

## 멜라토닌 및 관련 인돌 화합물의 산화방지능과 들기름 산화에 대한 억제 효과

김 석 중\*

동덕여자대학교 식품영양학과

### Antioxidant activity and inhibitory effect of melatonin and the relative indole compounds on perilla oil oxidation

Seok Joong Kim\*

Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University

**Abstract** Melatonin, known as a powerful wide-spectrum antioxidant, is consumed as a food supplement in some countries, but its applicability as an antioxidant additive was not yet studied. Therefore, we evaluated the antioxidant activity of melatonin by DPPH, ABTS, FRAP and ORAC assays as well as its ability to inhibit perilla oil oxidation. The activities of four other related indoles were also compared. Melatonin showed the highest antioxidant activity (mmol trolox equivalent per mol indole, mmol TE) in ORAC (2,159) assay, but a low antioxidant activity in DPPH (0.63), ABTS (91), and FRAP (764) assays, whereas serotonin showed an opposite result. Addition of 1% (w/w) melatonin to perilla oil extended the induction period of oxidation up to about 2 times ( $2.93 \pm 0.47$  h) compared to that of control ( $1.43 \pm 0.26$  h) in the Rancimat assay, corresponding to almost 50% of the ability of butylated hydroxyl toluene (BHT). Tryptamine was the most effective indole that inhibited perilla oil oxidation ( $9.53 \pm 1.43$  h).

**Keywords:** melatonin, indole, antioxidant, perilla oil, oxidation

## 서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 산화작용이 강한 산소종으로, 라디칼(수퍼옥사이드:  $O_2^-$ , 하이드록시:  $HO^\cdot$ , 퍼옥시:  $ROO^\cdot$ , 하이드로퍼옥시:  $HOO^\cdot$ )과 쉽게 라디칼로 바뀔 수 있는 비라디칼 산화제(과산화수소:  $H_2O_2$ , 하이포염소산:  $HClO$ , 오존:  $O_3$ ) 모두를 일컫는다(1). 이러한 ROS는 생체의 정상적인 대사과정, 염증반응, 식세포 식균작용 및 운동 중에도 생성되며, 세포 분화 및 사멸, 유전자 발현 등에서 필수 신호물질로 작용하나, 과도하면 지질, 단백질, 탄수화물, 핵산을 포함한 대부분의 생체분자를 산화시킬 수 있고, 이로 인해 혈관질환, 암, 신경계 질환, 염증, 당뇨, 섬유화, 노화 등의 다양한 질병을 유발할 수 있다(2,3). 정상적인 생체조건에서는 과도한 ROS가 효소적 산화방지제(초과산화물제거효소, 카탈레이스, 글루타싸이온 환원효소, 과산화효소 등)와 비효소적 산화방지제(글루타싸이온, 리포산, L-아르기닌, 조효소  $Q_{10}$ , 멜라토닌 등)에 의해 억제되지만(4) 체내 산화방지제의 부족이나 ROS를 증가시키는 외부요소(담배연기, 알코올, 자외선, 오존 등)에 노출 되면 ROS가 증가하는 산화적 스트레스 상태가 된다(5). 그러나 외부로부터 비타민 E와 C, 베타카로틴, 페놀화합물, 셀레늄 같은 다양한 산화방지제를 섭취하면 체내의 산화적 스트레스를 줄일 수 있으며(2), 산화방지 물질이 풍부한 과일이

나 채소 등의 식품을 섭취하면 ROS와 관련된 심혈관 질환, 고혈압, 암, 당뇨, 염증 등을 줄일 수 있음이 보고되어 있다(2,6).

한편, ROS는 식품에서의 산화도 유도하여 제품의 품질저하, 저장성 감소, 영양소 감소는 물론 독성물질을 생성시키기도 하는데 지질함량이 높은 식품의 경우에는 특히 문제가 크므로(7) 산화방지제를 첨가물로 사용하는 경우가 많다. 이에 뷰틸하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT), 뷰틸하이드록시안isol(1), 뷰틸하이드록시안isol(2), 뷰틸하이드록시안isol(3) 등과 같이 효능과 경제성 측면에서 우수한 합성 산화방지제들을 식품산화 방지용 첨가물로 자주 사용하지만(8), 고온에서의 높은 휘발성과 불안정성, 발암성 논란(9)과 더불어 최근 소비자들의 선호도 등으로 인해 천연 산화방지제에 대한 요구가 증가하고 있다. 특히 식품에 대한 산화방지 기능과 더불어 건강에 기여할 수 있는 소재에 대한 관심이 높다(10).

1958년에 발견(11)된 이래 척추동물의 계절 및 24 시간 주기를 조절하는 호르몬으로 알려진 멜라토닌(melatonin, N-acetyl-5-methoxytryptamine)(12)은 이후 많은 연구를 통해 면역조절, 항염증, 항암 등 다양한 효능이 있음이 확인되었고, 이러한 효능의 상당 부분은 멜라토닌의 강하고 특징적인 산화방지능과 관련됨이 밝혀졌다(13). 다른 산화방지제들에 비해 멜라토닌은 하이드록시 라디칼, 과산화수소, 일산화탄소( $CO$ ), 일산화질소(NO), 과산화질산염( $ONOO^-$ )과 같은 다양한 ROS를 직접 소거(14)할 수 있을 뿐 아니라, 초과산화물 제거효소(superoxide dismutase), 카탈레이스(catalase), 아스코브산 과산화효소(ascorbate peroxidase), 글루타싸이온 과산화효소(glutathione peroxidase), 글루타싸이온 환원효소(glutathione reductase) 등의 산화방지효소 활성도 간접적으로 조절할 수 있다(15). 또한 양친매성 구조로 인해 지용성 및 수용성 환경 모두에서 산화방지 작용을 하며 혈액-뇌 경계의 생리적인 막도 쉽게 통과할 수 있다(16). 그리고 산화방지 작용 후 생성되

\*Corresponding author: Seok Joong Kim, Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Korea  
Tel: 82-2-940-4466  
Fax: 82-2-940-4610  
E-mail: skim@dongduk.ac.kr  
Received August 12, 2016; revised August 28, 2016;  
accepted August 28, 2016

는 멜라토닌의 분해산물도 ROS를 소거할 수 있기에 낮은 농도에서도 세포의 산화적 손상을 지속적으로 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다(17). 특히, 발견 초기에 척추동물에만 존재하는 것으로 여겨졌으나 현재는 거의 모든 생물계뿐 아니라 다양한 식품에서도 발견되었다(18). 다른 산화방지제들과 유사하게 반응조건에 따른 산화방지능 강도나 산화촉진에 대한 논란(19,20)도 일부 있지만, 많은 연구들을 통해 멜라토닌은 현재 *in vivo* 및 *in vitro*에서 매우 광범위하고 효과적으로 작용하는 산화방지제로 인식되고 있다(21). 그럼에도 이를 식품의 산화방지용 소재로 활용하려는 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 일반적인 분석법들을 이용해 멜라토닌의 산화방지능을 측정하였고 구조적 특성과의 관계도 살펴보기 위해 관련 인돌 화합물들과 비교하였다. 그리고 식품의 산화방지용 소재로서의 활용 가능성을 검토하기 위하여 실제 식품계인 들기름에 대한 산화억제 효과도 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

