

Régi hormon új csodája: magyarországi meggyfajták mint természetes melatonin források

¹Homoki Judit Rita – ²Gyémánt Gyöngyi – ¹Remenyik Judit

Debreceni Egyetem

¹Mezőgazdasági-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

²Természettudományi és Technológiai Kar, Szervetlen- és Analitikai Kémiai Tanszék, Debrecen
homoki.judit@gmail.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleti munkánk során extrakciós eljárást dolgoztunk ki a melatonin hatékony kioldása érdekében. Továbbá kromatográfiás eljárást fejlesztettünk ki a melatonin kvantitatív és kvalitatív meghatározására. Preparatív HPLC-s technikával a standarddal egyező vegyületet tisztítottunk az extraktumból és a tisztított minta szerkezetét MALDI TOF-MS technikával és NMR analízissel igazoltuk. Méréseink alapján megállapítható, hogy a biológiai érettség állapotában betakarított magyarországi meggyfajták nagy mennyiségű melatonint tartalmaznak.

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a „VN4” fajta kiemelkedően magas melatonin tartalommal 9,893 µg/g rendelkezik. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a „Bosnyák” fajtakörből szelektált „VN4” fajta melatonin felhalmozó. Az általunk vizsgált magyarországi meggyfajták melatonin tartalmának átlagos értéke 2,319 µg/g.

Kulcsszavak: meggy, melatonin, HPLC, MALDI-TOF MS, NMR

SUMMARY

During our experimental work an effective extraction procedure has been developed for melatonin. Further chromatography was developed the quantitative and qualitative determination of melatonin. A compound that was equal to the standard was purified from the extract by preparative HPLC technique and the structure of the purified sample was confirmed by MALDI-TOF-MS and NMR analysis. Based on our measurements, harvested in the state of biological maturity Hungarian sour cherry cultivars contain high levels of melatonin.

Our results show that "VN4" variety has extremely high melatonin content, 9.893 µg g⁻¹ and suggest that "VN4" which were selected from the "Bosnyák" varieties is melatonin accumulating. The average value of the melatonin content of Hungarian sour cherry cultivars is 2.319 µg g⁻¹.

Keywords: sour cherry, Melatonin, HPLC, MALDI-TOF MS, NMR

BEVEZETÉS

Az elmúlt években egyre fokozódott az igény az életminőség javítását befolyásoló anyagok (pl. az anti-oxidánsok) megismerésére, vizsgálatára és felhasználására. Az egyre fokozódó, stresszel teli életmódunk megkívánja, hogy figyeljünk szervezetünk egyensúlyának megtartására. Ehhez azonban sokszor nem elegendő a hagyományos táplálkozással a szervezetünkbe juttatott tápanyagok mennyisége és minősége. Ahhoz, hogy a szervezetünkre jellemző biokémiai folyamatok végbe menjenek, teljes értékű táplálékot kell fogyasztanunk, amelyek természetes formában tartalmazzák az élethez nélkülözhetetlen bioaktív komponenseket.

A nemzetközi irodalomban a melatonin nem ismeretlen molekula, több mint 50 éve vizsgálják az N-acetil-5-metoxi-triptamin hatását a humán szervezetre. A kutatások során kiderült, hogy a melatonin élettani hatása sokkal szélesebb spektrumú annál, mint ahogy azt korábban gyanították. Folyamatos kutatásoknak köszönhetően a melatoninról elmondható, hogy lényegében egy belső, általános szabályozó molekula, úgynevezett „összszervező” hormon. Vizsgálatunk alanyának azért a magyarországi meggyfajtákat választottuk, mert hazánk földrajzi, éghajlati adottságainak és a hazai évtizedes nemesítő munkának köszönhetően kimagasló beltartalmi paraméterekkel rendelkező fajták jöttek létre. A hazai meggytermesztésnek évszázados múlt-

ja van, az alma mellett a legnagyobb mennyiségben termesztett gyümölcsünk (16%).

Célunk a fent említett hormonhatású molekula, a melatonin kimutatása a magyarországi meggyfajtákból.

Melatonin

Pergamon (i. sz. 130–200) 2000 évvel ezelőtt leírta a melatonint termelő tobozmirigyét, a glandula pinealist, mely a közti-, és középgyag határán a középgyag felső ikertestei között fekvő kb. 0,5 cm hosszú és néhány mm széles belső elválasztású mirigy (Szentágothai és Réthelyi, 1997). Az általa termelt melatonint csak 1958-ban sikerült azonosítani, miután Lerner et al. (1958, 1959) izolálták szarvasmarha tobozmirigy szövetből származó hormont, amely fő kiválasztási terméke a mirigynek az emlősökben. 1995-ig a kutatók úgy gondolták, hogy a melatonin egy kizárólag gerincesekben megtalálható hormon, melynek feladata az alvás-ébrenlét ciklus szabályozása.

A melatonin molekula amfoter tulajdonságokkal rendelkező vegyület (1. ábra). A molekula egy poláris és egy apoláris részből áll. Ez teszi lehetővé, hogy a melatonin poláros és apoláros közegben is jól oldódik, azaz képes transzlokálódni a sejtmembránon és ezáltal bejutni a sejtekbe és sejtorganelumokba.

