

## 니파야자(*Nypa fruticans* Wurmb) 싹 추출물 및 분획물의 항산화, 세포 보호 및 항균 효과에 관한 평가

신혁수 · 이윤주 · 김지웅 · 송바름 · 이상래 · 박수남\*  
서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품융합기술연구소

### Evaluation of Antioxidant, Cytoprotective and Antimicrobial Activities of the Extract and Fractions Obtained from Young Shoots of *Nypa Fruticans* Wurmb

Hyuk Soo Shin, Yoon Joo Lee, Ji Woong Kim, Ba Reum Song, Sang Lae Lee, and Soo Nam Park\*

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology,  
232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

**Abstract** – *Nypa fruticans* Wurmb is a species of palm, which is widely distributed in the mangrove forest of Southeast Asia. Various parts of *N. fruticans* has been used as a traditional medicinal plant. However, the physiological activities of *N. fruticans* has not yet been clarified well. Therefore, in this study, the 50% ethanol extract and its aqueous and ethyl acetate fractions of young shoots of *N. fruticans* were investigated for their antioxidant, cytoprotective effect, and antimicrobial activities. Every sample possessed very high free radical and various ROS scavenging capacities assessed by employing different *in vitro* assays such as DPPH,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ , and  $^1O_2$  scavenging activities. Based on these results, the cytoprotective effect was investigated using the oxidative hemolysis of erythrocyte. We found that the extract and fractions provide a greater protective effect compared with (+)- $\alpha$ -tocopherol. Furthermore, antimicrobial activities were confirmed against skin pathogens by broth microdilution assay. The ethyl acetate fraction had much higher antimicrobial activities than methyl paraben against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. Taken together, our results indicated that the young shoots of *N. fruticans* may have the potential role as a natural active ingredient through their antioxidant, cytoprotective effect, and antimicrobial activities.

**Keywords** – *Nypa Fruticans* Wurmb. Arecaceae, Antioxidant, Cytoprotective effect, Antimicrobial effect

피부 노화는 유전, 개인의 생활 습관 및 외부 환경 등 다양한 요인들에 의해 결정된다. 이 중 외부 환경의 요인은 공해나 담배 연기, 태양 광선을 말하며, 지표면에 도달하는 다양한 파장 영역의 빛은 피부의 광노화(photoaging)를 유발하는 주요 원인으로 보고되고 있다.<sup>1-3)</sup>

피부는 항상 산소에 접촉되어 있으며, porphyrin, nicotinamide, quinone 및 flavin과 같은 광증감제를 포함하고 있다. 이러한 광증감제는 태양 광선 노출로 에너지를 흡수하면, 산소에 에너지 전달을 통해 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 중 singlet oxygen( $^1O_2$ )을 생성하거나(type II

광증감 반응), 산소 분자에 전자 전달을 통해 superoxide anion radical( $O_2^{\cdot-}$ ) 및 부수적인 ROS를 생성한다(type I 광증감 반응).<sup>4,5)</sup> 이렇게 생성된 ROS는 다양한 산화적 손상을 통해 노화에 관여한다. 지질이나 단백질과 같은 세포막 성분들과 직접 반응하여 세포막을 파괴하거나, DNA의 염기와 반응해 7,8-dihydro-8-oxoguanine와 같은 산화적 변형을 일으켜 DNA의 손상을 유도한다. 이외에도 ROS는 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호 전달 경로를 통해 AP-1 전사인자를 활성화하여 matrix metalloproteinase(MMP)의 발현을 촉진한다. 이렇게 생성된 MMP는 콜라겐과 젤라틴 같은 세포 외 기질 성분들은 분해하여 피부의 탄력성 감소에 관여하게 된다. ROS는 NF- $\kappa$ B와 같은 전사 인자의 발현에도 관여하여 다양한 염증성 반응을 매개한다.<sup>6-10)</sup>

\*교신저자(E-mail): snpark@seoultech.ac.kr  
(Tel): +82-2-970-6451

체내에는 이러한 ROS를 소거하는 항산화 시스템이 구축되어 있지만 지속적인 자외선에 대한 노출은 ROS의 축적을 유발하고 다양한 산화적 손상을 유도한다. 따라서 산화적 손상으로 유도되는 노화 및 질병을 저해하기 위해서는 항산화제의 보충을 통한 ROS의 소거가 필요하다.<sup>1,11,12)</sup> 이에 따라 다양한 합성 항산화제 및 천연물 유래의 항산화제에 대한 수요가 증가하고 있으며, 관련 연구가 많이 진행되고 있는 상황이다.<sup>13)</sup>

화장품, 식품 및 의약품에서의 많은 제품에는 다량의 수분, 탄소원 및 질소원이 존재하기 때문에 미생물이 서식하기 좋은 환경을 제공한다.<sup>14)</sup> 이러한 미생물은 제품의 오염을 유발할 뿐만 아니라 다양한 염증 반응을 매개하게 된다. 대표적으로 *Staphylococcus aureus*는 모낭염, 질종 및 용종, 농가진 등의 피부 질환을 유발하며,<sup>15)</sup> 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*는 피부 병변 및 모낭염 등을 일으킬 수 있다.<sup>16)</sup> 이러한 종류의 미생물 번식을 저해하기 위해 방부제로 파라벤류가 주로 사용되어 왔으나 안정성에 관한 문제가 지속해서 제기 되고 있다.<sup>17-19)</sup> 따라서 이러한 파라벤류를 대체하기 위한 천연 방부제에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다.<sup>14,20,21)</sup>

니파야자(*Nypa fruticans* Wurmb) 맹그리브 숲에서 서식하는 야자나무과 식물로, *Nypa* 속의 유일한 종이다. 동남아시아 및 오세아니아의 열대에서 아열대 지역에 걸쳐 분포하여 서식한다.<sup>22,23)</sup> 동남아시아에서 니파야자는 다용도로 사용되는 식물로, 수액은 식용 및 발효하여 식초로 사용되고, 싹, 잎, 줄기, 뿌리는 두통, 치통, 헤르페스, 결핵, 해독 및 인두염 등의 치료에 사용된다.<sup>24,25)</sup> 니파야자의 생리활성에 관한 연구는 식초(nipa palm vinegar, NPV)에서 항산화 및 혈당 강하를 통한 항당뇨 효능 평가,<sup>26,27)</sup> 열매에서 항산화 효능 평가와 성분 분석,<sup>25)</sup> 잎 및 줄기에서 혈당 강하와 항통각 작용,<sup>28)</sup> 잎, 뿌리, 껍질에서 *S. aureus*에 대한 항균 활성,<sup>29)</sup> 잎에서 *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*에 대한 항균 활성<sup>30)</sup> 등이 보고된 바 있다. 하지만 니파야자 싹에 관한 연구는 아직 많이 보고되어 있지 않다. 최근 니파야자 싹에 관한 연구는 열수 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NF- $\kappa$ B의 활성 억제를 통한 염증성 cytokine의 발현을 저해하고, 에탄올 추출물에서의 우수한 자유 라디칼 소거 활성을 나타낸다는 내용이 보고되었다.<sup>31,32)</sup> 기존의 연구 결과와 더불어 식물체의 싹에는 페놀성 화합물 생합성에 관여하는 phenylpropanoid가 다량 존재하기 때문에 니파야자 싹이 우수한 생리 활성을 나타낼 것으로 기대되는바,<sup>33,34)</sup> 니파야자 싹의 항산화와 항균 소재로서의 가능성을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 니파야자 싹이 다양한 산화적 손상에서 보호 효능을 나타내는지 확인하기 위해 자유 라디칼과 다양한 ROS에 대한 소거 활성을 확인하였고, 이러한 결과를 바탕으로

광노화 메커니즘을 바탕으로 설계된 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구 손상에서의 세포에 대한 보호 효능을 확인하였다. 이와 더불어 화장품, 식품 및 의약품에서의 검출이 제한되고 있는 균주를 대상으로 니파야자 싹 추출물과 분획물의 항균 효능을 methyl paraben과 비교하여 평가하였다.

