creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000237878

2009年 2月

碩士學位論文

페놀 용액을 이용한 멜라닌 발색단의 분해

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

林 栿 奎

페놀 용액을 이용한 멜라닌 발색단의 분해

Decomposition of Melanin Chromophore by Phenolic Solution

2009年　2月　　日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

林 栩 奎

폐놀 용액을 이용한 멜라닌 발색단의 분해

指 導 敎 授　曺 秉 旭

이 論文을 工學碩士學位 申請 論文으로 提出함.

2008年　12月　日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

林 栩 奎

林枏奎의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 敎 授 崔 載 坤 印

委 員 朝鮮大學校 敎 授 曺 秉 旭 印

委 員 朝鮮大學校 敎 授 李 重 憲 印

2009年 2月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

목 차

LIST OF TABLES ····· iv

LIST OF FIGURES ····· v

ABSTRACT

1. 서 론 ····· *1*

가. *Melanin* ····· *1*

1) 멜라닌 생성 메카니즘과 기능성 ····· *3*

가) *Eumelanin* ····· *3*

나) *Phenomelanin* ····· *5*

다) *Neuromelanin* ····· *5*

2) 멜라닌색소의 억제반응 ····· *7*

나. *Melatonin* ····· *9*

*1) Phenol*과 *Hydrogen Peroxide* ····· *13*

가) *Phenol*과 *Hydrogen Peroxide* ····· 13
(1) Phenol ····· 13
(2) Hydrogen peroxide ····· 15
나) *Phenol* + H_2O_2와 *Ultraviolet rays* ····· 17

다. 연구의 목적 ····· 21

2. 실 험 ····· 22

가. 시약과 실험기기 ····· 22

1) 시 약 ····· 22

2) 실험기기 ····· 22

나. 방 법 ····· 23

3. 결 과 ····· 24

가. 순물질의 분광학적 거동 ····· 24

나. 페놀용액에서의 분광학적 거동 ····· 29

1) UV/vis spectrophotometer에서의 mixtures 분석 ····· 29

2) FT-IR과 ^{1}H-NMR에서의 혼합물의 거동 분석 ····· 43

4. 결 론 ····· 50

5. 연구 계획 ····· 51

REFERENCES ····· 52

TABLES

Table 1. Some kinds of Mechanisms and materials for blocking color pigments up 8

Table 2. Reaction mechanisms and their kinetic rates constants (k) for the aqueous phenol degradation by UV/H_2O_2 18

Table 3. Interpretation of FT-IR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution, (MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;MT) 44

FIGURES

Figure 1. The name of each position which consisting of both melanocyte and keratinocyte in epidermis ····· 2
Figure 2. Biosynthetic pathways for both eumelanin and pheomelanin ····· 4
Figure 3. The chemical structure of melanin ····· 6
Figure 4. The structure of melatonin ····· 10
Figure 5. Melatonin pathways starting from tryptophan ····· 12
Figure 6. Definition of structural parameters and axis convention for phenol · 14
Figure 7. The structure of hydrogen peroxide ····· 16
Figure 8. The physical property of hydrogen peroxide ····· 16
Figure 9. The UV/vis spectra of phenol aqueous solutions dependent on various concentrations, down : apply to Beer's Law, A : absorbance · 26
Figure 10. The UV/vis spectra of melatonin dependent on various concentrations, down ; the shift of wavelength (λmax) for UV/vis spectra ····· 27
Figure 11. The UV/vis spectra of various hydrogen peroxide dependent on various concentrations ····· 28
Figure 12. The UV/vis spectra of the mixtures, phenol;Et-OH ····· 29
Figure 13. The UV/vis spectra of mixtures, phenol;hydrogen peroxide on each various concentrations ····· 29
Figure 14. The UV/vis spectra of the mixtures, phenol;hydrogen peroxide;Et-OH as each volume ratios at aqueous states ····· 30
Figure 15. The UV/vis spectra of the mixtures, melatonin;various concentrations of hydrogen peroxide, 0.1 M ~ 0.9 M ····· 30
Figure 16. The UV/vis spectra of the mixtures, phenol;melatonin states on each various concentrations in aqueous ····· 31
Figure 17. The shift of wavelength (λmax) that obtained by Gaussian-multi - fitting for all of the mixture states at lower concentrations, P : - phenol, HP : hydrogen peroxide, E : ethanol, v.ME : various mela-

tonin cons. ····· 32
Figure 18. The UV/vis spectra of the mixture, phenol;melatonin at high concentrations, right; the UV/vis spectra from mathematical analysis ····· 36
Figure 19. The UV/vis spectra from mathematical analysis, Right; residual UV/vis spectrum after mathematical subtraction ····· 37
Figure 20. The UV/vis spectra of the mixtures, various phenol concentrations.; fixed melatonin concentration ····· 38
Figure 21. The residual UV/vis spectra of mathematical treatments, between mixtures and pure materials, and bathochromic shift ····· 39
Figure 22. The mutual UV/vis spectra of mixtures and pure materials ····· 40
Figure 23. The residual UV/vis spectra of mathematical treatments, and Beer's Law ····· 41
Figure 24. The UV/vis spectra of the mixture, H_2O_2;melatonin and phenol;H_2O_2; melatonin at high concentrations ····· 42
Figure 25. FT-IR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution, MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;MT, and the numbers of green color are related to Table 2 ····· 45
Figure 26. FT-IR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution in the wavelength range 1000~1900/ cm^{-1}, MT : melatonin, MTH : H_2O_2; Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;MT, and the numbers of green color are related to Table 2 ····· 46
Figure 27. ^{1}H-NMR of pure melatonin ····· 47
Figure 28. ^{1}H-NMR of MT, MTH solution, and MTC solution, MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;MT ····· 48
Figure 29. ^{1}H-NMR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution in specific ppm ranges, MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;MT ····· 49

Abstract

Decomposition of Melanin Chromophore by Phenolic Solution

by Im, Nam Kyu
Advisor : Prof. Jo, Byung Wook, Ph. D.
Prof. Lee, Chang Hoon
Department of Chemical Engineering,
Graduated school of Chosun University

Cells which produce melanosome are called melanocyte. Melanocytes produce melanin which is a pigment in the skin, hair, and eyes. The melanosome moves it easily from the center of the melanocyte to the surface of melanocyte due to absorbing UV irradiation, In some occasion, however, black pigments, tickles or freckles, come in sight on skin when these processes go to excess during protecting skin. So there are some methods to decompose excessive pigmented melanin through the use of AHA(alpha hydroxyl acid), Retinoid, Vitamin C, Hydroquinone, Kojic acid, Phenol 90%, Catechol, etc. are well known. The method through a surgical operation by laser has been known recently in the limelight above all things.

In this study, the main point is not so much elimination of melanin as

decomposition of melanin chromophore, and also doesn't mean to make a whitening face for whole of skin but to attack for the minimum part which black pigments is in. Therefore, Phenol 95% and Hydrogen Peroxide 34.5% were chosen by means of experimental materials; mix phenol and hydrogen peroxide in ethanol. As a solute for the possibility of decomposition, melatonin which has been known as one of precursor to synthesis melanin was chosen.

Even though phenol and hydrogen peroxide have intense oxidations by themselves, more radicals are produced and reproduced in solution states when they get the energy of one's molecules. In additional they have various reactions so much by their intermolecular interactions, like as quinone, catechol.

Usually UV/vis spectrophotometer is useful to find out the intermolecular interaction from between pure materials or solutes and solvents in the solution as to check its wavelength(λ_{max}) and shift of them; hypsochromic or bathochromic shift on various concentrations. The results confirmed at lower concentration since each materials in aqueous states were not enough to find out, therefore specific results were applied to higher concentration, and then could obtain the remaining specific UV/vis spectra after removing the original absorbance; phenol+melatonin, phenol+,H_2O_2+melatonin at higher concentrations. The remaining specific UV/vis spectra, however, couldn't know which radicals were produced and how they made some reactions or complexes with melatonin in solution when the solution was measured.

According to the contents above, this study used FT-IR, ^{1}H-NMR spectroscopies, which site of melatonin could be broken for exact identification of reactions in the solution, and what new molecule or by-products could find out after mixing those materials. So that results defined H_2O_2 can decompose melatonin into new products; interpreted C=O, NHCHO, Acetone peaks on FT-IR, ^{1}H-NMR and phenol works to prevent their regeneration from new structure to original stricture.

1. 서 론

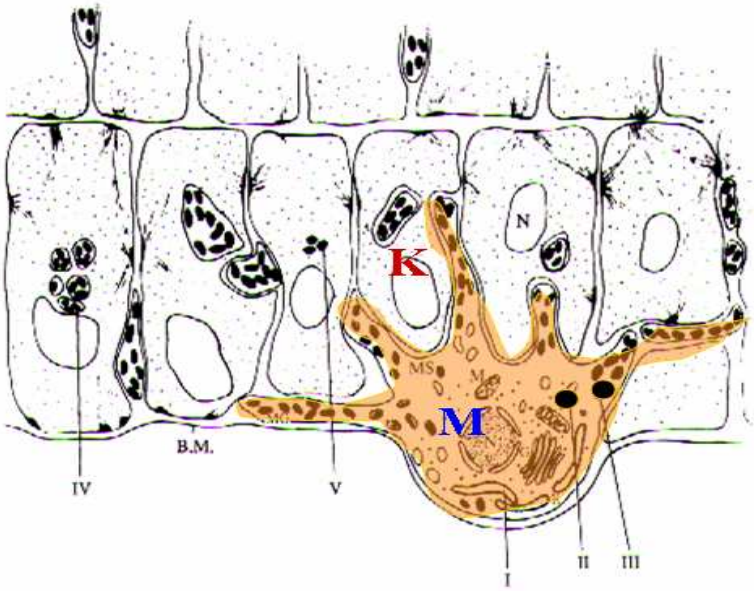
가. *Melanin*

멜라닌 (melanin) 은 식물, 동물, 그리고 원생생물에서 생합성되어지는 화합물의 일종으로서, 주로 피부, 털, 눈 등에 색소로서 존재하여 그것들의 색깔을 띠게 한다. 이러한 멜라닌 (melanin) 은 크게 두 가지로 분류되는데, brown-black의 유멜라닌 (eumelanin) 과 red-brown의 페오멜라닌 (pheomelanin) 이 있다.

멜라닌은 멜라노세포 (melaocyte) 내에 들어있는 멜라노솜 (melanosome) 이라는 작은 자루 모양의 소기관에서 만들어진다. 멜라닌 (melanin) 은 일정량 이상의 자외선 (ultraviolet light) 을 차단하는데, 멜라닌세포 (melanocyte) 가 자외선 (ultraviolet light) 에 자극을 받으면, 이로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌 (melanin) 이 만들어지며, 만들어진 멜라닌 (melanin) 은 피부의 표피층으로 이동한다. 멜라닌세포 (melanocyte) 의 크기와 만들어지는 멜라닌 (melanin) 의 양이 다르기 때문에 백인, 황인, 그리고 흑인에 따라 피부의 색깔이 결정되며 맬라닌 (melanin) 의 양이 많을수록 검은 피부색을 띤다.

멜라닌세포 (melanocyte) 는 멜라노솜 (melanosome) 이 들어 있는 돌기를 뻗어서 케라틴세포 (keratinocyte) 등 주변의 다른 세포에 멜라닌 (melanin) 을 전달하는데, 멜라닌세포 내 세포질 단위 면적당 프리멜라노솜 (premelanosome)이나 멜라노솜 (melanosome) 의 수는 멜라닌세포 (melanocyte) 의 가장 자리로 갈수록 증가하는 것으로 알 수 있다[1]. 자외선 (ultraviolet light) 에 많이 노출 된 사람일수록 이와 같은 일련의 과정이 많이 일어났기 때문에 피부가 더 검게 그을려 진다.

백인의 경우 유멜라닌 (eumelanin) 이 페오멜라닌 (pheomelanin) 보다 더 많은 반면 흑인은 페오멜라닌 (pheomelanin) 이 더 많이 존재하며, 페오멜라닌 (pheomelanin) 이 유멜라닌 (eumelanin) 보다 피부에 손상을 주는 자외선 (ultraviolet light) 에 대한 방어력이 좋다고 알려져 있다[2].



Ⅰ. *ER (endoplasmic reticulum) producing tyrosinase*

Ⅱ. *Premelanosome Stage 1*

Ⅲ. *Matured melanosome*

Ⅳ. *Convey melanosome to keratinocyte*

Ⅴ. *A pigment granule released from melanosome*

K : Keratinocyte

M : Melanocyte

B.M. : Basement membrane

Figure 1. The name of each position which consisting of both melanocyte and keratinocyte in epidermis.

Figure 1 은 멜라닌 생성에 관여하는 부분의 명칭과 자외선 (ultraviolet light) 으로부터의 피부 보호를 위한 멜라노솜 (melanosome) 의 이동을 보여준다. 멜라닌 (melanin) 은 피부에 부정적 효과도 가져온다.

예를 들면 과도한 자외선 (ultraviolet light) 노출에 의해 멜라닌 (melanin) 이 과잉 축적 및 침착되어 기미•주근깨 등을 생성하게하기도 하며, 피부 노화의 촉진 혹은 피부암을 유발할 수도 있다.

1) 멜라닌 생성 메카니즘과 기능성

멜라닌 (melanin) 은 자연 상태에서 자유라디칼 (free radicals) 를 가지는 페놀계 생물 고분자로만 알려져 있으며, 상자성체 부분은 산화•환원 조절[3], 그리고 방사선의 방어[4]에 있어서 직접적인 관련이 것으로 보고되고 있다. 앞에서 언급 한 바와 같이 멜라닌 (melanin) 은 멜라닌형성세포 (melanocyte) 의 멜라노솜 (melanosome) 에서 일련의 효소반응으로 합성되는데, 멜라닌 생성을 촉진시키는 여러 가지 원인으로는 멜라닌세포자극호르몬 (melanocyte-stimulating hormone), forskolin, cholera toxin, vitamin C metabolism, isobutylmethylxanthine, diacyglycerol analogs, ultraviolet light 등이 있으며, 사람의 경우 자외선이 멜라닌 생성을 촉진시키는 가장 중요한 요인으로 알려져 있다[5].

가) Eumelanin

유멜라닌 (eumelanin) 은 오랫동안 다수의 5,6-dihydroxylindole (DHI) 과 5,6-dihydroxylindole-2-carboxylic acid (DHICA) 분자가 서로 연결되어 구성된 것으로 알려져 있었다. 하지만 최근의 유멜라닌 (eumelanin) 의 전기에 대한 특성을 연구 한 논문을 보면 몇 가지 다른 메커니즘에 의해서 다른 분자에 들러붙어 저중합체를 구성하는 것을 밝혀냈다. 유멜라닌 (eumelanin) 은 머리카락과 피부에서 발견되어지고, 머리카락의 경우 회색, 검정, 노랑, 그리고 갈색의 색깔을 띠게 하며, 흑인 보단 백인에서 좀 더 다량의 유멜라닌 (eumelanin) 을 찾을 수 있다.

