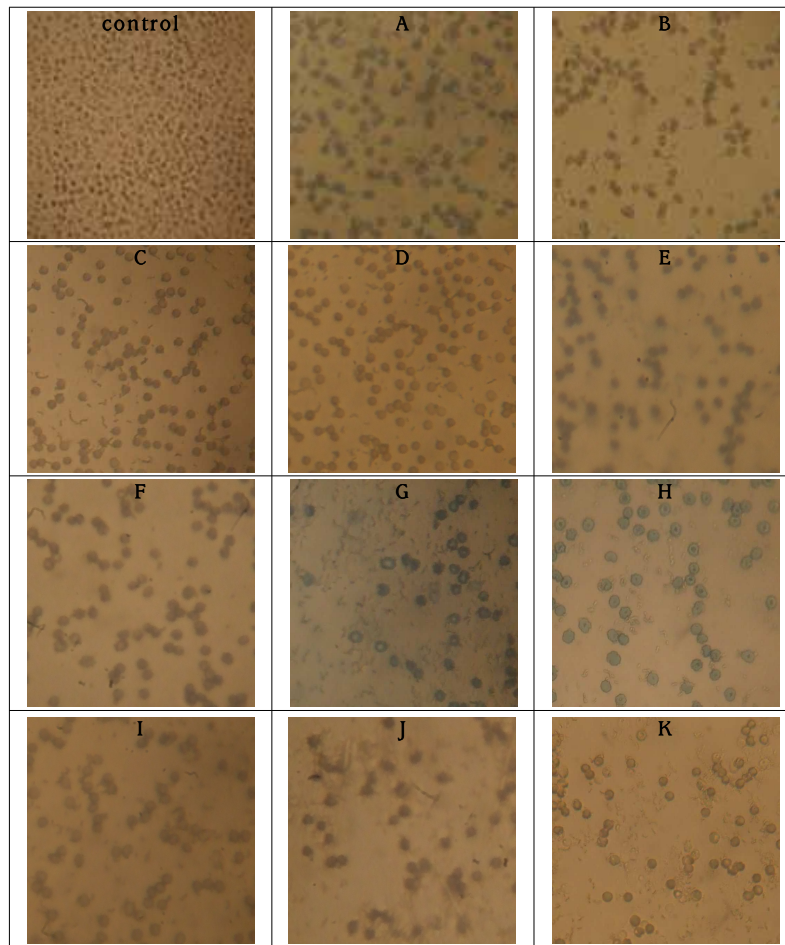


Fig. 28. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobacter pylori*. Hemagglutination was inhibited by water extrats from 11 medicinal plants. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*.

A: *P. thunbergiana*, B: *A. sessiliforun* S., C: *L. chinense* M.

D: *P. cocas* W., E: *C. japonica* C., F: *A. gramineus*

G: *C. officinale*, H: *P. oleracea*, I: *R. glutinosa* L.

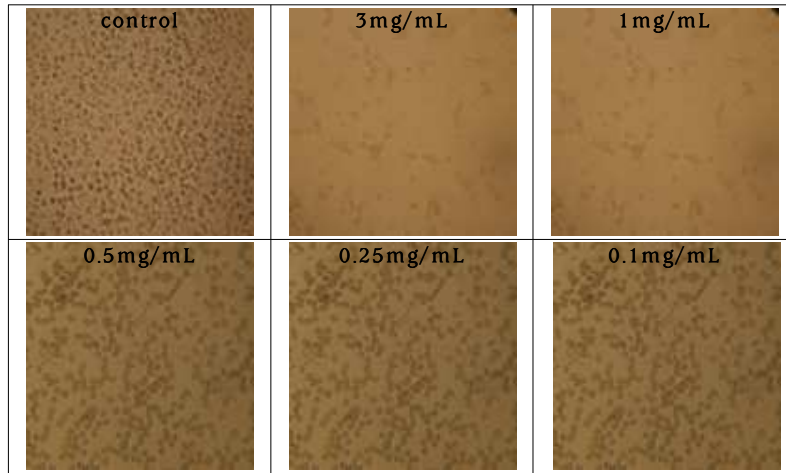
J: *H. macrophylla* for. *otaksa*, K: *P. notoginsengs*

적혈구 응집 저해 활성을 보인 천연 생약 추출물 중 저해 효과가 우수한 복분자(*R. coreanus* M, 95% EtOH ex.)와 오미자 및 흑오미자 추출물과 분획물에 대하여 0.1mg-3.0mg/mL의 다양한 농도로 적혈구 응집 저해 반응을 검색하였다.

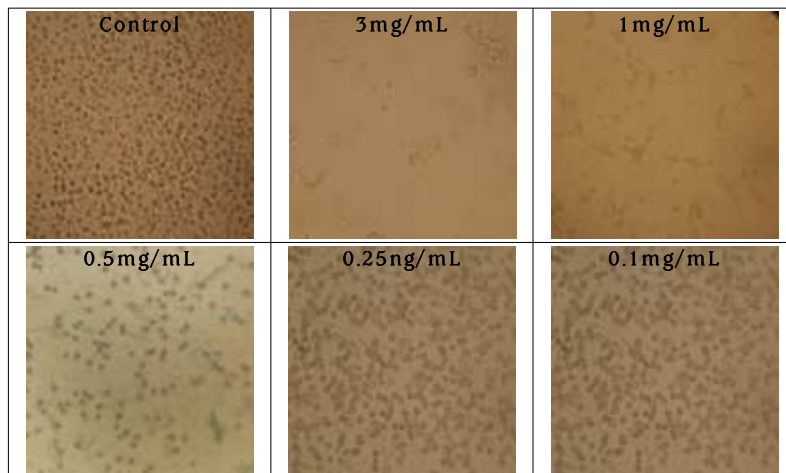
복분자를 숙성단계별로 미숙, 중숙, 완숙으로 나누어 95% EtOH로 추출하여 실험에 사용하였고 그 결과는 Fig. 29와 같다. 미숙한 복분자 추출물은 1mg/mL의 농도에서 저해 활성을 보였고 중숙 복분자 추출물은 0.5mg/mL의 농도에서 활성을 나타내었다. 완숙 복분자 추출물은 0.1mg/mL의 농도에서도 적혈구 응집 저해 활성을 보여 부착 억제가 매우 우수한 것으로 확인되었다.

오미자 추출물과 분획물의 적혈구 응집 저해 활성은 Fig. 30과 같다. EtOH 추출물과 EtOAc 분획물 모두 1mg/mL의 농도까지는 응집 저해 활성을 보였으나 0.5mg/mL의 농도에서는 EtOAc 분획물에서 약하게 저해 활성이 나타났고 EtOH 추출물에서는 활성이 나타나지 않음을 확인하였다. 한편, 흑오미자의 경우(Fig. 31) EtOH 추출물은 1mg/mL까지 활성이 나타난 반면 EtOAc 분획물이 0.25mg/mL의 농도까지 우수한 적혈구 응집 저해 활성을 나타내었다.

[A]



[B]



contineud-29

[C]

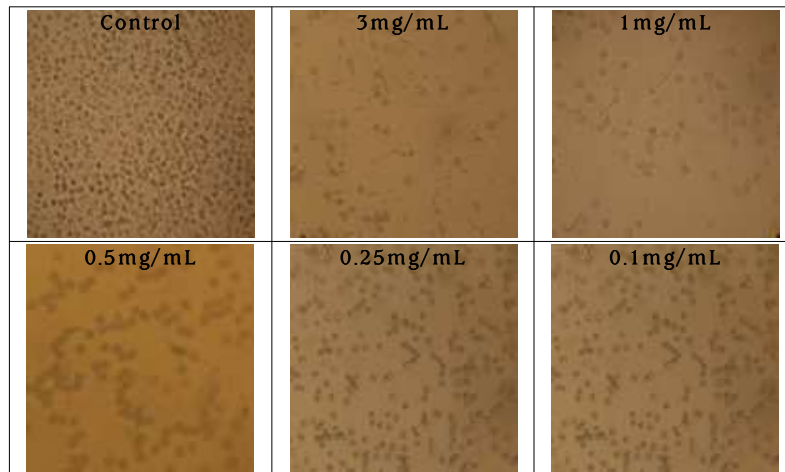
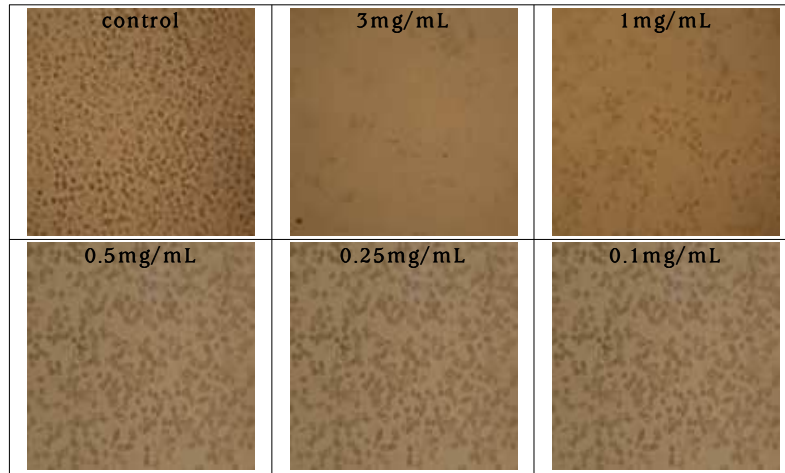


