

Process Optimization of *Nypa fruticans* Wurmb Extract using Mixed Solvent and its Functional Component Analysis

Jin Kim^{1,†,*}, Han Sung Kim^{2,*}, Jang Wan Son^{3,*}, Seong Yong Moon^{1,4,*}
and Sook-Young Lee^{5,†,*}

¹Dental Healthcare & Clinical Trial Center, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

²Him Co., Ltd, Business Incubation Center, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

³School of Infomatics & Product Design, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Chosun University, Oral and Maxillofacial Surgery, Gwangju 61452, Korea

⁵Marine Bio Research Center, Chosun University, Wando 59146, Korea

In this study, conditions for extraction of functional component from *Nypa fruticans* wurmb was optimized. The yield by extraction with 30% ethanol (LE30, 42.12%) was higher than those hot water extraction (LDW 33.32%), 50% ethanol (LE50, 40.12%) and 70% ethanol (LE70, 34.5%). The extract was purified and analyzed by GC MS. The prevailing compounds found in extract were Cyclodecasiloxane-, pentadecanoic acid, -eicosane, undecanal and tridecanoic acid. The presence of saturated and unsaturated fatty acids in ethanolic extract vindicate the use of this plant to treat many diseases in traditional medicine. The total phenolic contents in the LDW, LE30, LE50, LE70 extract were 128±1.65 mg/g, 205±2.3 mg/g, 210±4.23 mg/g and 180±5.6 mg/g, respectively. The DPPH was highest in LE70 extract (1,000 µg/mL, 81.14%), ABTS was highest in LE50 extract (1,000 µg/mL, 84.14%). The protective effects against oxidative stress in raw 264.7 cell imparted by the LE50 extract was better than those imparted by the other extracts. The findings of the present study suggest that 50% ethanol is best solvent for extraction of *Nypa fruticans* Wurmb, considering yield, polyphenol content, and antioxidant activities with extraction cost.

Key Words: *Nypa fruticans* Wurmb, Phytochemical, Antioxidant, Cell viability

서 론

현재 유행하고 있는 코로나 바이러스 감염증 및 다양한 질병으로 인해 사람들은 면역 증진에 도움이 되는 건강식품 및 약리적 효능을 가진 천연 소재에 대한 관심이 급격히 늘고 있다. 다양한 천연자원의 확보 및 개발 등은

고부가가치 산업으로 신약과 기능성 식품, 화장품, 생활용품으로 확대되고 있다. 식물이 가지고 있는 다양한 컬러는 화학 물질로 구성되어 있으며 인체에서 항산화 역할 및 다양한 물질이 서로 다른 약리적 작용을 한다(Koffi et al., 2010).

니파야자(*Nypa fruticans* Wurmb Fruit)는 야자나무과 식물로 '니파팜'이라고 부르기도 하며 바다에서 자라는 모

Received: February 10, 2022 / Revised: March 29, 2022 / Accepted: March 30, 2022

*Professor.

†Corresponding author: Jin Kim. Dental Healthcare & Clinical Trial Center, Chosun University, Gwangju 61452, Korea.

Tel: +82-62-230-6883, Fax: +82-62-608-5407, e-mail: cream4251@hanmail.net

†Corresponding author: Sook-Young Lee. Marine Bio Research Center, Chosun University, Wando 59146, Korea.

Tel: +82-62-973-7662, Fax: +82-62-973-7662, e-mail: seedbank2001@hanmail.net

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

습이 우리나라의 죽순과 비슷하여 해죽순으로 불리운다. 말레이시아 및 필리핀 등 동남아시아에 주로 재배되고 있으며, 잎은 주로 차로 이용되며 수액에서 설탕을 얻거나 천연 바이오 에탄올 연료나 의학적 목적으로 쓰이며 식 재료로 이용되기도 한다. 특히, 니파야자에는 chlorogenic acid, protocatechuic acid, kaempferol 등 다량의 polyphenol, flavonoid 화합물이 함유되어 있으며, 그에 따른 항산화 및 염증 조절 효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다 (Rahmatullah et al., 2010).

Reza et al. (2011)에 따르면 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 염증반응이 유도된 마우스 유래 대식 세포에서 니파야자 열수 추출물의 처리가 NF- κ B 경로의 활성을 억제하여 염증을 완화시킨다고 보고하였다. 최근 국내에도 니파야자의 생리활성 효능이 주목 받기 시작하면서 이를 이용한 침출차 형태의 음용차가 판매되고 있다. 주요 성분을 고부가 가치로 활용하기 위한 추출 공정에 대한 연구가 필요로 하다.