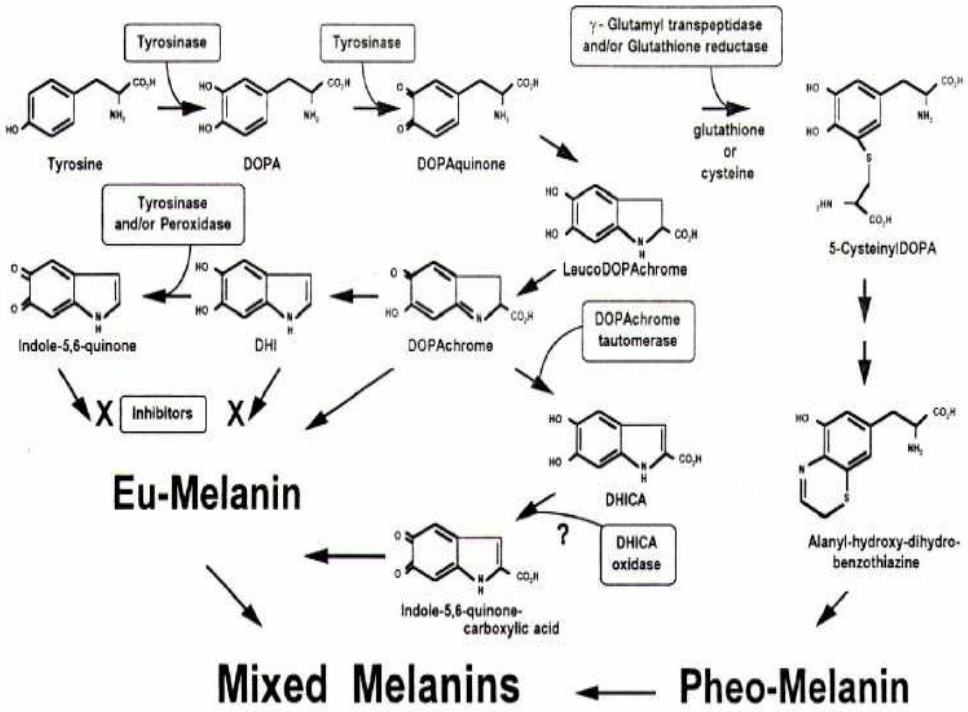


Figure 2. Biosynthetic pathways for both eumelanin and pheomelanin[6].

이러한 유멜라닌 (eumelanin) 은 그들 자체의 고분자 결합의 형태로 구별되어 두 가지 종류로 구분되어 진다. black eumelanin과 brown eumelanin이 그것인데, black eumelanin이 brown eumelanin보다 좀 더 어둡고 대부분의 non-europeans과 aged-europeans에서 있고, 적은량으로 회색의 머리카락 색깔을 결정하는 반면 brown eumelanin은 yound-europeans에 있으며, 적은량으로 갈색의 머리 색갈을 결정한다.

나) Phenomelanin

페오멜라닌 (pheomelanin) 은 거무스름한 피부를 가지는 사람과 밝은 피부를 가진 사람, 이 두 부류에서 다 발견되어 지고 일반적으로 보다 붉은 피부를 갖는 여성이 남성보다 좀 더 많은 페오멜라닌 (pheomelanin) 을 가지는 것으로 알려져 있다. 붉은 머리 색깔에 특히 많이 있으며, 입술, 유두와 같은 곳에도 집중되어져 있다. 유멜라닌 (eumelanin) 과 다른 점은 아미노산의 한 종류인 L-cysteine이 존재 할 때 DHI와 DHICA의 대신에 생성되어지는 Benzithiazine 이 두 멜라닌 (melanin) 의 저 중합체 구조가 어떻게 반응을 가지느냐에 달려 있다.

다) Neuromelanin

뉴로멜라닌 (neuromelanin) 은, 4개의 난해한 뇌신경 핵 (the substantia nigra, the locus ceruleus, the dorsal motor nucleus of the vagus nerve, and the median raphe nucleus of the pons.) 의 뉴런 (neuron) 을 함유하는 어두운 색의 멜라닌 (melanin) 종류 중 하나이다. 신경핵 (nuclei) 은 출생과 함께 색소가 침착되어 지지 않지만, 성장기의 세포 분열에 의해서 점차적으로 색소 침착이 이루어진다.

뇌에서의 뉴로멜라닌 (neuromelanin) 의 기증적 특성은 비록 알려진 바가 없지만, 색소 침착된 뉴런 (neurons) 이 지금까지 밝혀진 원인 중의 하나이기 때문에 monoamine neurotransmitters의 생성의 부산물로 여겨지고 있다. 최근 연구의 중심에 서 있는 Parkinson's disease와 Alzhermer's disease는 각각 substantia nigra와 locus ceruleus에서 색소 침착된 뉴런 (neurons) 의 생성과 더불어 dopamine, norepinephrine의 다량 혹은 완전 소실 인하여 악화되는 것으

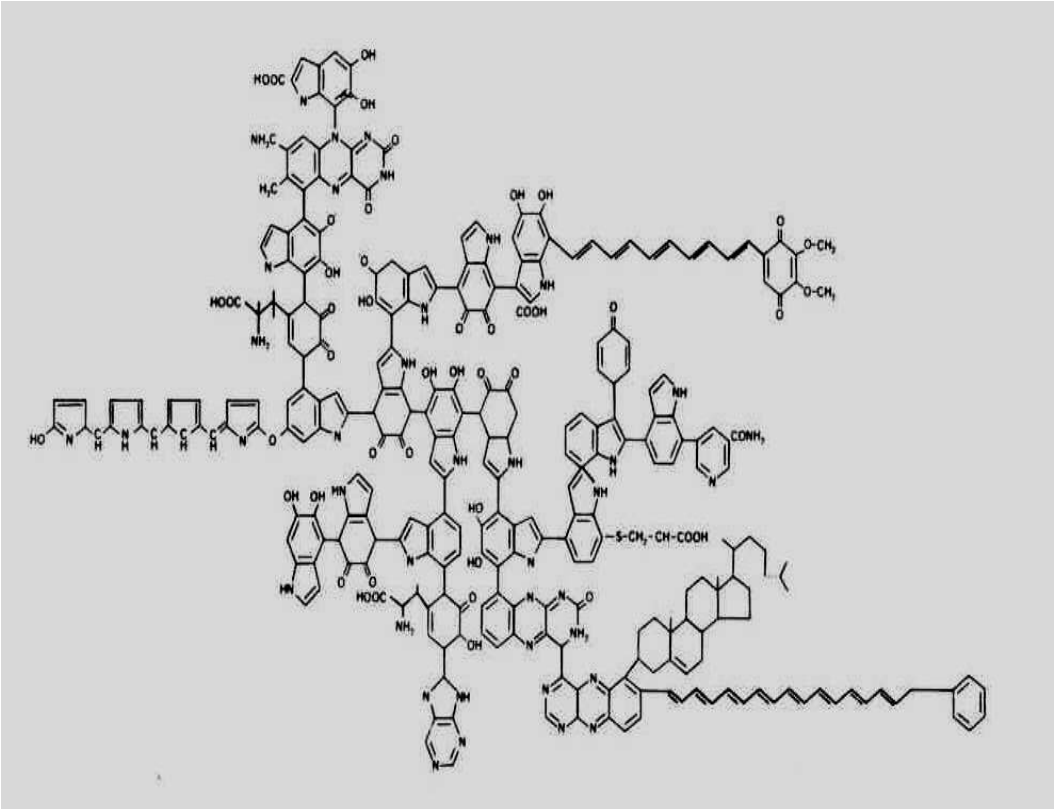


Figure 3. The chemical structure of melanin (molecular weight : 4993 g/mol).

로 알려져 있다.

2) 멜라닌색소의 억제반응

피부의 각질층은 자외선을 반사 및 확산 시켜 그 에너지를 감쇄시키지만, 멜라닌 (melanin)[7,8,9], SOD (superoxide dismutase)[10], 그리고 항산화성분 등은 피부에 닿는 자외선을 흡수하거나, 에너지를 감쇄시키고, 또한 앞의 두 과정에 의해서 생성되는 부산물에 의해 발생하는 활성산소를 제거하여 피부를 보호한다. 만약 이러한 과정에 있어서 방어 인자의 능력을 초과하는 자외선을 받거나, 노화가 진행됨에 따른 그의 회복 능력의 저하는 여러 가지 피부 장애를 동반하게 된다.

피부 미백제 (skin whitening agents)는 자외선에 의한 색소반점 현상을 예방하는 예방제로 정의할 수 있다. 다시 말하면, 멜라닌 (melanin) 생성을 조절하여 주근깨, 기미, 점과 같은 black pigments를 흐릿하게 만드는 것으로 멜라닌생성 억제, 생성된 멜라닌제거, 멜라닌의 환원 및 중간생성물의 억제 등 크게 네 가지 메커니즘으로 나뉘어 설명할 수 있으며 (Table 1) 자세한 내용은 뒤에 언급하겠다.

Table 1. Some kinds of Mechanisms and materials for blocking color pigments.

메커니즘	억제 내용	억제 재료	주요 작용
멜라닌 생성 억제	Tyrosinase의 생성 억제	Placenta extract	Tyrosinase의 합성 저해 Premelanosome 형성 저해
	Tyrosinase의 활동 억제	Arbutin	Tyrosinase의 합성 저해
		Kojic acid	Tyrosinate 불활성화에 필요한 2가의 금속이온을 킬레이트 하여 멜라닌 생성 억제
		Glycyrrhizae Radix extract	천연 재료를 통한 멜라닌 생성 억제
		Mori Cortex Radicis extract	
		Broussonetia papyrifera extract	
	활성산소를 제거에 의한 멜라닌 생성 억제	Theae folium extract	-
		Coenzyme Q10	-
		Superoxide dismutase	-
		Vitamin E	-
		Vitamin C	Tyrosinase 활동 억제 활성산소 제거
생성된 멜라닌 제거	멜라닌 파괴	Hydroquinone	
	각질 제거로 멜라닌 탈착	AHA(alpha-hydroxyl acid)	
		Placenta extract	
		Salicylic acid	
		Retinoic acid	
		Azelaic acid	
		Vitamin C	
생성된 멜라닌의 환원		Vitamin C	
		Glutathione	
		Magnesium ascorbyl phophate	
중간생성물의 억제		Inflammatory chemical mediator	bFGF, Vitamin D3에 의한 염증 등의 생성 억제

나. *Melatonin*

멜라토닌 (melatonin) 은 송과선 (pineal gland) 이라는 내분비선에서 생성되는 호르몬의 한 종류이다. 이곳은 두 대뇌반구의 가운데에 위치하며 데카르트는 '영혼이 머무는 자리'로 표현 했던 곳으로, 모노아민 (monoamine; 1개의 아미노기를 가지는 아민 화합물) 세로토닌 (serotonin; 포유 동물 혈액·뇌 속에 있는 혈관 수축 물질) 로부터 생성 되어 진다.

가장 잘 알려진 멜라토닌 (melatonin) 의 기능이 수면 호르몬이라는 것이다. 두부의 피부를 통과하는 빛을 받아 들 일 수 있다. 그래서 계절에 따른 밤과 낮의 일조 시간의 변화를 감지할 수 있고 이에 따른 생식활동의 일주성이나 연주성 등 생체리듬에 관여할 수 있는데 이 때 작용하는 호르몬이 멜라토닌 (melatnoin) 이다[11].

멜라토닌 (melatonin) 은 모노아민 세로토닌 (monoamine serotonin)으로부터 생성 되지만, 다른 조직에서도 합성이 되어 진다. 예를 들면 다양한 생리적·행동적인 면의 조절, 항산화 특성을 나타내거나, 강력한 내생의 프리라디칼 (free-radical) 의 청소부 역할로서 멜라토닌의 합성은 유도 되어 지는 것이다.

이렇게 만들어진 멜라토닌 (melatonin) 은 실제 불면증치료와 시차 극복에 있어서 탁월한 효과를 발휘하는 것으로 밝혀져 있으며[12], 노화방지와 면역기능 강화효과까지 갖고 있다고 보도되어진 바 있다[13].

그 밖의 다른 효과들로 생체주기리듬 (circadian rhythms) 조절, 세포파괴 방지(preventing ischemic damage)[14], Alzheimer's disease[15], 주의력 결핍 과잉 행동 장애 (ADHD, attention deficit hyperactivity disorder)[16], 수정 능력 (fertility)[17], 두통 약화 (headaches)[18,19], 정신 착란 (mental disorders)[20], 멜라토닌 (melatonin) 은 생체 내에서 위와 같은 경우에 관여를 하며, 여러 형태의 암을 치료와, 인체 면역 결핍 바이러스 (HIV, human immunodeficiency virus)의 치료에도 관여 할 것이라고 보고되었지만, 이를 확인하기 위한 연구가 진행되어 지고 있다[21].

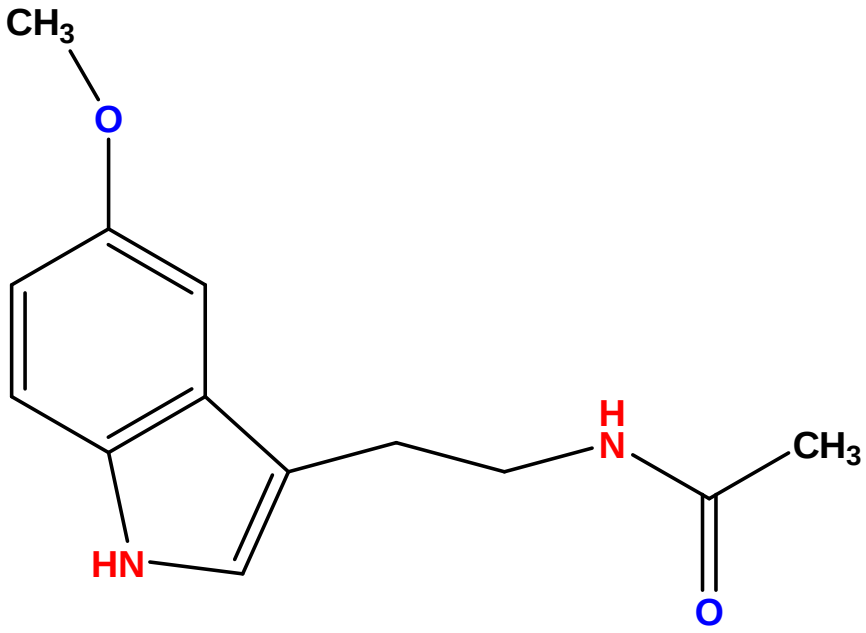


Figure 4. The structure of melatonin.

양서류의 경우 멜라토닌 (melatonin) 을 이용하여 피부 색깔을 유지하는 것으로 알려져 있다[22]. 하지만 사람의 경우 트립토판 대사산물 (tryptophan metabolite) 은 사람의 피부 색깔에는 아무 영향을 못 미치는 것으로 알려져 왔으며, 19개월 동안 환자에게 멜로토닌 (melatonin) 을 경구투여 (oral administration) 하였지만 멜라토닌 (melatonin) 을 투여하지 않았던 사람들과 비교하였을 때, 그렇게 특별한 변화를 알 수 없었다고 한다[23].

그러나 최근 연구에 의하면 멜라토닌 (melatonin) 이 과산화효소 (peroxidase) 와 H_2O_2의 혼합물에 함께 반응하였을 때, 멜라닌합성 (melanogenesis) 의 전구체 (precursor) 로서의 역할을 수행하는 것으로 밝혀지게 되었다[24]. 더욱이 반응환경에 자외선 (ultraviolet light) 이 조사되면 melatonin skeleton에 O_2가 첨가되고 이에 따라 새로운 경로와 채널을 가진 저 중합체의 생성을 이끈다고 보고되었다. 또한 망막에서의 멜라토닌은 망막의 색소 상피에서 작은 낟알의 멜라닌 색소의 집합으로 어둠 이라는 것을 인지하고[25], 간상체의 광수용체에서 판의 발산을 활성 시키고[26], 망막의 dopamine의 분출을 억제시킨다고 한다[27,28].

멜라토닌 (melatonin) 이 멜라닌 (melanin)과 직접적인 연관은 없어 보이지만, 트립토판 (tryptophan) 에서의 시작하는 메커니즘에서 둘 사이에 어느 정도의 연관성이 있음이 밝혀졌으며, 최근 다양한 분야에서의 연구를 살펴볼 때, 멜라토닌(melatonin)은 앞으로의 연구 분야가 폭 넓어 짊으로서 멜라닌 (melanin) 의 역할과 멜라토닌 (melatonin) 의 역할이 겹치는 부분에선 둘 사이의 상호 연관성이 중요한 열쇠가 될 것이라고 생각 한다.