1. ábra: A melatonin kémiai szerkezete

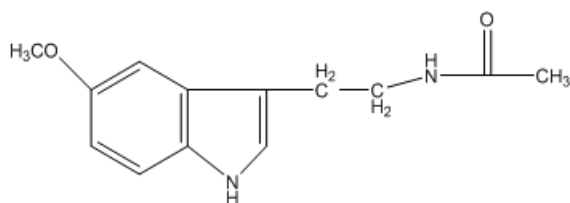


Figure 1: The chemical structure of Melatonin

A melatonin bioszintézise

A melatonin prekuzora a triptofán, mely egy esszenciális aminosav, ami azt jelenti, hogy csak a táplálékkal jut a szervezetünkbe, így az élelmiszereknek eltérő triptofán tartalma okozhatja a melatonin szint ingadozását a humán szervezetben (Dopfel et al., 2007). A melatonin bioszintézise (2. ábra) a triptofánból indul ki és a triptofán-hidroxiláz katalizálta reakcióban 5-hidroxi-triptofán keletkezik. A dekarboxiláz enzim hatására 5-hidroxi-triptamin, ismertebb nevén szerotonin keletkezik. A következő lépésben N-acetil transzferáz segítségével N-acetil-szerotinná alakul, majd a hidroxil-indol-O-metil-transzferáz enzim által katalizált reakcióban kialakul a melatonin. Az előzőekben levezetett szintézis útvonal jellemző valamennyi élőlény-

nél, az emlősöknél, baktériumoknál, gombáknál és a növényeknél is (Salisbury és Ross, 1992; Yu és Reiter, 1993; Blazer és Hardeland, 1996).

A melatonin elterjedése az élővilágban

A melatoninról sokáig úgy gondolták, hogy egy endogén módon keletkező molekula, amely kizárólag a gerincesekben található meg. Később sikerült kimutatni a melatonin a fotoszintetizáló *Rhodospirillum rubrum* nevű prokariótában is (Manchester et al., 1995). A N-acetil-5-metoxi-triptamin molekula szintézis útvonala erősen konzerválódott. A melatonin molekula eredete becslések szerint 2,5 milliárd évvel ezelőttre vezethető vissza. Feltételezések szerint a melatonin abban az időben fejlődhetett ki, amikor az élő szervezetek megkezdtek az átmenetet az anaerob anyagcseréről aerob anyagcserére. Ebből az következik, hogy a melatonin eredeti és elsődleges funkciója az élő szervezetekben az, hogy antioxidánsként szolgáljon, tehát az aerob anyagcsere során keletkezett szabad gyökök eliminálásáért felelős molekula (Tan et al., 2010; Blask et al., 2011; Motilva et al., 2011; Hardeland et al., 2012). Az elmúlt évtizedekben ezt a hormonhatású vegyületet megtalálták magasabb rendű növényekben, rovarokban, fonálférgekben és gombákban is (Tan et al., 2007b; Stehle et al., 2011; Migliori et al., 2012).

2. ábra: A melatonin bioszintézise

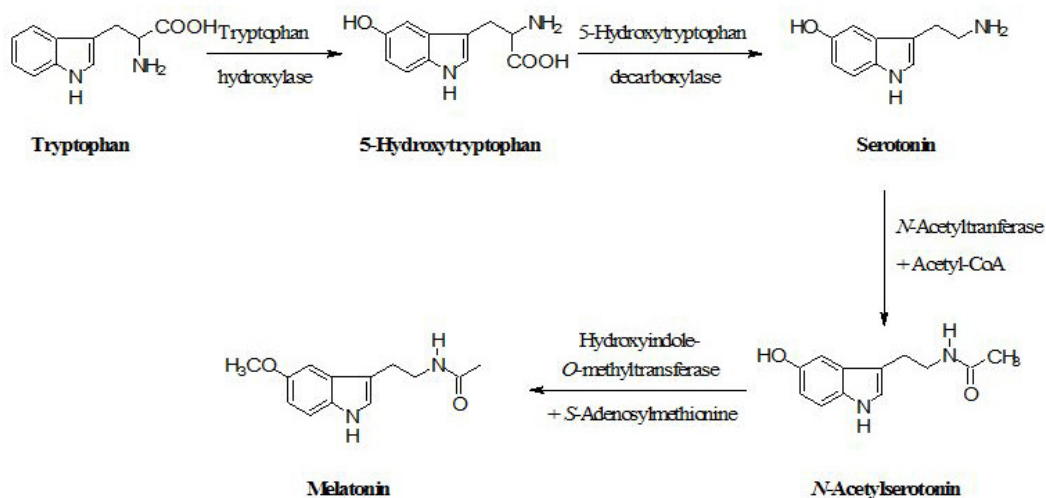


Figure 1: Biosynthesis of Melatonin

A melatonin szerepe a növényvilágban

Ezen kutatási eredmények után a melatonin keresése a növényekben elkerülhetetlen volt. Körülbelül egy évtizeddel ezelőtt a melatonin megtalálták a fotoszintetikus dinoflagellate-ban (*Gonyaulax polyedra*). Ezekben a fajokban a melatonin élettani szintje lényeges az antioxidáns védelem szempontjából (Poeggeler és Hardeland, 1994). A vizsgálatok sikeresen kimutatták, hogy a melatonin a növényvilágban is megtalálható (Reiter et al., 2001). Ezen eukariótáknál a melatonin bioszintézise a kloroplasztisban valamint mitokond-

riumban megy végbe (Tan et al., 2013). Legújabb kutatások szerint a magasabb rendű növények is termelik az N-acetil-5-metoxi-triptamint, főként a levélben, természetben és a magban halmozódik fel. Növények esetében a melatonin valószínűleg az oxidatív stressztől védi az élőlényt.

A melatonin kémiai szerkezetét tekintve egy indolamin, szintézise az L-triptofánból indul ki, mely egy esszenciális aminosav, ebből keletkezik a szerotonin, mely egy neurotranszmitter, és keletkezik indol-3-ecetsav (IAA), amely az auxinok családjába tartozik. A melatonin és az IAA hasonlósága néhány kutatót arra

ösztönzött, hogy megvizsgálja az exogén melatonin hatását a növekedésre. Sikertült igazolni, hogy a melatonin hatásos növekedési faktor (Hernandez-Ruiz és Cano, 2004). Nemrégiben bebizonyosodott, hogy a melatonin serkenti az etiolált csillagfürt sziklevelek növekedését (Hernandez-Ruiz és Arnao, 2008) és szerepe van a fitoremediációban is (Tan et al., 2007bc). Különböző stressz-hatások, mint például intenzív UV sugárzás, akut hőmérsékletváltozás vagy bizonyos kémiai ágensek eredményeként, néhány antioxidáns vegyület magasabb mennyisége mutatható ki (Roggero és Garcia-Parrilla, 1995; Cantos et al., 2000). A melatonin szint növekedése kapcsolatban lehet a védelmi mechanizmussal, ami segít megküzdeni ezekkel a stresszhatásokkal. Sőt, azok az alpesi és mediterrán növények, amelyek intenzív UV sugárzásnak vannak kitéve, magasabb melatonin koncentrációval rendelkeznek (Conti et al., 2002). Nagy intenzitású UV-B sugárzást alkalmaztak *Guralensis* gyökéren, kétszeresére növekedett a melatonin tartalom, mint alacsony intenzitású UV-B sugárzás esetén. Egyes szerzők úgy vélik, hogy a növények antioxidáns szintetizálásával védik meg magukat a sugárzás ellen (Reiter et al., 2007).