본 연구에서는 식품첨가물 기준에 맞춰 추출 용매를 물과 주정(에탄올)을 선정하였다. 니파야자를 증류수와 에탄올 농도에 따라 초음파 처리 공정을 적용한 추출방법으로 유효성분의 함량을 비교 분석하여 최적의 추출 조건을 확립하였다. 따라서 니파야자의 추출 용매의 조건을 평가하고, 최적의 농도에서 니파야자 추출물의 세포보호 효능 평가와 항산화 효능 검증은 각종 건강식품 및 의약품 개발로 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 니파야자(*Nypa fruticans* Wurmb)은 (주) 황금순(Gyeonggi-do, Korea)에서 2020년 12월 미얀마에서 채취한 것을 구입하였다. 추출에 사용되는 프레타놀(prethanol A)은 덕산화학(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 생리활성 측정 시약 Folin-Ciocalteu's reagent, Gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA (ATCC)에서 분양 받아 사용하였다. 세포를 배양하기 위해 Dulbecco's Modified Eagle's Medium

(DMEM), penicillin (10,000 U/mL), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Scotland로부터 구입하였다. 그 밖의 모든 시약은 정제 과정 없이 사용하였으며, 3차 증류수를 사용하였다.

니파야자 추출물 제조

니파야자는 흐르는 물에 3회 세척 후 물기를 제거하고 자연건조 시킨 후 분쇄기를 이용하여 분말화 하였다. 증류수 추출과 에탄올 침지 후 초음파 추출을 진행하여 추출물을 얻었다. 증류수 추출은 건조된 니파야자 분말 10 g에 10배(w/v)의 증류수를 첨가하여 100°C에서 1시간 교반기에서 추출한 군(LDW)과 건조된 니파야자 분말 10 g에 10배(w/v)의 에탄올 30%, 50%, 70% 조성의 용매에 각각 침지 시킨 그룹(LE30, LE50, LE70)을 초음파 분산기(Branson 5210 ultrasonic Bath, USA)를 사용하여 30 kHz에서 30분간 초음파 처리를 병행하는 방법을 사용하였다.

추출 용액을 원심분리(3,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 분리하였다. 분리된 추출액은 정량여과지(No 5c, Advantec, Tokyo, Japan)로 여과한 다음, 회전감압농축기(IKA, Staufen, Germany)로 감압 농축한 후, 동결건조기(Ilshin-BioBase, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 얻은 시료를 각각의 추출 용매에 녹여 실험을 진행하였다.

추출물의 GCMS에 의한 성분 분석

성분 분석을 위해 Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS) 장비(GC-2010, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 활용하였다. 시료를 DMSO에 충분히 용해시킨 후, 1차 원심분리를 이용하여 부유물을 제거하고 2차로 마이크로 필터로 여과 후, 시료를 준비하였다. 컬럼은 BD-5 (60 mm×0.25 mm×0.25 mm), 이동 가스(carrier gas)인 헬륨(H₂)가스는 분당 1 mL의 속도로 흘러 보냈으며 주입구(injection) 온도는 250°C, 분할비(split ratio) 10:1, 오븐 온도를 분당 3°C씩 250°C까지 상승시켰으며, 주입량은 1 μ L 조건으로 분석하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

각 추출 시료 0.1 mL에 증류수 6.4 mL와 2 N Folin-Ciocalteu 시약 0.3 mL를 첨가하고 20% Na₂CO₃ (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 1 mL를 가하여 2시간 동안 방치하였다. 반응물의 흡광도는 725 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer (U-1800, Hitachi Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였고 gallic acid (GAE)를 이용한 표준곡선으

로 양을 환산하였다.