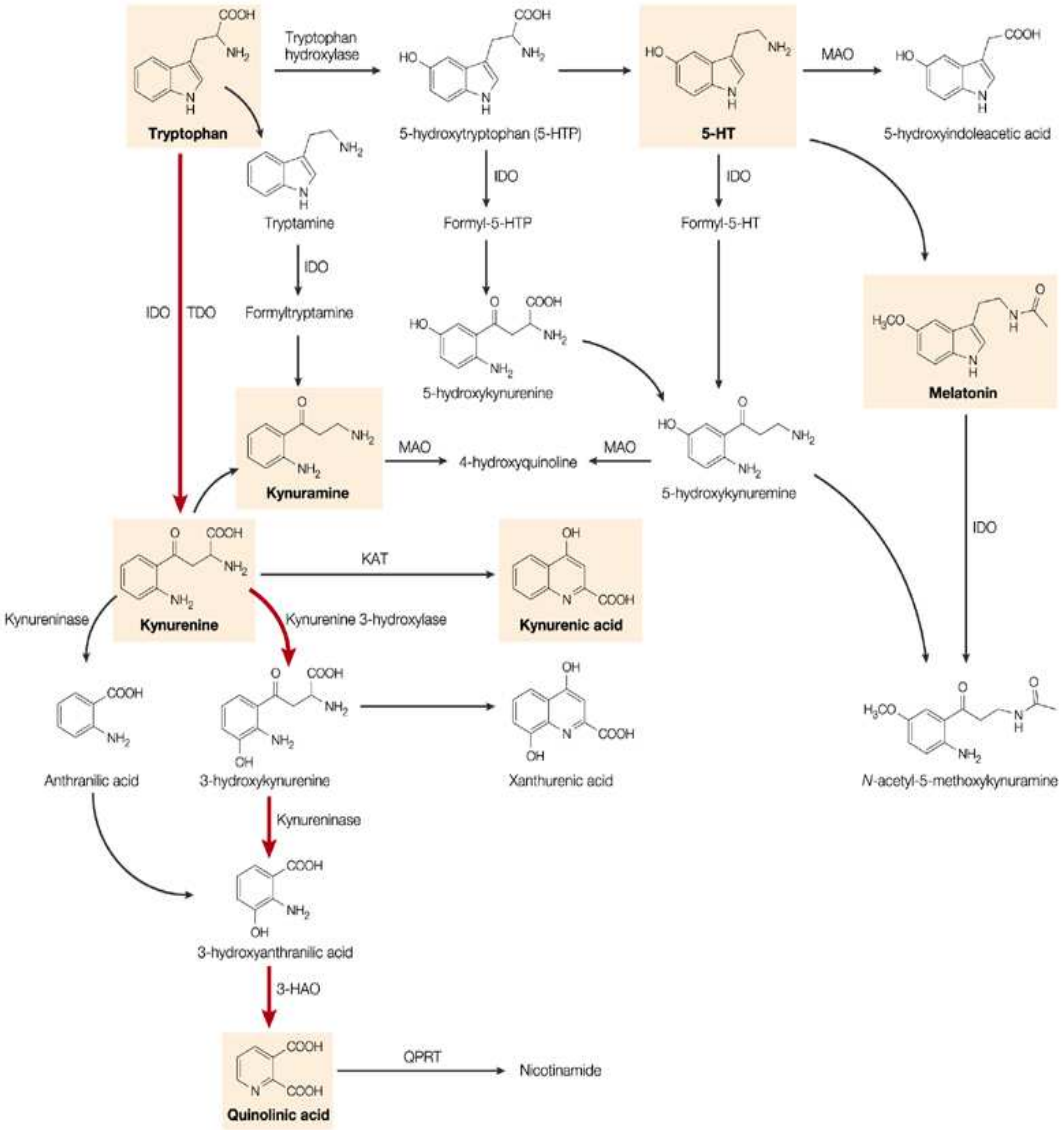


Figure 5. Melatonin pathways starting from tryptophan[29].

1) Phenol and Hydrogen Peroxide

가) Phenol and Hydrogen Peroxide

(1) Phenol

전 세계적으로 페놀에 의한 각종 오염과 피해로 인하여 인식적으로 위험한 화학 물질이다. 여러 사례들을 통하여 페놀의 사용은 엄격히 규제되어 지고 있으며, 사용에 있어서도 극히 저 농도로만 사용만이 허락되어 진다. 페놀이 산화되면 자신은 최대한 안정화 되려는 공명 구조를 이루게 되는 데, 이 때 페놀을 촉매로서 강산; (황산, 과염소산, p-톨루엔술폰산) 및 과산화수소의 존재 하에 처리하여 하이드록시화 (hydroxylation) 하거나, 페놀을 케톤의 존재 하에 황산, 술폰산을 촉매로써 사용하고, 과산화수소를 산화시켜 2가 페놀을 제조 하는 방법(일본 심판 소 56-21288) 등으로 이용하거나 처리를 한다.

이러한 페놀의 화학적 성질 및 메커니즘은 폐수 처리에 많이 이용되어 지며, 최근에는 페놀이 열수 순환으로 가정된 실험실 조건에서 탄산수소나트륨 (sodium hydrogen carbonate; $NaHCO_3$) 과 철가루 (1.8% chemical yield) 로부터 형성되어지는 것이 발견 되다[30]. 이 실험의 결과는 페놀이 생체 분자인 티로신 (tyrosine) 에서 떨어져 나온 것으로 보여 연구의 쟁점이 되고 있다.

예를 들어 치은을 제거 할 때 90% 페놀 용액을 사용 하였고[31], Hirschfeld는 페놀 용액을 착색되어진 부위에 상피박리를 시행하여 약 13% 만이 재 침착이 되었다고 하였다[32]. 페놀을 이용하여 깊은 부위까지 껍질을 벗기는 것은 화학적 필링 (peeling) 방법 중에 가장 효과적인 방법의 하나이다[33]. 하지만 이 과정 중에 부산물 (by-products) 의 생성과 그 생성물의 다른 부차적인 생체 내에서의 반응, 혹은 UV radiation에 의한 필링 (peeling) 이후 붉은 홍점의 생성 등은 문제점으로 남아 있다.

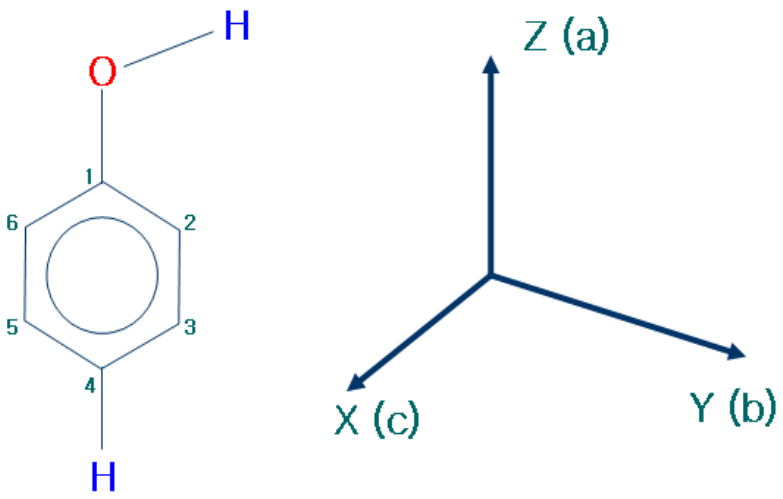


Figure 6. Definition of structural parameters and axis convention for phenol.

(2) Hydrogen peroxide

과산화수소 (H_2O_2) 는 과망간산칼륨, 염소, 과산화염소 보다 훨씬 더 강력한 산화제로 알려져 있다. 또한 과산화수소는 촉매의 존재 하, 혹은 자외선 (ultraviolet light) 에 노출되면 수산화 라디칼 (hydroxy radical, ·OH) 로 쉽게 전환 될 수 있다[8,34,35]. 그리고 이 때 생성되어지는 라디칼은 생체 내에서 자발적으로 산소 또는 물로 옮겨 갈 수 있다. 다시 말하면 부산물이 산소를 제거하는 환원제로 작용하며 과산화수소는 많은 반응에서 산화제 중의 하나로 거동한다.

과산화수소의 회전 형태는 anti-conformer; 분자의 공간적 배치에 관한 반박을 최소화 하려는 형태, 와 syn-conformer; 산소가 가지는 비 공유 전자쌍에 O-H 결합을 시키려는 형태, 의 형태를 가지려는 물리적 성질을 가지고 있다.

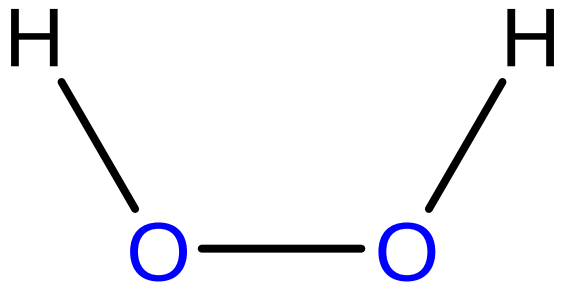


Figure 7. The structure of hydrogen peroxide.

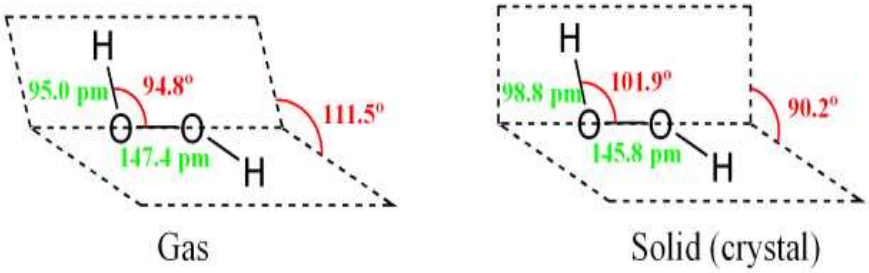


Figure 8. The physical property of hydrogen peroxide.

나) Phenol + H_2O_2와 Ultraviolet light

과산화수소는 페놀을 분해시키지만 상용성이 적어 이들의 상관관계를 파악하는 것은 쉽지 않다. 그렇지만 과산화수소와 페놀은 잘 섞이지도 않을뿐더러 페놀 자체의 산화력도 있기 때문에 둘 사이의 관계는 서로가 서로에게 영향을 주는 것인지 아니면 각각의 자시 자신이 스스로 분해되어 서로 섞여 있는 것처럼 보여 지는 것 인지 확실치 않다. 그러나 이들 페놀과 과산화수소 사이의 분자간 상호 작용을 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 각 조성에 대한 흡수파장 (λmax) 을 측정하여 정리하면 정성 정량적 관계를 파악할 수 있다.

Table 2. Reaction mechanism along their kinetic rates constants (k) for the aqueous phenol degradation by UV/H_2O_2[35].

Reaction Number	Reaction	k
R1	$H_2O_2 \xrightarrow{h\nu, k_1} 2{}^{\bullet}OH$	
R2	${}^{\bullet}OH + H_2O_2 \xrightarrow{k_2} HO_2^{\bullet} + H_2O$	$k_2 = 2.7 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
R3	${}^{\bullet}OH + HO_2^- \xrightarrow{k_3} HO_2^{\bullet} + OH^-$	$k_3 = 7.5 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$
R4	$H_2O_2 + HO_2^{\bullet} \xrightarrow{k_4} {}^{\bullet}OH + H_2O + O_2$	$k_4 = 3.0\ M^{-1}\ s^{-1}$
R5	$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{k_5} {}^{\bullet}OH + O_2 + OH^-$	$k_5 = 0.13\ M^{-1}\ s^{-1}$
R6	$O_2^{\bullet -} + H^+ \xrightarrow{k_6} HO_2^{\bullet}$	$k_6 = 1.0 \times 10^{10}\ M^{-1}\ s^{-1}$
R7	$HO_2^{\bullet} \xrightarrow{k_7} O_2^{\bullet -} + H^+$	$k_7 = 1.58 \times 10^5\ s^{-1}$
R8	${}^{\bullet}OH + {}^{\bullet}OH \xrightarrow{k_8} H_2O_2$	$k_8 = 5.5 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$
R9	${}^{\bullet}OH + HO_2^{\bullet} \xrightarrow{k_9} O_2 + H_2O$	$k_9 = 6.6 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$
R10	$HO_2^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \xrightarrow{k_{10}} H_2O_2 + O_2$	$k_{10} = 8.3 \times 10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$
R11	$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{k_{11}} HO_2^- + O_2$	$k_{11} = 9.7 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
R12	${}^{\bullet}OH + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{k_{12}} O_2 + OH^-$	$k_{12} = 7.0 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$
R13	${}^{\bullet}OH + C_6H_5OH \xrightarrow{k_{13}}$ intermediates $\rightarrow CO_2 + H_2O$	$k_{13} = 6.6 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$
R14	$C_6H_5OH \xrightarrow{h\nu, k_{14}}$ intermediates $\rightarrow CO_2 + H_2O$	
R15	$H_2O_2 \xleftrightarrow{k_a} H^+ + HO_2^-$	$pK_a = 11.6$

Table 2 에서 볼 수 있듯이 과산화수소는 UV radiation의 에너지를 받아 다양한 라디칼 (radicals), HO_2^-, ·OH, HO_2·, O_2^-·,를 형성하며 페놀 (C_6H_5OH) 은 자체 산화 혹은 H_2O_2/UV의 영향을 받아, 1,2-dihydroxybenzene, 1,3-dihydroxybenzene, 그리고 1,4-dihydroxybenzene과 ·OH를 형성한다 (Table 2).

$$[C_{tot}] = [H_2O_2] + [HO_2^-] \qquad (1)$$

$$\begin{aligned} & \xrightarrow{k_1} 1,2-dohidroxybenzene \xrightarrow{\bullet\ OH, k_{11}} organic\ acids \rightarrow CO_2 + H_2O \\ Phenol + \bullet\ OH & \xrightarrow{k_2} 1,3-dohidroxybenzene \xrightarrow{\bullet\ OH, k_{22}} organic\ acids \rightarrow CO_2 + H_2O \qquad (2) \\ & \xrightarrow{k_3} 1,4-dohidroxybenzene \xrightarrow{\bullet\ OH, k_{33}} organic\ acids \rightarrow CO_2 + H_2O \end{aligned}$$

이와 더불어 hydroxyl radical (·OH) 의 농도는 많은 자유라디칼(free-radical) 이 생성됨에도 불구하고 Equ. (2) 의 반응에 따라 감소한다.

$$\bullet\ OH + H_2O_2 \rightarrow \bullet\ OOH + H_2O \qquad (3)$$

멜라닌 (melanin) 에 의한 철과 구리의 결합은 과산화수소로부터 생성되는 hydroxyl radicals (·OH) 의 생성을 촉진시켜 금속이온의 활성을 저해 한다[7]. 그리고 멜라닌 색소 침착의 미백에 화학적으로 가장 유용한 지식 중의 하나는 과

산화수소로 만들어 진 알칼리성 용액이 쓰여 진다[36].

$$Mel-Cu(\mathrm{I})+H_2O_2 \xrightarrow{k_1} Mel-Cu(\mathrm{II})+OH+OH^-; \quad (4)$$

$$Mel-Cu(\mathrm{I})+O_2 \xrightarrow{k_2} Mel-Cu(\mathrm{II})+O_2^-. \quad (5)$$

멜라닌 (melanin) 에 의한 superoxide (O_2^-)의 제거는 멜라닌 색소에 의한 광보호에 있어서 중요한 요소이다[37,38]. 그리고 유멜라닌 (eumelanin) 이 광분해하는 동안 자외선을 받아 hydrated electron, hydrogen peroxide[39], 그리고 superoxide[39]가 생성되어진다.

다. 연구의 목적

페놀 (C_6H_5OH, hydroxybenzene) 과 과산화수소 (H_2O_2, hydrogen peroxide) 는 UV radiation의 영향에 따라 산화 되고, 이 때 생성되는 자유라디칼 (free-radical) 은 페놀의 중간 생성물인, 1,2-dihydroxybenzene (catechol), 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol), 그리고 1,4-dihydroxybenzene (hydroquinone) 과 라디칼 반응을 한다[35].

생체 내에서 페놀은 티로신 (tyrosine) 에서 떨어져 나온 조각일 것이라는 것과 과산화수소는 멜라닌 (melanin) 의 생성으로 발생되며, 또한 강력한 산화제라는 것, 그리고 멜라닌 (melanin) 생성 과정에 관여하는 구리이온 (Cu^{2+}) 은 hydroxy radical (·OH) 과 반응한다. 자외선 (ultraviolet light) 에 과다 노출 혹은 노화로 인한 색소 침착이 된 극소 부위의 멜라닌발색단 (melanin chromophore) 을 분해하기위하여 페놀이나 과산화수소를 사용하는 것이 가능하다.