Fig. 29. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobacter pylori*. Hemagglutination was inhibited by 95% EtOH extracts of immature *Rubus coreanus* M. A positive control (without inhibitor) is shown along with *H. pylori*. [A]: immature, [B]: well-timed, [C]: ripened

[A]



[B]

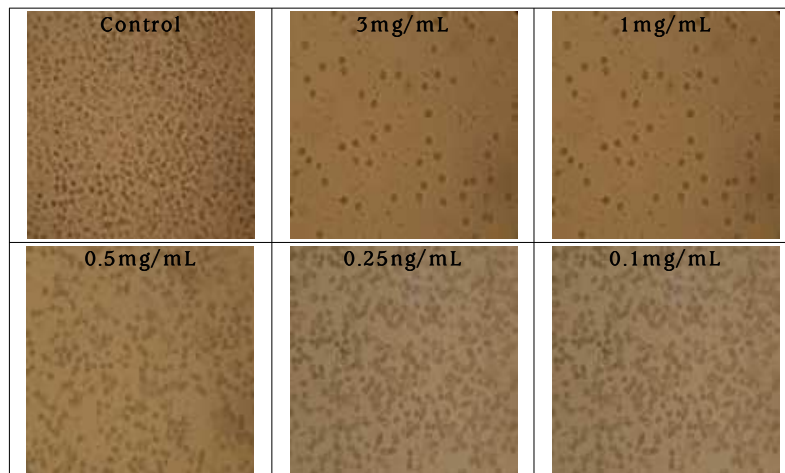
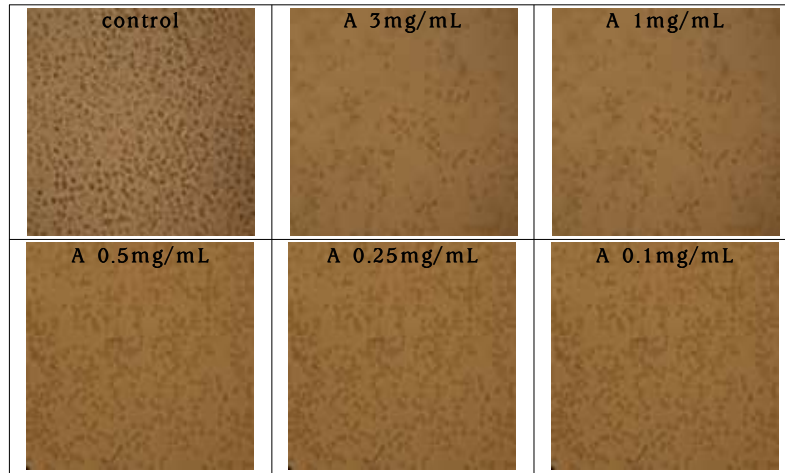


Fig. 30. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobacter pylori*. Hemagglutination was inhibited by EtOH extracts[A] and EtOAc fractions[B] of *Schizandra chinensis* Baillon. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*.

[A]



[B]

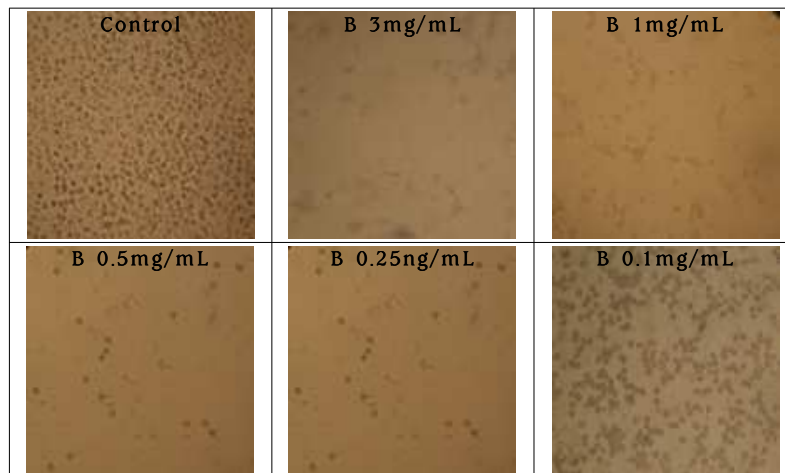


Fig. 31. Micrograph image of a hemagglutination inhibition assay by *Helicobacter pylori*. Hemagglutination was inhibited by EtOH extracts[A] and EtOAc fractions[B] of *Schizandra nigra* Max. A positive control(without inhibitor) is shown along with *H. pylori*.

본 연구에서 오미자를 포함한 188개의 천연 생약 추출물을 paper disc method로 *H. pylori*에 대한 항균활성을 측정하였으며 오미자의 항균 물질을 분리, 동정하였고 오미자의 urease 활성 저해효과와 부착억제 효과도 관찰하였다.

오미자의 항균 활성 물질로 ethyl 3- hydroxyhexanoate, ethyl 5-hydroxyhexanoate 두 개의 정유성분이 동정되었고 urease 활성 저해 효과는 AHA와 비교하여 EtOH 추출물이 27.85%, EtOAc 분획물이 35.8%로 약하긴 하나 urease 저해를 하는 것으로 확인되었다. 또한 부착 억제 실험에서는 1mg/mL의 농도에서는 적혈구 응집을 저해하는 것으로 확인되었으며 이 농도는 오미자의 MIC와 일치하였다. 따라서, 오미자는 in vitro에서 *H. pylori*를 제어할 수 있는 세 가지 측면에서 활성을 보여 *H. pylori* 관련 질환의 치료 및 예방에 화합물을 대신할만한 우수한 식품 소재 천연 추출물이라 사료된다.

그리고, *H. pylori*에 대하여 항균활성, urease 활성 저해, 부착억제 등의 다각적인 측면에서 188종의 천연 생약 추출물의 활성을 측정하였다. Paper disc method로 측정한 항균활성에서는 흑오미자(*S. nigra* M., 70% EtOH ex.), 오미자(*S. chinensis*, 95% EtOH ex.), 삼칠근(*P. notoginsengs*, water ex.) 등이 우수하였고 urease 저해 활성 측정 결과 95% EtOH 추출물 중 썸박하(*M. vulgare*), 현삼(*S. buergeriana*) 등이 AHA와 비교하여 200%이상 우수한 저해 활성을 보여주었다. 적혈구 응집 반응을 통한 부착억제 실험에서는 복분자(완숙)(*R. coreanus*)가 0.1mg/mL의 농도에서 응집 저해 활성을 보여주었다.

본 연구는 *H. pylori* 제어를 위한 세가지 측면의 활성 효과를 검토하였으며 이 결과를 바탕으로 천연추출물을 혼합한 시너지 효과를 기대해 볼 수 있을 것이다.

IV. 결 론

*H. pylori*는 사람의 위 점막에 서식하고 있으며 만성 위축성 위염, 십이지장궤양, 위궤양을 비롯하여 위암에 이르기까지 다양한 위십이지장 질환을 유발하는 원인균이다. 우리나라 성인의 46%이상, 전 세계적으로 50세 이상 성인의 50%가 감염되어있는 *H. pylori* 균을 제거하기 위한 방법으로 amoxicillin 등의 항생물질들, omeprazole 등의 proton pump inhibitors, acetohydroxamic acid 등의 urease 저해제들 및 백신 등을 중심으로 단독으로 처리하거나 2종 이상의 물질을 군별 또는 군간으로 복합처리하는 요법들이 시도되고 있지만 약제 내성균의 출현과 함께 제균율은 70% 내외를 나타내고 있고 제균제 복용자의 36% 정도가 변비, 발진, 역류성 식도염 등의 부작용을 보이는 것으로 보고 되어 있다.