## 재료 및 방법

**실험 재료** - 본 실험에 사용된 니파야자 싹은 2017년 5월 이전 미얀마에서 채취하여 현지에서 껍질을 벗기고 건조한 뒤 (주)도디팜코리아에 의해 국내로 수입되어 유통되는 시판 제품을 2017년 9월에 우주물산을 통해 구매하였다. 재료는 교신 저자인 박수남 교수가 동정하여 사용하였으며, 표본은 서울과학기술대학교 나노바이오 화장품 연구실에서 보관하고 있다.

**시약** - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione(luminol), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heparin, rose bengal, L-ascorbic acid, (+)- $\alpha$ -tocopherol(1,000 IU vitamin E/g) 및 1,3-diphenylisobenzofuran(DPBF)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서 구매하였다. Tryptic soy broth 및 potato dextrose agar는 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구매하였다. 완충용액 제조에 사용된 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, NaCl, HCl 및 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 에틸 아세테이트(EtOAc)와 같은 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

**추출물 및 분획물 제조** - 원물 200 g을 잘게 분쇄하여 상온에서 50% 에탄올 3 L에 5일 동안 침적한 후 여과하였다. 이 여과액을 감압 농축한 뒤 동결 건조하여 50% 에탄올 추출물을 얻었다. 남은 여과액 중 1 L를 감압 증류하여 대부분 에탄올을 제거한 뒤, 500 mL의 에틸 아세테이트를 이용하여 3회 반복하여 분획하였다. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 잔존하는 미량의 물을 완전히 제거한 뒤 감압 농축하여 에틸 아세테이트 분획을 얻었다. 추가적으로 에틸 아세테이트 분획 후 남은 물층을 감압 농축한 뒤 동결 건조하여 물 분획물을 얻었다.

**총 페놀 함량 측정** - 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하여 측정하였다. 이 방법은 염기성 조건에서 페놀성 화합물이 phomolybdic/phosphotungstic acid complex에 전자를 전달하여 환원물로 전환되는 정도를 흡광도로 판단하여 페놀성 물질의 함량을 결정하게 된다.<sup>35)</sup> 96-well plate에 다양한 농도의 gallic acid, 추출물 및 분획물 80  $\mu$ L와 Folin-Ciocalteu reagent(50% v/v) 20  $\mu$ L를 순서대로 첨가 후 5 min 동안 상온에 방치 하였다. 그리고 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2% w/v) 200  $\mu$ L를 넣고 상온에서 30 min 동안 반응시킨 후 microplate reader(Infinite M200 pro, Tecan, Austria)를 사용하여

760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 총 페놀 함량은 시료의 g당 gallic acid equivalent로 나타났다.

**DPPH Assay를 이용한 자유라디칼 소거 활성<sup>36)</sup>** - DPPH 라디칼은 상온에서 존재할 수 있는 비교적 안정한 라디칼로, DPPH 라디칼이 항산화제에 의해 DPPH-H로 환원이 되면 517 nm의 흡광도가 감소하게 된다. 여러 농도로 제조한 시료, 에탄올 및 0.2 mM의 DPPH 용액 0.4 mL를 암소에서 10 min 동안 반응시킨 후, UV-Vis spectrometer(Cary 50, Agilent, USA)를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 농도에서의 자유 라디칼 소거율은 아래의 식을 이용하여 얻었고, 자유 라디칼이 50% 소거되는데 필요한 농도를 구하여 자유 라디칼 소거 활성(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>)을 비교하였다.

Free Radical Scavenging (%) =

$$\left\{ 1 - \left( \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100$$

**Luminol 화학 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서 생성된 활성산소 소거 활성** - 활성산소 소거 활성 평가는 기존에 알려진 luminol을 이용한 화학 발광법을 이용하여 측정하였다.<sup>36)</sup> 다양한 농도의 시료 50 µL에 증류수 1.78 mL를 넣은 뒤 2.5 mM EDTA 용액 40 µL, 5 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 용액 10 µL, 35 mM luminol 용액 80 µL를 차례대로 넣은 후 섞어 주었다. 각 시료를 luminometer(6-channel LB9505 LT, Berthold, Germany)에 넣어준 뒤 35°C에서 5 min 동안 인큐베이션 하였고, 150 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 첨가하였다. 그리고 25 min 동안 luminol과 활성산소의 화학반응에 의해 발생한 발광을 측정하였다. 측정된 발광의 세기로부터 ROS 소거율은 아래의 식을 이용하여 얻었고, ROS가 50% 소거되는데 필요한 농도를 구하여 ROS 소거 활성(reactive oxygen scavenging activity, OSC<sub>50</sub>)을 비교하였다.

$$\text{ROS Scavenging (\%)} = \left( \frac{C_{\text{pm control}} - C_{\text{pm experiment}}}{C_{\text{pm control}} - C_{\text{pm blank}}} \right) \times 100$$

**Singlet Oxygen 소거 활성 평가** - <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소거 활성은 기존의 방법은 변형, 응용하여 측정하였다.<sup>37)</sup> DPBF는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>과 화학 반응을 통해 o-dibenzoyl benzene으로 산화되면 420 nm에서의 흡광도가 감소한다. DPBF는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>에 대해 물리적 quenching 작용은 나타내지 않기 때문에 DPBF가 산화되는 속도를 측정하여 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소거 활성을 평가할 수 있다.<sup>37,38)</sup> <sup>1</sup>O<sub>2</sub>의 생성은 rose bengal을 이용하였다. Rose bengal은 480-550 nm 영역의 가시광선 영역의 빛을 강하게 흡수하여 type II 광증감 반응을 통해 높은 수율로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>을 생성한다.<sup>39,40)</sup>

96-well plate에 900 µg/mL의 농도로 제조된 각 시료와 메

탄올에 용해시킨 200 µM의 DPBF와 24 µM의 rose bengal을 각각 100 µL씩 순차적으로 넣어주었다. 그 후 20 W의 형광등이 장착된 광 조사 장치에서 광원에서부터 10 cm의 거리에서 빛을 가하여 주었고, 10 s 마다 microplate reader를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시간에 따른 DPBF의 농도 변화를 확인하였다. 지속적으로 빛 조사가 이루어지는 상황에서 rose bengal에 의해 생성되는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>의 농도는 일정하기 때문에 DPBF와 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>의 반응에 의해 진행되는 DPBF의 산화 속도는 유사 1차 속도식으로 나타낼 수 있다.<sup>37,41)</sup> 이를 이용하여 각 시료 별 속도 상수와 반감기를 구하여 소거 활성을 비교하였다.