DPPH radical 소거능

각 시료에 대한 DPPH radical 소거활성은 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer로 측정하였다(Blois, 1958). 니파야자 추출물 및 양성 대조군으로 사용한 0.1% ascorbic acid (AA) 용액 0.1 mL를 DPPH 용액 0.3 mL와 함께 5초 동안 vortex mixer로 혼합하여 첨가한 후, 이를 30분간 암소에서 반응시켜 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 에탄올 0.1 mL를 첨가하여 대조군에 대한 흡광도의 감소 비율로 나타내었다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = (\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

ABTS ·+ radical 소거능

ABTS 용액은 7 mM ABTS와 2.45 mM K₂S₂O₈를 혼합해 16시간 동안 암소에 보관하여 준비하였으며, OD 값이 0.700±0.005에 도달하게 DW로 희석하였다(Re et al., 1999). 각 농도 별 니파야자 추출물 및 양성 대조군 0.1 mL와 3.9 mL의 ABTS 용액을 혼합한 후 23°C에서 6분간 반응시키면서 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 0.1% ascorbic acid (AA)을 사용하였으며 ABTS 라디칼 소거능은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = (\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

추출물의 세포독성 평가

니파야자 추출물에 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양 후 니파야자 추출물을 농도 별로 100 µL 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 생존율 평가를 위하여 well 당 10 µL의 MTT (5 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 생성된 formazan을 녹이기 위해서 DMSO를 100 µL 씩 첨가하고 1시간 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

H₂O₂에 의한 세포의 손상으로부터 세포보호 평가

면역세포 RAW264.7를 이용한 세포보호 평가는 Hwang 등 (2010)의 방법을 응용하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안

배양하였다. 배양된 RAW264.7 세포를 새로운 배지로 교환한 다음 H₂O₂ 1.5 mM 및 니파야자 추출물을 농도 별로 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후, MTT (5 mg/mL) 용액을 각 well에 10 µL 씩 첨가하고 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 이후 상등액을 완전히 제거하고 DMSO 100 µL를 각 well에 첨가한 후, 10분간 반응시켜 formazan 결정을 완전히 용해한 다음 microplate를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복하여 측정하였으며 평균값(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's *t*-test로 비교하였으며 **P*<0.05 이하인 것과 ***P*<0.01 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

추출물 수율 평가

추출 용매에 따른 니파야자 추출 수율은 각각 LDW (33.32%) < LE70 (34.5%) < LE50 (40.12%) < LE30 (42.12%) 순으로 확인되었다. 추출 용매 및 조건에 따라 추출 성분의 함량이 달라지며, 유효성분의 함량에 영향을 주는 것을 확인하였다(Bobade, 2019). 니파야자 추출물의 경우 에탄올 비율이 30%일 때 동결건조 후 얻는 고형분의 함량이 최대였다.

추출물의 GCMS 성분

GC-MS 분석 결과 증류수(LDW) 및 에탄올(LE30, LE50, LE70)을 용매로 추출하여 얻은 가용성 고형분의 생리활성 화합물의 성분을 확인하였다(Table 1). 4종류의 추출물에서 Cyclodecasiloxane계, pentadecanoic acid 화합물이 우세하게 존재하였다. Cyclodecasiloxane-, eicosamethyl 화합물은 향류마티스, 간보호 및 항경련과 같은 여러 생물학적 특성을 갖는 생리활성 화합물로 알려져 있다(Bobade, 2019).

Pentadecanoic acid는 포화 지방산으로 자연계에서 드물게 존재하며 약리적 성질을 가진 것으로 알려져 있으며, LDW (31.78%), LE30 (30.15%), LE70 (29.47%), LE50 (25.25%) 순으로 함유량이 관찰되었다. 비파잎에서 40%가 넘는 pentadecanoic acid 성분이 확인되었다(Shin et al., 2003). 또한, 식물, 식품, 인간혈청 및 조류의 대사산물로

Table 1. GC-MS analysis of various solution extract of *Nypa fruticans* wurmb

No	Retention time	Chemical constituents	% area			
			LDW	LE30	LE50	LE70
1	18.345	5-Hydroxymethylfurfural	22.8	8.88	18.52	12.36
2	20.808	Tridecane, 1-iodo-	10.63	4.71		3.64
3	20.817	Sulfurous acid, hexyl octyl ester			5.25	
4	29.39	Undecane, 3,8-dimethyl-				3.82
5	29.89	Eicosane		4.34		
6	29.88	Dodecane, 2,6,11-trimethyl-			4.3	
7	32.67	Undecanoic acid				1.97
8	37.99	Octadecane, 6-methyl-				4.3
9	40.06	Nonanoic acid				2.18
10	41.23, 54.67, 62.17	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-		15.48	21.48	6.48
11	42.076	Undecanal		3.64		
12	46.16, 50.67, 71.6	Cyclodecasiloxane, eicosamethyl-	14.87	15.74	9.86	5.31
13	46.808	Pentadecanoic acid	31.78	30.15	25.25	29.47
14	48.774	trans-2-Dodecen-1-ol			9.11	
15	48.778	Heptadecanal	7.75			4.95
16	50.665	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	5.38	5		
17	53.2	Octadecanoic acid			6.71	16.64
18	53.4	Tridecanoic acid		12.06		
19	58.42	Citronellol epoxide (R or S)				3.16
20	58.56	Iron, tetracarbonyl (pyridine)-				0.64
21	68.718	1,2-Ethanediamine	6.79			

알려져 있으며 중요한 생태학적 기능을 가지고 있다.