최근 *H. pylori* 항생제의 높은 부작용, 제균의 어려움, 내성균의 출현 등으로 인해 천연 재료에서 항균활성을 탐색하는 연구들이 보고 되고 있다. 그러나 *H. pylori* 치료를 위해서는 어느 한쪽 측면의 효과보다 생육 억제, urease 활성 억제, 부착억제 등의 다각적인 측면에서 접근이 필요하다.

본 연구에서는 기능성식품 또는 의약품 중간원료로의 용도개발을 위한 기초연구의 일환으로 오미자를 포함하는 188종의 천연 식용 생물자원으로부터 추출한 추출물을 대상으로 *H. pylori* 항균활성을 검색하였다. 그 결과 오미자의 ethanol 추출물로부터 *H. pylori*에 대한 항균 활성 물질을 분리 동정하였다. 또한 오미자 및 188종의 천연 생약 추출물의 urease 저해활성과 적혈구 응집반응을 통한 부착억제 실험을 하여 in vitro에서 *H. pylori*에 대한 다각적인 측면의 database를 구축하고자 하였다.

1. 95% ethanol(EtOH) 추출물 55종, 70% EtOH 추출물 73종, 물 추출물

60종, 총 188종의 생약소재 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균활성을 검토하였다. 쥐오줌풀(*V. fauriei*), 오미자(*S. chinensis* B.) 95% EtOH 추출물, 흑오미자(*S. nigra* M.) 70% EtOH 추출물, 삼칠근(*P. notoginsengs*) 물 추출물에서 생육 저해 활성이 확인되었고 인진쑥(*A. capillaris* T.), 사상자(*T. japonica*), 목단피(*P. suffruticosa* A.) 70% EtOH 추출물에서도 미약한 생육저해 활성이 관찰되었다.

2. 항균력이 있는 천연 생약소재 추출물 중 그 효과가 높은 소재면서 오랫동안 한국인이 섭취해 온 오미자(*Schizandra chinensis* Baillon)를 이용하여 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 조사하였다. 오미자의 EtOH 추출물 1mg/disc, 3mg/disc, 5mg/disc 각각의 농도에서 8.0mm(paper disc ϕ 6.0mm), 15mm, 20mm의 생육저해 환이 확인되었고 EtOAc 분획물에서는 각각의 농도에 대해 각각 9.0mm, 19.0mm, 25.0mm의 생육저해 환을 나타내었다.

3. 오미자를 풍건한 후 분쇄하여 ethanol로 70℃에서 3회 반복 reflux하여 얻은 EtOH 추출물과 순차적으로 용매 분획하여 얻은 분획물의 수율은 EtOH 추출물이 39.5%, dichloromethan(MC) 분획물이 8.66%, ethylacetate (EtOAc) 분획물이 17.03%, water 분획물이 4.98%로 나타났다.

4. 오미자의 항균활성을 나타낸 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물의 *H. pylori*에 대한 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물 모두 1.0mg/mL의 농도로 결정되었다.

5. 오미자 EtOAc 분획물의 농도를 3mg/disc로 하여 100℃에서 15, 30, 60분 동안 열처리 한 후 *H. pylori*의 생육정도를 측정한 결과 모든 열처리군

에서 대조군과 차이가 거의 없는 항균 활성을 확인하였다.

또한, 오미자 EtOAc 분획물의 농도를 3mg/disc로 하여 pH를 2, 4, 6, 8로 조절하고 1시간 처리하여 항균 효과를 조사한 결과 항균활성에 pH가 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되었다.

6. 오미자 EtOH 추출물로부터 극성에 따라 계통 분획을 실시한 다음 뚜렷한 항균활성을 나타낸 EtOAc 분획을 Middle pressure liquid chromatography (MPLC)를 실시하여 peak에 따라 총 11개의 subfraction으로 분리하였다. Paper disc method에 따른 각 subfraction의 *H. pylori*에 대한 항균활성은 11개의 subfraction 중 2개의 분획물에서 각각 22.0mm, 19.0mm의 저해환을 확인하였다.

이 중 큰 저해활성을 나타낸 첫 번째 화합물은 미황색 오일성 물질로 $C_8H_{16}O_3$ 임이 확인되었다. IR spectrum 결과 hydroxy group(-OH)은 3218.61cm^{-1} , carbonyl group(C=O)은 1718.26cm^{-1} , carboxyl group(C-O)은 1179.26cm^{-1} 에서 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(CDCl_3 , 400 MHz, δ)에서 1.24ppm(s, 1H), 1.26ppm(s, 1H), 1.27ppm(s, 1H), 1.28ppm(s, 1H), 1.29ppm(s, 1H), 1.30ppm(s, 1H), 2.85ppm(q, 2H, $J=6.5$), 2.89ppm(q, 2H, $J=4.1$), 4.17ppm(q, 2H, $J=7.1$), 4.24ppm(q, 2H, $J=2.01$), 4.54ppm(d, 1H, $J=1.38$), 4.59ppm(s, 1H)의 결과를 얻었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(CDCl_3 , 100 MHz, δ)에서 173.404(C-1), 38.505(C-2), 67.172(C-3), 62.238(C-4), 61.385(C-5), 14.016(C-6), 38.458(C-1'), 14.016(C-2')의 결과를 얻었다. 종합적으로 compound1(S-EA-3)은 ethyl 3-hydroxyhexanoate로 동정되었다.

두 번째 유효 성분 역시 미황색 오일성 물질로 $C_8H_{16}O_3$ 임이 확인되었다. IR spectrum 결과 hydroxy group(-OH)은 3197.4cm^{-1} , carbonyl group(C=O)은 1712.48cm^{-1} , carboxyl group(C-O)은 1190.83cm^{-1} 에서 확인되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(CDCl_3 , 400 MHz, δ)에서 1.74ppm(d, 3H, $J=6.61$),

1.20ppm(*d*, 3H, *J*=7.02), 2.69ppm(*d*, 2H, *J*=8.34), 2.75ppm (*d*, 2H, *J*=8.28), 2.80ppm(*d*, 2H, *J*=5.98), 4.04ppm(*d*, 1H, *J*=7.1), 4.11ppm(*d*, 2H, *J*=7.11), 4.13ppm(*s*, 1H)의 결과를 얻었다. ¹³C-NMR spectrum(CDCl₃, 100 MHz, δ)에서 172.034(C-1), 61.457(C-2), 43.704(C-3), 79.696(C-4), 73.675(C-5), 40.383 (C-6), 60.732(C-1'), 40.383(C-2')의 결과를 얻었다. 종합적으로 compound2 (S-EA-5)는 ethyl 5-hydroxyhexanoate로 동정되었다.

7. 188종의 천연 생약 추출물의 urease 저해활성을 검토한 결과 36종의 천연 생약 추출물에서 저해활성 효과가 나타났으며 특히, 쓴박하(*M. vulgare*, 95% EtOH ex.)추출물과 현삼(*S. buergeriana*, 95% EtOH ex.) 추출물에서 acetohydroxamic acid를 기준으로 200% 이상의 높은 활성이 나타났으며 인동(*L. japonica*, 70% EtOH ex.), 눈꽃동충하초(*I. japonica*, water ex.) 추출물 등도 비교적 높은 저해 활성을 보였다. 생육억제에서 우수한 활성을 보인 오미자는 EtOH 추출물이 27.85%, EtOAc 분획물이 35.80% 저해하였다.

