

연구노트

국내산 식용식물체의 멜라토닌 함량 분석

김 석 중

대구가톨릭대학교 식품공학과

Analysis of Melatonin Content from Domestic Edible Plants

Seok Joong Kim

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

Melatonin, which is a hormone secreted from pineal gland of brain and known to prevent oxidative damages of various tissues, was analyzed in 26 domestic edible plants. For the preparation of melatonin fraction, 50% ethanol extract prepared from lyophilized plant powder was filtered and applied on TLC plate. Melatonin position on TLC developed with acetone was identified by fluorescence light and extracted with methanol. This methanolic fraction was injected into HPLC comprising ODS-A column, fluorescence detector, and mobile phase consisting of a mixture (30 : 70, v/v) of 70% ammonium acetate and methanol at a flow rate of 1.0 mL/min. Melatonin was identified at the retention time of 17 min. Results revealed that celery, leek, broccoli, and cauliflower had higher melatonin contents than others.

Key words: melatonin, plant, HPLC

서 론

약 40년 전에 소의 뇌 추출물에서 처음 확인이 된 melatonin(N-acetyl-5-methoxyprotamine)은 그 이후 척추동물들의 송과선에서 분비되는 주요 호르몬으로서 동물의 24시간 및 계절적 주기조절, 수면유도, 생식 등과 관련이 깊은 것으로 확인되었다⁽¹⁾.

이와 같은 melatonin이 최근에 관심을 끄는 이유는 Tan 등⁽²⁾에 의해 밝혀진 melatonin의 항산화력에 기인한다. 호기호흡을 하는 지구상의 모든 생물들은 생존을 위해 산소를 필요로 하지만 체내에 들어온 산소 중 2-4% 정도는 물의 형태로 완전히 환원되지 못해 반응성이 매우 강한 활성산소를 생성하고 이들이 생체 구성성분에 대해 산화적 손상을 일으켜서 다양한 질병 및 노화 등을 일으키는 것으로 알려져 있다⁽³⁾. 이러한 활성산소 중에서 반응성이 특히 강한 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)에 대해 melatonin은 기존의 다른 항산화제 보다 강력한 소거능이 있는 것으로 확인되었다^(2,4). 이 후 여러 연구자들에 의해 melatonin은 peroxinitrite(ONOO⁻) anion⁽⁵⁾, singlet oxygen($^1\text{O}_2$)⁽⁶⁾, peroxy radical(LOO \cdot)⁽⁷⁾ 등도 소거시킬 수 있다는 사실이 확인되었으며, 이러한 항산화력과 관련하여

여 melatonin은 *in vitro*, *in vivo* 조건에서 생체의 주요 구성 성분인 지질, DNA, 단백질 등의 산화적 손상도 억제시킬 수 있음이 보고되었다^(8,9). 또한 melatonin은 노화가 진행됨에 따라 체내 생성량은 점차 줄어들고⁽¹⁰⁾, 송과선의 제거를 통해 melatonin의 체내 생성을 억제하는 경우에 생체조직의 산화가 촉진되며 수명도 단축되는 것으로 보아⁽⁹⁾ melatonin은 노화방지와도 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다. 더욱이 이와 같은 항산화력이외에 melatonin은 지금까지 알려진 다른 항산화제와는 달리 수용성환경과 지용성 환경에서의 용해도 특성으로 인해 체내 모든 부위에서 작용할 수 있는 특성을 지니고 있는 것으로 확인되어⁽¹¹⁾, 기존에 밝혀진 항산화제보다 생체조직 보호측면에서 우수한 것으로 알려져 있다.

한편, melatonin에 대한 연구는 거의 대부분 동물과 관련된 것이지만 최근에 식물체를 대상으로 melatonin의 존재와 기능에 대한 연구도 일부 진행되었다⁽¹²⁻¹⁴⁾. 그러나 이러한 연구들은 식물생리 측면에서 연구를 수행한 경우이거나 매우 제한된 소재를 사용한 경우로, melatonin을 함유한 기능성 식품소재로서의 식물체 연구라는 관점에서는 매우 미진하다고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 일상적으로 소비되는 국내산 식물체를 대상으로 melatonin 함량을 분석함으로써 향후 천연 melatonin 소재로의 활용 가능성을 조사하였다.

*Corresponding author : Seok Joong Kim, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Hayang, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-702, Korea
Tel: 82-53-850-3218
Fax: 82-53-850-3218
E-mail: sjkim@cataegu.ac.kr

재료 및 방법

재료

26종의 식물체를 인근 슈퍼마켓에서 구입하여 수세 후 채

로 썰어서 동결 건조한 다음 분말로 분쇄(삼성 CR-481W)하여 melatonin 함량 분석용 시료로 사용하였으며, 표준 melatonin은 Sigma사 제품을, 기타 시약은 HPLC 급을 사용하였다.