본 연구에서는 멜라닌 (melanin) 구조의 많은 부분을 이루는 -NH와 Indole의 구조를 깨는 것과 페놀용액과의 상호작용을 알아보기 위해 멜라닌 합성 전구체로 알려진 저분자량의 멜라토닌 (melatonin) 을 사용하였으며 확인을 위하여 자연상태의 멜라토닌 (melatonin) 을 그대로 사용하여 이들의 상관관계를 고찰코자 한다. 이러한 연구의 결과로부터 멜라닌색소 침착 된 점, 죽은 깨, 그리고 노화로 인한 검버섯 등의 멜라닌 (melanin) 을 제거할 수 있는 방안을 찾을 수 있을 것으로 기대한다.

페놀 용액 (phenolic solution) 과 멜라토닌 (melatonin) 의 관계를 UV/vis spectrophotometer, FT-IR 그리고 ^{1}H-NMR을 통하여 각 물질 상호간의 물리·화학적 반응을 분석하였고, 멜라토닌이 무엇에 어떠한 영향을 받아 분자구조가 깨지며, 그러한 일련의 과정을 겪는 동안 페놀의 영향은 무엇인가를 확인 하고자 한다.

2. 실　　험

가. 시약과 실험기기

1) 시 약

시약은 일반적으로 연구용 GR급을 그대로 사용하였다.

Phenol (C_6H_5OH, 95%)
Hydrogen Peroxide (H_2O_2, 34.5%)
Ethyl alcohol (C_2H_5OH, 95%)
Melatonin ($C_{13}H_{16}N_2O_2$, 5-methoxu-N-acetyltryptamine, 232.3 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma)

멜라토닌 (melatonin) 은 햇빛과 온도에 민감하여 -20℃에서 냉장 보관 하였다.

2) 실험기기

PDA UV/vis Spectrophotometer	Scinco, S-3100
FR-IR	NICOLET 6700
^{1}H-NMR	JEOL, YH300
Lyophilizer	RIKAKIKAI

나. 방 법

페놀 수용액 (0.01 mM ~ 100 mM, w/v%)과 과산화수소 (0.01 M ~ 1.0 M, w/v%)는 3차 증류수를 이용하여 페놀은 0.01 mM, 과산화수소는 1.0 M를 제조한 다음 희석시켜가면서 실험하였다. 에탄올 (1 M, 0.1 M) 은 페놀과 과산화수소가 고농도 (원액에 가까운) 에서 잘 혼합되어 지도록 하기 위하여 사용하였다.

멜라토닌 (melatonin) 은 최초 1.0 mM을 만들고 다른 시약들과 마찬가지로 3차 증류수로 희석하면서 농도를 맞춰 나갔다.

상호작용확인

UV/vis spectrophotometer로부터 얻은 실험 데이터를 정량적 분석하기 위하여 0.1~0.9의 absorbance를 갖도록 실험하였고, 자연광 (가시광선, 자외선) 에 의한 실험적 결과 오차를 줄이기 위하여 최대한 외부 빛을 차단했다.

각 시약들은 실험 전에 대표 농도를 선정하여 예비 실험을 하였고, 실험 기기의 calibration과 시약들의 사용 가능 여부를 확인 한 후 실험 및 데이터 분석에 적용하였다.

phenol과 hydrogen peroxide의 혼합물, phenol과 melatonin의 혼합물, 그리고 phenol과 hydrogen peroxide와 melatonin의 혼합물들은 각각의 농도와 조성에 따라 혼합하고, 그 중에서 UV/vis를 측정하기 위하여 1.0 ml만 취하였다.

실험 후 얻은 데이터는 Origin program에서 Gaussian multi-fitting 방법으로 분석하였고, 낮은 농도에서의 얻은 정량분석을 10 ~ 1000배 높은 농도에서 똑같은 방법으로 실험하였다.

생성물의 확인

UV/vis spectrpphotometer에서 확인 된 결과를 토대로, 각각의 시료의 농도에

따른 혼합물 중에서 적당한 샘플; Hydrogen Peroxide + Melatonin과 Phenol + Hydrogen Peroxide + Melatonin, 선택 후 동결건조를 시켰고, 멜라토닌(melatonin)의 각 시료들에 대한 영향을 FR-IR과 ^{1}H-NMR (solvent : $CDCl_3$)을 통해서 알아보았다.

3. 결 과

가. 순물질의 분광학적 거동

실험에 사용 되었던 페놀 수용액 (0.01 mM ~ 1.0 mM) 은 λmax (최대흡수파장) 의 움직임이 없었고, 농도에 의한 intensity의 증가만을 알 수 있었으며 Beer's Law의 법칙에도 성립하였다.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots Beer's\,law \ (6)$$

(A : absorbance, no units, ε : molar absorbtivity, $L \cdot mol^{-1}cm^{-1}$, b : path length of the cuvette, cm, c : concentration of the mixtures or materials, $mol \cdot L^{-1}$)

낮은 농도에서는 오차율도 적었고, 좀 더 확실한 직선을 보임에 따라 순수한 시약의 (페놀, 멜라토닌) 클러스터 영향 (cluster effects) 을 배제할 수는 있다는 것을 확인 했었고, 그리고 다른 시약들과의 혼합에서 데이터 분석하는데 참조하여야 했다 (Figure 9).

외부광에 노출된 페놀 수용액은 급격히 산화되어 점점 황색으로 변화하였고, 이의 UV/vis spectra는 Figure 9에서 보여준 차광상태의 UV/vis spectra와는

상이한 결과를 보였다.

멜라토닌 (melatonin) 은 0.5 mM 이상의 농도에서는 클러스터 영향 (cluster effects) 이 보여 졌으며, 농도에 따른 흡광도의 값은 페놀보다 좀 더 높은 기울기를 보였다. 하지만 멜라토닌 (melatonin) 에서 주의를 끌었던 것이 λmax의 blue shift이었다. 이는 클러스터 영향(cluster effects)일 수도 있지만, 햇빛 혹은 온도에 민감한 멜라토닌(melatonin)의 물리·화학적 특징으로 간주 된다 (Figure 10).

과산화수소는 분자 구조의 특성; 단일 결합, 물 (H_2O) 과 비슷한 구조, 상 UV/vis Spectrophotometer로는 농도 의존성 UV/vis Spectrum을 얻을 수 없었다. 만약 높은 농도의 과산화수소를 사용 할 경우 혼합물의 spectrum이 과산화수소의 spectrum에 오버랩 되어서 UV/vis 분석이 어려우므로 혼합물의 UV/vis spectrum에는 영향을 주지 않는 흡광도를 가지는 농도를 사용하였다 (Figure 11).

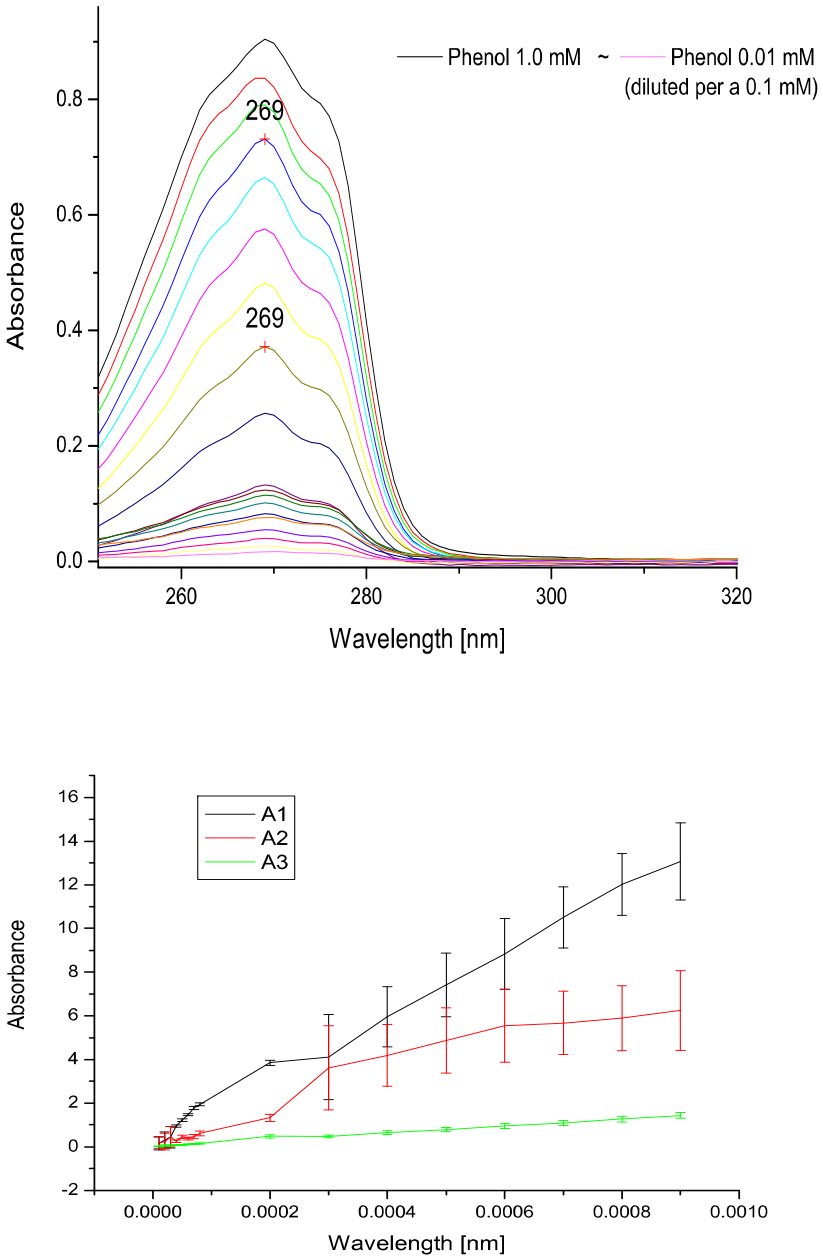
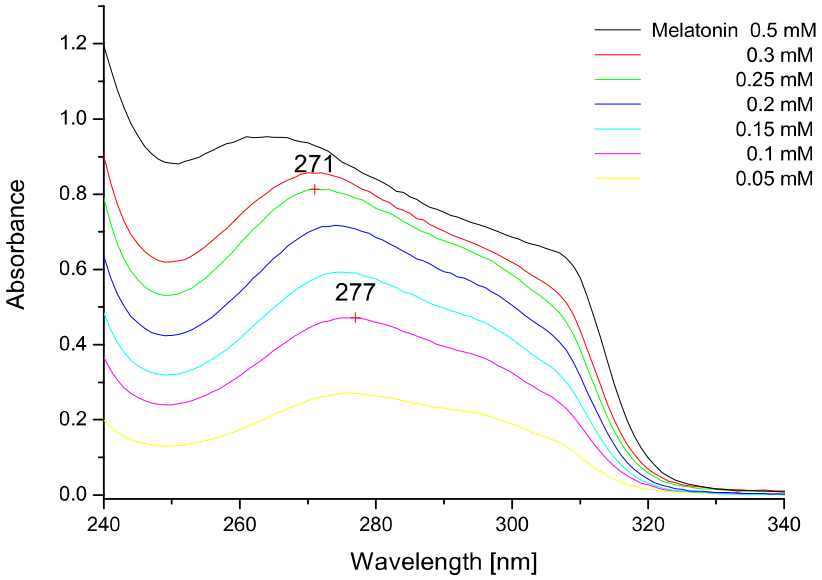


Figure 9. The UV/vis spectra of phenol aqueous solutions dependent on various concentrations, down : apply to Beer's Law, A : absorbance.



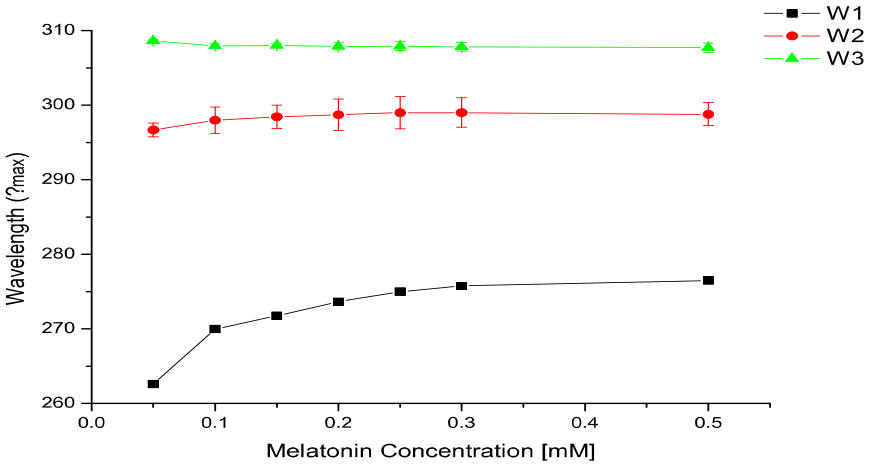


Figure 10. The UV/vis spectra of melatonin dependent on various concentrations, down ; the shift of wavelength (λ_{max}) for UV/vis spectra, (W1, W2, and W3 : wavelength (λ_{max}) at the range of three points of UV/vis spectra after gaussian multi-fitting).

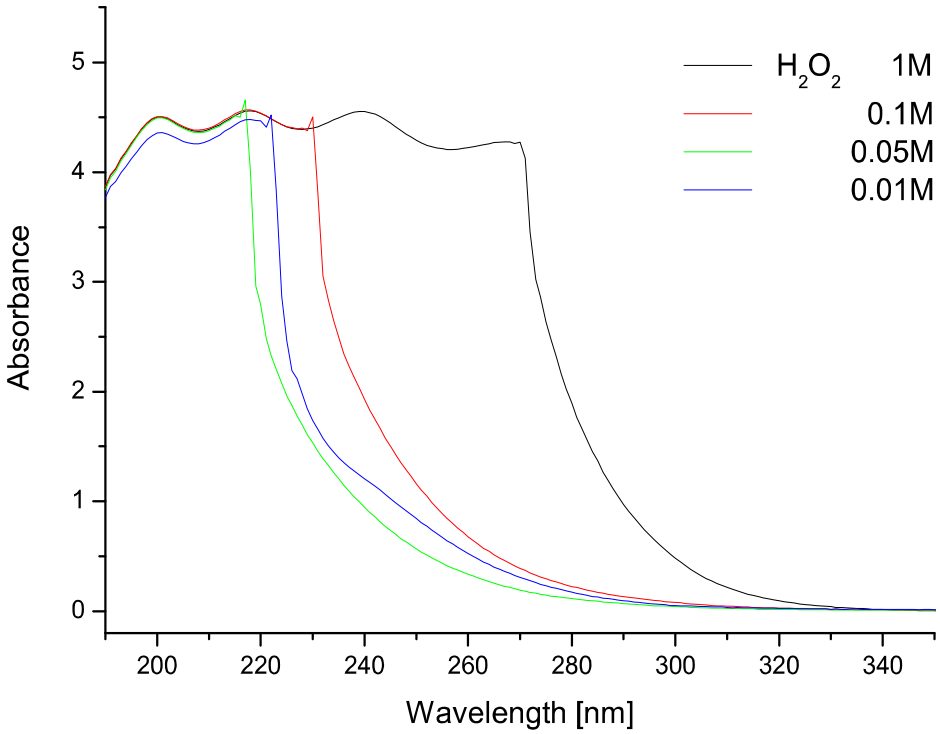


Figure 11. The UV/vis spectra of various hydrogen peroxide dependent on various concentrations.