**Singlet Oxygen으로 유도된 적혈구 광용혈에서의 세포 보호 효과** - 실험에 사용된 적혈구는 건강한 성인으로부터 얻었고, 채혈 후 혈액은 즉시 heparin이 포함된 conical tube 넣어 4°C에서 보관하였다. 채혈한 혈액 1 mL를 원심분리기(416, Labogene, Korea)를 이용하여 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리한 뒤 혈장을 제거하여 적혈구를 분리하였고, 4 mL의 PBS를 이용하여 3회 반복하여 세척하였다. 이렇게 얻은 적혈구는 Vis-spectrometer(Spectronic 20D system, Milton Roy Co., USA)를 이용하여 700 nm에서 O.D 값이 0.6이 되도록 PBS로 희석하여 사용하였으며, 이때의 적혈구 수는 약 1.5×10<sup>7</sup> cells/mL이었다. Pyrex 시험관(No. 9820)에 제조한 적혈구 현탁액 3.5 mL와 여러 농도의 시료를 넣은 후, 30분간 pre-incubation 하였다. 이 시료에 PBS로 희석한 15 µM rose bengal 0.5 mL를 넣고 입구를 parafilm으로 밀봉 한 뒤 광 조사 장치에서 15 min 동안 빛을 가하였다. 직접 제조한 광 조사 장치는 검은색으로 도색한 50 cm×20 cm×25 cm 크기의 상자 내부에 시료와 20 W의 형광등이 장착된 형태로, 형광등과 시험관의 거리는 5 cm이다. 15 min 동안 광조사를 한 후, 15 min 간격으로 Vis-spectrometer를 이용하여 700 nm에서의 시료들의 투광도를 측정하여 적혈구의 용혈 정도를 측정하였다. 모든 실험 과정은 20°C의 암소에서 진행되었다.

**항균 활성 평가<sup>42)</sup>** - 항균 활성 평가에 사용된 균주는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*(ATCC6538) 및 *Bacillus subtilis*(ATCC19659), 그람 음성균인 *Escherichia coli*(ATCC23736) 및 *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC29336), 진균인 *Candida albicans*(ATCC10231) 및 *Aspergillus brasiliensis*(ATCC16404)로 한국 미생물 보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양 받았다. *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*는 tryptic soy broth에서 37°C, 24 hr 조건으로 배양하였고, *A. brasiliensis*는 potato dextrose agar에서 30°C, 48 hr 조건으로 배양하였다. 시료의 항균 활성은 broth microdilution 방법을 통해 minimum inhibitory concentration(MIC)와 minimum bactericidal concentration(MBC) 및 minimum fungicidal concentration

(MFC)를 구하여 평가하였다. 시료는 DMSO에 용해하여 사용하였고, 96-well plate에 연속적으로 2배씩 희석한 시료가 20 µL가 되도록 분주하였다. 그리고 각 well에 3~5×10<sup>6</sup> CFU/mL로 희석한 균액 20 µL와 배지 160 µL를 주입하여 72.125–10,000 µg/mL 농도 범위에서 시료의 항균 활성을 평가 하였다. 이렇게 제조한 균액은 저온배양기에서 48 hr 동안 배양하였고, 배양 후 균이 증식되지 않는 농도를 육안으로 평가하여 MIC로 결정하였다. MBC 및 MFC는 성장이 억제된 wells의 균액을 평판 배지에 도말하여 24 hr 동안 배양 후 colony를 형성하지 않는 최소 농도로 결정하였다.

**통계처리** – 모든 실험 데이터는 3회 이상 반복하여 측정하였으며, 평균과 표준편차로 표시하였다. 본 실험의 통계 처리는 Graphpad Prism version 6.01 소프트웨어를 사용하였다. 각 데이터 간의 유의성 분석은 unpaired t test 또는 one-way analysis of variance(ANOVA) 분석 후 Tukey's honestly significant difference(HSD) test를 이용한 사후 검정을 통해  $p < 0.05$  수준에서 수행하였다.

## 결과 및 고찰

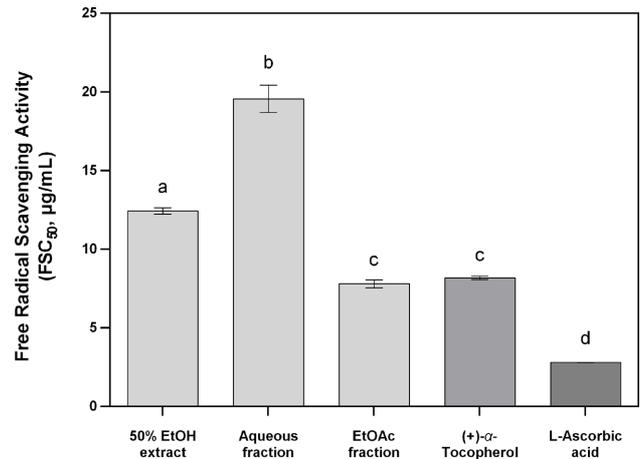
**수율 및 총 페놀 함량 측정** – 니파야자 추출물을 50% 에탄올에서 침적 시킨 후 여과한 뒤 감압 증류하여 에탄올 추출물을 얻었고 원물 대비 수율은 21.0%였다. 이 50% 에탄올 추출물에서 물 분획물과 에틸 아세테이트 분획물을 얻었고 원물 대비 수율은 각각 18.2%와 1.9%였다(Table I).

다양한 식물 추출물에는 식물 대사과정에서 생성된 다양한 hydroxybenzoic acid, hydroxycinnamic acid 및 flavonoid 등과 같은 페놀성 화합물을 포함하고 있으며, 이러한 물질들이 항산화, 항염증 및 항균 활성 같은 효능을 나타낸다.<sup>43)</sup> 따라서 이러한 물질들의 함량은 추출물의 효능을 평가하는데 있어서 중요한 요소이다. 50% 에탄올 추출물, 물 분획물, 에틸 아세테이트 분획물의 총 페놀 함량을 시료 g당 gallic acid equivalent로 환산하여 나타내었고, 각각 299.9, 216.9, 511.7 mg/g으로 나타났다(Table I).

**DPPH Assay를 이용한 자유 라디칼 소거 활성** – 본 실험에서의 양성 대조군으로 대표적인 수용성 항산화제인 L-

**Table I.** Weight yields and total phenolic contents of the extract and fractions obtained from young shoots of *N. fruticans* Wurmb. Values for total phenolic contents are presented as mean ± SD (n = 3).

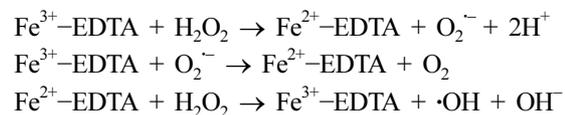
Sample	Yields (wt%)	Total phenolic (gallic acid, mg/g)
50% EtOH extract	21.0	299.9 ± 9.5
Aqueous fraction	18.2	216.9 ± 5.5
EtOAc fraction	1.9	511.7 ± 4.9



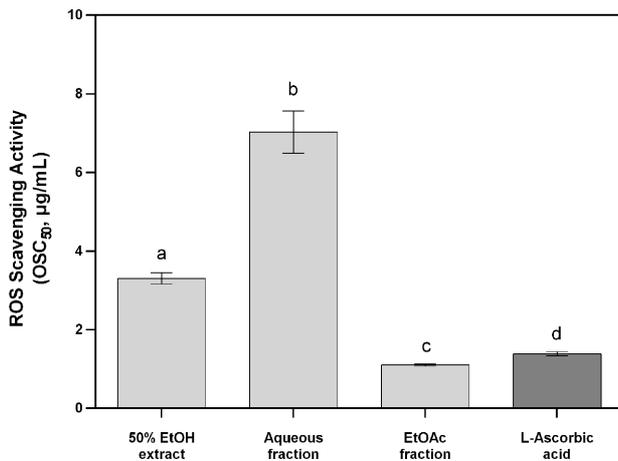
**Fig. 1.** Free radical scavenging activities of the extract and fractions obtained from young shoots of *N. fruticans* Wurmb and that of L-ascorbic acid and (+)-α-tocopherol. Values are presented as mean ± SD (n = 3). a-d, Different letters on the top of the bars denote significant differences ( $p < 0.05$ ).