식물체 추출물의 조제

각 식물체의 동결건조분말을 50% ethanol에 5%(w/v) 농도로 첨가한 후 상온에서 40분간 진탕 추출한 다음 10,000×g에서 4분간 원심분리하고 상등액을 취해 PVDF filter(0.45 μm, Millipore, USA)로 여과하였다. 이 여과액 30 μL을 TLC plate (silica gel 60 F254, Merck, Germany)에 spotting한 후에 acetone을 이용하여 전개시켰다. Melatonin의 위치를 확인하기 위하여 표준 melatonin을 식물체 추출물과 같이 전개시킨 후에 형광조사(366 nm)하에서 melatonin 위치에 해당하는 부위를 분리한 다음 500 μL methanol로 40분간 상온에서 진탕 추출하였다. 그리고 이 추출물을 PVDF filter로 재 여과한 후 HPLC로 melatonin 함량을 분석하였다.

Melatonin 분석조건

Melatonin의 함량을 분석하기 위해 Hattori 등의 방법⁽¹³⁾을 변형시켜 사용하였다. 즉, HPLC(model PV-980, Jasco, Japan) 분석에서 melatonin의 분리에 ODS-A column(4.6 mm i.d.×250 mm, S-10 μm, 120A), peak의 확인에는 fluorescence detector(excitation 280 nm, emission 340 nm)를 사용하였다. 분리를 위한 이동상으로 70% ammonium acetate와 methanol을 30:70(v/v)으로 혼합한 용매를 사용하였으며 유속은 1.0 mL/min이었고 시료 주입량은 10 μL였다. 시료에서의 melatonin 함량은 Borwin chromatography software(Rev. 1.2150, Jasco, Japan)를 이용하여 구하였고 표준물질은 melatonin 시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

뇌의 송과선에서 분비되는 호르몬인 melatonin은 그 생성량이 빛의 조사량에 의해 조절되는 것으로 빛이 강한 낮에는 감소하고 밤에는 증가하는 것으로 알려져 있으며 밤에 melatonin의 혈중농도는 개체에 따라 50-125 pg/mL 수준인 것으로 알려져 있다⁽¹⁵⁾. 그러나 melatonin의 강한 항산화력에 대한 최근의 연구와 체내 생성량이 노화가 진행됨에 따라 감소하는 것으로 알려져 있어 이들이 활성산소와 관련된 다양한 질병 및 노화방지 등과 관련이 깊은 것으로 여겨지고 있다⁽¹⁰⁾. 이와 관련하여 미주 지역에서는 현재 합성 melatonin 제품이 food supplement 형태로 판매되고 있는 중이다. 그러나 우리나라의 경우에 melatonin의 판매가 금지되어 있는 상황이고 또한 최근에 천연물에 대한 소비자들의 선호도가 높아지고 있는 상황을 고려할 때 천연식품소재로부터 melatonin의 함량을 분석하는 것은 매우 의미 있는 일이라고 판단된다.

본 실험에서는 먼저 조사대상 26 품목의 식물체로부터 melatonin 분획을 얻기 위하여 50% ethanol 추출과 TLC 분리를 실시하여 형광하에서 단일한 분획을 확인할 수 있었다. 그리고 이 부분 추출물을 HPLC로 분석한 결과 조사된 모든 식물체 분획으로부터 분리 17분에 단일한 peak를 얻을 수 있었으며 이는 표준 melatonin peak와 일치하는 것으로

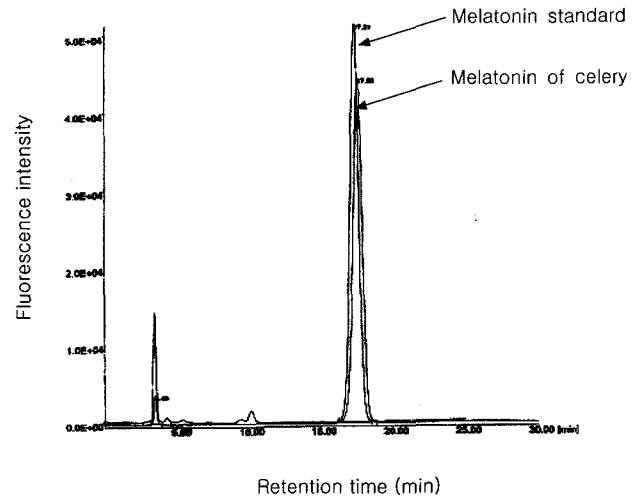


Fig. 1. HPLC elution profile of melatonin.