나. 페놀용액에서의 분광학적 거동

1) UV/vis spectrophotometer에서의 mixtures 분석

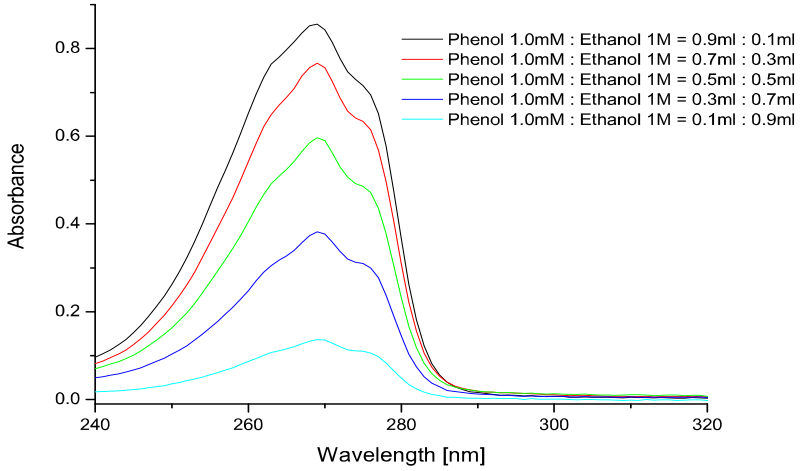


Figure 12. The UV/vis spectra of the mixtures, phenol;Et-OH.

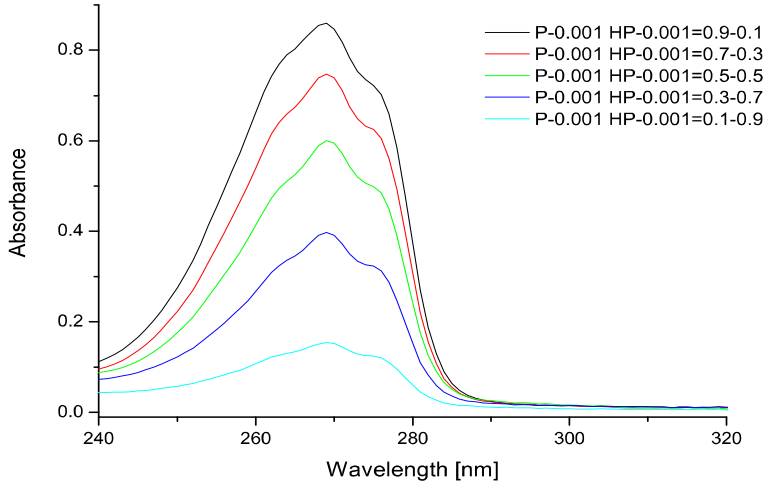


Figure 13. The UV/vis spectra of mixtures, phenol;hydrogen peroxide on each various concentrations.

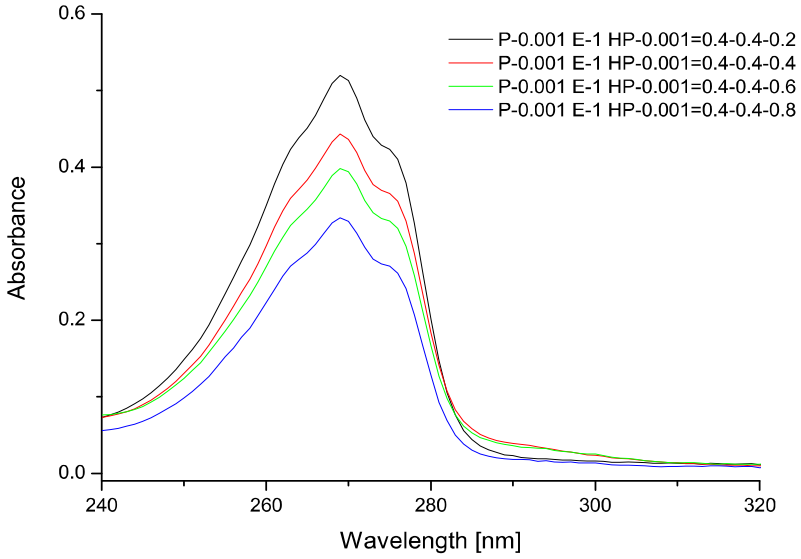


Figure 14. The UV/vis spectra of the mixtures, phenol;hydrogen peroxide;Et-OH as each volume ratios at aqueous states.

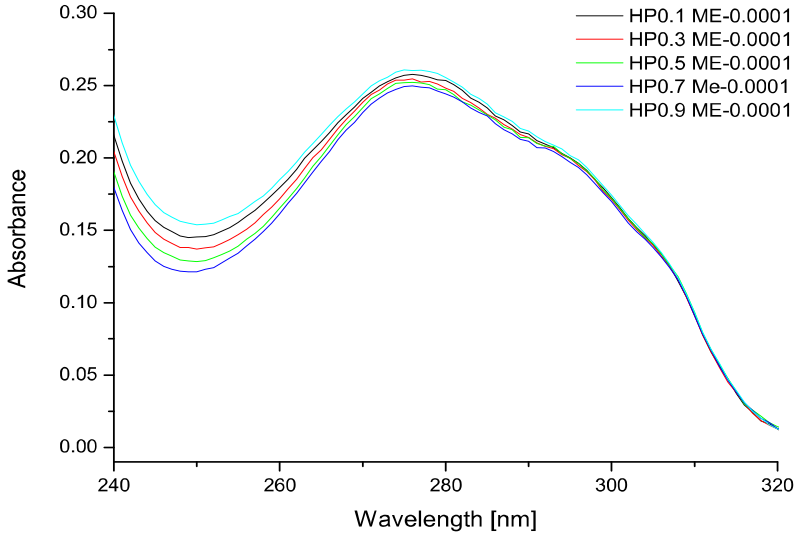


Figure 15. The UV/vis spectra of the mixtures, melatonin;various concentrations of hydrogen peroxide, 0.1 M ~ 0.9 M.

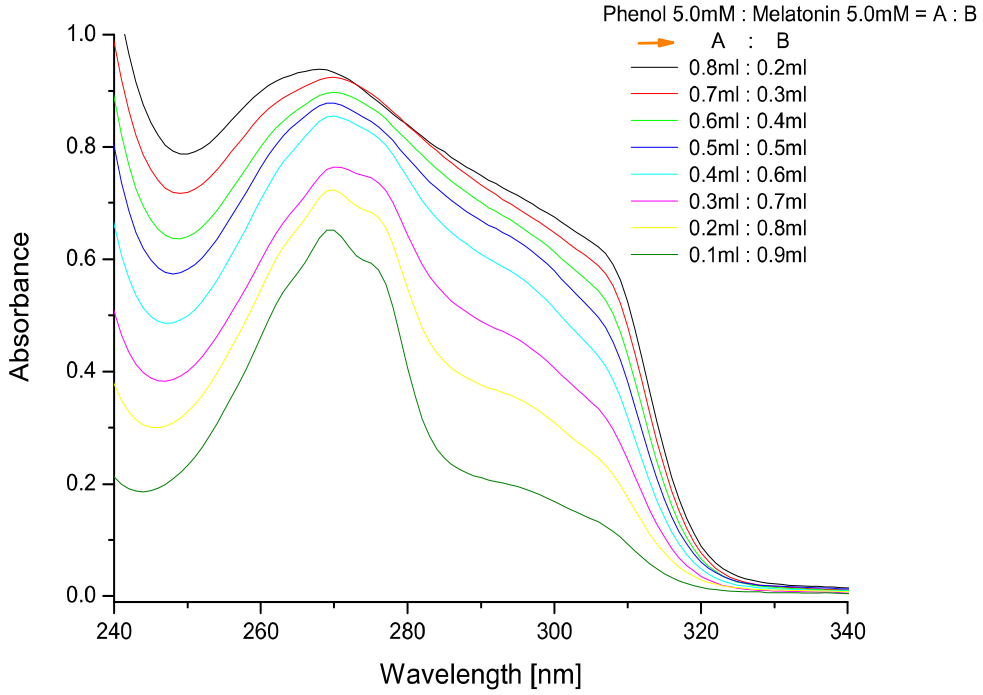


Figure 16. The UV/vis spectra of the mixtures, phenol;melatonin states on each various concentrations in aqueous.

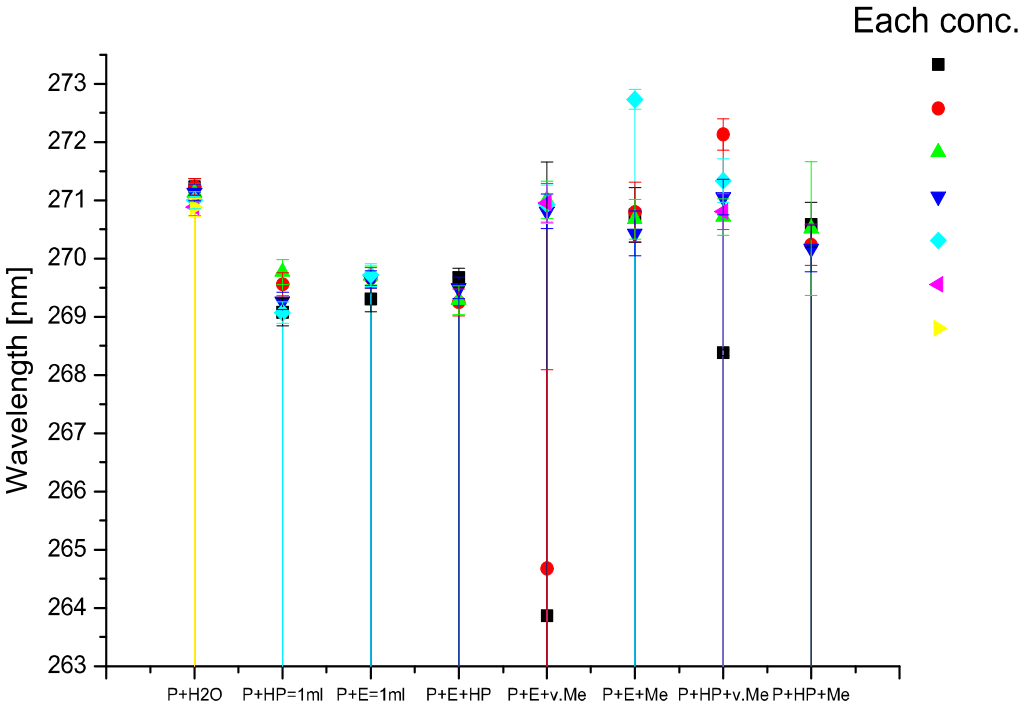


Figure 17. The shift of wavelength (λ_{max}) that obtained by Gaussian-Multi Fitting for all of the mixture states at lower concentrations, P : phenol, HP : hydrogen peroxide, E : ethanol, v.ME : various melatonin cons.

페놀 혼합용액에서의 분과학적거동을 성분의 수, 농도의 변화에 대하여 고찰하였다. Figure 12. ~ 16.은 실험 재료에 대한 이성분과 삼성분 혼합물 (P + Et-OH, P + HP, P + Et-OH + HP, and HP + ME, P + ME, P : phenol, Et-OH : ethanol, HP : hydrogen peroxide, and ME : melatonin.) 의 상호 작용을 확인하기위한 UV/vis spectra이고, Figure 17.은 위 각각의 혼합물의 λmax를 농도별, 혼합물의 조성별로 나타내어 상호 작용에 의한 변화를 보고자 하였다. 다시 말하면, 각 시약들의 혼합 상태에 따른 λmax의 흐름; blue or red shift, 과 absorbance를 측정하여 용매 간 상호 작용과 용매와 용질의 상호작용을 알아보고자 하였다.

그 결과, 멜라토닌 (melatonin)이 들어있지 않은 다른 이성분 혼합물들 중에서 phenol + ethanol (Figure 12), phenol + hydrogen peroxide (Figure 13) 에서는 2~3 nm 정도의 blue shift를 볼 수 있었고, 삼성분 혼합물 (Figure 14) 에서는 이성분 혼합물의 UV/vis spectra와는 또 다른 absorbance와 λmax에서 차이점을 발견할 수 있었다. 하지만 용액 상태에서는 라디칼 영향 (radical effects) 과 하이드록실 그룹 (hydroxy groups, ·OH) 이 많기 때문에, 그들 사이의 상호 작용이 구체적으로 어떤 것인지는 확실치 않다.

한편 각각의 혼합 용액에 멜라토닌 (melatonin) 을 혼합하였을 때는 용매와 용질간의 상호 작용에 의해 λmax은 다양한 변화를 보여 주었다. (Figure 15 and Figure 16). 하지만 최대흡수파장에서의 흡광도에 따라 각 조성의 농도별로 Charge-transfer complex의 검증을 위한 Benesi-Hildebrand equation (식 3-2)[40] 을 적용하였지만 ε_λ (molar absorptivity)의 값이 (-) 를 보여주어 이 혼합물 계는 전하이동에 의한 착물의 형성이 아닐 수 있음을 보여준다.

$$\frac{[A]_0}{A} = \frac{1}{K_c^{AD}\epsilon_\lambda^{AD}} \cdot \frac{1}{[D]_0} + \frac{1}{\epsilon_\lambda^{AD}} \qquad Benesi-Hildebrand\ equation\ (7)$$

($[A]_0$: initial concentration of acceptor, K_c : equilibrium constant, ε_λ : molar absorptivity, $[D]_0$: initial concentration of dornor)

이에 따라, ultraviolet radiation을 에너지의 관점에서 생각하고 물리·화학적 방법으로 접근하는 방법을 사용했다. 다시 말하면, 일반적으로 UV/vis spectra가 blue shift 쪽으로의 흐름은 분자들 상호 간 혹은 구조가 더욱 강해 진 것이기 때문에 용액 상태의 각 재료들이 서로의 반응에 의해 점점 안정적인 구조로 변해가고 있다는 것을 의미한다고 볼 수 있었다. 이에 따라 λmax의 흐름이 좀 더 높은 흡광도를 보여 지는 곳에서는 흐름의 정도가 더 클 것이라는 예상으로 10 ~ 1000배 높은 농도에서 실험을 하였다. 또한 UV/vis spectra에 대한 수학적 가감을 사용하여 위의 결과를 간접적으로 확인하려 했다.

고농도에서 0.1 mM의 페놀과 1.0 mM의 멜라토닌 (melatonin) 을 혼합하여 UV/vis spectra를 실험적으로 얻으면 Figure 18 와 Figure 19 에서 볼 수 있듯이 빨간색의 스펙트럼을 얻을 수 있다. UV/vis spectrophotometer는 용액 안에 들어있는 시약이 UV radiation을 받을 때 바닥상태에서 들뜬상태로 갈 때의 에너지 값을 측정하는 기기이기 때문에, 이론적으론 흡광도의 값이 '0'에 가깝거나, Y축의 (-) 영역으로 떨어지는 것이 맞다. 하지만 결과는 Figure 19의 spectrum에서 보듯이 (+) 영역에서의 잔류 데이터 값이 있었고, 그 값들은 혼합물을 이루는 재료들의 농도, 상호관계에 따라서 UV/vis spectra의 일정한 intensity 및 blue or red shift를 보였다 (Figure 20 ~ 23).

이론적으로 생각하면 들어가는 각각의 농도에 대해서 그려지는 UV/vis spectrum은 검정색과 초록색 실선이 그려지는 것이 여야 하고, 이들의 합이 UV/vis spectrum에 검정색 나와야 하지만, 실제 cuvette를 통과 한 혼합물의 UV/vis spectrum을 보면 그렇지 않다. 이 이유는 cuvette에 들어가는 각 재료의 농도는 위의 Figure 18, 19에서 보듯이 페놀 (0.1 mM), 멜라토닌 (1.0 mM) 이지만, UV radiation이 통과하는 cuvette의 길이는 일정할 때, 그 cuvette에 들어가는 각 재료의 부피는 각 농도의 반이기 때문에 실험적으로 얻었던 UV/vis spectrum와 많은 차이를 보일 수밖에 없었다. 그래서 원재료의 데이터 값을 반으로 나눠준 후 이들의 데이터를 수학적으로 합하여 주면 실험적으로 얻었던 데이터의 값과 유사한 UV/vis spectrum을 얻을 수 있었다.