8. 적혈구 응집 저해 반응으로 188종의 천연 생약 추출물의 *H. pylori*에 대한 부착억제 활성을 조사한 결과 95% EtOH 추출물 54종 중 쓴박하(*M. vulgare*), 마가목(*S. commixta*), 땡땡이덩굴(*C. trilobus*), 황백(*P. amurense*), 선인장(*O. ficus-indica* var. *saboten*), 복분자(*R. coreanus* M.) 6종에서 적혈구 응집 저해 활성이 나타났고 70% EtOH 추출물 74종 중에서는 진피(*C. unshin*)와 나복자(*R. satirus*)에서 응집저해활성을 나타내었다. 60종의 물 추출물에서는 칩(*P. thunbergiana*), 오가피(*A. sessiliflorum* S.), 구기자(*L. chinense* M.), 백복령(*P. cocas* W.), 토사자(*C. japonica* C.), 석창포(*A. gramineus*), 천궁(*C. officinale*), 쇠비름(*P. oleracea*), 생지황(*R. glutinosa* L.), 수국(*H. macrophylla* for. *otaksa*), 삼칠근(*P. notoginsengs*) 11종에서 적혈구 응집 저해 활성을 확인하였다. 이 중 복분자를 숙성단계별

로 미숙, 중숙, 완숙으로 나누어 95% EtOH로 추출하여 적혈구 응집 저해 활성 시험을 실시한 결과 미숙한 복분자 추출물은 1mg/mL의 농도에서 저해 활성을 보였고 중숙 복분자 추출물은 0.5mg/mL의 농도에서 활성을 나타내었다. 완숙 복분자 추출물은 0.1mg/mL의 농도에서도 적혈구 응집 저해 활성을 보여 부착 억제가 매우 우수한 것으로 확인되었다. 한편, 오미자 추출물과 분획물의 적혈구 응집 저해 활성을 조사한 결과 EtOH 추출물과 EtOAc 분획물 모두 1mg/mL의 농도까지는 응집 저해 활성을 보였으나 0.5mg/mL의 농도에서는 EtOAc 분획물에서 약하게 저해 활성이 나타났고 EtOH 추출물에서는 활성이 나타나지 않았다.

본 연구는 오미자를 포함한 188종의 천연 생약추출물을 가지고 *H. pylori*의 제어를 위하여 생육 억제, urease 활성 억제, *H. pylori* 부착억제의 세가지의 측면에서 접근하였다. 생육억제 측면에서는 그 효과가 가장 높은 소재 중 하나이면서 오랫동안 한국인이 섭취해 온 오미자를 유효 소재로 선정하여 *H. pylori*의 생육 억제 유효 물질을 분리하여 동정하였고 urease 활성억제 및 *H. pylori* 부착억제 측면에서는 188종의 천연 생약 추출물 중 우수한 활성을 갖는 몇가지 추출물을 선별, 제시하였다. 본 연구 결과는 *H. pylori*의 제어를 위한 in vitro 실험의 database가 되며 오미자를 위시로 우수한 활성이 밝혀진 추출물들을 적절하게 혼합하여 *H. pylori* 억제 활성에 시너지 효과를 기대해 볼 수 있는 훌륭한 자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

Reference

1. Kim HY: What is the most important factor for gastric carcinogenesis in Koreans: *Helicobacter pylori*, host factor or environmental factor? *Korean J. Gastroenterol.* 49: 60-71 (2007)
2. Yearly report of Korean on cancer development(1991. 1. 1. - 1999. 12. 31.). Ministry of health and welfare for Korean government. (2000)
3. Yearly statistical report on causes of death(1991. 1. 1. - 1999. 12. 31.). Korean national statistical office (2000)
4. Parsonnet J: The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 9: 45-52 (1995)
5. Pounder RR: The prevalence of *Helicobacter pylori* in different countries. *Aliment Pharmacol Ther.* 9: 33-40 (1995)
6. Kim JH, Kim HY and Kim NY: Seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic people in South Korea. *J. Gastroenterol Hepatol.* 16: 969-975 (2001)
7. International Agency for Research of Cancer, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of human (Vol. 160) infection with *Helicobacter pylori*. Lyon: 170-240 (1994)
8. Warren JR and Marshall BJ: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273-1275 (1983)
9. Dunn BE, Cohen H and Blaser MJ: *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 720-741 (1997)
10. Marshall BJ: History of the discovery of *Campylobacter pylori*. p.7-24 In M.J. Blaser(ed.), *Campylobacter pylori* in gastritis and

- peptic ulcer disease, Igaku Shoin publishers, New York, N.Y. (1989)
11. Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, DiMugno EP, Carpenter HA, Perez-Perez GI and Blaser MJ: Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *J. Natl. Cancer Inst.* 83:1734-1739 (1991)
 12. Forman D, EG Newell, F. Fullerton, JW Yarnell, AR Stacey, N. Wald and F. Sitas: Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br. Med. J.* 302: 1302-1305 (1991)
 13. Nomura A, GN Stemmermann, PH Chyou, I Kato, GI Perez-perez and MJ Braser: *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 325: 1132-1136 (1991)
 14. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N and Sibley RK: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325: 1127-1131 (1991)
 15. Anonymous. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 61: 1-241 (1994)
 16. 김태한. *Helicobacter pylori*와 관련기술의 연구개발동향. 기술동향분석 보고서. 한국과학기술정보연구원. (2003)
 17. McGowan CC, Cover TL and Blaser MJ: *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic imolications. *Gastroenterology* 110: 926-938 (1996)
 18. Josenhans C, A Labigne and S. Superbaum: Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits. Fla A

- and Fla B, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J. Bacteriol.* 177: 3010–3020 (1995)
19. Suerbaum S, C Josenhans and A Labigne. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* Fla b flagellin genes and construction of H. pylori Fla a- and Fla b- negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* 175: 3278–3288 (1993)
 20. Dunn BE, GP Campbell, GI Perez-Perez and MJ Blaser: Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 265: 9464–9469 (1990)
 21. Eaton KA, CL Brooks, DR Morgan and S. Krakowka: Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 59: 2470–2475 (1991)
 22. Hawtin PR, AR Stacey and DG Newell: Investigation of the structure and localization of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1995–2000 (1990)
 23. Eaton KA and S Krakowka: Effect of gastric pH on urease dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62: 3604–3607 (1994)
 24. Evans DJ, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN and Kviety PR: Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* 63: 2213–2220 (1995)
 25. Replogie ML, Glaser SL, Hiatt RA and Parsonnet J: Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *Am J. Gastroenterol.* 142: 856–863 (1995)

26. Choi KH, Lee SH and Park YH: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among Korean adults in Pusan. *Korean J. Gastroenterol.* 28: 758-763 (1996)
27. Song JB, Lee SH, Shin YM, Choi KH, Lee SD and Park YH: Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients without gastric symptoms. *Korean J. Gastroenterol.* 29: 310-326 (1997)
28. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Petez-petez GI and Blaser MJ: *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Agericans in Hawaii. *N Engl J. Med.* 325: 1132-1136 (1991)
29. Parsonnet J: *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut.* 43: 56-59 (1998)
30. Jang MK, Kim HY and Cho BD: Prospective study for the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric ulcer and duodenal ulcer among Korean population. *Korean J. Med.* 52: 457-464 (1997)
31. Kim HY, Kim JS and Park SJ: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in spouses and its clinical significance. *Korean J. Gastroenterol* 31: 740-747 (1998)
32. Chang YW, Han YS and Lee DK: Role of *Helicobacter pylori* infection among offspring or siblings of gastric cancer patients. *Int. J. Cancer* 101: 469-474 (2002)
33. Suerbaum S and Michetti P: *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl J. Med* 347: 1175-1186 (2002)
34. de Boer W, Driessen W, Jansz A and Tytgat G: Effect of acid suppression on efficacy of treatment for *Helicobacter pylori*

- infection. *Lancet*. 345:817-20 (1995)
35. de Boer WA, Van Etten RJ, Van De Wouw BA, Schneeberger PM, Van Oijen AH and Jansen JB. Bismuth-based quadruple therapy for *Helicobacter pylori* - a single triple capsule plus lansoprazole. *Aliment Pharmacol Ther*. 14:85-89 (2000)
36. Dickey W, Kenny BD and McConnell JB: Effect of proton pump inhibitors on the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Aliment Pharmacol Ther*. 10:289-293 (1996)
37. Peterson WL, Ciociola AA, Sykes DL, McSorley DJ and Webb DD: Ranitidine bismuth citrate plus clarithromycin is effective for healing duodenal ulcers, eradicating *H. pylori* and reducing ulcer recurrence. RBC *H. pylori* Study Group. *Aliment Pharmacol Ther*. 10:251-261 (1996)
38. Wolle K and Malfertheiner P: Treatment of *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 21:315-324 (2007)
39. Treiber G, Malfertheiner P and Klotz U: Treatment and dosing of *Helicobacter pylori* infection: when pharmacology meets clinic. *Expert Opin Pharmacother*. 8:329-350 (2007)
40. Kim NY: The effect of antibiotic resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Korean J. Gastroenterol* 47: 82-86 (2006)
41. Huang JQ and Hunt RH: Treatment after failure: the problem on "non-responders". *Gut*. 45: 40s-44s (1999)
42. Laheij RJ, Rossum LG, Jansen JB, Straatman H and Verbeek AL: Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection—a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 857-864 (1999)