총 폴리페놀 함량 측정

식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중 하나로 페놀성 화합물은 플라보노이드와 탄닌이 주성분이고 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지므로 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(Kim et al., 2012).

추출 용매에 따른 니파야자 추출물의 총 폴리페놀의 함량은 Table 2와 같다. 폴리페놀 함량은 증류수 용매에서 128±1.65 mg/g로 가장 낮은 값을 확인하였다. 또한, 에탄올의 비율이 50% (LE50)인 조건에서 210±4.23 mg/g으로 가장 높았다. 에탄올의 비율이 30% (LE30)일 때 205±2.3 mg/g으로 LE50일 때와 비슷한 함량이 확인되었다 (Table 2). 울금 및 황금 추출 용매에 따른 폴리페놀의 함량은 열수 추출물 보다 유기 용매 추출물에서 더 높은 함량을 나타내어 본 연구 결과와 유사하다(Park et al.,

Table 2. Total phenolic contents of *Nypa fruticans* wurmb by various solution extract

Samples	Total polyphenol contents (GAE mg/g)
LDW	128±1.65
LE30	205±2.3
LE50	210±4.23
LE70	180±5.6

The values represent mean ± SD of triplicate determinations. LDE, hot-water extract; LE30, 30% ethanol extract; LE50, 50% ethanol extract; LE70, 70% ethanol extract

2013; Lim et al., 2019). 본 연구에서 페놀화합물 함량이 가장 많이 함유된 그룹은 에탄올 30%와 50%로 추출한 시료 그룹이 증류 추출(LDW) 그룹보다 높은 항산화 활성 효과가 나타날 것으로 사료된다.

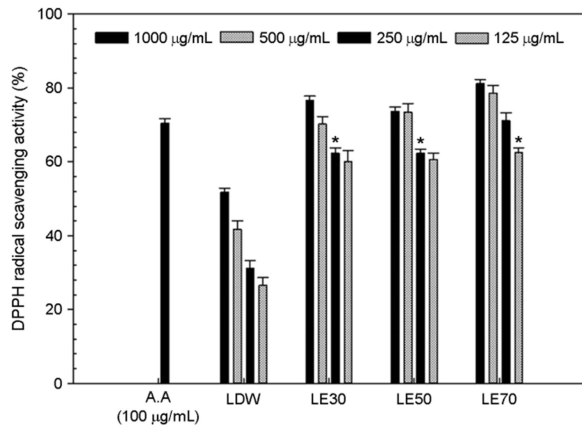


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of *Nypa fruticans* wurmb extract. DPPH radical scavenging analysis was performed to investigate. The antioxidant effects of *Nypa fruticans* wurmb at varying concentration levels of 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1,000 µg/mL. Each value presents the mean ± standard deviation (n=3). Asterisks indicate a significant increment in DPPH scavenging activity compared with controls (* $P < 0.05$).

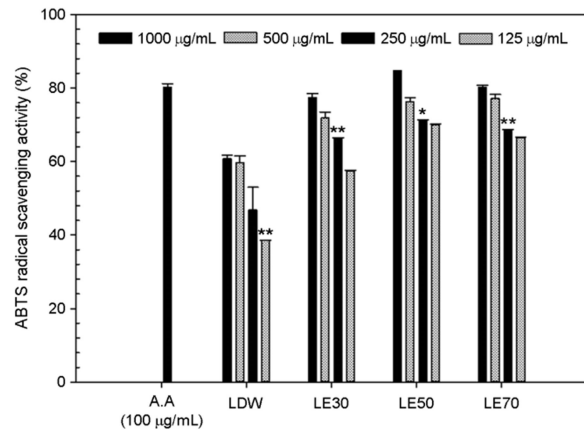


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of *Nypa fruticans* wurmb extract. ABTS radical scavenging analysis was performed to investigate. The antioxidant effects of *Nypa fruticans* wurmb at varying concentration levels of 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1,000 µg/mL. The appropriate amount of ascorbic acid was used as a positive control (AA). Each value presents the mean ± standard deviation (n=3). Asterisks indicate a significant increment in ABTS scavenging activity compared with controls (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