용매 간 상용성은 알 수 없었지만, Figure 20 ~ 23에서 보여주듯이 멜라토닌 (melatonin) 이 들어간 혼합물 상태에서 특정 재료의 농도의 변화에 따라 λmax의 흐름을 볼 수 있었으며, absorbance의 변화도 확인 할 수 있었다. 비록 고농도에서의 실험과 수학적 가감의 방법으로 용매와 용질 간의 상호 작용을 직접

적으로 볼 순 없었지만, 과산화수소를 원액 상태에서 멜라토닌 (melatonin) 과 반응 시키고 이를 희석하면서 UV/vis spectra을 실험 해 보았을 때 Figure 24 에서 볼 수 있듯이 새로운 UV/vis spectra를 확인 할 수 있었고, 같은 조건에 원액 상태의 페놀을 첨가 했을 경우 과산화수소만을 넣었을 때와 다른 UV/vis spectra를 보여 줌으로써 페놀 역시 멜라토닌 (melatonin) 과 상호 관계가 있음을 간접적으로 확인 시켜 주었다.

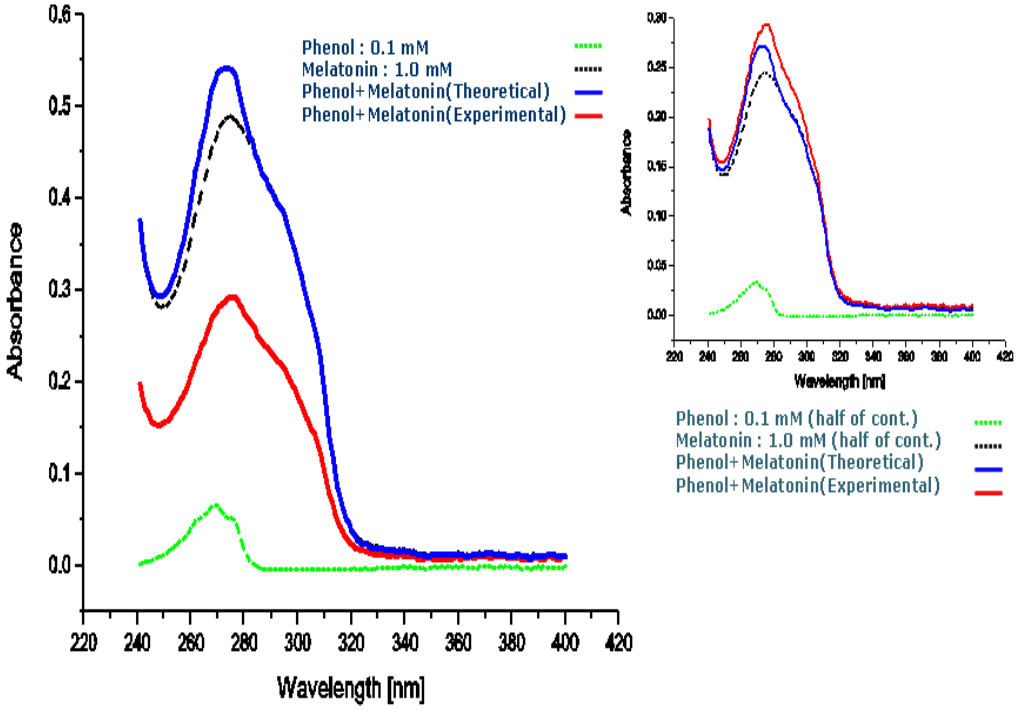


Figure 18. The UV/vis spectra of the mixture, phenol;melatonin at high concentrations, right; the UV/vis spectra from mathematical analysis.

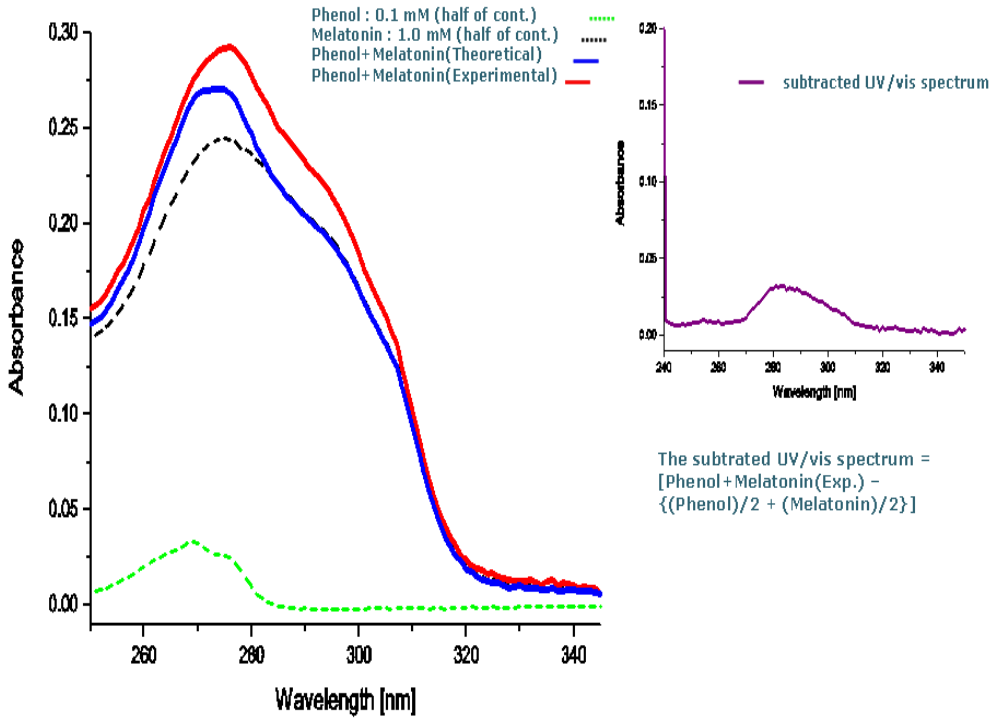


Figure 19. The UV/vis spectra from mathematical analysis, Right; residual UV/vis spectrum after the mathematical subtraction.

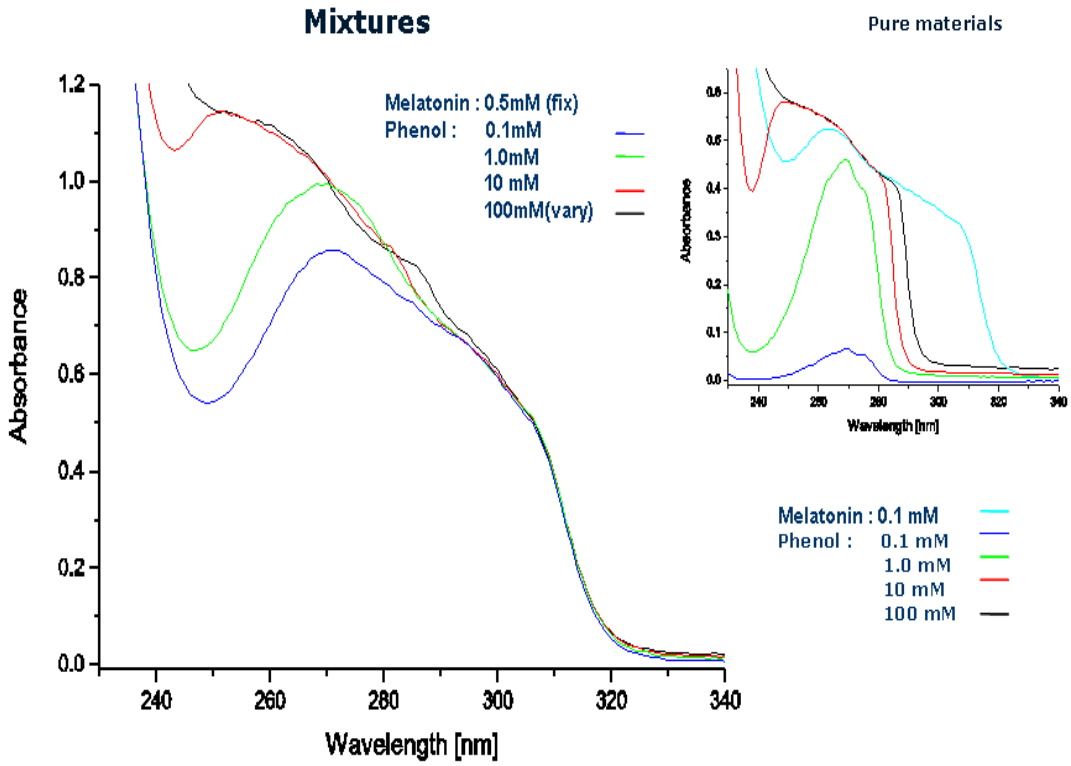


Figure 20. The UV/vis spectra of the mixtures, various phenol concentrations.; fixed melatonin concentration.

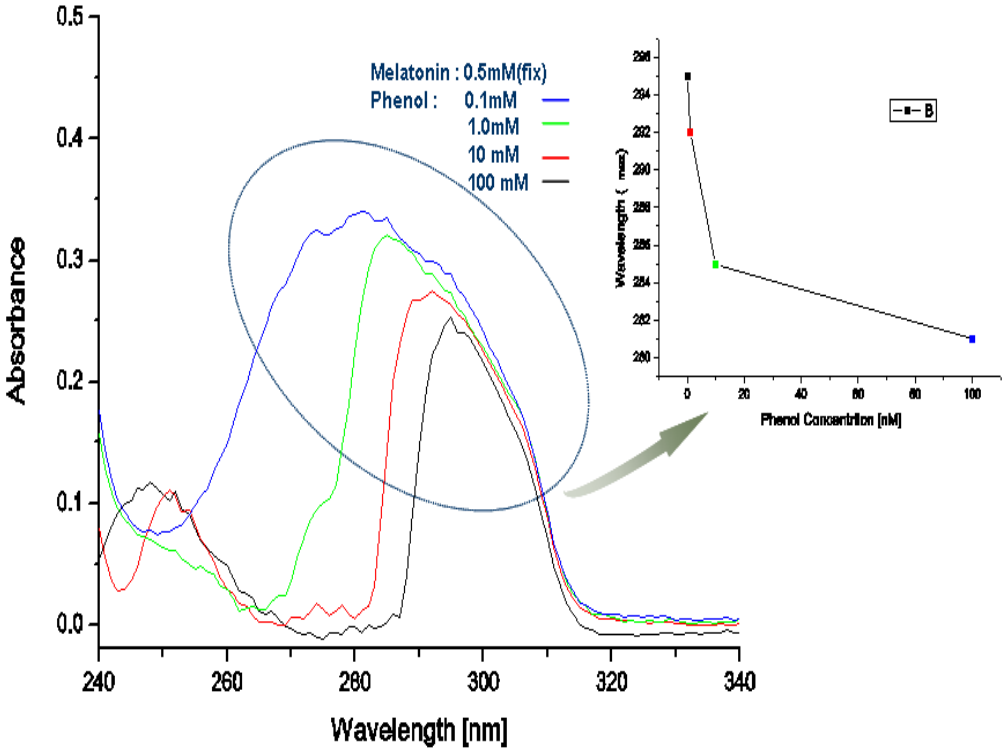


Figure 21. The residual UV/vis spectra of mathematical treatments, between mixtures and pure materials, and bathochromic shift.

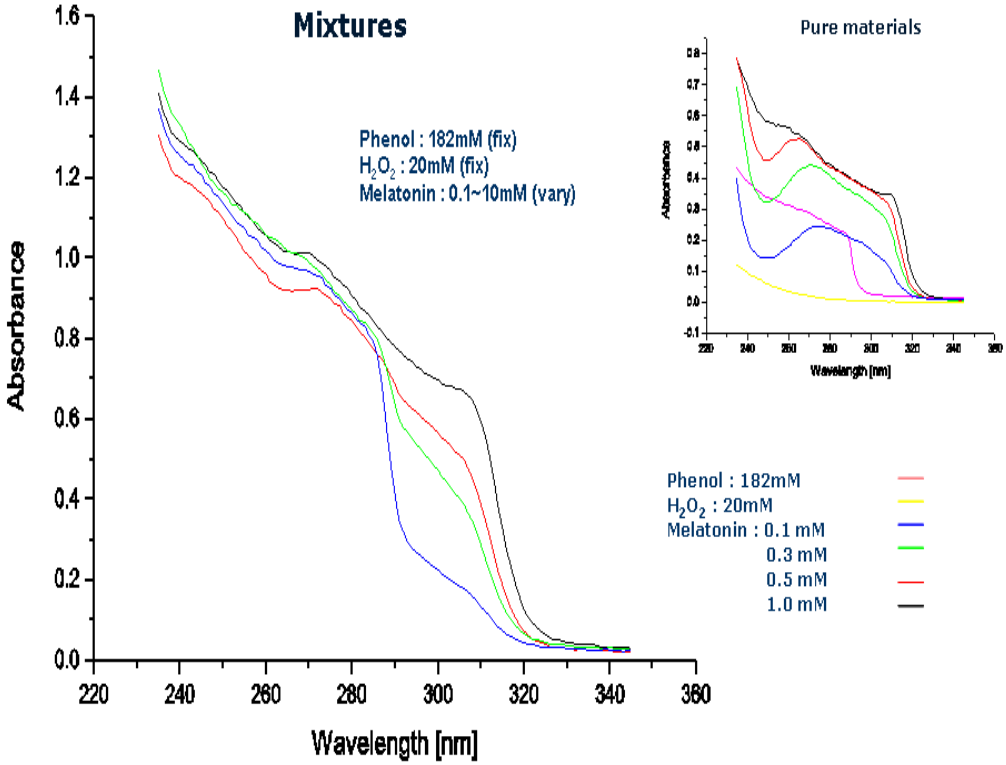


Figure 22. The mutual UV/vis spectra of mixtures and pure materials.

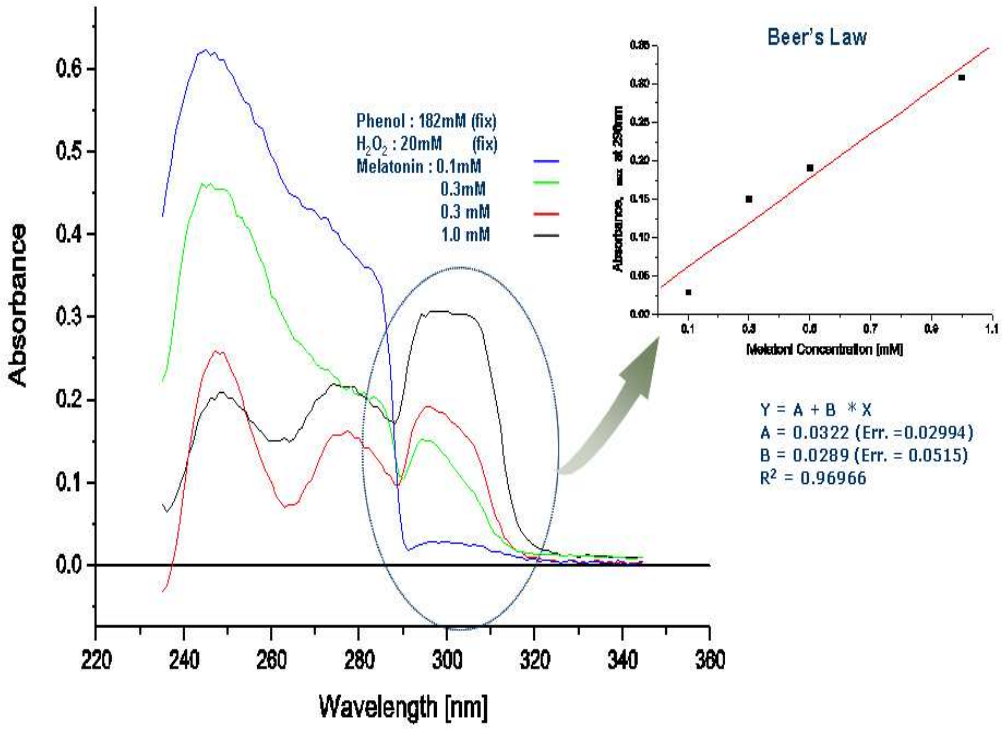


Figure 23. The residual UV/vis spectra of mathematical treatments, and Beer's Law.