43. Perri F, Qasim A, Marras L and Q' Morain C: Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 8: 53-60 (2003)
44. Peitz U, Hackelsberger A and Malfertheiner P: A practical approach to patients with refractory *Helicobacter pylori* infection, or who are re-infected after standard therapy. *Drugs*. 57:906-920 (1999)
45. Deltenre M, Ntounda R, Jonas C and De Koster E: Eradication of *Helicobacter pylori*: why does it fail? *Ital J. Gastroentero Hepatol* 30:3 26s-328s (1998)
46. Graham DY: Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology* 115: 1272-1277 (1998)
47. de Boer WA and Tytgat GN: Regular review: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 320: 31-34 (2000)
48. Axon AT: Treatment of *Helicobacter pylori*: an overview. *Aliment pharmacol Ther* 14: 1-6 (2000)
49. Peitz U, Sulliga M and Wolle K: High rate of post-therapeutic resistance after failure of microlide-nitroimidazole triple therapy cure *Helicobacter pylori* infection: impact of two second-line therapies in a randomized study. *Aliment pharmacol Ther.* 16: 315-324 (2002)
50. Korean *Helicobacter pylori* Study Group: Diagnosis and treatment for *Helicobacter pylori* infection in Korea. *Korean J. Gastroenterol* 32: 275-289 (1998)
51. Gisbert JP, Boixeda D and Bermojo F: Re-treatment after *Helicobacter pylori* eradication failure. *Eur J. Gastroenterol Hepatol* 11: 1049-1054 (1999)
52. Elizalde IR, Borde F, Jara C, Martinez A, Rodfiguez C and Jimenez J: Efficiency of two consecutive treatments in the eradication of

- Helicobacter pylori* (in Spanish). *Med Clin(Bare)* 114: 185-195 (2000)
53. Gomollon F, Ducins JA and Ferrero M: Quadruple therapy is effective for eradication *Helicobacter pylori* after failure of triple proton pump inhibitor-based therapy: a detailed, prospective analysis of 21 consecutive cases. *Helicobacter* 4: 222-225 (1999)
54. Gasbarrini A, Ojetti V and Pitocco D: Efficacy of different *Helicobacter pylori* eradication regimens in patients affected by insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J. Gastroenterol* 35: 260-263 (2000)
55. Lee JM, Breslin NP, Hyde DK, Buckley MJ and O'Morain CA: Treatment options for *Helicobacter pylori* infection when proton pump inhibitor-based triple therapy fails in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther.* 13: 489-496 (1999)
56. Gisbert JP, Gesbert JL, Marcos S, Gravalos RG, Capio D and Pajares JM: Seven-day 'rescue' therapy after *Helicobacter pylori* treatment failure: omeprazole, bismuth, tetracycline and metronidazole vs. ranitidine bismuth citrate, tetracycline and metronidazole. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 1311-1316 (1999)
57. Perri F, Festa V and Clemente R: Randomized study of two 'rescue' therapies for *Helicobacter pylori*-infected patients after failure of standard triple therapies. *Am J. Gastroenterol* 96: 58-62 (2001)
58. Sicilla B, Sierra E, Lago A, Villar M, Garcin S and Gomollon F: High eradication rates in *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer who failed previous eradication therapy (in Spanish). *Med Clin (Bare)* 115: 641-643 (2000)

59. Bacna JM, Lopez C, Rams F, Garcia M, Rosario M and Teruel J: Efficacy of a multistep strategy for *Helicobacter pylori* eradication: quadruple therapy with omeprazole, metronidazole, tetracycline and bismuth after failure of a combination of omeprazole, clarithromycin and amoxicillin (in Spanish). *Med Clin (Bare)* 115: 617-619 (2000)
60. Michopoulos S, Tsibouris P and Bouzakis H: Randomised study comparing omeprazole with ranitidine as anti-secretory agents combined in quadruple second-line *Helicobacter pylori* eradication regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 737-744 (2000)
61. Cheon JH, Kim N and Lee DH: Trial of moxifloxacin containing triple therapy after initial and second-line treatment failures for *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Gastroenterol* 45: 111-117 (2005)
62. Mantzaris GJ, Petraki K and Archavlis: Omeprazole triple therapy versus omeprazole quadruple therapy for healing duodenal ulcer and eradication of *Helicobacter pylori* infection: a 24-month follow-up study. *Eur J. Gastroenterol Hepatol* 14: 1237-1243 (2002)
63. Canducci F, Ojetti V, Pola P, Gasbarrini G and Gasbarrini A: Rifabutin-based *Helicobacter pylori* eradication 'rescue' therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 15: 143 (2001)
64. Wong WM, Gu Q and Lam SK: Randomized controlled study of rabeprazole, levofloxacin and rifabutin triple therapy vs. quadruple therapy as second-line treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 17: 553-560 (2003)
65. Bae EA, Han MJ, Kim NJ and Kim DH: Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biol Pharm Bull*. 21: 990-992 (1998)

66. Bae EA, Han MJ, Baek NI and Kim DH: In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of panaxytriol isolated from ginseng. *Arch Pharm Res.* 24: 297-299 (2001)
67. Bae EA, Han MJ and Kim DH: In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity irisolidone isolated from the flowers and rhizomes of *Pueraria thunbergiana*. *Planta Med.* 67: 161-163 (2001)
68. Bae EA, Han MJ and Kim DH: In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med.* 65: 442-443 (1999)
69. Lee JJ, Kim SH, Chang BS, Lee JB, Huh CS, Kim TJ and Baek YJ: The Antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 764-770 (1999)
70. Lee JK and Yoon JW: Determination and characterization of inhibitory activity of mycelial extracts from several Korean mushrooms against *Helicobacter pylori*. *Kor. J. Micrology.* 32: 142-144 (2004)
71. Ha YD: Antitumoral, antioxidant and antimicrobial activities of solvent fraction from *Grifola umbellatus*. *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.* 8: 481-487 (2001)
72. Yoon YS, Lee SH, Baek NI, Kim HY and Park CH: Inhibition of cell growth and urease activity of *Helicobacter pylori* by medicinal plant extracts. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 187-191 (2004)
73. Park CE and Park CH: Inhibition of urease activity of *Helicobacter pylori* by *Artemisia asiatica* Nakai. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 348-351 (2004)
74. Cho YJ, Chun SS, Yoon SJ, Kim TW and Choi WK: Screening of

- the antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* from herb plants. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 161-165 (2005)
75. Kim JH, Yoon SJ and Cho YJ: Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and actioxidant activity of Yerusalem sage (*Phlomis fructosa* L.). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 178-182 (2005)
76. Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S and Skaltsa H: In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greeck herbal medicines. *J. Ethnopharmacology.* 88: 175-179 (2003)
77. Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R, Cannatelli MA, Marzio L and Alonzo V: Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* 19: 198-202 (2005)
78. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY and Tan RX: In vitro anti-*Helicobacter pylori* action fo 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer disease. *J. Ethnopharmacology* 98: 329-333 (2005)
79. Ibrahim M, Khan AA, Tiwari SK, Habeeb MA, Khaja MN and Habibullah CM: Antimicrobial activity of *Spanidus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H. pylori*: In vitro and in vivo studies. *World J. Gastroenterol.* 12: 7136-7142 (2006)
80. Jonkers D, van den Broek E, van Dooren L, Thijs C, Dorant E, Hageman G and Stobberingh E: Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrobial chemotherapy* 43: 837-839 (1999)
81. O' Gara EA, Hill DJ and Maslin DJ: Activities of galic oil, galic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*.

- Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2269–2273 (2000)
82. Chatterjee A, Yasmin T, Bagchi D and Stohs SJ: Inhibition of *Helicobacter pylori* in vitro by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 265: 19–26 (2004)
83. Vatter DA, Lin YT, Ghaedian R and Shetty K: Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry.* 40: 1583–1592 (2005)
84. Gadhi CA, Benharref A, Jana M and Lozniewski A: Anti-*Helicobacter pylori* activity of Aristolochia paicunervis Pomel extracts. *J. Ethnopharmacology.* 75: 203–205 (2001)
85. Stete PW, Davicino RC, Vega AE, Casali YA, Correa S and Micalizzi B: Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav(jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine.* 131: 724–727 (2006)
86. Tabak M, Armon R and Neeman I: Cinnamon extracts inhibitory effect of *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacology.* 67: 269–277 (1999)
87. Shin IS, Madusa H and Naohide K: Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *International J. Food Microbiology.* 94: 255–261 (2004)
88. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholrus I, Stephenson KK, Talalay P and Lozniewski A: Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *PNAS* 99: 7610–7615 (2002)

89. Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M and Colwell RR: Antibacterial activity of black myrobalab (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *International J. Antimicrobial Agents* 18: 85-88 (2001)
90. Park BS, Lee HK, Lee SE, Piao XL, Takeoka GR, Wong RY, Ahn YJ and Kim JH: Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacology*. 105: 255-262 (2006)
91. Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M and Castro AD: In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 680-686 (2007)
92. Chae SG, Kim SH, Shin DH, Oh HG, Lee SJ, Chang YH and Choi Y: Food Chemistry. Publishing Hyo-II, Seoul, Korea (2000)
93. Kim TS: *The plant of Korea*. Seoul national univ. Publishing. Seoul. p. 297-301 (1996)
94. Chung KH, Lee SH, Lee YC and Kim JT: Antimicrobial activity of Omija(*Schizandra chinensis*) Extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 127-132 (2001)
95. 첨단기술을 이용한 자생오갈피, 오미자류의 유전자원 수집동정 및 우량 품종 개발. 최종연구보고서. 국립산림과학원 (2004)
96. Ikeya Y, Taguchi H, Yosioka I and Kobayashi H: The constituents of *Schizandra chinensis* B. I. isolation and structure determination of five new lignans gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandran. *Chem. Pharm. Bull.* 26: 3257 (1978)
97. Ikeya Y, Taguchi H, Yosioka I and Kobayashi H: The constituents of *Schizandra chinensis* B. II. isolation and structure determination

- of five new lignans, gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandran. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 1383 (1979)
98. Ikeya Y, Taguchi H and Yosioka I: The constituents of *Schizandra chinensis* B. III. isolation and structure determination of five new lignans, gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandran. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 2536 (1979)
99. Ikeya Y, Taguchi H Yosioka I and Kobayashi H: The constituents of *Schizandra chinensis* B. IV. isolation and structure determination of five new lignans, gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandran. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 2695 (1979)
100. Ikeya Y, Taguchi H, Yosioka I, Itaka Y and Kobayashi H: The constituents of *Schizandra chinensis* B. V. isolation and structure determination of five new lignans, gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandran. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 1395 (1979)
101. Shon HJ, Bock JY, Baik SO and Kim YH: Determination of lignan compounds in fruits of *Schizandra chinensis* BAILLON by capillary-GC(FID). *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32: 350-356 (1989)
102. Kim KI, Nam JH and Kwon TW: On the proximate composition organic acid and anthocyanins of omija, *Schizandra chinensis* Baillon. *Korean J. Food Sci. Technol.* 5: (1973)
103. Kim OC and Chang HJ: Volatile components of *Schizandra chinensis* Baillon. *Agric. Chem. Biotech.* 37: 30-36 (1994)
104. Li XN, Cui H, Song YQ, Liang YZ and Chau FT: Analysis of volatile fractions of *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill. using GC-MS and chemometric resolution. *Phytochem. Anal.* 14: 23-33 (2003)

105. Chung KH, Lee SH, Lee YC and Kim JT: Antimicrobial activity of Omija (*Schizandra chinensis*) extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 127-132 (2001)
106. Lee SH and Lim YS: Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 239-243 (1998)
107. Lee JY, Min YK and Kim HY: Isolation of antimicrobial substance from *Schizandra chinensis* Baillon and antimicrobial effect. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 389-394 (2001)
108. Jung GT, Ju IO, Choi JS and Hong JS: The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J. Food Sci Technol.* 32: 928-935 (2000)
109. Baek NI, Han JT, Ahn EM, Park JK, Cho SW, Jeon SG, Jang JS, Kim JK and Choi SY: Isolation of anticonvulsant compounds from the fruits of *Schizandra chinensis* Baill. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 72-77 (2000)
110. Rho SN and Oh HS: Effect of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts on the growth of liver cancer cell line SNU-398. *J. Korean Nutr. Soc.* 35: 201-206 (2002)
111. Min YK, Jeon JK, Kim SG and Chang KW: Inhibitory effects of *Schizandra chinensis* extracts on the growth and adsorption to salicylate-coated HA beads of some oral bacteria. *J. Korean Acad Dent Health* 25: 165-183 (2001)
112. Lee CY and Kim YJ: Natural spice and tar pigment. Hyangmoon Publishing. Seoul. p. 95-101 (1987)

113. Shin YS: *Natural food of health*. Munmin Publishing. Seoul. p. 233-237 (1983)
114. Conner DE and Beuchat LR: Effect of essential oils from plants of growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.* 49: 429-435 (1984)
115. Malekzadch F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M and Colwell RR: Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Rctz) against *Helicobacter pylori*. *International J. Antimicrobial Agents* 18: 85-88 (2001)
116. Yang SW, Ho JN, Lee YH, Shin DH, Hong BS and Cho HY: Isolation and characterization of *Helicobacter pylori* urease inhibitor from *Rubus coreanus* Miquel. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 769-777 (2004)
117. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* 10: 2606-2616 (1971)
118. Lee JH, Shim JS, Lee JS, Kim MK, Chung MS and Kim KH: Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax ginseng* with selective antiadhesice activity against pathogenic bacteria. *Carbohydrate Res.* 341: 1154-1163 (2006)
119. Cho CH, Lee JC, Kim HY, Kim KS, Ahn TJ and Han OK: Odor chracteristics of essential oil of *Valeriana fairueu* var. *dasycarpa* HARA. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 4: 31-37 (1996)
120. Cho YH and Chiang MH: Essential oil composition and antibacterial activity of *Astemisia capillaris*, *Artemisia argyi* and *Artemisia princeps*. *Kor. J. Intl. Agri.* 13: 313-320 (2001)
121. Yook CS, Kim DH, Kang SG, Park SY and Ro DS: The Microbial

- Activity of Herbal Drugs and Studies on the Essential Oils of Artemisia and Torilis Genus. *Bull. K.H. Pharma. Sci.* 22: 85-99 (1994)
122. Park HJ and Choi MY: In vitro antiinflammatory activity of paeonol from the essential oil and its derivative methylpaeonol. *Kor. J. Pharmacol.* 36: 116-120 (2005)
123. Park UK, Chang DS and Choi HR: Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Korean Soc. of Food Sci. Nutr.* 21: 91-95 (1994)
124. Pino JA, Rosado A, Baluja R: Analysis of natural citrus aqueous essences. *Food/Nahrung* 32: 823-830 (1988)
125. Barron D and Etievant PX: The volatile constituents of strawberry jam. *Z. Lebensm Unters Forsch* 191: 279-285 (1990)
126. Adedeji J, Hartman TG, Rosen RT and Ho CT: Free and glycosidically bound aroma compounds in Hog Plum (*Spondias mombins* L.) *J. Agric. Food Chem.* 39: 1494-1497 (1991)
127. Allegrone G and Barbeni M: Identification of volatile components of Caja Friut (*Spondias lutea* L.) and chiral analysis of 3-hydroxy alichatic ester. *Flavour Fragr. J.* 7: 337-342 (1992)
128. Jordan MJ, Tandon K, Shaw PE and Goodner KL: Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry(GC-O). *J. Agric. Food Chem.* 49: 4813-4817 (2001)
129. Pino JA, Marbot R, Rosado A and Vazquez C: Volatile constituents of Malay rose apple (*Syzygium malaccense* L. Merr. & Perry). *Flavour Fragr. J.* 19: 32-35 (2004)
130. Pino JA, Almora K and Marbot R: Volatile components of papaya