DPPH radical 소거능

DPPH radical 시약은 짙은 보라색에 자유 라디칼로 화학적으로 안정된 수용성 화합물로 알려져 있다. DPPH 시약은 항산화 활성을 가진 물질과 반응하면 양성자-라디칼 소거능에 의해 노란색으로 탈색되며 517 nm에서 광흡수 성질을 바탕으로 항산화 활성을 측정할 수 있다. 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL 농도의 LDW, LE30, LE50, LE70를 대조군 AA와 비교한 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 각 추출물들의 항산화 활성은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 관찰하였으며 LE70 추출물 1,000 µg/mL에서 81.14%의 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였다. 대조군인 AA가 100 µg/mL일 때, 70.42±1.2%로 니파야자 LE30, LE50 추출물의 500 µg/mL 농도일 때와 저해능이 비슷한 것을 확인하였다.

ABTS ·+ radical 소거능

ABTS ·+ 라디칼 소거능의 평가는 potassium persulfate 반응에 의해 생성된 ABTS ·+ 자유 라디칼이 항산화 효능을 가진 생리활성 물질에 의해 제거되어 청녹색이 탈색되는 것을 이용하는 원리이다(Lee et al., 2012). 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL 농도의 LDW, LE30, LE50, LE70를 ABTS ·+ 라디칼 소거능을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 니파야자 추출물을 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL 농도로 처리하였을 때 대부분의 농도에서 ABTS 라디칼 소거능

이 높게 관찰되었다. 증류수로 추출한 시료보다 에탄올 추출 시료에서 전체적으로 높은 소거능이 관찰되었다. DPPH 라디칼과 비교하여 ABTS 라디칼 소거활성이 높은 이유는 ABTS 라디칼 소거활성에서 극성과 비극성 물질의 활성이 모두 측정되고, 라디칼 또한 양이온 라디칼의 특징을 가지고 있는 반면 DPPH 라디칼 소거활성에서는 자유 라디칼을 기질로 이용하기 때문인 것으로 사료된다(Andrzej and Olszowy, 2013).

추출물의 세포독성 평가

니파야자 추출물을 RAW 264.7 세포에 여러 농도(0~1,000 µg/mL)로 24시간 처리한 후 MTT assay를 수행한 결과는 Fig. 3과 같다. 의로기기 생물학적 안전성 시험 규격으로 시험한 결과 1,000 µg/mL의 농도에서도 세포 생존율이 80% 이상으로 비교적 안전함을 알 수 있었다. 각 추출물의 1,000 µg/mL에서 LDW, LE30, LE50, LE70은 각각 86±1.3%, 82.1±4.2%, 82±3.2% 및 81±3.2%로 측정되었다.

H₂O₂에 의한 세포의 손상으로부터 세포보호 평가

활성산소의 일종인 H₂O₂는 처음에 hydroxyl radical로 바뀌고, 이것이 산소와 물로 전환되기 전에는 세포에 강력한 산화 스트레스를 주어 세포 손상을 가속화시킨다. 이

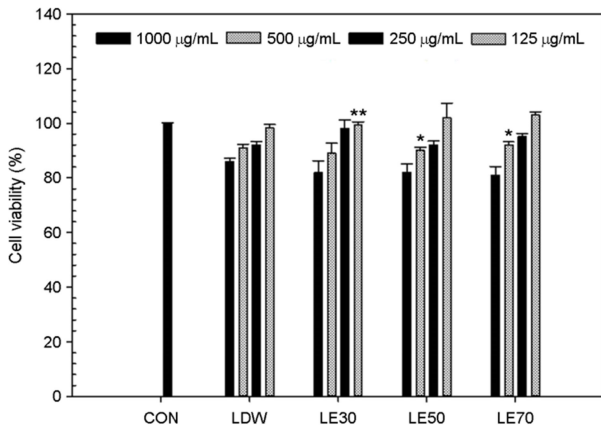


Fig. 3. Effect of extracts on *Nypa fruticans* wumb on cell viability of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with extracts on *Nypa fruticans* wumb at varying concentration levels 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1,000 µg/mL. The values are expressed as the means \pm standard deviation of three individual experiments. Statistically significant differences are marked with an asterisk compared to the untreated group (* P <0.05, ** P <0.01).