멜라토닌 및 관련 인돌 화합물인 트립토판, 트립타민, 세로토닌, *N*-아세틸 세로토닌은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 산화방지능 분석 시약으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azobis (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), potassium persulfate ( $K_2S_2O_8$ ), 2,4,6-tripirydyl-*s*-triazine (TPTZ), ferric chloride hexahydrate ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), 2,2'-azobis (2-amidino propane) dihydrochloride (AAPH), sodium fluorescein, 트롤록스(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, trolox), 뷰틸하이드록시톨루엔도 동일 사의 제품을 사용하였다. 그 외 모든 시약은 분석등급이었다. 들기름은 일반 들깨를 120°C에서 25분간 볶은 후 180°C에서 압착하여 착유한 제품을 인근 마트(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

### DPPH법

DPPH법은 DPPH· 라디칼 소거능을 통해 산화방지능을 분석하는 방법으로, Fukumoto and Mazza(22)의 96-well microplate법을 일부 변형하여 수행하였다. 먼저 DPPH·를 80% 메탄올 수용액에 녹여 517 nm에서의 흡광도(O.D.)가 1.00(±0.02)이 되도록 DPPH· 라디칼 용액을 준비하였다. Microplate의 각 well에 80% 메탄올로 용해시킨 각 농도의 인돌 화합물 시료용액을 20 µL씩 넣은 후, 준비한 DPPH 라디칼 용액 200 µL를 첨가했다. 혼합 후 30분간 상온에서 반응시킨 다음 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Biotek Instruments Inc., Colmar Cedex, France)를 이용해 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조구는 시료대신 80% 메탄올 수용액을 사용하였다. 시료의 DPPH· 라디칼 소거능은, 먼저 시료 농도별 흡광도의 감소 퍼센트[Inhibition (%)=(1-O.D. of sample/O.D. of control)×100]를 계산한 후 농도와 억제능에 대해 이중역상도시(double reciprocal plot)를 하여 상관계수가 높은 추세선을 얻은 다음, 이로부터 50% 억제에 필요한 농도인  $EC_{50}$  (mM)값을 산출하였다. 그 다음 산화방지능 지표 물질로 트롤록스의  $EC_{50}$  (mM)값과 비교하여 다음의 식으로부터 인돌 화합물 1 mol에 상응하는 트롤록스의 mmol (mmol trolox equivalent, mmol TE)값으로 나타내었다.

$$\text{mmol TE} = (EC_{50} \text{ of trolox} / EC_{50} \text{ of sample}) \times 1,000$$

### ABTS법

이 방법은 ABTS· 라디칼 소거능을 평가하는 방법으로 Payet 등의 방법(23)을 일부 변형하여 실시하였다. 먼저 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 포함하는 ABTS 용액을 준비한 후 암소에 2-16시간 동안 방치하여 ABTS· 라디칼이 생성되도록 한 다음, 메탄올을 사용해 약 60배로 희석하여 734 nm에서의 흡광도가 0.7000(±0.02)이 되게 준비하였다. 96-well microplate에 메탄올로 용해시킨 각 농도의 시료를 20 µL씩 넣은 후 희석시킨 ABTS· 용액 200 µL를 혼합시킨 다음, 암소에서 6분간 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더를 이용해 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조구는 시료대신 메탄올을 사용하였다. 시료의 ABTS· 라디칼 소거능은 DPPH· 라디칼 소거능과 같은 방식으로 산출하였다.

### FRAP법

FRAP 분석은 Fe(III)을 Fe(II)로 환원시키는 산화방지제의 능력(ferric reducing antioxidant power)을 평가하는 것으로 Arthur 등의 방법(24)을 일부 변형하여 실시하였다. 먼저 300 mM 아세트산 완충용액(acetate buffer, pH 3.6) 100 mL, 40 mM HCl에 10 mM 농도로 녹인 TPTZ 용액 10 mL, 20 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  용액 10 mL를 분석 직전에 혼합한 FRAP 용액을 제조하였다. 96-well microplate에 증류수로 녹인 각 농도의 시료용액 20 µL와 37°C로 미리 가온한 FRAP 용액 180 µL를 넣어 혼합한 후 37°C에서 4분간 반응시킨 다음 생성된 TPTZ-Fe(II) 복합체의 흡광도는 마이크로플레이트 리더를 이용해 593 nm에서 측정하였다. FRAP 분석에서는 앞의 두 방법과 달리 시료의 농도에 따라 흡광도가 증가하기에 산화방지능은 593 nm에서 흡광도를 0.1 증가시키는 농도( $EC_{\Delta 0.1}$ , mM)로 정의하였고 앞에서와 같이 역상도시를 통하여 정확한  $EC_{\Delta 0.1}$  값을 산출한 후 트롤록스의  $EC_{\Delta 0.1}$  값과 비교하여 다음과 같이 mmol TE값으로 나타내었다.

$$\text{mmol TE} = (\Delta_{0.1} \text{ of trolox} / \Delta_{0.1} \text{ of sample}) \times 1,000$$

### ORAC법

ORAC은 산소 라디칼 흡수능(oxygen radical absorbance capacity)으로 Huang 등의 방법(25)에 따라 시료의 산화방지능을 분석하였는데 모든 시료 및 시약은 75 mM 인산 완충용액(phosphate buffer, pH 7.4)에 녹여 사용하였다. 농도 별로 희석한 시료용액 25 µL와 80 nM 농도의 sodium fluorescein 125 µL를 96-well microplate에 넣고 3분 동안 교반시킨 후 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 여기에 사용하기 직전에 제조한 75 mM AAPH 용액 50 µL를 첨가하고 37°C로 유지된 마이크로플레이트 리더에서 40분 동안 1분마다 형광분석(excitation 485 nm, emission 528 nm)을 실시하였다. 그 결과 얻어지는 형광감소곡선의 아래 면적(area under the curve, AUC)을 다음의 식으로 계산하였으며  $f_0$ 는 0분,  $f_i$ 는 *i*분에서의 형광 값을 나타낸다.

$$AUC = 0.5 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{30}/f_0 + 0.5(f_{40}/f_0)$$