ascorbic acid와 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol을 이용하여 자유 라디칼 소거 활성을 평가하였다(Fig. 1). 50% 에탄올 추출물, 물 분획물, 에틸 아세테이트 분획물의 FSC<sub>50</sub>은 각각 12.43, 19.84, 7.81 µg/mL로, 에틸 아세테이트 분획이 가장 높은 자유 라디칼 소거 활성을 나타냈다. L-ascorbic acid(2.81 µg/mL)의 활성에 비해 니파야자 추출물 및 분획물들은 낮은 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 하지만 에틸 아세테이트 분획물은 (+)-α-tocopherol(8.18 µg/mL)과 유사한 활성을 나타냈다. 이러한 니파야자 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 자유 라디칼 소거 활성은 본 연구실에서 보고한 돌의,<sup>44)</sup> 감초,<sup>45)</sup> 인동덩굴,<sup>13)</sup> 금전초,<sup>46)</sup> 니아울리 잎<sup>47)</sup> 및 라벤더 꽃잎<sup>48)</sup>의 활성과 비교하여도 뛰어난 결과였다.

**Luminol 화학 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서 생성된 활성산소 소거 활성** – Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서는 아래와 같은 반응을 통해 ·OH 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup>와 같은 ROS를 생성한다.<sup>49,50)</sup>



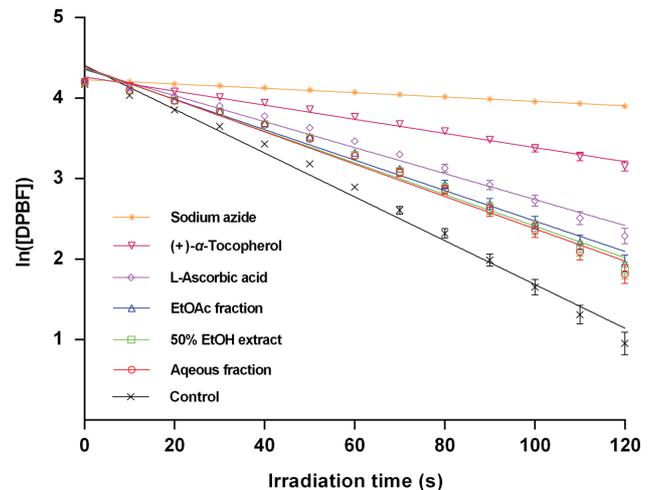
이러한 ROS는 luminol을 산화시켜 들뜬 상태의 3-aminophthalate 음이온을 형성하고, 이것이 바닥 상태로 내려오면서 425 nm 부근에서 발광을 나타낸다. Luminol이 ROS에 의해 산화되면서 발생하는 화학 발광은 각 시료에 의해 감소될 수 있으며, 이 메커니즘은 항산화 효능을 갖는 물질이 ROS를 직접 소거하거나 철 이온(Fe<sup>2+</sup> 및 Fe<sup>3+</sup>)을 킬레이팅하여 ROS 생성을 저해하는 방법이 존재한다.<sup>13,36,51)</sup> 따라서 이러한 발광의 상대적인 세기를 측정하여 항산화제



**Fig. 2.** Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities of the extract and fractions obtained from young shoots of *N. fruticans* Wurm compared to that of L-ascorbic acid, as determined by luminol-dependent chemiluminescence assay in a  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  system. Values are presented as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). a-d, the letters on the top of the bars denote a significant difference ( $p<0.05$ ).

의 ROS 소거 활성을 측정할 수 있다. 본 실험에서는 양성 대조군으로 L-ascorbic acid를 이용하여 각 시료의 화학 발광을 50% 저해하는 농도( $\text{OSC}_{50}$ )를 통해 ROS 소거 활성을 평가하였다(Fig. 2). 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol은 이러한 수용성 시스템에서 항산화 효능을 나타내지 않았다 (data not shown).

50% 에탄올 추출물, 물 분획물, 에틸 아세테이트 분획물의  $\text{OSC}_{50}$ 는 각각 3.31, 7.02, 1.10  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 50% 에탄올 추출물과 물 분획물의 활성은 L-ascorbic acid(1.39  $\mu\text{g/mL}$ ) 보다 낮았지만, 에틸 아세테이트 분획물은 L-ascorbic acid보다 뛰어난 소거 활성을 나타냈다. 기존에 보고된 식물체 연구와 비교하여도 니파야자 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 ROS 소거활성은 들외,<sup>44)</sup> 감초,<sup>45)</sup> 금전초,<sup>46)</sup> 니아울리 잎<sup>47)</sup> 및 라벤더 꽃잎<sup>48)</sup>보다 우수한 활성을 보여 주었다.



**Fig. 3.** Linearized pseudo first-order kinetic profiles corresponding to relative photo-oxidation of DPBF induced by single oxygen in the presence of different samples at a concentration of 300  $\mu\text{g/mL}$ . Symbols are experimental data and error bars are given as SD ( $n=5$ ). Lines; pseudo first-order model fittings.

**Singlet Oxygen 소거 활성 평가** -  $^1\text{O}_2$ 은 매우 반응성이 큰 활성 산소종으로, 노화와 밀접한 관련이 있는 미토콘드리아 DNA의 돌연변이 유발에 영향을 미친다는 보고가 있으며,<sup>10,52)</sup> 많은 페놀성 화합물들은 화학적 및 물리적 quenching을 통해  $^1\text{O}_2$ 의 활성을 저해한다고 알려져 있다.<sup>37,53,54)</sup> 따라서 본 실험에서는 ROS 중  $^1\text{O}_2$ 에 대한 소거 활성을 평가하였고, 양성 대조군으로는  $^1\text{O}_2$ 의 강력한 quencher로 알려진 sodium azide( $\text{NaN}_3$ )를 사용하였다.<sup>55)</sup> Fig. 3에 나타난 것과 같이 각 시료에서  $^1\text{O}_2$ 에 의한 DPBF의 산화 반응 속도는 유사 1차 속도식에 잘 부합하였으며, 동일 농도(300  $\mu\text{g/mL}$ )에서 시료 별 상대적인 DPBF의 산화 반응 속도 상수 및 반감기를 Table II에 나타냈다.  $^1\text{O}_2$  소거 활성은 sodium azide, (+)- $\alpha$ -tocopherol, L-ascorbic acid 및 에틸 아세테이트 분획물, 50% 에탄올 추출물, 물 분획물 순서로 나타났으며, 에

**Table II.** Kinetic parameters of pseudo-first order kinetic model for relative photo-oxidation of DPBF in the presence of different samples at a concentration of 300  $\mu\text{g/mL}$ . Values are presented as mean  $\pm$  SD ( $n=5$ )