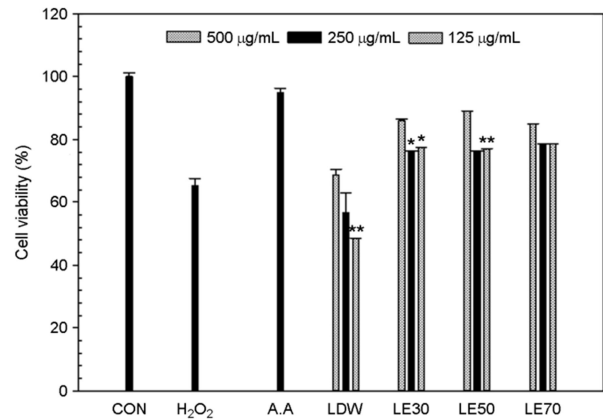


Fig. 4. Effects of extracts on *Nypa fruticans* wumb on H₂O₂ (1.5 mM) induced oxidative damage production RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated the indicated concentrations of *Nypa fruticans* wumb extracts treated with H₂O₂ 20 µL. After 24 h incubation, the amounts of oxidative damage were measured by MTT assay. The appropriate amount of ascorbic acid was used as a positive control (AA). Results are represented as mean \pm standard deviation. Asterisks indicate a significant increment in cell viability compared with cells treated with H₂O₂ only (* P <0.05, ** P <0.01).

는 신경변성 질환인 알츠하이머병, 파킨슨병 및 노화 등 과도 밀접한 관련이 있어 항산화 기작을 통한 세포보호가 염증질환에 중요한 역할을 한다(Emi et al., 2002).

세포보호 효과는 모든 시료에서 1.5 mM H₂O₂ 첨가구 (65.3 \pm 2.3%)와 비교한 결과 세포보호율이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 대조군 ascorbic acid (AA)군의 경우 95 \pm 1.35%로 세포보호율을 확인하였다.

증류수 추출물(LDW) 500 µg/mL 농도에서 68.6 \pm 1.92%로 나타났고 LE30, LE50, LE70의 시료 500 µg/mL를 처리한 군에서 각각 86 \pm 0.6%, 89 \pm 0.11% 및 85 \pm 0.05%로 나타났다. 에탄올 추출물의 모든 군에서 125 µg/mL의 농도에서 70%가 넘는 높은 세포 생존율이 관찰되었다(Fig. 4).

플라보노이드계 성분인 baicalein이 함유된 황금 추출물의 경우 100 µg/mL 농도에서 모두 1.5 mM H₂O₂ 대조군에 비해 17.72~41.63%로 높은 활성을 나타내었으며, 80% 메탄올 추출물이 85.11%로 세포보호 효과가 가장 높게 나타나 H₂O₂로부터 손상된 세포를 보호하는 효과가 가장 우수한 것을 확인하였다.

본 연구에서도 LDW보다 LE30, LE50, LE70 추출물에서 더 높은 세포보호 효과가 나타난 것을 확인하였다.

고 찰

니파야자(*Nypa fruticans* wumb)은 미얀마 맹글로브 식

물로 염증개선, 항산화, 항염증 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으며 생리활성 물질로 chlorogenic acid, protocatechuic acid, kaempferol과 같은 다량의 polyphenol, flavonoid 화합물이 함유되어 있다(Reza et al., 2011). 니파야자는 국내에 2015년 8월에 식품 재료 및 화장품 원료로 사용 가능해짐에 따라 다양한 연구가 진행되었지만 추출 공정에 따른 성분에 대한 연구가 미흡하여 본 연구에서는 증류수, 에탄올 30%, 50%, 70% 용매로 초음파 장치를 활용하여 얻은 추출물의 생리활성 성분에 대한 연구를 수행하였다. 인진쑥 및 복분자의 경우 에탄올 농도가 40%일 때 가용성 고형분 수율이 가장 높으며 추출 시간보다 시료에 대한 용매 비율 및 농도에 영향을 받는 것으로 보고되었다(Kim, 2014). 가용성 고형분 함량은 원료나 원료의 가공 특성에 따라 달라지며 용매의 비율과 농도에 따라 영향을 받는 것을 알 수가 있었다(Yoon et al., 2003).