시료의 산화방지능은 시료 첨가구의 AUC 값에서 대조구의 AUC값을 제한 순면적(net AUC=AUC<sub>sample</sub>-AUC<sub>control</sub>)을 구한 후, 이를 앞의 방법에서와 같이 역상도시하여 추세선을 얻은 다음 이로부터 net AUC를 5만큼 증가시키는 시료의 농도인 net AUC<sub>5</sub> (mM)값을 산출하였다. 그 다음 트롤록스의 net AUC<sub>5</sub> (mM)값과 비교하여 다음과 같이 시료의 mmol TE값을 구하였다.

$$\text{mmol TE} = (\text{net AUC}_5 \text{ of trolox} / \text{net AUC}_5 \text{ of sample}) \times 1,000$$

## Rancimat법

유지의 산화유도기간을 분석하는 Rancimat법으로 각 인돌 화합물들이 들기름의 산화안정성에 미치는 효과를 분석하였다. 이를 위해 들기름에 각 시료를 1%(w/w) 농도로 첨가하고 5분간 초음파 처리를 하여 용해 또는 분산시킨 후에 Rancimat 743 (Metrohm, Herisau, Switzerland)을 사용해 120°C (delta T 1.6°C)에서 20 L/h로 공기를 공급하면서 들기름의 산화유도기간을 측정하였다. 산화억제능 비교 물질로 뷰틸하이드록시톨루엔을 사용하였다.

## 통계 분석

DPPH, ABTS, FRAP 및 ORAC법 분석은 최소 3회 이상, Rancimat법 분석은 최소 2회 이상을 실시하였고, 그 결과를 평균 ±표준편차로 나타내었다. 통계분석은 SPSS Software Package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용한 일원배치분산분석(one way ANOVA)법으로 분산분석을 하였고,  $p < 0.05$  수준에서의 조사 항목 간 유의성을 검정하기 위해 Duncan의 다중 검정법을 수행하였다.

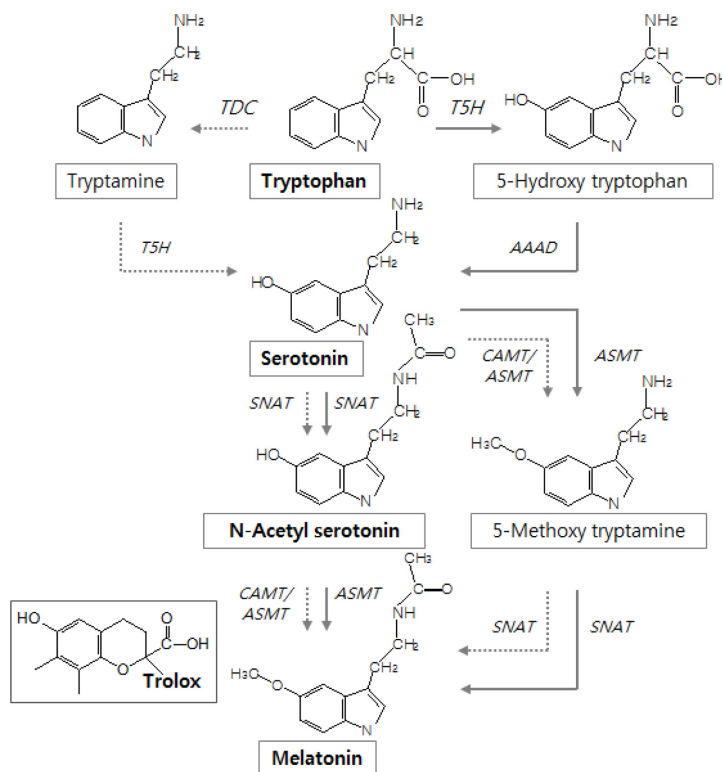
## 결과 및 고찰

### 산화방지능의 분석

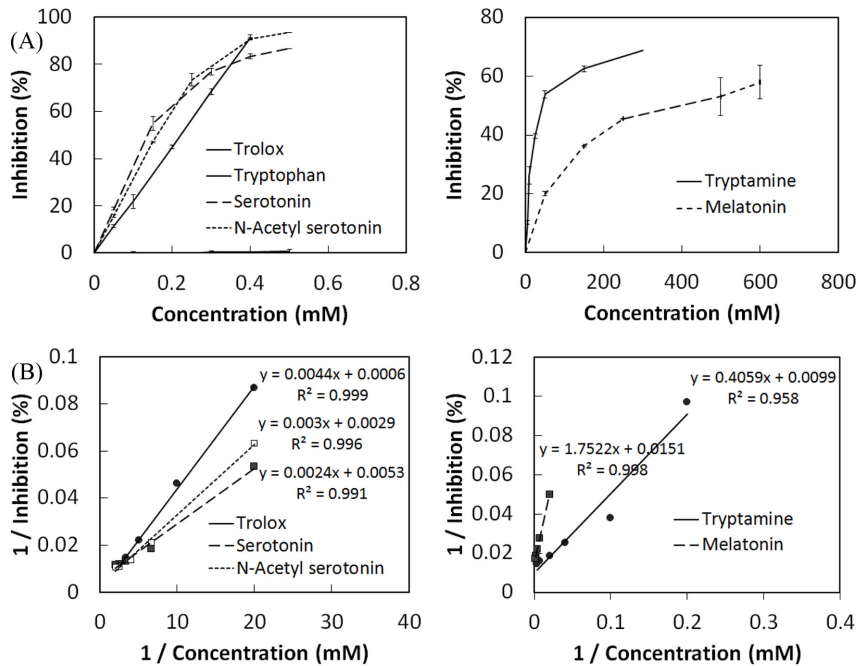
멜라토닌은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 동물, 식물 모두에서 아미노산인 트립토판에서 합성이 되며 세로토닌 이후의 과정은 동일하다. 하지만 세로토닌 합성까지는 차이가 있는데, 동물에서는 트립토판의 수산화가 먼저 일어나 5-하이드록시 트립토판이 생성된 후 탈탄산화에 의해 세로토닌으로 전환되는 반면 식물에서는

먼저 탈탄산화가 일어난 후 트립타민으로 전환된 다음 수산화를 통해 세로토닌이 생성된다(21,26). 본 실험에서는 멜라토닌 및 동·식물에서의 공통적인 인돌 화합물인 트립토판, 세로토닌, *N*-아세틸 세로토닌, 그리고 식물에서 나타나는 트립타민의 산화방지능을 비교하였다. 산화방지능 평가는 기본적으로 환원력에 기초한 DPPH, ABTS, FRAP, ORAC법을 이용하였다. 일반적으로 산화방지능은 그 메커니즘에 따라 산화방지제로부터의 전자전달 (electron transfer, ET)능이나 수소원자전달(hydrogen atom transfer, HAT)능으로 구분하나 명확하지 않은 경우도 많다. 예를 들면 FRAP법과 ORAC법은 각각 산화방지제의 전자전달능과 수소원자전달능을 평가하는 것으로 알려져 있으나 DPPH와 ABTS법은 구분이 명확하지 않고 반응용액 및 조건에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(27,28).