Sample	$k'$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s) <sup>1)</sup>	Correlation coefficient ( $R^2$ )
Control	$0.0272 \pm 0.0011^a$	$25.5 \pm 1.1^a$	$0.9865 \pm 0.0026$
50% EtOH extract	$0.0197 \pm 0.0009^b$	$35.3 \pm 1.7^b$	$0.9836 \pm 0.0004$
Aqueous fraction	$0.0201 \pm 0.0010^b$	$34.6 \pm 1.7^b$	$0.9832 \pm 0.0006$
EtOAc fraction	$0.0189 \pm 0.0009^b$	$36.7 \pm 1.8^b$	$0.9836 \pm 0.0004$
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	$0.0087 \pm 0.0005^c$	$79.2 \pm 4.5^c$	$0.9910 \pm 0.0003$
L-Ascorbic acid	$0.0161 \pm 0.0001^d$	$43.0 \pm 2.17^d$	$0.9839 \pm 0.0004$
Sodium azide	$0.0027 \pm 0.0001^e$	$256.5 \pm 10.8^e$	$0.9971 \pm 0.0001$

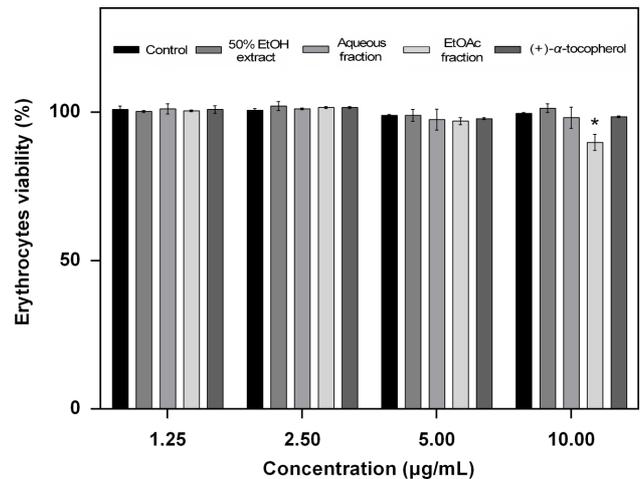
<sup>1)</sup>Half-life of DPBF, <sup>a-e</sup>Different superscripts denote significant differences in the same column ( $p<0.05$ )

틸 아세테이트 분획물, 50% 에탄올 추출물 및 물 분획물의  $^1\text{O}_2$  소거 활성은 통계학적으로 유의하지 않은 차이를 보였다. 니파야자 싹 추출물과 분획물들은 (+)- $\alpha$ -tocopherol 및 L-ascorbic acid보다는 낮은  $^1\text{O}_2$  소거 활성을 나타냈지만, 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 유의한  $^1\text{O}_2$  소거 활성을 나타냈다.

**Singlet Oxygen으로 유도된 적혈구 광용혈에서의 세포 보호 효과** - 반응성이 큰  $^1\text{O}_2$ 은 세포에서 자동산화반응의 개시제로도 작용하게 된다. 이러한 자동산화반응을 통해서 적혈구 막 단백질, 구조 단백질 및 불포화 지방산의 산화 반응이 일어나게 되고, 막 투과성의 변형 및 세포 독성 대사 산물로 인해 적혈구의 용혈이 발생한다. 용혈된 적혈구에서 방출된 철 이온에 의한 Fenton 반응 및 지질 과산화 반응으로 인해 발생한 2차 라디칼은 연쇄적인 산화 반응을 유도하여 급격한 적혈구의 용혈을 유도한다. 이로 인해 광산화적 손상으로 유도된 적혈구 용혈은 실제 피부의 광노화 메커니즘과 매우 밀접한 관련성을 가지고 있다. 따라서 항산화 평가에서 적혈구의 광용혈 억제 활성은 광노화 차단의 매우 중요한 지표로 판단할 수 있다.<sup>51,56-58)</sup>

본 실험에서는 양성 대조군으로는 세포 지질층에서 막 유동성과 투과성에 관한 안정성에 관여하며, 지질 과산화를 저해하는 것으로 알려진 (+)- $\alpha$ -tocopherol을 이용하였다.<sup>57)</sup> 우선 시료에 의한 적혈구에 용혈이 발생하지 않은 농도를 확인하기 위해 30 min 동안 여러 농도(1.25, 2.50, 5.00, 10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 시료를 적혈구 현탁액에 처리하였다. 50% 에탄올 추출물, 물 분획물 및 (+)- $\alpha$ -tocopherol은 모든 농도에 대해서 시료에 의한 적혈구 용혈은 발생하지 않았고, 에틸 아세테이트 분획물은 10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 용혈이 발생하였다(Fig. 4). 이러한 결과를 바탕으로 각 시료의  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 산화적 손상에서 적혈구 세포 보호 효과를 확인하였고, 적혈구가 50% 용혈되는 시간( $\tau_{50}$ )을 통해 활성을 비교 평가하였다(Table III).

시료를 첨가하지 않은 대조군의  $\tau_{50}$ 값은  $34.2 \pm 4.7$  min으로, 이는 실험은 모두 재현성 있게 수행되었음을 의미한다. 1.25, 2.50, 5.00 및 10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 에탄올 추출물의  $\tau_{50}$ 값은 각각 60.5, 104.5, 316.3 및 994.2 min, 물 분



**Fig. 4.** Effect of the extract and fractions obtained from young shoots of *N. fruticans* Wurm and (+)- $\alpha$ -tocopherol on erythrocytes viability. Erythrocytes were treated with different concentration of samples for 30 min, after which viability was determined. Values are presented as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \* $p < 0.05$  compared with untreated control.

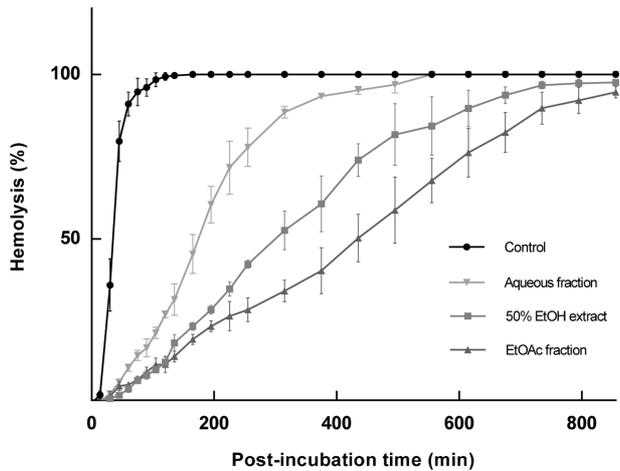
획물의  $\tau_{50}$ 값은 50.3, 72.0, 178.1 및 645.3 min으로, 50% 에탄올 추출물이 더 우수한 세포 보호 활성을 나타냈다. 50% 에탄올 추출물 및 물 분획물은 실험에 사용한 농도 범위에서 농도 의존적으로 세포 보호 활성을 증가시켰고, (+)- $\alpha$ -tocopherol(37.6, 40.4, 44.6 및 52.7 min)보다 월등히 우수한 세포 보호 효능을 나타냈다. 에틸 아세테이트 분획물은 1.25, 2.50, 및 5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 88.6, 160.1, 및 442.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의  $\tau_{50}$ 을 나타냈고, 이는 (+)- $\alpha$ -tocopherol은 물론 50% 에탄올 추출물과 물 분획물보다 뛰어났다(Table III, Fig. 5). 세포 보호 활성에서도 니파야자 싹 추출물 및 분획물은 기존에 보고된 감초,<sup>45)</sup> 인동덩굴,<sup>13)</sup> 금전초,<sup>46)</sup> 니아올리 잎<sup>47)</sup> 및 라벤더 꽃잎<sup>48)</sup>의 활성보다 우수하였다.