나타났다(Fig. 1). 각 품목에 대한 함량을 비교한 결과, 셀러리가 분말 g 당 9.8 μg의 melatonin을 함유하는 것으로 나타났으며 고춧잎, 부추, 브로콜리 등이 2 μg/g 이상, 컬리플라워, 치커리, 새송이버섯, 마늘, 달래, 팽이버섯 등에서 1 μg/g 이상의 melatonin이 확인되었다. 특히 고추의 경우는 우리가 일반적으로 많이 섭취하는 풋고추, 홍고추, 파리고추 보다는 잎 부분에 많이 존재하는 것으로 나타났다.

본 실험의 결과로부터 얻어진 melatonin 함량은 이전에 식물체 melatonin을 분석한 Hattori 등⁽¹³⁾과 Dubbels 등⁽¹⁴⁾의 결과와 비교시 매우 높은 것으로 확인되었다. 즉, Hattori 등은 radioimmunoassay를 이용하여 26종의 식물체로부터 melatonin 함량을 분석하였는데 생체조직 g 당 수 pg(아스파라거스 9.5 pg/g)에서 수천 pg(tall fescuse 5288 pg/g) 수준이라고 하였고 Dubbels 등도 6종의 식물체로부터 생체 100 g당 0-50 ng 수준의 melatonin을 확인하였다. 이처럼 식물체 중의 melatonin 함량이 본 실험 결과에 비해 상당히 낮게 나타난 이유는 두 연구 모두 melatonin 함량의 비교 분석에는 주로 radioimmunoassay를 이용하였고 시료의 형태도 생체조직을 사용한 차이가 작용하였으리라 생각된다. 그러나 더 중요한 이유는 추출방법의 차이에 기인한 것으로 판단된다. 즉 melatonin은 구조상 수용성 및 지용성 용해 특성을 동시에 지니는 관계로⁽¹¹⁾ 추출시 일반적인 물보다는 다소 극성이 낮은 용매를 사용하는 것이 효과적으로 본 연구에서는 추출에 50% ethanol을 사용하였다. Kim 등⁽¹⁶⁾은 과량의 melatonin을 동물에게 투여하는 실험에서 고농도의 melatonin 용액을 제조하기 위해 ethanol 수용액을 사용한 바 있다. 그러므로 Hattori 등과 Dubbels 등의 추출방법이 본 연구에서 사용한 추출방법보다 비효율적이기 때문에 melatonin 함량이 차이가 나는 것으로 판단되었다. 또한 이들은 수용액 추출물을 그대로 HPLC 분석에 이용함으로써 melatonin 이외에 많은 다른 물질 peak가 나타났으나 본 연구에서는 TLC 분리를 통해 얻어진 melatonin 분획을 HPLC 분석에 사용한 결과 깨끗한 단일 peak를 얻을 수 있었다.

한편, Murch 등⁽¹⁷⁾은 5종의 약용식물체로부터 melatonin 함량을 분석하였는데 Huang-qin과 St. John's Wort flowers에서

Table 1. Melatonin content in some edible plants

Scientific name	English name	Melatonin content (µg/g)*
<i>Apium graveolens</i>	Celery	9.82
<i>Hypericum erectum</i>	Red pepper leaf	3.28
<i>Allium tuberosum</i>	Leek	2.75
<i>Brassica oleracea var.italica</i>	Broccoli	2.25
<i>Brassica campestris</i>	Cauliflower	1.79
<i>Cichorium intybus</i>	Chicory	1.56
<i>Tricholoma matsutake</i>	Song-i mushroom	1.50
<i>Allium sativum</i>	Garlic	1.35
<i>Allium monanthum</i>	Wild garlic	1.34
<i>Flamm velutipes</i>	Nameko	1.24
<i>Agaricus bisporus</i>	Agaric mushroom	0.90
<i>Pleurotus ostratus</i>	Oyster mushroom	0.89
<i>Brassica oleracea</i>	Red cabbage	0.87
<i>Lactuca sativa var. capitata</i>	Lettuce	0.80
<i>Lentinus edodes</i>	Shiitake	0.75
<i>Lactuca sativa</i>	Lettuce	0.71
<i>Capsicum annum</i>	Unripe pepper	0.65
<i>Brassica olercea capitata</i>	Cabbage	0.62
<i>Allium cepa</i>	Onion	0.52
<i>Allium sativum</i>	Garlic flower stem	0.44
<i>Daucus carota var.sativa</i>	Carrot	0.40
<i>Capsicum annum</i>	Red pepper	0.26
<i>Capsicum annum var.</i>	Green pimento	0.23
<i>Capsicum spp.</i>	Ggwari pepper	0.07
<i>Capsicum annum var.</i>	Red pepper	0.04
<i>Petroselinum sativum</i>	Parsley	0.00

*Melatonin content per freeze-dried powder of plant.

각각 7.11 및 4.39 µg/g을 확인하여 본 연구결과와 유사한 수준의 melatonin 함량을 확인한 바 있다. 그러나 이들의 연구 결과에는 자세한 분석방법 등에 대한 내용이 기술되어 않다.