DPPH법으로 측정된 DPPH· 라디칼 소거능은 Fig. 2(A)에 나타난 바와 같았다. DPPH· 라디칼은 수 시간 동안 지속되는 안정된 질소 라디칼로서 산화방지제에 의해 환원되어 소거될 수 있는데 메탄올 같은 용매 하에서는 주로 산화방지제로부터의 전자전달에 이루어진다고 알려져 있다(29,30). 본 실험에서는 80% 메탄올을 사용하였기에 DPPH· 라디칼 소거능은 주로 인돌 화합물의 전자전달능을 나타낸 것이라 할 수 있다. Fig. 2(A)에 나타난 바와 같이 인돌 화합물 중에서 세로토닌과 *N*-아세틸 세로토닌은 페놀성 산화방지제인 트록소스보다 효과가 우수한 반면 트립타민과 멜라토닌은 매우 낮게 나타났고 특히 멜라토닌이 가장 낮았다. 세로토닌과 *N*-아세틸 세로토닌의 높은 산화방지능은 인돌의 벤젠고리 5번 탄소에 수산(5-OH)기가 존재하기 때문으로 판단된다 (Fig. 1). 높은 산화방지능을 보이는 물질 중에는 벤젠고리에 수산기가 붙은 페놀 구조를 가진 경우가 많은데 전자나 수소원자



**Fig. 1. Preferred biosynthesis pathway and structure of melatonin and its related indole compounds in animals (solid lines) and plants (dashed lines).** Trolox was shown for the structural comparison with indole compounds. TPH, tryptophan hydroxylase; AAAD, aromatic amino acid decarboxylase; SNAT, serotonin *N*-acetyltransferase; ASMT, *N*-acetylserotonin *O*-methyltransferase; TDC, tryptophan decarboxylase; T5H, tryptamine 5-hydroxylase; CAMT, caffeic acid *O*-methyltransferase.



**Fig. 2. Antioxidant activity of indole compounds measured by DPPH assay.** Trolox was used for the activity comparison. (A) Normal plot for DPPH radical scavenging activity expressed in inhibition (%) depending on the concentration of indole compound. (B) Double-reciprocal plot obtained by plotting the reciprocal of mean value of inhibition (%) versus the reciprocal of mean value of concentration.

를 대상 라디칼에 전달한 후에 산화되어 생성되는 페녹시 라디칼의 공명 안정성 때문으로 알려져 있고(31), 트롤록스도 이런 구조를 가지고 있다(Fig. 1). Rodriguez-Naranjo 등(32)도 5-OH기를 가진 인돌 화합물들은 페놀류와 유사한 DPPH· 라디칼 소거능을 나타낸다고 하였다.

5-OH기가 없는 트립타민, 멜라토닌도 산화방지능을 보였는데 이는 벤젠과 피롤로 이루어진 인돌 고리 구조 자체도 전자가 풍부하여 피롤 고리에서 전자가 전달 후에 공명 구조를 형성할 수 있기 때문으로 알려져 있다(32). 하지만 5-OH기를 가진 인돌 화합물들에 비해 그 효과가 낮았는데 이는 전자전달 후 생성되는 구조의 공명 안정성이 낮기 때문에 DPPH· 라디칼에 충분히 전자를 전달하지 못하기 때문이다. 그리고 이로 인해 환원된 DPPH로부터 전자를 다시 가져오게 되는 가역반응이 일어나(29,30) 농도를 증가시키더라도 100% 억제에는 도달하지 못하고 평형에 도달하는 포물선 형태를 보이는 것으로 판단된다. Dawidowicz 등(33)은 DPPH· 라디칼에 대한 시료의 접근성 역시 산화방지능에 영향을 미친다고 하였는데 멜라토닌의 경우 트립타민에 비해 인돌 고리에 치환기가 크고 많아 DPPH· 라디칼에 대한 인돌 고리의 접근이 어려운 점도 낮은 산화방지능에 기여한 것으로 추정된다. 트롤록스의 경우도 벤젠고리의 수산기에 옆에 2개의 메틸(-CH<sub>3</sub>)기가 있어 세로토닌이나 N-아세틸 세로토닌의 수산기보다 DPPH· 라디칼에 대한 접근이 어려워 산화방지능이 다소 낮은 것으로 여겨진다. 한편, 트립토판은 반응용액에서의 낮은 용해도로 인해 고농도에서의 억제능 분석이 어려웠다.

일반적으로 산화방지능의 수치적인 비교를 위해 50%의 소거능을 보이는 시료의 농도 값인 EC<sub>50</sub>을 자주 사용하며 농도-억제능 관계로부터 직선의 추세선을 이용해 그 값을 산출한다. 하지만 Fig. 2(A)에서 볼 수 있듯이 대부분의 인돌 화합물들이 포물선의 관계를 보여 상관계수(r<sup>2</sup>)가 높은 추세선을 구하기 어려웠다. Hoyle and Santos(34)은 농도와 산화방지능 관계가 직선성을 보

이지 않았던 라임주스에 대해 이중역상도시법을 적용하여 산화방지능 특성을 연구한 바 있다. 이에 본 실험에서도 농도값과 억제능값에 대해 모두 역수를 취하여 이중역상도시한 결과, Fig. 1(B)에 나타난 바와 같이 트립토판을 제외한 모든 시료에서 높은 상관계수(0.958-0.999)를 가진 직선의 추세선을 구할 수 있었다. 그리고 각 시료의 산화방지능은 이 추세선 식을 이용해 EC<sub>50</sub> 값을 구한 후 트롤록스의 EC<sub>50</sub>값과 비교하여 mmol TE값으로 표현하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 세로토닌과 N-아세틸 세로토닌은 트롤록스보다 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였고 그 다음 트립타민, 멜라토닌 순으로 나타났으며 멜라토닌의 경우에는 농도-억제능 곡선에서도 예상되었듯이 0.63 mmol TE의 매우 낮은 소거능을 보였다.