Rose bengal에 의해 유도된 적혈구 용혈 현상에서 항산화제의 보호 메커니즘은 일차적으로 생성된  $^1\text{O}_2$ 에 대한 소거 능력,  $^1\text{O}_2$ 과 세포막의 지질 및 단백질과의 반응으로 생성된 2차 ROS의 소거 능력, 철 이온에 대한 킬레이팅 능력 및 세

**Table III.** Cytoprotective effects of extract and fractions obtained from young shoots of *N. fruticans* Wurm, and that of (+)- $\alpha$ -tocopherol against  $^1\text{O}_2$ -induced photohemolysis in erythrocytes. Values are presented as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Sample	$\tau_{50}$ (half time of hemolysis) <sup>1)</sup> (min)			
	1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$
50% EtOH extract	60.5 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	104.5 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	316.3 $\pm$ 37.7 <sup>a</sup>	994.2 $\pm$ 50.9 <sup>a</sup>
Aqueous fraction	50.3 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	72.0 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	178.1 $\pm$ 9.8 <sup>b</sup>	645.3 $\pm$ 76.1 <sup>b</sup>
EtOAc fraction	88.6 $\pm$ 6.7 <sup>c</sup>	160.1 $\pm$ 16.1 <sup>c</sup>	442.8 $\pm$ 48.0 <sup>c</sup>	-
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	37.6 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	40.4 $\pm$ 1.7 <sup>d</sup>	44.6 $\pm$ 1.7 <sup>d</sup>	52.7 $\pm$ 2.3 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Untreated control,  $\tau_{50} = 34.2 \pm 4.7$  min, <sup>a-d</sup> Different superscripts denote significant differences in the same column ( $p < 0.05$ )



**Fig. 5.** Time-dependent photohemolysis of erythrocytes induced by singlet oxygen in the extract and fractions obtained from young shoots of *N. fruticans* Wurm. at a concentration of 5.00 µg/mL. Values are presented as mean ± SD (n = 3).

포막에 대한 투과성이 복합적으로 작용한다.<sup>36,38,59,60</sup> 선행 연구에서 L-ascorbic acid는 세포막에 대한 투과성이 낮고, (+)-α-tocopherol은 수용성 시스템에서 ROS 소거 활성이 저조하기 때문에 큰 적혈구 보호 효능을 갖지 못하는 것을 확인하였다.<sup>38</sup> 이에 반해 니파야자 추출물 및 분획물은 매우 우수한 적혈구 보호 효능을 나타냈다. 이러한 결과는 추출물과 분획물은 모두 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소거 활성뿐만 아니라, 자유 라디칼 및 수용성 시스템에서 ROS 소거 활성이 뛰어났기 때문인 것으로 추측된다. 이와 더불어 니파야자의 유효 성분들은 세포막에 대한 투과성도 나타내어 세포 내로 침투한 ROS 및 지질 과산화물에 의한 라디칼 연쇄 반응을 유효하게 차단하는 것으로 사료된다. 이러한 보호 효능을 나타내는 물

질은 주로 페놀성 화합물로 기존의 다양한 연구에서 식물 추출물에 존재하는 페놀성 화합물이 적혈구의 산화적 손상에서 세포 보호 효능을 갖는다고 보고하였다.<sup>36,38,59,60</sup> 앞선 실험에서 니파야자 추출물 및 분획물에 많은 양의 페놀성 화합물이 존재하는 것을 확인하였다. 따라서 추출물 및 분획물의 우수한 세포 보호 효과는 이러한 페놀성 화합물에서 기인한 것으로 판단되며, 추후 이러한 우수한 효능을 나타내는 유효 물질에 대한 성분 분석에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

**항균 활성 평가** - 시료들의 항균 활성은 화장품 및 의약품에서의 검출이 제한되고 있는 균주를 대상으로 MIC 및 MBC/MFC(µg/mL)값을 비교하여 평가하였다. 양성 대조군으로는 보편적으로 사용되고 있는 방부제인 methyl paraben을 사용하였고, 결과는 Table IV에 나타났다. 니파야자 추출물 및 분획물들의 항균 활성은 에틸 아세테이트 분획이 가장 우수했고, 이는 에틸 아세테이트 분획물이 가장 많은 양의 페놀성 화합물을 포함하기 때문인 것으로 판단된다. 이러한 결과는 페놀류 함량과 항균 활성이 양의 상관관계를 갖는다는 기존의 보고에 부합하는 결과이다.<sup>61</sup> 에틸 아세테이트 분획은 평가에 사용된 6종의 균주 중 총 5종의 균주(*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*)에서 항균 활성을 나타냈다. 활성을 나타낸 서로 다른 균주에 대한 에틸 아세테이트 분획의 MIC 값은 156.25 – 2,500 µg/mL 범위로 나타났고, MBC 및 MFC 값은 625 – 2,500 µg/mL의 범위의 값을 나타냈다. 이러한 에틸 아세테이트 분획의 항균 활성은 *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에 대해 양성 대조군으로 사용한 methyl paraben보다 뛰어났다. 50% 에탄올 추출물은 4종의 균주(*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*)에 대해 항균 활성을 나타냈다. MIC 값은 625 – 10,000 µg/mL의 범위로 나타났

**Table IV.** Antimicrobial activity of extract and fractions obtained from young shoots of *N. fruticans* Wurm. and that of methyl paraben against *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, and *A. brasiliensis*

Test	NC <sup>1)</sup>		<i>N. fruticans</i>					
	Methyl paraben		50% EtOH extract		Aqueous fraction		EtOAc fraction	
Gram positive bacteria	MIC <sup>2)</sup>	MBC <sup>3)</sup>	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i>	2,500	2,500	625	1,250	2500	2500	156.25	625
<i>B. subtilis</i>	1,250	1,250	1,250	1,250	10,000	- <sup>5)</sup>	312.5	625
Gram negative bacteria	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i>	1,250	1,250	-	-	-	-	2,500	2,500
<i>P. aeruginosa</i>	1,250	1,250	1,250	1,250	-	-	312.5	312.5
Fungi	MIC	MFC <sup>4)</sup>	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i>	1,250	1,250	10,000	-	-	-	312.5	625
<i>A. brasiliensis</i>	625	625	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>Negative control, <sup>2)</sup>Minimum Inhibitory concentration (µg/mL), <sup>3)</sup>Minimum bactericidal concentration (µg/mL), <sup>4)</sup>Minimal fungicidal concentration (µg/mL), <sup>5)</sup>No activity detected.

다. 또한 50% 에탄올 추출물은 *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* 균주에 대해 1,250 µg/mL의 MBC 값을 나타냈고, *C. albicans*에 대해서는 실험 농도 범위에서 MFC 값을 나타내지 않았다. 물 분획물은 *S. aureus*(MIC/MBC, 2,500 µg/mL)와 *B. subtilis*(MIC, 10,000 µg/mL)에 대해서 항균 활성을 보였다. 니파야자 싹 추출물과 분획물은 공통적으로 그람 양성균에서 항균 활성을 나타냈으며, 그 중 *S. aureus*에 대해 가장 우수한 항균력을 보였다. 위와 같은 실험 결과, 니파야자 싹 추출물과 분획물은 실험 균주에 대해 methyl paraben과 동등 혹은 이상의 항균 활성을 나타냈기에 파라벤류를 대체할 천연 방부제로서의 응용 가능성이 존재한다고 판단된다.