이처럼 식물체 melatonin의 분석에 대한 연구는 현재까지 매우 미진한 편이고 그 방법 자체도 명확히 정립되어 있지 못하다. 이러한 측면에서 본 연구에서는 melatonin 분획 제조 및 HPLC 분석을 통해 기존 방법에 의한 분석결과보다는 식물체내에 좀 더 많은 melatonin이 존재함을 확인 할 수 있었다. 향후 이와 같은 분석 조건을 이용하여 더 많은 식물소재를 탐색한다면 식물체 유래의 새로운 항산화제로서 melatonin을 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

뇌의 송과선에서 분비되는 호르몬인 melatonin은 생체의 산화적 손상을 방어하는 효능이 있다고 알려져 있는데, 26종의 식물체로부터 그 존재 및 함량을 분석하였다. Melatonin 함유 분획을 조제하기 위하여 동결건조된 식물체 분말을 50% ethanol로 추출한 다음 여과 후 TLC 상에서 acetone으로 전개시켜 melatonin을 분리하였다. 형광하에서 확인된 melatonin spot은 methanol로 추출한 다음 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석시 ODS-A column을 사용하였으며 이동상은 70% ammonium acetate와 메탄올을 30 : 70(v/v)으로 섞어서 1.0 mL/min

의 속도로 흘려주었다. Melatonin peak의 확인은 형광 detector를 이용하였으며 retention time은 17분이었다. 이같은 분석조건에서 셀러리, 부추, 브로콜리, 컬리플라워 등에서 높은 melatonin 함량이 확인되었다.

문 헌

1. Brzezinski, A., Melatonin in humans. *New Eng. J. Med.* 336: 186-195 (1997)
2. Tan, D.X., Poeggeler, L.D., Manchester, L.D. and Reiter, R.J. Melatonin: A potent endogeneous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1: 57-60 (1993)
3. Kehler, J.P. and Smith, C.V. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases, pp. 25-62. In: *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, Frei, B. (ed.). Academic Press, London, UK (1994)
4. Stasica, P., Ulanski, P. and Rosiak, J.M. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J. Pineal Res.* 25: 65-66 (1998)
5. Gilad, E., Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Salzman, A.L. and Szabó, C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci.* 60: PL169-174 (1997)
6. Cagnoli, C.M., Atabay, C., Kharlamova, E. and Manev, H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* 18: 222-226 (1995)
7. Livrea, M.A., Tesoriere, L., D'Arpa, D. and Morreale, M. Reaction of melatonin with lipoperoxyl radicals in phospholipid bilayers. *Free Radical Biol. Med.* 23: 706-711 (1997)
8. Reiter, R.J., Tan, D.X., Kim, S.J. and Qi, W. Melatonin as a

- pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 41, 229-236 (1998)
9. Reiter, R.J., Tan, D.X., Kim, S.J., Manchester, L.C., Qi, W., Garcia, J., Cabrera, J., El-Sokkary, G. and Rouvier-Garay, V. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. *Mech. Aging Dev.* 110: 157-173 (1999)
 10. Reiter, R.J. The pineal gland and melatonin in relation to aging: A summary of the theories and of the data. *Exp. Gerontol.* 30: 199-212 (1995)
 11. Kim, S.J., Qi, W., Tan, D.X., Cabrera, J. and Reiter, R.J. Melatonin prevents oxidative damage to protein and lipid induced by ascorbate-Fe³⁺-EDTA: Comparison with glutathione and α -tocopherol. *Neuroendocrinol. Lett.* 21: 269-276 (2000)
 12. Reiter, R.J. and Kim, S.J. Phytochemicals: melatonin. pp. 1918-1922. In: *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Francis, F.J. (ed.). John Wiley, New York, USA (1999)
 13. Hattori, A., Migitaka, H., Igio, M., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T. and Reiter, R.J. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35: 627-634 (1995)
 14. Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W. and Schloot, W. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. 18: 28-31 (1995)
 15. Reiter, R.J., Pablos, M.I., Agapito, T.T. and Gerrero, J.M. Melatonin in the context of the free radical theory of aging, *Pharmacol. Int. Aging Age-Asso. Dis.* 15: 362-378 (1996)
 16. Kim, S.J., Reiter, R.J., Rouvier-Garay, V., Qi, W., El-Sokkary, G.M. and Tan, D.X. 2-Nitropane-induced lipid peroxidation: anti-toxic effects of melatonin. *Toxicol.* 130: 183-190 (1998)
 17. Murch, S.J., Simmons, C.B. and Saxena, P.K. Melatonin in feverfew and other medicinal plants. *Lancet* 350: 1598-1599 (1997)

(2002년 12월 7일 접수; 2002년 12월 10일 채택)