- (*Carica papaya* L., Maradol variety) fruit. *Flavour Fragr. J.* 18: 492-496 (2003)
131. Nanduri VB, Hanson RL, Goswami A, Wasylyk JM, Laporte TL, Katipally K, Chung HJ and Patel RN: Biochemical approaches to the synthesis of ethyl 5-(S)-hydroxyhexanoate and 5-(S)-hydroxyhexane nitrile. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 632-636 (2001)
132. Buchbauer G: Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z. Naturforschc* 46: 1067-1072 (1991)
133. Zheng G, Kenny PM and Lam LKT: Potential anticarcinogenic natural products isolated from lemongrass oil and galanga root oil. *J. Agric. Food Chem.* 41: 153-356 (1993)
134. Lawless J: The illustrated encyclopedia of essential oil. Element books Ltd. Shafesbury. UK. (1995)
135. Deans SG and Waterman PG: Biological activity of volatile oils In *Volatile Oils*. Edt. Hay and waterman. p97-111 (1993)
136. Kang JM, Cha IH, Lee YK and Ryu HS: Identification of Volatile Essential Oil, and Flavor Characterization and Antibacterial Effect of Fractions from *Houttuynia cordata* Thunb II. Flavor Characterization and Antibacterial Effect of Fraction from *Houttuynia cordata* Thunb by Prep - HPLC. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 214-221 (1997)
137. Kim YG, Jo JS and Moon CK: Antimicrobial Activities and Components Analysis of the Essential Oil from *Abies koreana* Wilson. *Agric. Biosci. Res. Kyungsang univ.* 32: 7-14 (1998)
138. Yoo MJ, Kim YS and Shin DH: Antibacterial effects of natural essential oils from various spices against *Vibrio* sp. and their volatile

- constituents. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 438-443 (2006)
139. Bergonzelli GE, Donnicola D, Porta N and Corthesy-Theulaz IE: Essential oil as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* Infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 3240-3246 (2003)
140. Lattanzio V, De Cicco V, Di Venere D, Lima G and Salerno M: Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage, *Ital. J. Food Sci.* 1:23-30 (1994)
141. Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H and Weis N: Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Ess. Oil Res.* 1: 119-128 (1989)
142. Otha T, Shibata H, Kawamori T, Iimuro M, Sugimura T and Wakabayashi K: Marked reduction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by urease inhibitors, acetohydroxamic acid and flurofamide, in Mongolian gerbils. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 728-733 (2001)
143. Kim JI, Baik SC, Cho MH, Lee WK and Rhee KH: Purification of the urease of *Helicobacter pylori* and production of monoclonal antibody to the urease of *Helicobacter pylori* (in Korean). *J. Korean Soc. Microbiol.* 26: 531-540 (1991)
144. Park CK, Lee WK, Doh YM, Cho MJ and Rhee KH: Development of diagnostic method of *Helicobacter pylori* infection: I. Molecular cloning and DNA sequencing of urease (in Korean). *J. Korean Soc. Microbiol.* 26: 541-552 (1991)
145. 출원번호 제 10-0051304: 항인플루엔자 바이러스제 및 그것을 포함하는 조성물과 음식물. 가부시끼가이샤 룩데 (2003-07-25)

146. Kariotia A, Protopappaa A, Megoulasb N and Skaltsa H: Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorg. Med. Chem* 15: 2708–2714 (2007)
147. Sahpaza S, Garbackib N, Titsb M and Bailleul F: Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacology* 79: 389–392 (2002)
148. De Jesus RA, Cechinel-Filho V, Oliveira AE and Schlemper V: Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*. 7: 111–115 (2000)
149. Hahn SH and Chae YA: Production and Rooting of Shoots in Bioreactor Culture of *Scrophularia buergeriana* Miquel. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 8:117–122 (2000)
150. Kim SR, Kang SY, Lee KY, Kim SH, Markelonis GJ, Oh TH and Kim YC: Anti-amnestic activity of E-p-methoxycinnamic acid from *Scrophularia buergeriana*. *Brain Res Cogn Brain Res.* 72: 454–461 (2003)
151. Kim SR, Lee KY, Koo KA, Sung SH, Lee NG, Kim J and Kim YC: Four new neuroprotective iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* roots. *J Nat Prod.* 65: 1696–1699 (2002)
152. Kim SR and Kim YC: Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of *Scrophularia buergeriana*. *Phytochemistry.* 54: 503–509 (2000)
153. Kim SR, Koo KA, Sung SH, Ma CJ, Yoon JS and Kim YC: Iridoids from *Scrophularia buergeriana* attenuate glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures. *J Neurosci Res.* 74: 948–955. (2003)

154. Lee EJ, Kim SR, Kim J and Kim YC: Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl₄-induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. *Planta Med.* 68: 407-411 (2002)
155. Lee YS: The Korean Herbal Pharmacopoeia. Korea Food and Drug Administration. Seoul. 304 (2002)
156. Lee SJ, Shin EJ, Son KH, Chang HW, Kang SS and Kim HP: Anti-inflammatory activity of the major constituents of *Lonicera japonica*. *Arch. Pharma. Res.* 18: 133-135 (1995)
157. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang YH, Kim HD and Choi BT: Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF- κ B activation through reducing I- κ B α degradation in rat liver. *Int. J. Mol. Med.* 7: 79-83 (2001)
158. Han DS, Baek KH, Kim YO, Choi KW, Kwang JS and Baek SH: Development of anticancer agents from Korean medicinal plants. part 6. Cytotoxic activity of the ethyl acetate soluble fraction of *Lonicerae flos* against human oral epitheloid carcinoma cells. *Kor. J. pharmacogn.* 29: 22-27 (1998)
159. Jung DY, Lee HY, Ha HK, Jung DY, Kang SS and Kim JS: Induction of growth hormone release by the extracts of *Lonicera japonica* THUNB. *Kor. J. pharmacogn.* 34: 256-262 (2003)
160. Kobayashi Y and Shimizu D: Iconography of vegetable wasps and plant worms. Hoikushs Pub. Co. Ltd. Osaka. 280 (1983)
161. Samson RA, Evans HC and Latge JP: Atlas of entomopathogenic fungi. Springer. Heidelberg. 189 (1988)

162. Zhu JS, Halpern GM and Jones K: The scientific rediscover of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*. Part I. *J. Altern. Complement. Med.* 4: 289-303 (1998)
163. Zhu JS, Halpern GM and Jones K: The scientific rediscover of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*. Part II. *Ibid* 4: 429-457 (1998)
164. Shim JY, Lee YS, Lim SS, Shin KH, Hyun JE, Kim SY and Lee EB: Pharmacological activities of *Peacilomyces japonica*, A New Type *Corduceps* sp. *Kor. J. Pharmacogn.* 31: 163-167 (2000)
165. Lee BW, Lee MS, Park KM, Kim CH, Ahn PU and Choi CU: Enzymes , Metabolites ; Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Appl. Micorbiol, Biotechnol* 20: 311-315 (1992)
166. Lee SJ, Mun SH, Kim T, Kim JY, Seo JS, Kim DS, Kim YLA, Kim YJ and Park YI: Anticancer and antioxidant activity of *Coriolus versicolor* culture extracts cultivated in the Citrus extracts. *J. Appl. Micorbiol, Biotechnol* 31: 367-367 (2003)
167. Go JB and Choe MA: Effect of liquid culture of *Coriolus versicolor* on lipid metabolism, protein level and enzyme activities in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33:512-517 (2003)
168. Pope AJ, Toseland CD, Rushant B, Richardson S, Mcvey M and Hills J: Effet of potent urease inhibitor, fluorofamide, on *Helicobacter* sp. in vivo and in vitro. *Dig Dis Sci.* 43: 109-119 (1998)
169. Star RA, Gillin AD, Parikh VJ and Sands JM: The urease inhibitor acetohydroxamic acid is transported by the urea pathway in rat terminal IMCD. *Am J Physicol.* 265: 385-390 (1993)

170. Park JB, Imamura L and Kobashi K: Kinetic studies of *Helicobacter pylori* urease inhibition by a novel proton pump inhibitor, rabeprazole. *Biol Pharm Bull.* 19: 182-187 (1996)
171. Nagata K, Takagi E, Satoh H, Okamura H and Ramura T: Growth inhibition of *Ureaplasma urealyticum* by the proton pump inhibitor lansoprazole: direct attribution to inhibition by lansoprazole of urease activity and urea-induced ATP synthesis in *U. urealyticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2187-2192 (1995)
172. Itzhak O and Ronald J: Bacterial adhesion to cells and tissue, *Chapman and Hall*. Doyle (1994)
173. Koo JK and Choi TB: Studies on adherence inhibition and detachment of *Helicobacter pylori* using egg yolk IgY and additives. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16: 41-47 (2001)
174. O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J and Basset C: Bacterial and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.* 47: 7499-7507 (2006)

Abstract

Antibacterial activities of medicinal herbs including *Schizandra chinensis* Baillon. against *Helicobacter pylori*

Park, Ju-Yeon

Department of Food and Nutrition

Graduate school

Sungshin Women's University

Approximately 46% of the Korean adults and 50% of over 50-year-old adults in the world are reported of infection by *Helicobacter pylori*. In order to remove this bacteria some antibiotics (i.e., amoxicillin), proton pump inhibitors (i.e., omeprazole), urease inhibitors (i.e., acetohydroxamic acid), and vaccines are presently treated singularly or complexly. But these medical treatments causes medicine-resistant *H. pylori* and and the patients treated with this medicine show some side effects of constipation, eruption, or reflux esophagitis.