## 결 론

본 연구에서는 50% 에탄올을 이용하여 니파야자 싹에서 에탄올 추출물을 얻었고, 이 추출물에서 물 및 에틸 아세테이트 분획물을 제조하였다. 그리고 제조한 추출물과 분획물들의 항산화 활성, 세포 보호 효능 및 항균 활성에 관한 평가를 수행하였다. 니파야자 싹 에탄올 추출물 및 물, 에틸 아세테이트 분획물은 자유 라디칼과 다양한 형태의 ROS에 대한 높은 소거 활성을 나타냈다 이러한 결과를 바탕으로 피부의 손상 메커니즘을 바탕으로 설계된 적혈구 광용혈 실험을 수행하였고, 추출물과 분획물들은 산화적 손상으로 유도된 적혈구에 대해 뛰어난 세포 보호 효능을 나타냈다. 이러한 니파야자 싹의 항산화 및 세포 보호 효능은 본 연구진에 의해 보고된 기존에 많은 식물 추출물 및 분획물의 효능과 비교하여도 매우 우수하였다. 이와 더불어 니파야자 추출물 및 분획물들의 항균 활성도 확인하였다. 특히 에틸 아세테이트 분획물은 그람 양성균, 그람 음성균 및 진균 모두에 관해 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 이상의 결과들을 통해 니파야자 싹이 화장품, 식품 및 의약품 등의 다양한 분야에서 항산화 및 항균 소재로의 활용 가능성이 있다고 판단되기에 이에 관한 후속 연구가 기대된다. 특히, 본 연구에서 수행된 모든 실험에서 에틸 아세테이트 분획물은 에탄올 추출물 및 물 분획물에 비해 우수한 항산화 및 항균 활성을 나타냈다. 이는 니파야자 싹의 우수한 효능을 나타내는 유효 성분이 에틸 아세테이트 분획물에 중요하게 존재하기 때문인 것으로 보이며, 이에 따라 에틸 아세테이트 분획물의 성분 분석과 개별 성분들의 효능 평가를 통한 유효 성분의 규명이 필요할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Darvin, M. E., Fluhr, J. W., Schanzer, S., Richter, H., Patzelt, A., Meinke, M. C., Zastrow, L., Golz, K., Doucet, O., Sterry, W. and Lademann, J. (2011) Dermal carotenoid level and kinetics after topical and systemic administration of antioxidants: enrichment strategies in a controlled *in vivo* study. *J. Dermatol. Sci.* **64**: 53-58.
- Silva, A. R., Menezes, P. F., Martinello, T., Novakovich, G. F., Praes, C. E. and Feferman, I. H. (2010) Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. *Int. J. Cosmet. Sci.* **32**: 73-80.
- Zastrow, L. and Lademann, J. (2016) Light - Instead of UV protection: New requirements for skin cancer prevention. *Anticancer Res.* **36**: 1389-1393.
- Cadet, J. and Douki, T. (2011) Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *J. Investig. Dermatol.* **131**: 1005-1007.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J. L. and Di Mascio, P. (2009) Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**: 903-911.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J. G., Barnes, D. E., Lindahl, T. and Epe, B. (2001) Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase(Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* **22**: 1459-1463.
- Natarajan, V. T., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R. and Gokhale, R. S. (2014) Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 542-551.
- Xuan, S. H., Park, Y. M., Park, S. H., Jeong, H. J. and Park, S. N. (2018) Suppression of ultraviolet B-mediated matrix metalloproteinase generation by *Sorbus commixta* Twig extract in human dermal fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **94**: 370-377.
- Jung, Y. R., Kim, D. H., Kim, S. R., An, H. J., Lee, E. K., Tanaka, T., Kim, N. D., Yokozawa, T., Park, J. N. and Chung, H. Y. (2014) Anti-wrinkle effect of magnesium lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE: inhibition of MMPs via NF-κB signaling. *PLoS One* **9**: e102689.
- Kammeyer, A. and Luiten, R. M. (2015) Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**: 16-29.
- Darvin, M., Patzelt, A., Gehse, S., Schanzer, S., Benderoth, C., Sterry, W. and Lademann, J. (2008) Cutaneous concentration of lycopene correlates significantly with the roughness of the skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**: 943-947.
- Park, S. N., Kim, S. Y., Lim, G. N., Jo, N. R. and Lee, M. H. (2012) *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts. *J. Ind. Eng. Chem.* **18**: 680-683.
- Lee, Y. S., Yun, M. E., Lee, Y. J., Park, Y. M., Lee, S. L. and Park, S. N. (2018) Antioxidant activities and cytoprotective effects of *Lonicera japonica* Thunb. extract and fraction against oxidative stress. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **46**: 18-28.
- Park, S. N., Ha, J. H., Bae, J. Y., Jang, H. N. and Kim, H. J.