초음파 추출은 전통적으로 사용하던 열수 추출법의 단점인 장시간 가열로 인한 유용 성분 파괴 및 가용성분 위주의 추출 등을 방지할 뿐 만 아니라 추출 시간을 단축하고, 높은 추출 수율과 생리활성 효과를 기대할 수 있는 추출방법이다(Lee et al., 2017). 추출 용매 및 방법에 따라 식물의 유효성분의 함유량이 달라진다(Park et al., 2013). LE30 시료에서 eicosane, undecanal, tridecanoic acid계 화합물이 32.1%가 넘게 검출되었으며, 항변이원성과 항산화

성과 상관관계가 있는 화합물의 유효성분이 다른 군에 비해 다량 검출된 것을 확인하였다(Yoon et al., 2003).

본 연구에서 선정된 용매는 증류수와 에탄올 30%, 50% 및 70% 조성의 혼합 용매를 이용하였으며 에탄올 30% (LE30) 조성에서 추출 수율이 가장 높았다. 폴리페놀 함량 측정과 항산화 연구에서 에탄올 30%와 50% 용매를 사용한 조건에서 높은 항산화능이 관찰되었다. 대조군으로 선정된 ascorbic acid (AA) 100 µg/mL을 처리한 군과 LE30의 500 µg/mL을 처리한 군에서 유사한 항산화 값을 확인하였다. 현재까지 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT) 및 butylated hydroxyanisole (BHA)가 높은 항산화성 효과를 보이고 값이 저렴하여 경제성도 뛰어나기 때문에 널리 사용되어 왔다. 하지만, 이들의 인체에 대한 유해성이 보고되면서 고 사용이 점차로 줄어들고 있어 인체에 무해하고 항산화 효과가 높은 천연 항산화제를 찾는 것이 절실히 요구되고 있다(Park et al., 2003). 해안 식물로 잘 알려진 함초를 마이크로웨이브 추출 장치로 추출한 경우 열수 추출보다 에탄올로 추출했을 경우 더 높은 DPPH 라디칼 소거능이 보고된 바 있다(Kim, 2015).

Song et al. (2007)에 따르면 함초 에탄올 추출물의 농도가 500 µg/mL일 때, ABTS 소거능은 47.9%로 관찰되었다. 실험 결과를 통해 지질 과산화 억제, DPPH 라디칼 소거 활성, 환원력 효과에서 총 페놀 함량과 항산화능이 상관관계가 없으며, 페놀 함량이 항산화능에 미치는 효과의 정도가 다르다고 보고하였다(Song et al., 2007). 모든 항산화 지표가 폴리페놀 함량에 영향을 받는 것은 아니며, 폴리페놀 외에 다른 물질이 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

니파야자 추출물의 모든 군에서 세포독성 결과 각 추출물에서 80% 이상의 세포 생존율을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 정상 세포를 산화적 스트레스로부터 보호할 수 있는지를 살펴보았다. H₂O₂는 산소를 이용한 세포 내 호흡 과정에서 정상적으로 생성되는 물질이며, 다양한 세포 실험에서 산화적 스트레스를 생성하는 자극원으로 활용된다(Bi et al., 2008).

H₂O₂를 세포에 처리하여 강력한 산화 스트레스를 준 세포에서 에탄올 추출 시료가 증류수 추출물 처리 군보다 더 높은 세포보호 효과를 나타냈다. Park et al. (2003)의 연구에서 O₂로부터 유도된 세포막파괴는 황금 추출물의 활성성분인 baicalein이 세포보호 효과를 나타내었고 그 배당체인 baicalin은 ascorbate 첨가에 의해 상승적으로 ROS에 대항하여 세포를 보호한다고 보고하였다(Park et al.,

2003).

또한, glutamate로 유도된 세포에서 상백피 에탄올 추출물 10 µg/mL 농도에서 약한 활성을 보였지만 메탄올 추출물 10 µg/mL 농도에서 70% 이상의 높은 활성을 보여 신경세포보호 효과를 나타내었다(Lim et al., 2019).