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 분석에서도 세로토닌과 N-아세틸 세로토닌이 트롤록스보다 효과적이었던 반면, 나머지 인돌 화합물들은 낮은 값을 보였으며 멜라토닌의 산화방지능이 가장 낮았다(Fig. 3(A), Table 1). 산화방지제에 의한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼의 환원도 DPPH· 라디칼과 유사하게 메탄올에서는 주로 전자전달에 의한 것으로 알려져 있기에(27,29) 본 결과 역시 시료들의 전자전달능을 평가한 것이라 할 수 있으며 DPPH법에서와 동일한 경향을 보였다. 하지만 DPPH법으로 분석한 결과에 비해 대부분의 인돌 화합물에서 EC<sub>50</sub>값이 감소하였다(Table 1). 특히 DPPH법에서 효과가 낮았던 인돌 화합물에서 EC<sub>50</sub>값이 크게 감소하여 트립타민은 약 1.2%, 멜라토닌은 약 0.8% 수준의 농도에서도 50% 소거능을 보였다. 이는 전자에 대한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼의 반응성, 즉 산화력이 DPPH· 라디칼보다 훨씬 높기(35) 때문으로 추정된다. 이로 인해 DPPH법에서는 확인이 어려웠던 트립토판의 항산화능도 확인할 수 있었으나 여전히 용해도 문제로 인해 50% 소거능 농도에 도달하기는 어려웠다.

본 실험의 조건에서의 DPPH나 ABTS법은 주로 전자전달에 의한 환원능을 분석하는 방법으로 인식되지만 수소원자전달에 의

**Table 1. Antioxidant activity parameters (EC<sub>50</sub>, ΔOD<sub>0.1</sub>, net AUC<sub>5</sub>, and mol TE) of indole compounds according to assay methods**

Compounds	DPPH		ABTS		FRAP		ORAC	
	EC <sub>50</sub> (mM)	mmol TE	EC <sub>50</sub> (mM)	mmol TE	ΔOD <sub>0.1</sub> (mM)	mmol TE	net AUC <sub>5</sub> (mM)	mmol TE
Trolox	0.233	1,000	0.268	1,000	0.068	1,000	5.110	1,000
Tryptophan	.*	.*	1.631	164	.*	.*	2.845	1,793
Serotonin	0.163	1,700	0.121	2,215	0.031	2,194	5.367	950
N-Acetylserotonin	0.175	1,297	0.114	2,351	0.040	1,700	nd**	nd**
Tryptamine	40.188	5.65	0.500	536	3.784	18	2.631	1,939
Melatonin	357.592	0.63	2.937	91	0.089	764	2.363	2,159

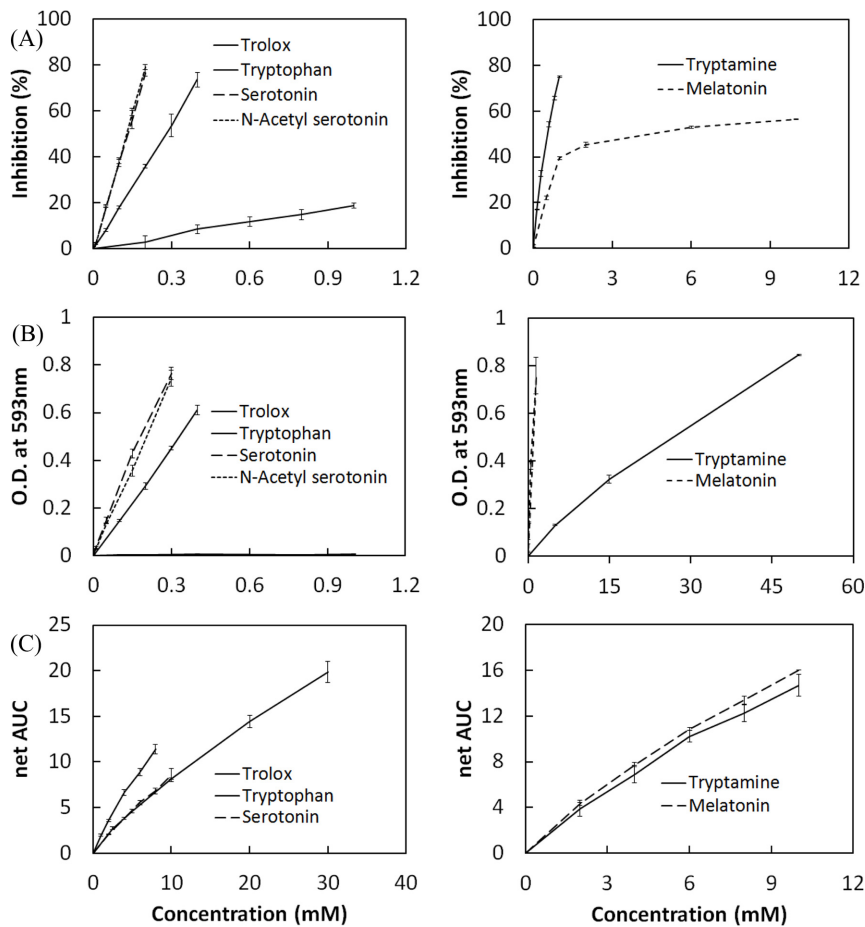
EC<sub>50</sub>, mmol TE, ΔOD<sub>0.1</sub>, and net AUC<sub>5</sub> were defined in material and methods. These parameters were obtained from the regression curves of the double reciprocal plots on indole compounds in assays, of which correlation coefficients (r<sup>2</sup>) were over 0.994 except for tryptamine (0.958) in DPPH assay, and tryptophan (0.971) and melatonin (0.956) in ABTS assay. \*: activity was not found. \*\*: not determined.

한 환원능도 완전히 배제할 수는 없다(29,30). 이에 Fe(III)를 Fe(II)로 환원시키는데 필요한 전자전달능을 평가하는 FRAP법(36)을 이용해 인돌화합물들의 산화방지능을 조사하였다. 이 방법에서는 DPPH나 ABTS법에서와 달리 산화방지능 증가에 따라 593 nm에서의 흡광도도 증가하기에, 흡광도값을 0.1 증가시키는데 필요한 시료 농도를 산화방지능(EC<sub>50</sub>)으로 하여 트롤록스와 비교함으로써 mmol TE값을 산출하였다. 그 결과(Fig. 3(B), Table 1), 앞의 두 방법에서의 결과와 마찬가지로 세로토닌, N-아세틸 세로토닌이 트롤록스보다 우수하였고 나머지는 낮았다. 하지만 이 경우에는 멜라토닌(764 mmol TE)의 산화방지능이 트립타민(18 mmol TE)보다 높게 나타나 앞의 방법들에서의 결과와 차이를 보였으며 트립토판의 효과는 확인되지 않았다. 전자전달능 평가 측면에서 Fe(III) 이온의 환원전위(0.70 V)가 ABTS<sup>+</sup> 라디칼의 환원전위(0.68 V)와 유사하므로(29) FRAP법과 ABTS법으로 분석한 결과는 유사할 것으로 예상되며 실제 높은 환원력을 보이는 세로토닌과 N-아세틸 세로토닌은 두 방법에서 유사한 mmol TE값을 보였다(Table 1). 하지만 환원력이 낮은 시료들은 ABTS법의 결과와 차이를 보였는데 이는 두 방법간의 차이에 기인한다고 생각된다. Huang 등(29)에 의하면 FRAP법에서는 Fe(III)가 Fe(II)로 환원되는데 1 전자 반응이지만 ABTS법에서는 전자의 수와 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능사이의 관련성이 명확하지 않아 전달전자 수가 다르더라도 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능이 거의 같은 경우가 있다고 하였다. 예를 들어 아스코르산은 1개의 전자, 글루타싸이온은 2개의 전자를 전달하나 mmol TE값은 각각 1,050 및 1,280으로 유사하였으며 페룰산(ferulic acid)와 카페산(caffeic acid)은 구조가 거의 같음에도 불구하고 페룰산의 소거능이 2배 가량 높게 나타나는 차이가 있다고 하였다. 한편, 사용 용매(ABTS법에서는 메탄올, FRAP법에서는 pH 3.6의 산성 수용액)도 산화방지능에 영향을 미칠 것으로 판단된다. 실제로 ABTS법에 비해 FRAP법으로 분석시 더 낮은 산화방지능을 보인 트립타민과 트립토판은 예비 실험을 통해 메탄올보다 수용액에서의 용해도가 더 낮았음이 확인되었다.