A növények nagy mennyiségű melatoninot tartalmaznak. Nagy részét a növény maga szintetizálja, e folyamathoz szükséges valamennyi enzimet ismerjük. Egy kisebb hányadát a melatoninnak, a talajból felszívás során veszik fel a növények vízben oldott állapotban (Tan et al., 2007a). A melatonin antioxidáns hatását az első védelmi vonalon fejti ki. Az élőlényekre jellemző biokémiai folyamatok során a melatonin a kloroplasztiszt és a mitokondrium védelmét látja el úgy, hogy detoxifikálja, azaz eliminálja a sejtlegzés során keletkezett szabad gyököket. Figyelembe véve a mitokondrium és kloroplasztisz közös evolúciós eredetét nem meglepő, hogy ezek az intracelluláris sejtorganellumok képesek szintetizálni a melatoninot minden sejtben. Összefoglalva, a mitokondrium és a kloroplasztisz képes a melatonin termelésre (Reiter et al., 2002; Acuna-Castroviejo et al., 2011; Ozturk et al., 2012; Song et al., 2012; Wang et al., 2012; Park et al., 2013). Számos tanulmány van arra vonatkozóan, hogy a melatonin képes megakadályozni a klorofil bomlását, ezáltal megőrzi a kloroplasztisz fiziológiai hatását, valamint védi a kloroplasztisz integritását és elősegíti a fotoszintézis folyamatát (Tan et al., 2012; Zhang et al., 2013). A melatonin gátolhatja a gyümölcs idő előtti lehullását. A melatonin koncentrációja rendkívül különböző a növényekben, valamint nem egyenlően oszlik meg a növényi részekben. A melatonin megtalálták egyéb növényi részekben úgymint gyökerekben, szárazokban, levelekben, gyümölcsökben és a magvakban. A legtöbb elemzett növény ehető. A megvizsgált kevés gyümölcs között melatoninot találtak a Montmorency meggyben (16–18 ng/g) (Burkhardt et al., 2001). A meggy érettségi foka nem korrelál a mért melatonin szinttel (Reiter et al., 2001). Egy 2000-ben készült tanulmány során a szerzők számos növényfajtának megvizsgálták a melatonin tartalmát. A publikációkból kiderült, hogy a különböző növényi részek eltérő mennyiségben tartalmazzák a melatoninot. Általában elmondható, hogy a növényi magvakban alacsony koncentrációban van jelen a molekula, kb. 7–29 ng/g száraz tömegre vonatkoztatva, (Manchester et al., 2000) míg a

zöld növényi részekben és a termésekben nagyobb, egyes növényeknél viszont kiugróan magas melatonin koncentrációt detektáltak, kb. 30–700 ng/g száraz tömegre vonatkoztatva.

A melatonin hatása a humán szervezetre

A tobozmirigy (glandula pineale) melatonin szekréciójának fontos szerepe van a cirkadián ritmus kialakulásában. Ellentétben a klasszikus endokrin mirigyekkel, a tobozmirigyet nem befolyásolják más belső elválasztású mirigyek, vagy az azokból származó hormonok. A melatonin termelés fő szabályozója a fény. A tobozmirigy éjszaka folyamán bőségesen termel melatoninot (Reiter, 1993). A cirkadián ritmus kialakításában fontos szerepet játszanak kiterjedt idegrendszeri területek, úgymint a SCN vagy más néven a szuprakiazmatikus mag, amely vezérli a melatonin szekréciót. A mag az agyalon helyezkedik el és körülbelül 10 000 neuronból áll. A mag neuronjaiban endogén ritmusgenerálás mutatható ki, és ide futnak a retinából jövő nem vizuális rostok. Ez a retina-hypothalamus összeköttetés. Amennyiben ezek a neuronok bármilyen károsodást szenvednek, az élőlény napi ritmusa felborul. A napfelkeltével növekszik a retina fotoreceptorai által érzékelt fény intenzitása, amely az agyba jutva csökkenti az SCN-n keresztül a tobozmirigy aktivitását, ezzel elősegítve a szervezet felébredését. A szervezet a délután folyamán éri el a legalacsonyabb melatonin szintet. Nagyon jó példa a cirkadián ritmus megzavarására az úgy nevezett „jet-lag” jelenség. Ez azt jelenti, hogy ha valaki repülőgéppel több időzónát is átrepül, akkor az utazásokat követően több napba is telhet az egyéni alvás alkalmazkodása a helyi időkhöz. Melatonin tartalmú készítmények szedésével az alkalmazkodás mértéke javítható (Fonyó és Ligeti, 2007).

A melatonin nagyon hatásos szabadgyök megkötő vegyület, sokkal hatékonyabb, mint a referenciának számító E-vitamin (Claustrat et al., 2005). A humán szervezetekben a biotranszformáció során más biogén aminokká alakul pl. kinuraminok. A szervezetben a melatonin biotranszformációja két lépésben történik. Az első lépésben a melatonin direkt oxidáció során N-acetil-N-formil-5-metoxi-kinuraminná alakul. (Ezt *in vitro* kísérletben igazolták. Teljes kinetikai és szerkezetvizsgálatokkal írták le. A kísérletekben vizsgálták a melatonin és a H₂O₂ reakcióját.)