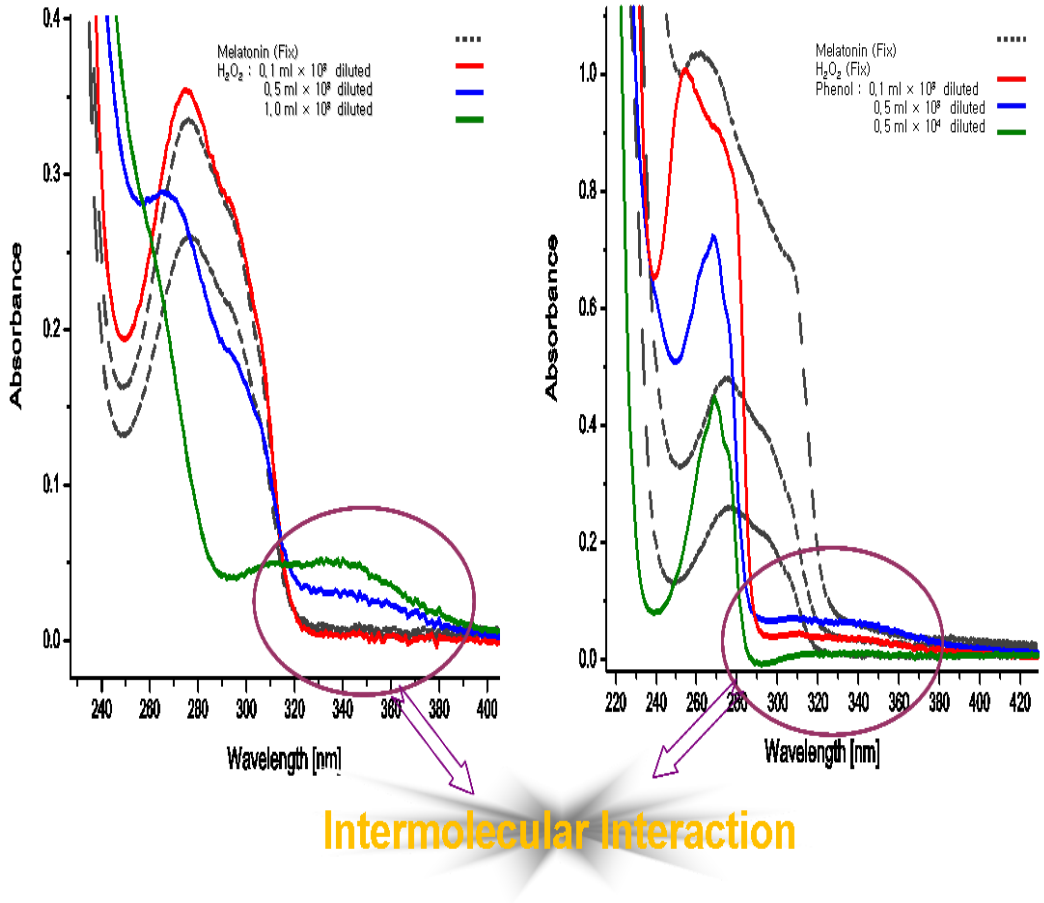


Figure 24. The UV/vis spectra of the mixture, H_2O_2;melatonin and phenol;H_2O_2;melatonin at high concentrations.

2) *FT-IR*과 ^{1}*H-NMR*에서의 혼합물의 거동 분석

FT-IR과 ^{1}H-NMR 분석에 있어서 실험 재료들은 binary solution states, ternary solution states, 그리고 위의 두 용액들에 멜라토닌 (melatonin) 을 투입시켜 모든 상태에 대하여 실험을 해 보았지만, 페놀 (C_6H_5OH), 에탄올 (C_2H_5OH), 과산화수소 (H_2O_2), 그리고 물 (H_2O) 의 ·OH가 FT-IR과 ^{1}H-NMR의 실험 결과에 상당한 영향을 주었다. 그래서 각 재료의 혼합에 있어서 최대한 수분을 생성 및 제거에 주의하면서 시행하였고, 남아있을 수분과 FT-IR과 ^{1}H-NMR 분석에서 순수 멜라토닌의 변화만을 보기 위해서 동결건조를 시행하였다.

FT-IR의 결과는 Table 3 와 Figure 25 ~ 26 에서 볼 수 있듯이 멜라토닌 (melatonin) indole 부분의 이중결합이 깨지면서 C=O가 하나 더 생겨나는 것을 MTH, MTC (MTH : HP + E + ME, MTC : P + HP + E + ME) 두 샘플의 1710 cm^{-1} 부분이 완곡하게 나옴으로 확인했다. 이러한 변화는 과산화수소의 영향 때문이라는 종래의 실험 결과와 부합하는 것으로 과산화수소가 멜라토닌 (melatonin) 과 상호 관계가 있음을 확인 시켜주었다. 또한 -NH가 무너지고, 3300 cm^{-1}, -OH의 생성, 3380 cm^{-1}, 3407 cm^{-1} 또한 확인 할 수 있었다.

^{1}H-NMR의 결과는 다음과 같이 나타내었다 (Figure 27 ~ 29). Figure 27은 순수 멜라토닌 (melatonin) 만의 스펙트럼이고 Figure 28에서 멜라토닌 (melatonin) 과 MTC 혹은 MTH 용액에서 변화 된 멜라토닌 (melatonin)의 흔적을 찾을 수 있었고; NHCHO (11.2 ppm), CHO (8.45 ppm), CH_2CO (2.95 ppm), 이는 FT-IR의 스펙트럼과 상응하는 결과로 과산화수소가 멜라토닌 (melatonin) 과 확실히 상호 작용 혹은 반응이 있음을 보여 주었다. 그리고 Figure 29에서 볼 수 있듯이 MTC와 MTH의 스펙트럼의 차이 또한 확인 할 수 있었는데 UV/vis spectrophotometer와 FT-IR에서의 결과와 관계가 있다는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Interpretation of FT-IR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution, MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;MT.

No.	wavenumbers [cm^{-1}]	FT-IR signal
①	1100~1300	Lactone, C-O-C stretching vibration
②	1213	C-O-CH_3 stretching
③	1242~978	C-O stretching affected by N and hydrogen bonded
④	1373	CNO_2 stretching
⑤	1556	N-H-CO stretching
⑥	1590	Indole stretching
⑦	1627	C=O amidic(acetyl) stretching
⑧	2842	CH_2 sy stretching
⑨	2956	CH_2 asy stretching
⑩	3300	NH stretching
⑪	3380, 3407	OH stretching

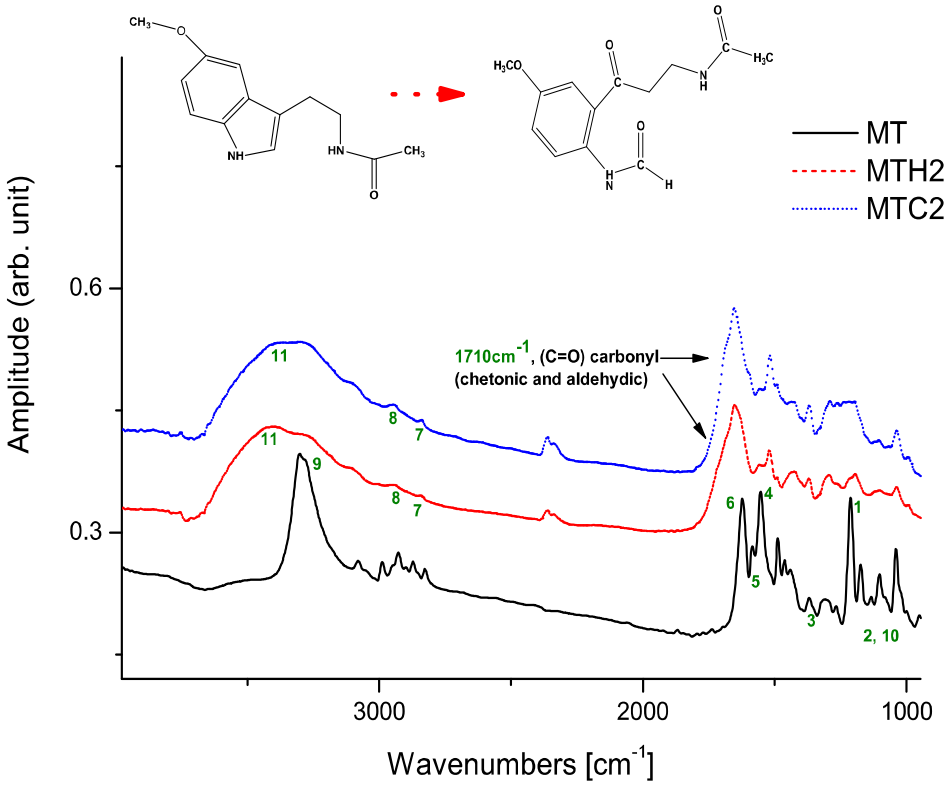


Figure 25. FT-IR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution, MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;-H_2O_2;Et-OH;MT, and the numbers of green color are related to Table 2.

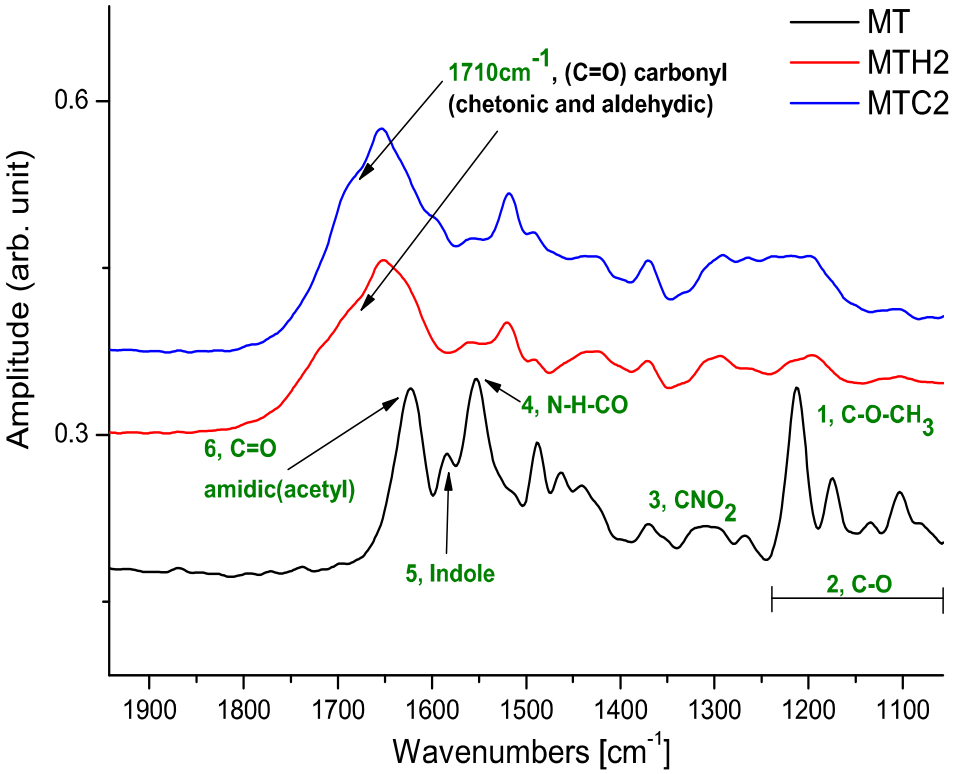


Figure 26. FT-IR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution in the wavelength range 1000~1900/ cm^{-1}, MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;MT, and the numbers of green color are related to Table 2.

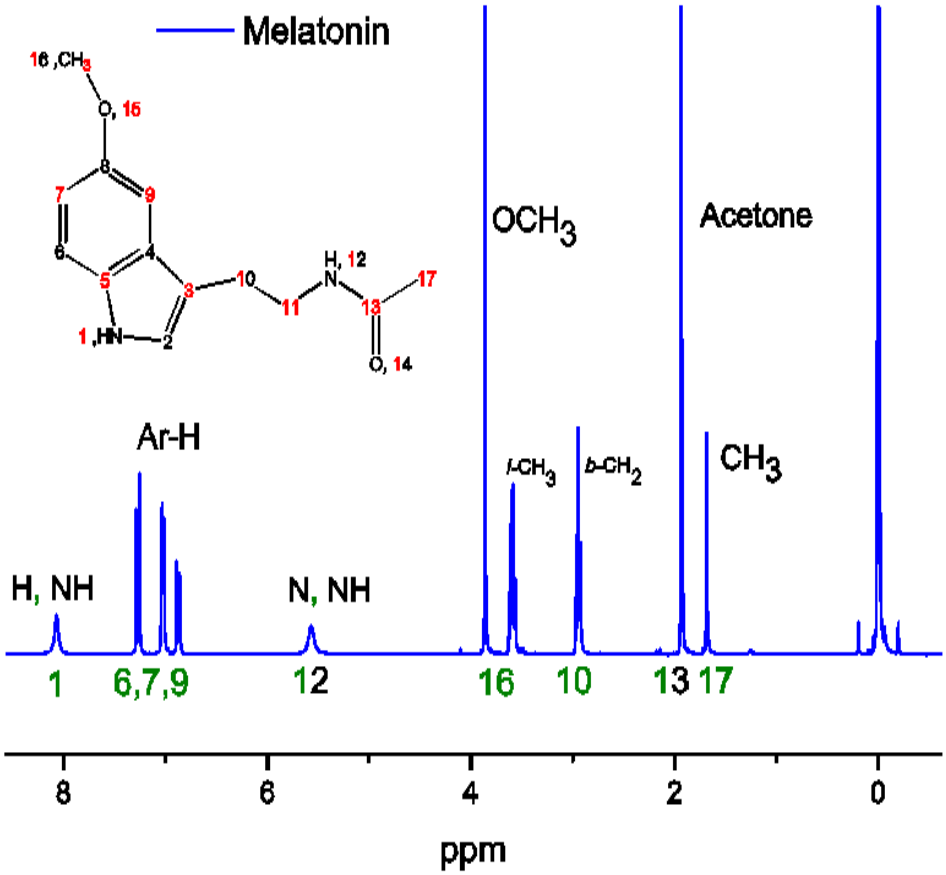


Figure 27. ^{1}*H-NMR of pure melatonin.*

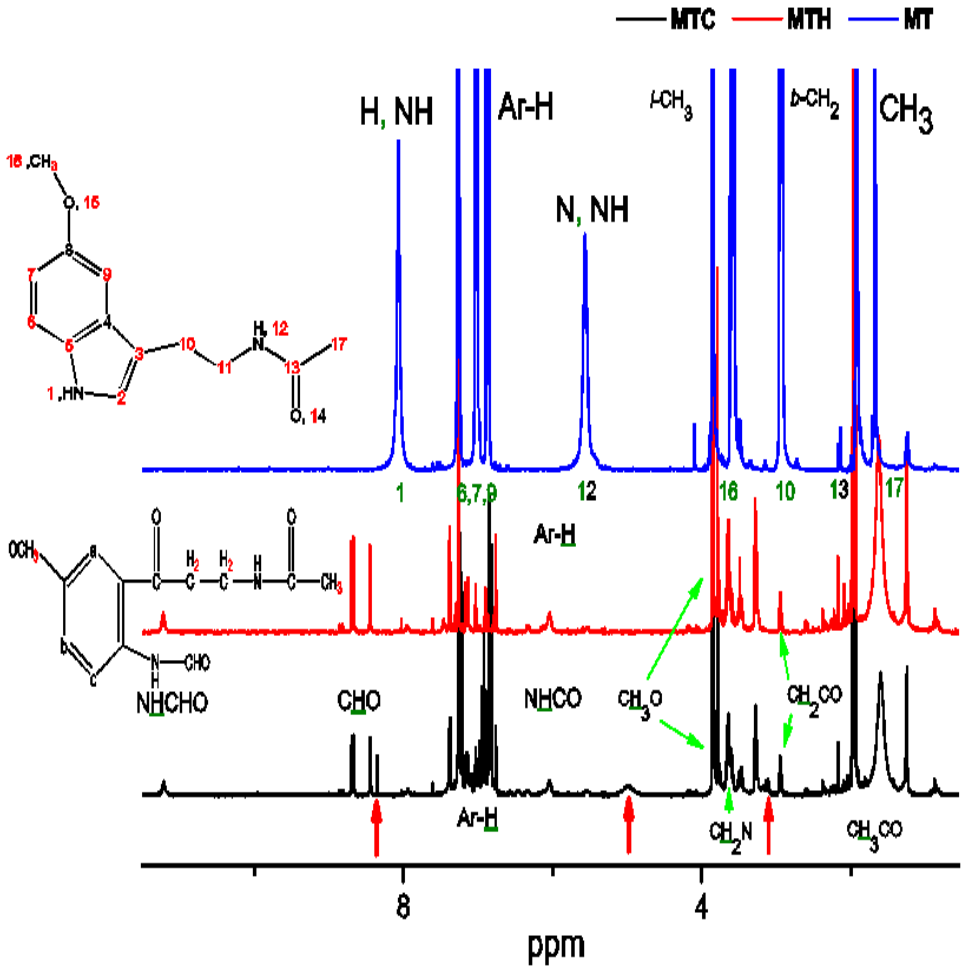


Figure 28. 1H-NMR of MT, MTH solution, and MTC solution, MT : melatonin, MTH : H_2O_2;Et-OH;MT, and MTH : phenol;H_2O_2;Et-OH;-MT.