What we call *Schizandra chinensis* in general indicates fruit of *S. chinensis* Baillon. In oriental medicine and folk remedies, fruit of *S. chinensis* Baillon is used for nutrition. As food, it, exactly, its pigment, is used to make a kind of pattern-pressed candy (made from starch)

or rice cake after being soaked in water. It is also used to make tea, wine or juice. Most of the existing researches of *S. chinensis* Baillon were focused on its ingredients, and in relation to its functions, there were some papers reporting that it lowers hyperlipidemia and that it is effective for protection of liver cells, for antioxidation, and for antibiosis.

Recently, some researches of examining antibiotic activities of natural materials are being reported because *H. pylori* antibiotics have high side effects. This paper examined antibiotic activities against *H. pylori*, targeting the extracts from 188 kinds of natural edible biological resources. As a result of it, *S. chinensis* Baillon was finally selected as a final test sample. As a part of a basic study for development of functional food or of an intermediary material of a medicine by use of *S. chinensis* Baillon, this paper examined antibiotic activities of the ethanol extracts of *S. chinensis* Baillon against *H. pylori* and separated and identified the active substances.

In addition, through urease inhibitory activities and hemagglutination inhibition assay of 188 natural herb medicines, it had an antiadhesive activities assay and tried to construct database of *H. pylori* in vitro from various aspects.

In order to control *H. pylori* with 188 kinds of natural herb medicines, this paper examined them from three aspects of growth inhibition, urease inhibitory activity and adhesion inhibition assay. The results obtained are as following.

1. Using paper disc method, 95% ethanol(EtOH) extracts of 54

medical plants, 70% EtOH extracts of 70 medical plants and water extracts of 60 medical plants were tested an antimicrobial activities against the *Helicobacter pylori*. *Valeriana fauriei* (95% EtOH extract), *Schizandra nigra* M. (70% EtOH extract) and *Panax notoginsengs* (water extract) showed the inhibition zone each 10.0, 9.0 and 9.0mm. And *Paeonia suffructicosa* A., *Artemisia capillaris* T. and *Torilis japonica* 70% EtOH extracts showed a weak anti-*H. pylori* activities. Their inhibition zone were a 7.5mm each.

2. The EtOH extracts concentrations of 1mg/disc, 3mg/disc and 5mg/disc of *Schizandra chinensis* Baillon showed the inhibition zone 8.0, 15.0, 20.0mm at each concentration. And ethylacetate(EtOAc) fractions of *S. chinensis* showed the inhibition zone 9.0, 19.0, 25.0mm at same concentration.

3. The yield of EtOH extract of *S. chinensis* B. had the highest percentage (39.5%); MC fraction(8.66%), EtOAc fractions (17.03%) and water fraction (4.98%).

4. MICs of *H. pylori* from *S. chinensis* B. found that EtOH extract and EtOAc fraction had concentrations of 1mg/mL.

5. After heat treatment of EtOAc fraction of *S. chinensis* B. at 100°C for each 15, 30, 60 min growth rate of *H. pylori* were checked. According to the result of growth rate, there were not a differences of antimicrobial activity between all of test and control.

In result of growth of *H. pylori* in the midium adding EtOAc fraction treated various pH conditions (2, 4, 6, 8) there were no differences of antimicrobial activity. So its stability on pH was high quality.

6. Using MPLC, the EtOAc fraction obtained from EtOHl extracts of *S. chinensis* was separated 11 subfractions. Then, in the result of identifying antimicrobial effect on the 11 subfractions by paper disc method, two subfractions had the inhibitory effect only.

1) Compound 1: S-EA-3

Bright yellow oil (form EtOAc fraction)

$C_8H_{16}O_3$, ethyl 3-hydroxyhexanoate

IR spectrum: 3218.61cm^{-1} hydroxy group(-OH), 1718.26cm^{-1} carbonyl group(C=O), 1179.26cm^{-1} carboxyl group(C-O)

$^1\text{H-NMR}$ spectrum(CDCl_3 , 400 MHz, δ): 1.24ppm(s, 1H), 1.26ppm(s, 1H), 1.27ppm(s, 1H), 1.28ppm(s, 1H), 1.29ppm(s, 1H), 1.30ppm(s, 1H), 2.85ppm(q, 2H, $J=6.5$), 2.89ppm(q, 2H, $J=4.1$), 4.17ppm(q, 2H, $J=7.1$), 4.24ppm(q, 2H, $J=2.01$), 4.54ppm(d, 1H, $J=1.38$), 4.59ppm(s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(CDCl_3 , 100 MHz, δ): 173.404(C-1), 38.505(C-2), 67.172(C-3), 62.238(C-4), 61.385(C-5), 14.016(C-6), 38.458(C-1'), 14.016(C-2')

2) Compound 2: S-EA-5

Bright yellow oil (from EtOAc fraction)

$C_8H_{16}O_3$, ethyl 5-hydroxyhexanoat

IR spectrum: $3197.4.\text{cm}^{-1}$ hydroxy group(-OH), 1712.48cm^{-1} carbonyl group, 1190.83cm^{-1} carboxyl group

¹H-NMR spectrum(CDCl₃, 400 MHz, δ): 1.74ppm(*d*, 3H, *J*=6.61), 1.20ppm(*d*, 3H, *J*=7.02), 2.69ppm(*d*, 2H, *J*=8.34), 2.75ppm (*d*, 2H, *J*=8.28), 2.80ppm(*d*, 2H, *J*=5.98), 4.04ppm(*d*, 1H, *J*=7.1), 4.11ppm(*d*, 2H, *J*=7.11), 4.13ppm(*s*, 1H)

¹³C-NMR spectrum(CDCl₃, 100 MHz, δ): 172.034(C-1), 61.457(C-2), 43.704(C-3), 79.696(C-4), 73.675(C-5), 40.383 (C-6), 60.732(C-1'), 40.383(C-2')

7. Urease inhibitory activities from the extracts of 188 medical plants lead as follow. *M. vulgare*(95% EtOH ex.) had the highest percentage, 231.25%; 95% EtOH extract of *S. buergeriana* (200.56%), 70% EtOH extract of *L. japonica*(164.54%), water extract of *I. japonica* (137.5%) and water extract of *C. versicolor* (97.72%).

8. In the result of hemagglutination inhibition assay to the extracts of 188 medical plants, 6 kinds (*M. vulgare*, *S. commixta*, *C. trilobus*, *P. amurense*, *O. ficus-indica var. saboten* and *R. coreanus* M.) among the 95% EtOH extracts of 55 medical plants were showed effect of hemagglutination inhibition. And, *C. unshin* and *R. satirus* among the 70% EtOH extracts of 73 medical plnats were showed effect it. 11 kinds (*P. thunbergiana*, *A. sessiliforun* S., *L. chinense* M., *P. cocas* W., *C. japonica* C., *A. gramineus*, *C. officinale*, *P. oleracea*, *R. glutinosa* L., *H. macrophylla for. otaksa*, and *P. notoginsengs*) among the water extracts of 60 medical plants were showed effect it.

Adhesion inhibitory assay from the 95% EtOH extract of *R. coreanus* in its evolution (immature, well-timed and ripen) by

hemagglutination inhibition assay lead as follow. The EtOH extract of ripen *R. coreanus* was showed effect of hemagglutination inhibition at 0.1mg/mL concentration. It was very excellent.

On one side, adhesion inhibitory assay from the EtOH extract and EtOAc fraction of *S. chinensis* B. by hemagglutination inhibition assay lead as follow. Both of EtOH extract and EtOAC fraction were showed effect of hemagglutination inhibition at 1mg/mL concetration. But, at 0.5mg/mL concetration EtOAC fraction were showed weak effet it only.

For growth inhibition, *S. chinensis* Baillon, with which Koreans are familiar, was selected as a sample. A growth inhibitory substance for *H. pylori* was separated and identified. For urease inhibitory activity and hemagglutination inhibition assay, some extracts with excellent activity were selected out of 188 kinds of natural herb medicine extracts. This paper constructed database of the in vitro test for control of *H. pylori*, which will become useful for future in vitro researches.