Második lépésben az AFMK-t a kataláz enzim átalakítja N-acetil-5-metoxi-kinuraminná. A melatonin antioxidáns tulajdonságáért ez a vegyület a felelős (Tan et al., 2013). Ezt a származékot a plazmából is sikerült kimutatni. Leírták egyes biokémiai folyamatokban a szerepét, így pl. az AMK gátolja a prosztata-glandinok bioszintézisét, vagy képes hozzákapcsolódni a GABA receptorokhoz (Zurowski et al., 2012).

Az N-acetil-5-metoxi-triptamin adagolása gátolja a daganatok növekedését ezért preventív hatása van. De megelőző szerepe nagyban függ az ember életmódjától és az étkezési szokásaitól is. A melatonin prekürzora a triptofán, így az élelmiszereknek eltérő triptofán tartalma okozhatja a melatonin szint ingadozását a humán szervezetben (Dopfel et al., 2007). Az infarktuszban szenvedő betegeknek a melatonin szintje alacsony. A melatonin antioxidáns hatása segít megelőzni a reak-

tív oxigénformák okozta kóros folyamatok kialakulását, amelyek sokszor vezetnek szív- és érrendszeri elváltozásokhoz. A melatoninnak vérnyomás szabályozó szerepe is ismer. Egy patkányokon végzett tanulmány arról számol be, hogy az állat tobozmirigyének eltávolítása magas vérnyomást okozott (Claustrat et al., 2005). Számos ideggyógyászati esetben bizonyították, hogy egyes kórfolyamatokban, úgy, mint az epilepszia, a stroke és a migrén esetében a betegeknek mindig kevesebb volt a melatonin szintjük a fiziológiához viszonyítva. Melatonin bejuttatása a szervezetbe megoldás lehet e páciensek kezelésében (Claustrat et al., 2005).

Ezen kívül szerepe van immunfunkcióban, retina élettanában, tumor gátlásban és nemrég antioxidánsként is azonosították (Reiter, 1993; Dubocovich et al., 1999; Malpoux et al., 2001; Blask et al., 2002; Guerrero és Reiter, 2002; Reiter et al., 2002; Tan et al., 2002). Ezt igazolja az a tény is, hogy kétféle melatonin receptort azonosítottak a humán szervezetben: MT_1 és MT_2 receptorokat. Több szervben is felismerték ezen receptorokat, például az agyban, retinában, keringési rendszerben, májban, vesében, immunsejtekben, bőrben, prosztatában és mellkasi sejtekben (Ekmekcioglu et al., 2006). Tulajdonképpen kijelenthető, hogy ezen receptorok a fontos szervek valamennyi sejt felszínén előfordulnak. Melatonin receptorok már magzati életben is találhatóak (Macchi et al., 2004) és a 26. héttől kezdve az embrióban melatonin szintézis is zajlik. A magzat az anyaméhben is kapcsolatba kerül a melatoninnal, mert a méhlepényen átjutva az embrió bioritmusát is szabályozza. A születést követő 2–3 hónapban a melatonin szint nem mutat cirkadián ingadozást. A gyermek fejlődése során a melatonin termelés csúcspontja 3–6 éves korban van, majd a melatonin szintézis 80%-ra csökken, amíg az egyén eléri a felnőtt kort (Macchi és Bruce, 2004). Bár a tobozmirigy egy belső elválasztású mirigy, de nem képes tárolni a terméket ezért az a termelődést követően a véráramba kerül, és a keringéssel eljut a különböző szervekbe, ahol gyorsan kiválasztódik. Az N-acetil-5-metoxi-triptamin víz-, és lipidoldékony molekula, ez a tulajdonsága azért érdekes, mert így a molekula könnyen átjut a sejtmembránon keresztül. A keringésbe jutva a melatonin kiválasztódik a nyálba, vizeletbe, bekerül az anyatejbe, valamint a gerincfolyadékba. Ez a hormon a hajnali órákban három és négy óra között található meg a felsorolt testnedvekben (Claustrat et al., 2005). Az 1990-es évek közepén terjedt el a melatonin tartalmú készítmények szedése, főleg az álmatlanságban szenvedőknél kezdték el használni. A készítményeket alapvetően két forrásból állítják elő. Növényi extraktokból és állati kivonatokból, amelyeket az adott élőlény tobozmirigy kivonatát tartalmaznak. Ez a kivonat állatok esetében tartalmazhat vírusokat és olyan fehérjéket melyek antitest-képződést generálnak az emberi szervezetben, azaz potenciálisan allergének lehetnek. Ezért a szakemberek azt tanácsolják, hogy amennyiben lehetséges ne ezeket a készítményeket alkalmazzuk. A másik forrás a szintetikus melatonin tartalmú termékek. A medicina valamint a farmakológia is e formának a felhasználását támogatja. A melatonin szedését tanácsos elkerülni gyermekeknek és terhes nőknek hisz a méhlepényben kiválasztódik és bejut az embrió szervezetébe is. A melatonin nem szedhető együtt drogokkal és alkohollal (Gyógyszer Kompendium, 2005).

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgált meggyfajtákat 2012-ben az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Non-profit Közhasznú Kft. bocsátotta rendelkezésünkre. A minták biológiai érettségük elérésekor kerültek szedésre, majd hűtött körülmények között szállították a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszékére, ahol feldolgozásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on sötét helyen tárolták.

Szárazanyag-tartalom mérése

A minta előkészítés során a meggy húst apró kockákra vágtuk, ezt $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on előfagyasztottuk két órán keresztül. Ezután liofilizálás előtt $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk az előkészített mintát. A liofilizálást CHRIST ALPHA 1-4 LSC típusú berendezéssel végeztük. A fagyasztva szárítás $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt. A szárítás időtartama 12 óra volt, melyet többször egymás után ismételtünk. A kapott mintát porítottuk és a pontos tömeg ismeretében kiszámoltuk az egyes fajták szárazanyag-tartalmát.