결과적으로 니파야자 추출물은 증류 추출보다 에탄올 30~50%을 이용한 추출물의 조성이 생리활성이 더 높은 것을 확인하였다. 이는 에탄올 50% 조성에 용매는 니파야자의 유용 성분에 용출이 증진되고, 초음파 공정을 통해 니파야자 유용 성분의 수율 향상 및 신물질 용출로 식품, 화장품, 의약품 등에 다양한 산업군으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENT

Following are results of a study on the "Leaders in Industry-university Cooperation +" Project, supported by the Ministry of Education and National Research Foundation of Korea.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Andrzej L, Olszowy DM. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *European Food Research and Technology*. 2013. 236: 1099-1105.
- Bi J, Jiang B, Liu JH, Lei C, Zhang XL, An LJ. Protective effects of catalpol against H₂O₂-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. *Neuroscience Letters*. 2008. 442: 224-227.
- Bobade AF. GC-MS Analysis of bioactive compound in ethanolic extract of *Pithecellobium dulce* leaves. *American Society of Plastic Surgeons*. 2019. 3: 8-13.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958. 181: 1199-1200.
- Emi II, Yoichi K, Ikuko M, Masato A, Norio O. Glial Cells Protect Neurons Against Oxidative Stress via Transcriptional Up-Regulation of the Glutathione Synthesis. *Journal of Neurochemistry*. 2002. 72: 2334-2344.
- Hwang YG, Lee JJ, Kim AR, Lee MY. Chemical Components and antioxidative effects of *Eriobotrya japonica* Lindl. Leaf. *International Journal of Life Sciences*. 2010. 20: 1625-1633.

- Kim IR. Antioxidant and Pro-oxidant Activities of Hamcho (*Salicornia herbacea* L.). The Korean Journal of Food and Nutrition. 2015. 28: 40-46.
- Lee JJ, Park DH, Lee WY. Optimization of microwave-assisted extraction process of *Hordeum vulgare* L. by response surface methodology. Korean Journal of Food Preservation. 2017. 24: 949-956.
- Kim SN, Kim MR, Cho SM, Kim SY, Kim JB, Cho YS. Antioxidant activities and determination of phenolic compounds isolated from oriental plums (soldam, oishiwase and formosa). Nutrition Research and Practice. 2012. 6: 277-285.
- Koffi E, Sea T, Dodeh Y, Soro S. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three ivorian plants. J Anim Plant Sci. 2010. 5: 550-558.
- Lim MJ, Gu YR, Hong JH. Extraction solvent-dependent antioxidant activities and cancer cell growth inhibitory effects of *Scutellaria baicalensis* extracts. Korean Journal of Food Preservation. 2019. 26: 566-575.
- Lee S, You Y, Kim K, Park J, Jeong C, Jhon DY, Jun W. Antioxidant activities of native Gwangyang *Rubus coreanus* Muq. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2012. 41: 327-332.
- Rahmatullah M, Sadeak SMI, Bachar SC. Brine Shrimp Toxicity Study of different Bangladeshi Medicinal Plants. Advances in Natural and Applied Sciences. 2010. 4: 163-173.
- Park JJ, Lee JM, Jun WJ. Radical scavenging and anti-obesity effects of various extracts from turmeric (*Curcuma longa* L.). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2013. 42: 1908-1914.
- Park SN. Antioxidative properties of Baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Gerogi and its application of cosmetic (I). Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2003. 14: 657-665.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999. 26: 1231-1237.
- Reza H, Haq VM, Das AK, Rahman S, Jahan R, Rahmatullah M. Anti-hyperglycemic and antinociceptive activity of methanol leaf and stem extract of *Nypa fruticans* Wurmb. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011. 24: 485-488.
- Shin SY, Kang MY, Nam SH. Correlation of Lipid Soluble Compounds of Colored Rices and its Mutagenicity, Antimutagenicity and Antioxidativity. Journal of Applied Biological Chemistry. 2003. 46: 214-219.
- Song HS, Kim DP, Jung YH, Lee MK. Antioxidant activities of red Hamcho (*Salicornia herbacea* L.) against lipid peroxidation and the formation of radicals. The Journal of Nutrition and Health. 2007. 20: 150-157.
- Yoon SR, Jeong YJ, Lee GD, Kwon JH. Changes in phenolic compounds properties of *Rubi fructus* extract depending on extraction conditions. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2003. 32: 338-345.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.1.34>

Cite this article as: Kim J, Kim HS, Son JW, Moon SY, Lee SY. Process Optimization of *Nypa fruticans* Wurmb Extract using Mixed Solvent and its Functional Component Analysis. Biomedical Science Letters. 2022. 28: 34-41.