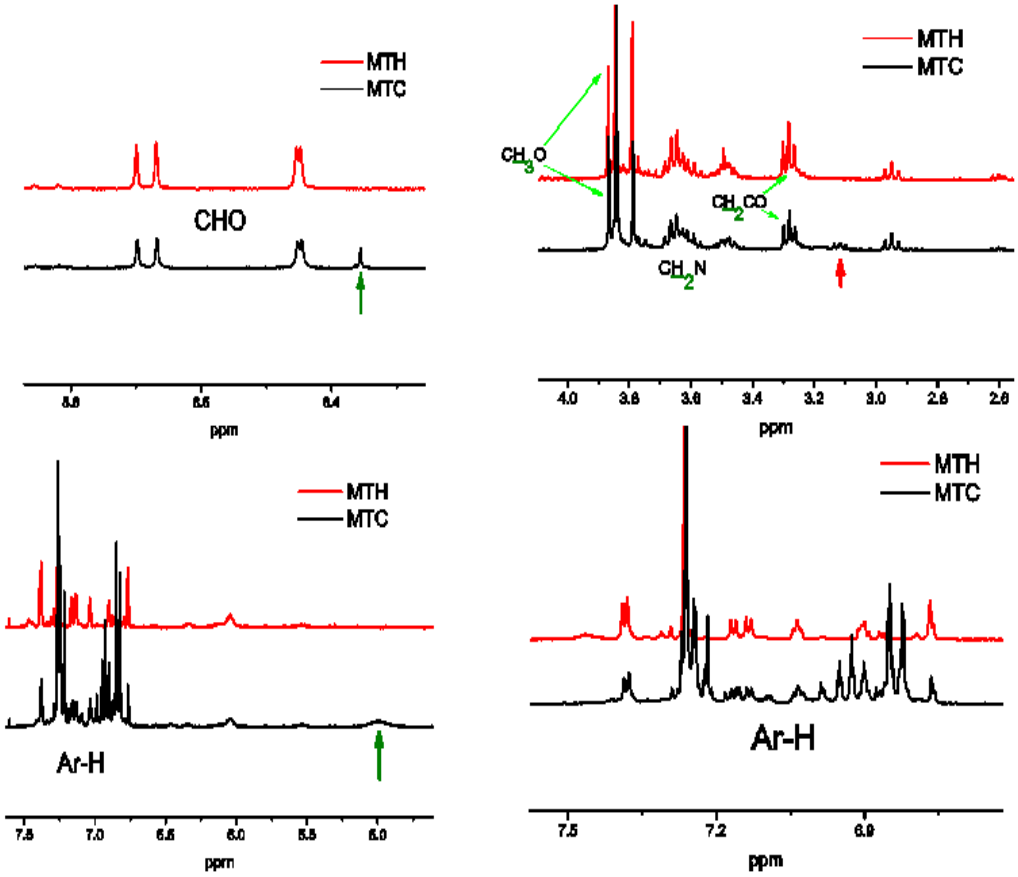


Figure 29. ^{1}*H-NMR spectrum of MT, MTH solution, and MTC solution in specific ppm ranges, MT : melatonin, MTH :* H_2O_2*;Et-OH;MT, and MTH : phenol;*H_2O_2*;Et-OH;MT.*

4. 결　　론

본 실험에서는 멜라닌이 침착 된 극소 부위에서의 멜라닌발색단 (melanin chromophore) 분해에 대해서 알아보고자 하였다. 다시 말해서 색소 침착 된 점, 죽은 깨, 그리고 노화로 인한 검버섯 등의 멜라닌 (melanin) 을 제거하고자 페놀, 과산화수소, 그리고 멜라닌 (melanin) 합성 전구체인 멜라토닌 (melatonin) 을 통해 실험 하였다.

페놀 용액을 이루는 각 재료의 농도의존성과 상호 연관성을 보여 주는 UV/vis Spectrum에서는 Beer's Law, Benesi-Hildebrand Equation,이 적용이 되지 않았지만, UV/vis Spectrum의 수학적 가·감 분석으로 얻어진 UV/vis Spectrum에서는 각각의 재료와 멜라토닌 (melatonin) 의 반응성 및 상호 관계를 확인 할 만 한 결과를 보여 주었다. 잔류 UV/vis Spectrum이 특정 재료의 농도에 따라 absorbance의 증·감이 있었으며, 혼합 용액의 재료에 따라서도 다른 영향 (bathochromic or hypsochromic shift) 또는 새로운 λmax생성 등이 있었다.

이러한 결과는 H_2O_2/UV radiation의 영향으로 생겨 난 라디칼 (radicals) 이 페놀, 멜라토닌 (melatonin) 의 비 공유 전자쌍이나 분자 간 결합이 약한 부분을 공격함으로서 보여지는 라디칼의 이동 혹은 반응이었으며 FT-IR과 ^{1}H-NMR을 통해서 확인 하였다. 그 결과 과산화수소에 의한 멜라토닌 (melatonin) indole 부분의 링 오픈과 함께 C=O가 생겨남을 FT-IR로 확인했으며, 이에 따라서 페놀의 작용으로 반응이 종결되어 새로 생성 된 멜라토닌 (melatonin)의 분자구조를 예측 할 수 있었다. 다시 말하면 멜라닌발색단 (melanin chromophore)의 분해 가능성 및 제거에 충분히 가능하다고 간주되어 진다.

차 후 *in vitro*에서 멜라닌 (melanin) 과 페놀 용액(phenolic solution) 의 반응에 있어 좀 더 확실하고 분석의 질을 높이기 위해선 구체화 된 전처리 과정의 확립이 필요하다고 생각한다.

5. 연구 계획

본 실험에서 보고자 하였던 것은 멜라닌 (melanin) 합성 전구체인 멜라토닌 (melatonin) 을 사용하여 멜라닌발색단 (melanin Chromophore) 의 분해를 확인하는 것이었다. 하지만 직접적으로 멜라닌발색단 (melanin chromophore) 과 페놀 용액 (phenolic solution) 사이의 반응 및 생성물을 위한 분석을 해야 할 것이다.

피부의 전체적인 표면에 분포하는 멜라닌 (melanin) 의 제거가 아닌 과잉 침착 된 극소 부위에 대한 멜라닌 (melanin) 의 분해라는 점에서 페놀 용액 (phenolic solution) 의 사용은 *in vitro* 와 *in vivo* 에서의 상당한 실험적 차이를 가져오리라고 예상된다. 그러므로 *in vivo* 에 실험을 들어가기 전에 *in vitro* 에서 페놀 용액 (phenolic solution) 을 이루는 실험 재료들 사이에서의 상호 관계와 페놀 용액 (phenolic solution) 과 멜라토닌 (melatonin) 혹은 멜라닌 (melanin) 의 상호 관계를 보여 줄 수 있는 수학적 모델링을 세우는 것도 필요할 것이다.

이와 더불어 페놀 용액과 멜라토닌 (melatonin) 과의 혼합 후 분석 과정에서 페놀과 다른 실험 재료를 완벽히 제거하지 못하고 구조의 변화를 일으킨 멜라토닌 (melatonin) 을 분석하였는데, 페놀 용액 (phenolic solution) 과 멜라토닌 (melatonin)의 순수 반응 생성물을 얻기 위한 실험 과정도 더 정확히 하고 *in vivo* 의 실험에 도전해야 할 것이다.

in vivo 에서의 실험은 아직 구체화 되어진 것은 없지만, 일련의 과정을 다시 재점검・보충하여 세포독성 (cytotoxicity), 실제 피부에의 적용 등의 실험을 추진해 갈 방향이다.

REFERENCES

1) C. D. Papaspyrides, S. A. Protopapas(1988). E.f.r approach on hydroquinone melanin possible interaction, Int. J. Biol. Macromol., Vol. 10, February,

2) M. Paul; R. Jennifer(2004). Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin, Photochemistry and photobiology 79 (2): 211-216.

3) H. S. Manson, D. J. E. Ingram, and B. Allen(1960). The free radical property of melanin. Arch. Biochem. Biophys. 86:225.

4) K.N. Prasad, and H. A. Johnson(1968). Differential radiosensitivity of the hepatic melanocytes of Amphiuma tridactylum. Radiat. Res. 33:403.

5) Naeyaert et al(1991), Tastmali et al(2002).

6) JS Hwang, In vitro evaluation methods for development of osmeceutical Ingredients, skin research institute, R&D center, Amore-pacific Corp.

7) W. Korytowski, Sarna T. Bleaching of melanin pigments)1990). Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic opa-melanin. J. Biol. Chem. 265;12410-12416;

8) R. Dunford, E. J. Land, M. Rozanowska, T. Sarna, T. G Truscott(1995) Interaction of melanin with Carbon and Oxygen centered radicals from methanol and ethanol, Free Radical Biology & Medicine, Vol.19, No.6, pp. 735-740.

9) K.Clarke, R. Edge, V. Johnson, E. J. Land, S. Navaratnam, T. G. Truscott, Direct observation of $NH_2^{\bullet}$ reactions with oxygen, amino acids, and melanins., 10.1021/jp076395r, American Chemical Society, 2008.

10) W. Korytowski, B. Kalyanaraman, I. A. Menon, T. Sarna, Roger C. Sealy(1986). Reaction of superoxide anions with melanins; electron spin resonance and spin trapping studies, Biochimica et Biophysica Acta 882(1986)145-153.

11) Richardson G(2005). The human circadian system in normal and diso-

rdered sleep., J Clin Psychiatry 66 Suppl 9: 3 - 9; quiz 42-3.

12) Russel J. Reiter, D.X. Tan, B. Poeggeler, A. Menendezpelaez, L.D. Che-n, S. Saarela(1994). Melatonin as a free radical scavenger : implications for aging and age-related diseasesa, annals of the new york academy of Sciences 719 (1) , 1 - 12.

13) MY Lee. YH Kuan, HY Chen, TY Chen, ST Chen, CC Huang, IP Yang, YS Hsu, TS Wu, EJ Lee(2007). Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral is chemia in rats. J Pineal Res, Apr;-42(3):297 - 309.

14) Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Bick RJ, Hickson-Bick DL, Reiter RJ, Efthimiopoulos S, Robakis NK(1997). Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide, J Neurosci 17(5): 1683 - 1690.

15) Tjon Pian Gi CV, Broeren JP, Starreveld JS, Versteegh FG(2003). Melatonin for treatment of sleeping disorders in children with attention deficit/hyperactivity disorder: a preliminary open label study, Eur J Pediatr. 162(7): 554 - 555.

16) Bellipanni G, DI Marzo F, Blasi F, Di Marzo A(2005). Effects of melatonin in perimenopausal and menopausal women: our personal experience, Ann N YAcad Sci 1057(Dec): 393 - 402.

17) Dodick D, Capobianco D(2001). Treatment and management of cluster headache, Curr Pain Headache Rep 5(1): 83 - 91.

18) Gagnier J (2001). The therapeutic potential of melatonin in migraines and other headache types, Altern Med Rev 6(4): 383 - 9.

19) Bhattacharjee, Yudhijit(2007). Is Internal Timing Key to Mental Health, ScienceMag (AAAS) 317: 1488 - 90.

20) M. Edalatmanesh, R. Dhib, M Mr(2007). Kinetic modeling of aqueous phenol degradation by UV/H_2O_2 process, International Journal of Che-mical Kinetics, Vol. 40, No. 1, pp. 34-43.

21) Altun A, Ugur-Altun B (2007), Melatonin: therapeutic and clinical utili-

zation, Int. J. Clin. Pract. 61 (5): 835 - 45.

22) Lerner AB, Case JD, Takahasji Y(1992). Isolation of melatonin and 5-meth-oxyindole-3acetic acid from bovine pineal glasds. J. Biol. Chem 1960;235:

23) McElhinney DB, Hoffman SJ, Robinson WA, Ferguson J. Effect of em-altonin on human skin color. J. Invest. Dermatol. 1994;102: 258.

24) Andrea Rizzi[1], Stefano Comai[2], Antonella Bertazzo[2], Carlo V. L. Costa,[2] Graziella Allegui[2], Pietro Traldi[1*], An invenstigation on the possible role of melatonin in melanogenesis., J. Mass Spectrom. 2006;41:517-526.

25) Kraus-Rupert and Lemveck, 1965; Cheze and Ali, 1976; Pang and Yew, 1979; Kemali et al. 1986.

26) Besharse and Duins, 1983a.

27) Dubocovich, 1983, 1988.

28) G. Scott, Q. Zhao(2001). Rab3a and SNARE proteins: potential regulator of melanosome movement, Journal of Investigative Dermatology 116, 296-304.

29) Trevor W. Stone, L. Gail Darlington, Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development, Natrue reviews drug discovery 1, 609-620 (August 2002) DOI:10.1038/nrd870.

30) G. Tian, H. Yuan, Y. Mu, C. He, and S. Feng Org. Lett, Hydrothermal reactions from sodium hydrogen carbonate to phenol, 2007;9(10) 2019-2021.

31) 이인경, 한수부, 멜라닌 색소 침착의 치료., 대한치주과학회지, VOl.33,No-.2,2003.

32) Hirschfeld I, Hirschfeld L. Oral pigmentation and a method of removing it. Oral Surg Med Oral Pathol, 1951;4:1012-1016.

33) JH Park, YD. Choi, SW Kim, YC Kim, SW Park(2007). Effectiveness of modified phenol peel (Exoderm) on facial wrinkles, acne scars and other skin problems of Asian patients The Journal of Dermatology 34 (1), 17 - 24.

34) S. G. Poulopoulos, F. Arvanitakis, C. J. Philppopoulos, Photochemical

treatment of phenol aqueous solutions using ultraviolet radiation and hydrogen peroxide, J. Hazardous Materials B219 (2006) 64-68.

35) M. Edalatmanesh, R. Dhib, M Mehrvar, Kinetic Mideling of Aqueous Phenol Degradation by UV/H_2O_2 Process, Wiley Periodicals, Inc. Int J Chem Kinet 40: 34-43, 2008.

36) Sealy, R. C. Free radicals in melanin formation, structure, and reactions , In: Armstromg, D. et al., eds. Free radicals in lomecular biology, aging, and disease. New York: Raven; 1984:67-76.

37) Van Woert, M. H. (1968) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129;165-171.

38) Goodchild, N. T., Kwock, K. and Lin, P. S.(1981). in Oxygen and Ixy Radicals in Chemistry and Biology (Rodgers, M. A. J. and Powers, E. L.. eds.), p. 648, Academic Press, New York.

39) Felix, C. C., Hyde, J. S. and Sealy, R. C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 84;335-341.

40) Rui Wand, Zhiwu Yu, Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method, Acta Phys. -Chim. Sin., 2007, 23(9): 1353-1359.

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학과	학 번	20077092	과정	수 료
성 명	한글 임 남 규 한문 林 枏 奎 영문 Im, Nam-Kyu				
주 소	광주시 서구 세하동 691-1				
연락처	E-mail : kyunami8@nate.com				
논문제목	한글: 페놀 용액을 이용한 멜라닌 발색단의 분해				
	영문: Decomposition of Melanin Chromophore by Phenolic Solution				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2009 년 2월 일

저작자: 임 남 규 (인)

조선대학교 총장 귀하