- (2014) Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active Ingredients. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 386-392.
15. Choi, S. H., Kim, H. J., Lee, B. C., Moon, T. K. and Kim, N. S. (2013) Clinical evaluation of residual effectiveness of antibacterial agents. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **39**: 133-140.
  16. Park, S. H. (1983) A case of gram negative folliculitis due to *Pseudomonas*. *Korean J. Dermatol.* **21**: 429-341.
  17. Rastogi, S. C., Schouten, A., de Kruijf, N. and Weijland, J. W. (1995) Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* **32**: 28-30.
  18. Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J. and Sumpter, J. P. (1998) Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**: 12-19.
  19. Barr, L., Metaxas, G., Harbach, C. A., Savoy, L. A. and Darbre, P. D. (2012) Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *J. Appl. Toxicol.* **32**: 219-232.
  20. Chae, K. Y. (2012) Antibacterial activity of Hippophae rhamnoides leaf extract and the stability of a cream with the extract. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 43-49.
  21. Kim, H. J. (2013) Comparative study on the antimicrobial activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts with various countries of origin as natural antiseptics. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 358-366.
  22. Sugai, K., Watanabe, S., Kuishi, T., Imura, S., Ishigaki, K., Yokota, M., Yanagawa, S. and Suyama, Y. (2015) Extremely low genetic diversity of the northern limit populations of *Nypa fruticans* (Arecaceae) on Iriomote Island, Japan. *Conserv. Genet. Resour.* **17**: 221-228.
  23. Jian, S., Ban, J., Ren, H. and Yan, H. (2010) Low genetic variation detected within the widespread mangrove species *Nypa fruticans* (Palmae) from Southeast Asia. *Aquat. Bot.* **92**: 23-27.
  24. Rahmatullah, M., Sadeak, S. M. I., Bacha, S. C., Hossain, M. T., Abdullah-al-Mamun, Montaha, Jahan, N., Majeedul H. Chowdhury, Jahan, R., Nasrin, D., Rahman, M. and Rahman, S. (2010) Brine shrimp toxicity study of different Bangladeshi medicinal plants. *Adv. Nat. Appl. Sci.* **4**: 163-173.
  25. Prasad, N., Yang, B., Kong, K. W., Khoo, H. E., Sun, J., Azlan, A., Ismail, A. and Romli, Z. B. (2013) Phytochemicals and antioxidant capacity from *Nypa fruticans* Wurmb. fruit. *Evid. -based Complementary Altern. Med.* **2013**: 154606.
  26. Yusoff, N. A., Ahmad, M., Al-Hindi, B., Widyawati, T., Yam, M. F., Mahmud, R., Razak, K. N. and Asmawi, M. Z. (2015) Aqueous extract of *Nypa fruticans* Wurmb. vinegar alleviates postprandial hyperglycemia in normoglycemic rats. *Nutrients* **7**: 7012-7026.
  27. Yusoff, N. A., Yam, M. F., Beh, H. K., Abdul Razak, K. N., Widyawati, T., Mahmud, R., Ahmad, M. and Asmawi, M. Z. (2015) Antidiabetic and antioxidant activities of *Nypa fruticans* Wurmb. vinegar sample from Malaysia. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **8**: 595-605.
  28. Reza, H., Haq, W. M., Das, A. K., Rahman, S., Rownak, J. and Rahmatullah, M. (2011) Anti-hyperglycemic and antinociceptive activity of methanol leaf and stem extract of *Nypa fruticans* Wurmb. *Pak. J. Pharm. Sci.* **24**: 485-488.
  29. Kong, C., Yehye, W. A., Noorsaadah, A. R., Tan, M.-W. and Nathan, S. (2014) Discovery of potential anti-infectives against *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *BMC Complement Altern. Med.* **14**: 4.
  30. Bakshi, M. and Chaudhuri, P. Antimicrobial potential of leaf extracts of ten mangrove species from Indian Sundarban. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* **51**: 294-304.
  31. Lee, Y. H., Kim, W. K., Jung, H. A. and Oh, W. K. (2017) Analysis of nutritional components and antioxidant activity of nipa palm (*Nypa fruticans* Wurmb) Flower Stalk. *Korean J. Food Nutr.* **30**: 1080-1086.
  32. Bae, G. S. and Park, S. J. (2016) The anti-inflammatory effect of *Nypa fruticans* Wurmb. fruit on lipopolysaccharide-induced inflammatory response on RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbol.* **31**: 79-84.
  33. Ruhmann, S., Leser, C., Bannert, M. and Treutter, D. (2002) Relationship between growth, secondary metabolism, and resistance of apple. *Plant Biol.* **4**: 137-143.
  34. Kuete, V. (2013) Medicinal plant research in africa: Pharmacology and chemistry, 251, Elsevier, New York.
  35. Ainsworth, E. A. and Gillespie, K. M. (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2**: 875-877.
  36. Hwang, J. P., Ha, J. H., No, G. Y., Jeong, Y. J. and Park, S. N. (2017) Cellular protective effect of novel dimeric ferulamide derivatives against UVA and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and its structural mechanism. *J. Ind. Eng. Chem.* **53**: 164-170.
  37. Park, S. N. and Lee, T. Y. (1984) Single oxygen quenching activities of carotenoids. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **10**: 75-89.
  38. Park, S. N., Won, D. H., Hwang, J. P. and Han, S. B. (2014) Cellular protective effects of dehydroeffusol isolated from *Juncus effusus* L. and the mechanisms underlying these effects. *J. Ind. Eng. Chem.* **20**: 3046-3052.
  39. Miller, J. S. (2005) Rose bengal-sensitized photooxidation of 2-chlorophenol in water using solar simulated light. *Water Res.* **39**: 412-422.
  40. DeRosa, M. C. and Crutchley, R. J. (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **233-234**: 351-371.
  41. Paula, L., Santos, R., Menezes, H., Britto, J., Vieira, J., Filho, P. and Oliveira, C. (2010) A comparative study of irradiation systems for photoinactivation of microorganisms. *J. Braz. Chem. Soc.* **21**: 694-700.

42. Jang, H. N. and Park, S. N. (2014) Antimicrobial activity of Niaouli(*Melaleuca quinquenervia*) leaf extracts against skin flora. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **40**: 313-320.
43. Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**: 191-203.
44. Kim, K. M., Kim, A. R., Kim, A. Y., Ha, J. H., Xuan, S. H., Jeong, Y. J., Park, Y. M., Jeong, H. J., Hong, I. G. and Park, S. N. (2017) Antioxidative and cellular protective effects of dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) extracts against oxidative stress. *Kor. J. Pharmacogn.* **48**: 125-133.
45. Han, S. B., Gu, H. A., Kim, S. J., Kim, H. J., Kwon, S. S., Kim, H. S., Jeon, S. H., Hwang, J. P. and Park, S. N. (2013) Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **39**: 1-8.
46. Kim, A. R., Jung, M. C., Jeong, H. I., Song, D. G., Seo, Y. B., Jeon, Y. H., Park, S. H., Shin, H. S., Lee, S. L. and Park, S. N. (2018) Antioxidative and cellular protective effects of *Lysimachia christinae* Hance extract and fractions. *Appl. Chem. Eng.* **29**: 176-184.
47. Kim, M. J., Kim, E. J. and Park, S. N. (2014) Antioxidative effect and component analysis of niaoulin (*Melaleuca quinquenervia*) leaf extracts. *J. Korean Oil chem. Soc.* **31**: 771-780.
48. Kim, A. Y., Ha, J. H., Kim, A. R., Jeong, H. J., Kim, K. M. and Park, S. N. (2017) Cellular protective effect and active component analysis of lavender(*Lavandula angustifolia*) extracts and fractions. *Appl. Chem. Eng.* **28**: 469-484.
49. Gutteridge, J. M., Maitt, L. and Poyer, L. (1990) Superoxide dismutase and Fenton chemistry : Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem. J.* **269**: 169-174.
50. Park, S. N., Kim, M. J., Ha, J. H., Lee, N. H., Park, J., Lee, J., Kim, D. and Yoon, C. (2016) Protective effects of TES trioleate, an inhibitor of phospholipase A2, on reactive oxygen species and UVA-induced cell damage. *J. Photochem. Photobiol. B* **164**: 30-35.
51. Gutteridge, J. M., Richmond, R. and Halliwell, B. (1979) Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* **184**: 469-472.
52. Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H. and Krutmann, J. (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J. Biol. Chem.* **274**: 15345-15349.
53. Kim, J. I., Lee, J. H., Choi, D. S., Won, B. M., Jung, M. Y. and Park, J. (2009) Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by common synthetic antioxidants(tert-butylhydroxyanisol, tert-di-butylhydroxytoluene, and tert-butylhydroquinone) as compared with alpha-tocopherol. *J. Food Sci.* **74**: C362-369.
54. Nagai, S., Ohara, K. and Mukai, K. (2005) Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *J. Phys. Chem. B* **109**: 4234-4240.
55. Huang, L., St Denis, T. G., Xuan, Y., Huang, Y. Y., Tanaka, M., Zadlo, A., Sarna, T. and Hamblin, M. R. (2012) Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **53**: 2062-2071.
56. Niki, E., Komuro, E., Takahashi, M., Uranoz, S., Itos, E. and Terao, K. (1988) Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *J. Biol. Chem.* **263**: 19809-19814.
57. Park, S. N. (1999) Effects of natural products on skin cells – Action and suppression of reactive oxygen species. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **25**: 77-127.
58. Valenzeno, D. P., Trudgen, J., Hutzenbuhler, A. and Milne, M. (1987) Singlet oxygen involvement in photohemolysis sensitized by merocyanine-540 and rose bengal. *Photochem. Photobiol.* **46**: 985-990.
59. Magalhaes, A. S., Silva, B. M., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentao, P. and Carvalho, M. (2009) Protective effect of quince(*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* **47**: 1372-1377.
60. Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B. and Sengupta, P. K. (2007) Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**: 42-48.
61. Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D. and Corke, H. (2007) The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* **117**: 112-119.

(2018. 4. 25 접수; 2018. 5. 25 심사; 2018. 6. 25 게재확정)