이처럼 분석방법에 따른 일부 차이에도 불구하고 전자전달능에 기초한 분석법들의 결과는 일반적으로 유사한 경향을 보인다고 알려져 있는데(37), 본 실험의 세 방법에서도 5-OH기를 가진 인돌 화합물이 멜라토닌과 같이 5-OH기가 없는 인돌 화합물보다는 높은 산화방지능을 보였다. 하지만 이 방법들은 생체나 식품에 존재하지 않는 라디칼 또는 물질들을 사용하며 생체조건과 다른 반응용액, 그리고 일정시간 반응 후의 변화만을 측정하기에 실제 식품이나 생체에서의 효능에 바로 연관 짓기는 쉽지 않다. 이에 생체나 식품에서의 지질산화와 관련된 주요 라디칼 중 하

나인 퍼록시 라디칼에 대한 소거능을 비교하고자 ORAC법을 실시하였다(25). 이 방법은 AAPH 유래의 퍼록시 라디칼에 대해 산화방지제가 수소원자를 전달하여 반응성이 없는 하이드로퍼옥사이드(ROOH)로 전환시키는 능력을 평가한다. 특히 반응 조건은 생리적 조건과 유사한 pH 7.4, 37°C 수용액에서 실시하며, 시간에 따른 산화방지능의 총량을 나타내는 장점(38)과 더불어 식품 산업에서 산화방지능 측정에 많이 사용되어 왔다(29). ORAC 분석 결과는 Fig. 3(C) 및 Table 1에 나타내었는데, 앞의 세 방법들에서의 결과와는 달리 멜라토닌(2,159 mmol TE)의 산화방지능이 가장 높았고, 트립타민(1,939 mmol TE), 트립토판(1,793 mmol TE)도 트롤록스보다 우수하였으나 세로토닌(950 mmol TE)의 경우는 가장 낮았다. Reiter 등(16)은 멜라토닌이 *in vivo*에서 효과적인 퍼록시 라디칼 소거제라 보고한 바 있고, Rodriguez-Naranjo 등(32)도 멜라토닌이 5-OH기를 가진 인돌보다 퍼록시 라디칼 소거능이 높다고 하여 본 결과와 일치하였다. 반면, Antunes 등(19)은 멜라토닌이 폴리페놀에 비해 좋은 퍼록시 라디칼 소거제가 아니며 그 활성은 금속이온 비활성화 효과 때문이라고 한 바 있다.

세로토닌보다 전자전달능이 훨씬 낮았던 멜라토닌의 퍼록시 라디칼 소거능이 더 우수한 이유를 명확히 설명하기 위해서는 추가적인 연구가 요구되나, 분석법과 멜라토닌의 특성을 고려하면 그 이유를 다음과 같이 추정해 볼 수 있다. 먼저 DPPH, ABTS, FRAP법에서는 시료의 첨가시점에 모든 양의 DPPH· 라디칼, ABTS<sup>+</sup> 라디칼, 혹은 Fe(III) 이온이 이미 전자수용이 가능한 형태로 존재하기에 전자전달속도가 큰 시료일수록 산화방지능이 높게 나타날 것이다. 즉 시료의 전자전달속도가 환원반응의 속도조절단계가 된다. 반면, ORAC법에서는 반응에 필요한 퍼록시 라디칼이 37°C에서 AAPH의 열분해로 서서히 생성[AAPH+2O<sub>2</sub>→2ROO·+N<sub>2</sub>, R은 HN=C(NH<sub>2</sub>)-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-]되므로 퍼록시 라디칼의 생성속도가 수소원자전달에 의한 환원반응의 속도조절단계가 된다(39). 또한, 퍼록시 라디칼은 그 환원전위가 중성 pH 7.0 수용액에서 약 1.0 V 수준으로(40) DPPH·나 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 및 Fe(III) 이온보다 더 강한 산화제여서 시료간의 수소원자전달속도 차이에 의한 영향이 줄어든다. Apak 등(28)도 ORAC법에서는 퍼록시 라디칼이 일정한 속도로 방출되기에 서서히 반응하는 산화방지제의 활성이 크게 나타날 수 있고 다른 방법과의 관련성이 약할 수 있다고 하였다. 즉, ORAC법에서는 산화방지제간의 수소원자 전달속도 차이보다는 그 양의 차이가 좀 더 중요한 요소로 생각된다. 실제 본 실험에서 사용한 시료들의 농도는 총 퍼록시 라디칼 농도(18.5 mM의 AAPH로부터 37 mM 생성)를 넘지 않았는데 이러한 조건에서 멜라토닌의 산화방지능이 높았던 이유는 다른 시료에 비해 퍼록시 라디칼로 전달되는 수소원자의 양이 많았기



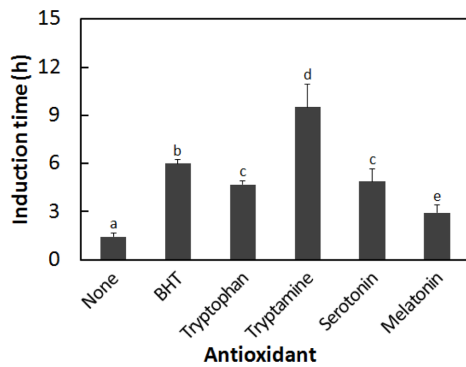
**Fig. 3. Antioxidant activities of indole compounds measured by ABTS (A), FRAP (B) and ORAC (C) assays. Trolox was used for the activity comparison.** ABTS<sup>+</sup> radical scavenging (ABTS), ferric reducing (FRAP) and peroxy radical scavenging (ORAC) activities were expressed in inhibition (%), O.D. at 593 nm, and net AUC, respectively. The double-reciprocal plots were obtained by the same way as in Fig. 2 for all assays (data not shown). For the plots in FRAP and ORAC assay, the reciprocals of O.D. at 593 nm and net AUC were used, respectively, instead of inhibition (%) in DPPH and ABTS assays