Melatonin-izolálás

A vizsgált meggyfajtákat feldolgozásig fagyasztva tároltuk, annak érdekében, hogy a meggy gyümölcs ne sérüljön, azaz az enzimatisz folyamatok leálljanak. Erre azért van szükség, mert a bioaktív komponenseket így tudjuk megőrizni. A minták felolvasztása után a meggy magot eltávolítottuk, ezt követően megkezdtük a meggy gyümölcs feltárását.

Ahhoz, hogy az extrakció eredményes legyen, a kivonó közegnek be kell jutnia a sejtek belsejébe és oldania kell a sejt tartalmat. Ez a folyamat a sérült sejtekben akadálytalanul végbemegy, és a sejt tartalom kioldódik, ezért a kivonás első és igen fontos lépése a sejtek feltörése. A kioldás tulajdonképpen a diffúzió folyamatával jellemezhető. A diffúzió lehet szabad diffúzió, amikor a tömény oldat szabadon diffundál az oldószerrel, ill. lehet gátolt diffúzió, amikor a kivonó folyadék a sejt falon be kell jutnia és oldania kell a sejt tartalmat, valamint ennek a tömény oldatnak ki kell jutnia a sejtből. Ez a folyamat duzzasztással meggyorsítható.

A kivonás folyamatára jellemző, hogy egyensúlyra vezet. A sejt lé koncentrációja nagy, a töltőlé koncentrációja nulla. A diffúziós folyamat egyre csökkenő sebességgel mindaddig tart, míg az egyensúly be nem áll, azaz a sejt lé és a töltőlé koncentrációja egyenlő nem lesz (Rác és Selmecezi, 1991).

A kioldást különböző tényezők befolyásolják, pl. ha nő a sérült sejtek aránya, akkor szabad diffúzió aránya is nő ezáltal az extrakció hatékonyabb lesz. Ezért a vizsgálatban szereplő valamennyi mintánál a homogenizálást Braun Multiprimer (300 Watt) készülékkel végeztük.

A másik fontos tényező, hogy a sejt lé és a töltőlé közötti koncentráció különbséget fenn kell tartani. Ez több módon is történhet, pl. növeljük a töltőlé mennyiségét vagy a töltőlét megújítjuk, ez lehet szakaszos vagy folyamatos. A melatonin kioldáshoz mi nagy mennyi-

ségű töltőt alkalmaztunk melyeknél a kioldás folyamatos volt, azaz a töltőt nem cseréltük a kivonás során. A kivonás hatékonysága szempontjából fontos még a hőmérséklet szerepe. Köztudott, hogy a hőmérséklet növelésével nő a szabad és gátolt diffúzió sebessége (Rácz és Selmeczi, 1991). Mi a kivonást szobahőmérsékleten végeztük, mert töltőre és a vizsgálni kívánt hatóanyagra is igaz, hogy nem termostabilisak. Töltőként a kloroformot választottuk. Erre az oldószerre jellemző, hogy vízzel nem elegyedik így a diffúzió sebessége és annak hatékonysága is csökkenhet.

A kivonás módszerei közül az áztatást választottuk, mely folyamatos volt. A kloroform több szempontból jónak bizonyult, mert megfelel a töltővel szembeni követelményeknek, azaz oldja a hatóanyagot és nem lép azzal reakcióba. Annak érdekében, hogy a koncentráció különbség megmaradjon és a diffúzió sebessége ne csökkenjen a töltő háromszorosát adtuk az egyes meggyfajták tömegéhez. Az extrakciót állandó kevertetéssel tettük még hatékonyabbá. Az áztatás előnye, hogy a munkabefektetés igen csekély, valamint azonos kiindulási anyagok esetén azonos hatóanyag-tartalmú kivonatot nyerhetők.

A 200 g szobahőmérsékleten felolvasztott magozott meggy pulp-hoz 600 ml kloroformot és 300 µl Na₂HPO₄-ot adunk, majd 40 percig szobahőmérsékleten mágneses keverővel kevertettük. A melatonin fényérzékenysége miatt a kevertetés sötétben történt (Reiter et al., 2005; Remenyik által módosítva 2012).

A következő lépés a szűrés folyamata. Első lépésként durva szűrést alkalmaztunk gézen át. A szűrletképzés során nagyon fontos lépés a préselés folyamata, mert ebben az esetben a sejtekben lévő oldat egy jelentős részét is kinyerjük. Ezután választótölcséren elválasztjuk a két fázist. Ezt követően a szerves fázishoz 2 kanál szárított magnézium-szulfátot adagoltunk. Abban az esetben, ha a vizes fázist nem sikerült maradéktalanul eltávolítani megismételjük a szárított magnézium-szulfát hozzáadását és finom szűrést végzünk szűrőpapírral. Ezt követően a szerves fázist bepároltuk, Büchi Rotavapor R-210/215 (Switzerland) vákuumbepárolóval. A bepárlás 40 °C-os vízfürdőn történt 145 mBar nyomáson. Az oldatot szárazra pároltuk. A minta tömegét visszamértük és ezzel a lépéssel az extraktumot előkészítettük HPLC analízisre

A melatonin mennyiségi meghatározása HPLC módszerrel

A mintákat Merck-Hitachi LaChrom nagy nyomású folyadék kromatográfán diódasoros detektorral L-7455 analizáltuk, automata mintavevővel L-7250, interface L-7000, pumpa L-7100 és a HPLC rendszerhez Manager szoftvert, használtunk.

Chromolith Performance RP -18e 100×4,6 mm No UMO 119/009 oszlopon (Darmstadt, Germany) történt az elválasztás. Kromatográfias módszert fejlesztettünk ki a melatonin mennyiségi meghatározására.

A mozgó fázis az acetinitril: Sörensen puffer (pH 4,79)=18:82 eluens volt. Az áramlási sebesség 1 ml/perc, a melatonin 275 nm-nél detektáltuk standard segítségével.

Tömegspektrometriás mérések (szilárd lézer MALDI-TOF MS)

Méréseinkhez Bruker Biflex III reflektorral és „delayed extraction”-nal felszerelt tömegspektrométert használtunk 2,5-dihidroxi-benzoész (DHB), vagy 2,3,6-trihidroxi-acetofenon (THAP) mátrix alkalmazásával, pozitív-ion módban. A minták gáz fázisba juttatása és ionizálása nitrogén lézer, 3 ns impulzusidő alkalmazásával történt. Többszöri, általában 100 impulzust alkalmaztunk 19 kV gyorsító és 20 kV reflektor feszültség mellett. A készüléket melatonin [M+Na]⁺ ionjainak m/z értékére (255,30 g/mol) kalibráltuk külső kalibrációt alkalmazva.

¹H és ¹³C NMR analízisek

¹H (500,13 MHz) és ¹³C NMR (125,76 MHz) spektrumok Bruker DRX-500 spektrométerrel készültek D₂O-ban. A kémiai eltolódásokat a külső kalibrációra használt DSS-hez viszonyítva számítottuk.

EREDMÉNYEK

Méréseink során meghatároztuk az egyes meggy-minták szárazanyag-tartalmát. A kapott eredményt *1. táblázatban* foglaltuk össze. A mérés során azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált fajták szárazanyag-tartalma jelentősen eltér. Magas szárazanyag-tartalommal jellemezhető a „VN1” Bosnyák fajtakörből szelektált, valamint az „Érdi jubileum” fajta. Kisebb szárazanyag-tartalommal jellemezhető az Ujfehértói fürtösből szelektált fajták, és a „Cigánymeggy7” fajta. A kapott eredményekből az is kiderült, hogy a magas szárazanyag-tartalommal rendelkező fajtákból kevesebb mennyiségű kivonatot extraháltunk, míg a kisebb szárazanyag-tartalommal rendelkező fajtáknál nagyobb mennyiségű extraktumot állítottunk elő a kloroformos extrakcióval.

1. táblázat

A meggyfajták szárazanyag-tartalma (%)

Meggyfajták(1)	Kiindulási tömeg (g)(2)	Extrahált tömeg (mg)(3)	Szárazanyag-tartalom (%) (4)
E	108	51,4	13,20±0,122
Cigánymeggy7	212	227,0	14,41±0,161
A	214	114,8	15,11±0,231
M	152	81,9	15,79±0,135
VN4	204	69,3	16,10±0,181
Pándy279	142	177,1	16,12±0,070
Cigánymeggy59	200	118,0	17,46±0,130
Érdi jubileum	214	81,8	19,09±0,165
VN1	204	69,3	21,83±0,131

Table 1: The dry matter content of sour cherry cultivars
Sour cherry cultivars(1), Weighed mass (g)(2), Extracted mass (mg)(3), Dry matter content (%) (4)

Kromatográfias rendszert fejlesztettünk ki a melatonin kvalitatív és kvantitatív meghatározására a magyarországi meggyfajtából. A melatonin azonosítására

hoz és mennyiségi meghatározásához standardot használtunk melatonin 99+% (Alfa Aesar, Germany). A melatonin retenció ideje a fenti kromatográfiás rendszerben 5,49 min. A mérési eredményeinket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat

A meggyfajták melatonin tartalma ($\mu\text{g/g}$)

Meggyfajták(1)	Melatonin tartalom száraz tömegre vonatkoztatva ($\mu\text{g/g}$)(2)
Pándy279	0,126+/-0,014
Érdi jubileum	0,198+/-0,015
M	0,358+/-0,050
VN1	1,186+/-0,090
E	1,547+/-0,119
A	2,175+/-0,028
Cigánymeggy59	2,466+/-0,119
Cigánymeggy7	2,923+/-0,133
VN4	9,893+/-0,181

Table 2: The Melatonin content of sour cherry cultivars

Sour cherry cultivars(1), Melatonin content expressed as dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$)(2)

A minőségi azonosítást standard segítségével a mennyiségi meghatározást belső addíciós módszerrel számoltuk ki. A vizsgált meggy gyümölcs melatonin koncentrációja száraz tömegre van vonatkoztatva.

Preparatív HPLC-s módszerrel a Bosnyák fajtakörből szelektált „VN4” mintából a nagy intenzitású 5,76 percnél detektálható frakciót izoláltuk. Az izolált vegyület molekulatömegét MALDI TOF-MS segítségével meghatároztuk.

A 3. ábrán jól látható a 232,29 g/mol molekulatömegű frakciónk melynek értéke tökéletesen megegyezik az irodalomban szereplő melatonin molekulatömeggel, illetve a $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 255,30 g/mol és kis intenzitással látható $[\text{M}+\text{K}]^+$ molekulaionok jelei is, 273,214 g/mol, ezen kívül egyéb szennyező anyagot nem tartalmaz a spektrum.

Az izolált vegyület szerkezetét NMR mérésekkel igazoltuk. A kapott karakterisztikus értékeket a 3–4. táblázatban foglaltuk össze. A proton és a ^{13}C spektrum vizsgálata során a kémiai eltolódások, illetve a csatolási állandók alapján egyértelmű, hogy az izolált vegyület a N-acetil-5-metoxi-triptamin.

Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a „Pándy 279”, és az „Érdi jubileum” alacsony melatonin koncentrációval jellemezhető, átlagosan 0,162 $\mu\text{g/g}$, továbbá vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a Bosnyák fajtakörből szelektált „VN4” fajta kiemelkedően magas melatonin tartalommal 9,893 $\mu\text{g/g}$ rendelkezik, azaz melatonin-felhalmozó. A „Cigánymeggy” klónok közel azonos mennyiségű melatonin koncentrációval jellemezhetőek, míg az „Újfehértói” tájszelekcióból származó mintákból az „M” fajta szignifikánsan alacsonyabb melatonin tartalommal rendelkezik, mint a másik ugyanazon tájszelekcióból származó variánsok. Az általunk vizsgált magyarországi meggyfajták melatonin tartalmának átlagos értéke 2,319 $\mu\text{g/g}$ száraz tömegre vonatkoztatva.