때문으로 추정된다. 이와 관련하여 Tan 등(21)은 멜라토닌이 자신 뿐 아니라 그 산화 분해산물들도 단계적으로 수소원자전달능이 있음을 밝힌 바 있다. 일반적인 폐놀계 산화방지제는 전자나 수소원자전달 후에는 상당히 안정된 공명 라디칼을 형성하거나 라디칼끼리의 결합으로 추가적인 산화방지 작용을 하지 못하고 수소원자 전달로 생성된 하이드로퍼옥사이드에 대해 전자를 전달함으로써 알콕시(RO·) 등의 새로운 라디칼을 생성시켜 산화를 촉진시키기도 한다. 이에 반해 수소원자전달속도는 상대적으로 약하더라도 멜라토닌이 피롤고리로부터 수소원자를 일단 퍼록시 라디칼에 전달하면 멜라토닌양이온 라디칼(melatonyl cation radical)이 형성된다(41). 그러나 이 라디칼의 안정성은 그리 크지는 않기 때문에 주위에 존재하는 산화제(퍼록시 라디칼)에 수소원자를 추가로 전달한 후 쉽게 산화되어 cyclic 3-hydroxy melatonin으로 전환된다(21). 이후 순차적인 수소원자전달을 통한 산화로 *N*<sup>1</sup>-acetyl-*N*<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), *N*-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)이 생성되고 이후에도 분해가 지속되며 수소원자전달이 가능하다고 알려져 있다(21). 즉 ORAC법에서 멜라토닌의 높은 산화방지능은 다른 산화방지제와 달리 한 분자의 멜라토닌으로부터 많은 양의 수소원자전달이 가능하기 때문으로 여겨진다. 트립타민, 트립토판의 항산화능이 멜라토닌과 차이가 크지 않았던 것은 5-OH기가 없어 멜라토닌과 유사하게 피롤고리

가 산화방지에 역할을 하기 때문으로 추정된다. 반면, 5-OH기를 가져 전자전달능이 우수하였던 세로토닌과 트롤록스의 경우는 수소전달 후 생성된 산화물의 구조가 추가적인 수소원자전달에 적당하지 않아 멜라토닌보다 효과가 낮았을 것으로 생각된다.

**들기름 산화에 대한 인돌 화합물의 억제 효과**

들기름은 불포화 지방산, 특히 리놀렌산의 함량이 다른 유지에 비해 매우 높아 산화되기 쉽기에 이의 안정화 연구에 대한 관심이 높다(42). 이에 산화방지제로서 멜라토닌 및 관련 인돌 화합물들의 활용 가능성을 확인하고자 들기름에 1%(w/w) 농도로 첨가한 후 이들이 들기름의 산화에 미치는 효과를 Rancimat법을 이용해 분석하였다. 그 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 모든 인돌 화합물들이 산화 유도기간을 유의적으로 증가시켜 들기름 산화에 효과가 있음이 확인되었다. 멜라토닌(2.93±0.47 h)은 대조구(1.43±0.26 h)에 비해 약 2배 가량 산화 유도기간 연장효과가 있었는데 이는 뷰틸하이드록시톨루엔의 약 50% 수준에 달하는 수준으로 유지식품에서 산화방지 소재로서의 활용 가능성이 확인되었다. Garca-Luna 등(43)은 올리브유에서 최대 119 µg/mL 수준의 천연 멜라토닌 존재를 확인하였고 이들이 올리브유에 존재하는 건강 기능성 인자 중의 하나라고 하였다. 따라서 멜라토닌 첨가는 유지의 산화방지뿐 아니라 건강기능 측면에서도 도움이 될



**Fig. 4.** Effect of indole compounds on the induction period during the oxidation of perilla oil. BHT was used for the comparison.

것으로 판단된다. 인돌 화합물 중에서는 트립타민의 효과가 가장 우수(9.52±1.43 h)하여 뷰틸하이드록시톨루엔(6.00±0.26 h)보다도 높은 수준이었고, 그 다음으로 세로토닌(4.89±0.78 h)과 트립토판(4.70±0.23 h)의 효과가 우수하였다. 이들은 멜라토닌보다 효과가 우수하였기에 향후 유지산화 억제 소재로서 추가적인 연구를 할 가치가 크다고 판단된다.

한편, 인돌 화합물들의 산화방지능과 들기름에 대한 산화방지 효과를 비교해 보았다. 그 결과, 유지산화와 관련이 있는 ORAC 법에서 확인된 퍼록시 라디칼에 대한 소거능은 멜라토닌, 트립토판, 트립타민에서 유사하게 높았으나 들기름에서의 산화방지효과는 트립타민>트립토판>멜라토닌 순이었는데 이는 DPPH, ABTS, FRAP법에서 확인된 전자전달능의 차이에 기인한 것으로 판단된다. 반면 전자전달능이 가장 우수하였던 세로토닌은 낮은 퍼록시 라디칼 소거능으로 인해 트립타민보다 효과가 낮았으나 강한 전자전달능으로 인해 트립토판과는 유사하고 멜라토닌보다는 효과가 컸을 것으로 판단된다. 이에 따라 전자전달능(DPPH, ABTS, FRAP법) 분석과 퍼록시 라디칼 소거능(ORAC법) 분석에서 모두 효과가 높은 소재를 발굴한다면 이 소재는 유지와 같은 실제 식품계에서도 효과가 있을 것으로 판단된다. 하지만 유지식품의 산화에는 지방산 불포화도, 산소, 온도, 수분, 광선 산화 촉진제, 산화방지제 존재 여부 등 매우 복잡하기에(7), 최적의 소재 발굴을 위해서는 추가적인 산화방지 평가법의 적용이나 방법 간 가중치 부여 등에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

## 요 약

멜라토닌은 척추동물 뇌의 송과선에서 생성되는 인돌 호르몬으로 알려졌으나 그 이후로 동물, 식물, 미생물을 포함한 대부분의 생물체에서도 존재하고 멜라토닌 함유 식품을 섭취 시 생체 내에 흡수되며, 다양한 기능성과 함께 강한 산화방지능이 확인되어 기능성 소재로서의 관심이 높다. 하지만 이를 식품의 산화방지용으로 활용하고자 한 연구는 없었기에, 본 연구에서는 유지식품의 산화방지용 소재로서 멜라토닌의 활용 가능성을 조사하였다. 이를 위해 먼저 DPPH, ABTS, FRAP, ORAC법을 이용하여 멜라토닌의 산화방지능을 조사하였고, 실제 유지식품으로서 들기름에 대한 산화방지 효과를 분석하였다. 또한 멜라토닌 합성경로에 관련된 다른 인돌 화합물인 트립토판, 트립타민, *N*-아세틸 세로토닌, 세로토닌과도 그 효과를 비교하였다. DPPH, ABTS, FRAP 법으로 분석한 멜라토닌의 산화방지능은 매우 낮았으나 ORAC 법에서는 가장 높은 효능을 나타내었다. 반면 세로토닌은 반대의

경향을 나타내 분석법에 따라 산화방지능에서의 차이가 나타났다. 들기름에 인돌 화합물들을 각각 1%(w/w) 농도로 첨가한 후 Rancimat법으로 산화 유도기간을 분석한 결과, 멜라토닌 첨가구에서의 산화 유도기간은 2.93±0.47 h로 대조구의 1.43±0.26 h에 비해 2배 가량 연장되었으며 뷰틸하이드록시톨루엔 효과의 약 50% 수준에 달해 실제 유지식품에서 산화방지 효과가 있었다. 조사한 인돌 화합물들 중에는 트립타민(9.52±1.43 h)이 들기름의 산화억제에 가장 효과적이었고 다음으로 세로토닌, 트립토판이 유사하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2012년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로, 이에 감사 드립니다.

## References

1. Bayr H. Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.* 33: S498-S501 (2005)
2. Lobo V, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4: 118-126 (2010)
3. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97: 55-74 (2015)
4. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4: 89-96 (2008)
5. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* 94: 329-354 (2014)
6. Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP, Li HB. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* 20: 21138-21156 (2015)
7. Choe E, Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 5: 169-186 (2006)
8. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Hamid SBA, Alhadi AA, Kadir FA, Yaeghoobi M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *Eur. J. Med. Chem.* 101: 295-312 (2015)
9. Powell CJ, Connelly JC, Jones SM, Grasso P, Bridges JW. Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity. *Food Chem. Toxicol.* 24: 1131-1143 (1999)
10. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* 46: 244-282 (2007)
11. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587-2587 (1958)
12. Brainard GC, Petterborg LJ, Richardson BA, Reiter RJ. Pineal melatonin in syrian hamsters: Circadian and seasonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology* 35: 342-348 (1982)
13. Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 278: 55-67 (2010)
14. Tan DX, Lucien C, Manchester MP, Terron L, Flores J, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42: 28-42 (2007)
15. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martini V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36: 1-9 (2004)
16. Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Manchester LC, Kilic VE, Kilic U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol. J. Pharmacol.* 56: 159-170 (2004)
17. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging

- activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res.* 54: 245-257 (2013)
18. Garcia-Parrilla MC, Cantos E, Troncoso AM. Analysis of melatonin in foods. *J. Food Compos. Anal.* 22: 177-183 (2009)
  19. Antunes F, Barclay LR, Ingold KU, King M, Norris JQ, Scaiano JC, Xi F. On the antioxidant activity of melatonin. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 117-128 (1999)
  20. Munik MS, Ekmekciolu C. Prooxidant effects of melatonin: A brief review. *Turk. J. Biol.* 39: 832-839 (2015)
  21. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules* 20: 18886-18906 (2015)
  22. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.* 48: 3597-3604 (2000)
  23. Payet B, Shum Cheong Sing A, Smadja J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: Determination of their polyphenolic and volatile constituents. *J. Agr. Food Chem.* 53: 10074-10079 (2005)
  24. Arthur H, Joubert E, de Beer D, Malherbe CJ, Witthuhn RC. Phenylethanoid glycosides as major antioxidants in *Lippia multiflora* herbal infusion and their stability during steam pasteurization of plant material. *Food Chem.* 127: 581-588 (2011)
  25. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agr. Food Chem.* 50: 4437-4444 (2002)
  26. Hardeland H. Melatonin in plants-diversity of levels and multiplicity of functions. *Front. Plant Sci.* 7: 198 (2016)
  27. Apak R, zyrek M, Gl K, apanolu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agr. Food Chem.* 64: 997-1027 (2016)
  28. Apak R, zyrek M, Gl K, apanolu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer(HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *J. Agr. Food Chem.* 64: 1028-1045 (2016)
  29. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agr. Food Chem.* 53: 1841-1856 (2005)
  30. Xie J, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 62: 4251-4260 (2014)
  31. Foti MC. Antioxidant properties of phenols. *J. Pharm. Pharmacol.* 59: 1673-1685 (2007)
  32. Rodriguez-Naranjo MI, Moy ML, Cantos-Villar E, Garcia-Parrilla MC. Comparative evaluation of the antioxidant activity of melatonin and related indoles. *J. Food Compos. Anal.* 28: 16-22 (2012)
  33. Dawidowicz AL, Wianowska D, Olszowy M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method. *Food Chem.* 131: 1037-1043 (2012)
  34. Hoyle CHV, Santos JH. Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia. *Int. Food Res. J.* 17: 937-946 (2010)
  35. Shalaby EA, Shanab AMM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J. Geo-Marine Sci.* 42: 556-564 (2013)
  36. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76 (1996)
  37. Connor AM, Luby JJ, Hancock JF, Berkheimer S, Hanson EJ. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *J. Agr. Food Chem.* 50: 893-898 (2002)
  38. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescence probe. *J. Agr. Food Chem.* 49: 4619-4626 (2001)
  39. Ximenes VF, Pessoa AS, Padovan CZ, Abrantes DC, Gomes FH, Maticoli MA, de Menezes ML. Oxidation of melatonin by AAPH-derived peroxy radicals: evidence of a pro-oxidant effect of melatonin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 787-792 (2009)
  40. Koppenol WH. Oxyradical reaction: From bond-dissociation energies to reduction potentials. *FEBS Lett.* 264: 165-167 (1990)
  41. Estevo MS, Carvalho LC, Ferreira LM, Fernandes E, Marques MMB. Analysis of the antioxidant activity of an indole library: cyclic voltammetry versus ROS scavenging activity. *Tetrahedron Lett.* 52: 101-106 (2011)
  42. Shin HS, Kim SW. Lipid composition of perilla seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 619-622 (1994)
  43. Garca-Luna PP, Lardone PJ, Herrera JL, Fernandez-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D, de la Puert C, Carrascosa-Salmoral MP. Melatonin is a phytochemical in olive oil. *Food Chem.* 104: 609-612 (2007)