3. ábra: A melatonin MALDI-TOF MS

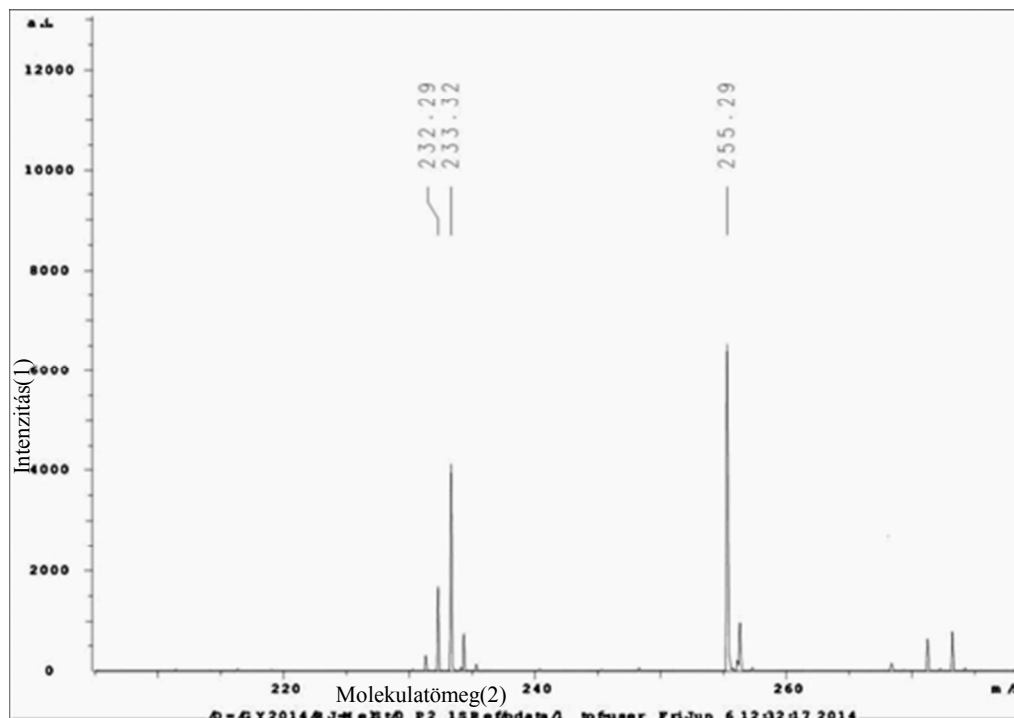


Figure 2: The MALDI-TOF MS spectrum of Melatonin

Intensity(1), Molecular weight(2)

3. táblázat

¹ H NMR értékek			
Csoport(1)	Kémiai eltolódás (δ ppm)(2)	Csatolási állandó (J, Hz)(3)	Jel alakja(4)
2-CH ₃	1,88		s
OCH ₃	3,88		s
b-CH ₂	2,92	6,5	t
l-CH ₃	3,40	6,5	q
6-H	6,89	8,5	q
4-H	6,92	2,0	d
7-H	5,70	8,5	d

Table 3: ¹H NMR value

Team(1), Chemical shift (δ ppm)(2), Coupling constant (J, Hz)(3), Signal shape(4)

4. táblázat

¹³ C NMR értékek	
Csoport(1)	Kémiai eltolódás (δ ppm)(2)
2-CH ₃	23,250
CH ₂	25,470
b-CH ₂	41,510
OCH ₃	57,540
C-3	112,980
C-4a	128,710
C-5	154,160
C-7a	133,047

Table 4: ¹³C NMR value

Team(1), Chemical shift (δ ppm)(2)

Méréseink alapján megállapítható, hogy a biológiai érettség állapotában betakarított, általunk vizsgált magyarországi meggyfajták kiemelkedően magas melatonin-tartalommal jellemezhetőek.

Eredményeinkre alapozva, elmondhatjuk, hogy a meggy gyümölcs természetes melatonin forrás lehet, mindazonáltal alkalmassá válhat arra, hogy melatonin felhalmozó funkcionális élelmiszereket fejlesszünk belőle.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani téma-vezetőmnek, dr. Remenyik Judit tanárnőnek, hogy a kísérlet során szakmai tapasztalattal és építő jellegű kritikával támogatta munkámat. Köszönettel tartozom a Szervetlen- és Analitikai Kémiai Tanszéken dr. Gyémánt Gyöngyi tanárnőnek, aki kérésünkre megmérte a preparatív HPLC során elválasztott frakció molekula-tömegét, és ez által identifikált a melatonin molekulát MALDI TOF-MS készülékkel, valamint szeretném köszönetemet kifejezni dr. Bajza István tanár úrnak, hogy az izolált vegyület szerkezetét igazolta NMR analízissel.

IRODALOM

- Acuna-Castroviejo, D.–Lopez, L.C.–Escames G. (2011): Melatonin-mitochondria Interplay in health and disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 11: 221–240.
- Balzer, I.–Hardeland, R. (1996): Melatonin in algae and higher plants: possible new roles as a phytohormone and antioxidant. *Bot. Acta*. 109: 180–183.
- Blask, D. E.–Hill, S. M.–Dauchy, R. T. (2011): Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *Journal of Pineal Research*. 51: 259–269.
- Blask, D. E.–Sauer, L. A.–Dauchy, R.T. (2002): Melatonin as a chronobiotic/anti-cancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2: 113–132.
- Burkhardt, S.–Tan, D. X.–Reiter, R. J. (2001): Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *Food Chemistry*. 49: 10: 4898–902.
- Cantos, E.–Garcia-Viguera, C.–de Pascual-Teresa, S.–Tomas-Barberan, F. A. (2000): Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 4606–4612.
- Claustrat, T. B.–Brun, J.–Chazot G. (2005): The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*. 9: 11–24.
- Conti, A.–Tettamandi, C.–Singaravel, M.–Haldar, C.–Pandi-Perumal, R. S.–Maestroni, G. J. M. (2002): Melatonin: an ubiquitous and evolutionary hormone. [In: Haldar, C. et al. (eds.) *Treatise on Pineal Gland and Melatonin*.] Science Publishers. Enfield. USA. 105–143.
- Dopfel, P.–Schulmeister, K.–Schernhammer, E. S. (2007): Nutritional and lifestyle correlates of the cancer-protective hormone melatonin. *Cancer Detection and Prevention*. 31: 140–148.
- Dubocovich, M. L.–Mansana, M. I.–Benloucif, S. (1999): Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 460: 181–190.
- Ekmekcioglu, C. (2006): Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 60: 97–108.
- Fonyó A.–Ligeti E. (2007): Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest. 1147.
- Guerrero, J. M.–Reiter, R. J. (2002): Melatonin-immune system relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2: 167–180.
- Gyógyszer Kompendium (2005): Az Országos Gyógyszerészeti Intézet Hivatalos Kiadványa. 1598.
- Hardeland, R.–Madrid, J. A.–Tan, D. X. (2012): Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *Journal of Pineal Research*. 52: 139–166.
- Hernandez-Ruiz, J.–Arnao, M. (2008): Melatonin stimulates the expansion of etio-lated lupin cotyledons. *Plant Growth Regulation*. 55. 1: 29–34.

- Hernandez-Ruiz, J.–Cano, A. (2004): Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*. 220: 140–144.
- Lerner, A. B.–Case, J. D.–Heinzelmann, R. V. (1959): Structure of melatonin. *Journal of the American Chemical Society*. 81: 6084–6085.
- Lerner, A. B.–Case, J. D.–Takahashi, Y. (1958): Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*. 80: 2587.
- Macchi, M. M.–Bruce, J. N. (2004): Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 25: 177–195.
- Malpoux, B.–Migaud, M.–Tricoire, H.–Chemineau, P. (2001): Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*. 16: 336–347.
- Manchester, L. C.–Poeggeler, B.–Alvares, F. L.–Ogden, G. B.–Reiter, R. J. (1995): Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: Implications for an ancient antioxidant system. *Cellular and Molecular Biology Research*. 41: 321–325.
- Manchester, L. C.–Tan, D. X.–Reiter, R. J.–Park, W.–Monis, K.–Qi, W. (2000): High levels of melatonin in the seeds of edible plants. Possible Function in germ tissue protection. *Life Sciences*. 67: 3023–3029.
- Migliori, M. L.–Romanowski, A.–Simonetta, S. H. (2012): Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Pineal Research*. 53: 38–46.
- Motilva, V.–Garcia-Maurino, S.–Talero, E. (2011): New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *Journal of Pineal Research*. 51: 44–60.
- Ozturk, G.–Akbulut, K. G.–Guney, S. (2012): Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin. *Exp. Gerontol.* 47: 706–711.
- Park, S.–Lee, D. E.–Jang, H. (2013): Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *Journal of Pineal Research*. (in print)
- Poeggeler, B.–Hardeland, R. (1994): Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *Journal of Pineal Research*. 1. 7: 1–10.
- Rácz I.–Selmeczi B. (1991): *Gyógyszertechnológia 3. Medicina Kiadó*. Budapest. 417–426.
- Reiter, R. J. (1993): The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 49: 654–664.
- Reiter, R. J.–Manchester, L. C.–Tan, D. X. (2005): Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*. 21: 920–924.
- Reiter, R. J.–Tan, D. X.–Burkhardt, S.–Manchester L. C. (2001): Melatonin in Plants. Special Article. 286–290.
- Reiter, R. J.–Tan, D. X.–Sainz, R. M. (2002): Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 54: 1299–1321.
- Reiter, R. J.–Tan, D. X.–Terron, M. P.–Flores, L. J.–Czarnocki, Z. (2007): Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. 54. 1: 1–9.
- Roggero, J. P.–Garcia-Parrilla, C. (1995): Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes. *Sciences des Aliments*. 15. 411–422.
- Salisbury, F. R.–Ross, C. W. (1992): *Plant physiology*. 4th ed. Wadsworth. Belmont.
- Song, N.–Kim, A. J.–Kim, H. J. (2012): Melatonin suppresses doxorubicin-induced premature senescence of A549 lung cancer cells by ameliorating mitochondrial dysfunction. *Journal of Pineal Research*. 53: 335–343.
- Stehle, J. H.–Saade, A.–Rawashdeh, O. (2011): A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *Journal of Pineal Research*. 51: 17–43.
- Szentágothai J.–Réthelyi M. (1997): *Funkcionális anatómia II. Semmelweis Kiadó*. Budapest. 1136.
- Tan, D. X.–Hardeland, R.–Manchester, L. C. (2010): The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 85: 607–623.
- Tan, D. X.–Hardeland, R.–Manchester, L. C. (2012): Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J. Exp. Bot.* 63: 577–597.
- Tan, D. X.–Manchester, L. C.–di Mascio, P. (2007b): Novel rhythms of N-1-acetyl- N-2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. *FASEB Journal*. 21. 8: 1724.
- Tan, D. X.–Manchester, L. C.–Helton, P.–Reiter, R. J. (2007c): Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. *Plant Signal Behaviour*. 2: 514–516.
- Tan, D. X.–Manchester, L. C.–Liu, X.–Rosales-Corral, S. A.–Acuna-Castroviejo, D.–Reiter, R. J. (2013): Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of Pineal Research*. 54: 127–138.
- Tan, D. X.–Manchester, L. C.–Terron, M. P.–Flores, L. J.–Reiter, R. J. (2007a): One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and reactive nitrogen species? *Journal of Pineal Research*. 42: 28–42.
- Tan, D. X.–Reiter, R. J.–Manchester, L. C. (2002): Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2: 181–198.
- Wang, P.–Yin, L.–Liang, D. (2012): Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*. 53: 11–20.
- Yu, H. S.–Reiter, R. J. (1993): *Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications*. CRC Press. Boca Raton.
- Zhang, N.–Zhao, B.–Zhang, H. J. (2013): Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*. (in print)
- Zurowski, D.–Nowak, L.–Machowska, A.–Wordliczek, J.–Thor, P. J. (2012): Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 63. 6: 641–647.