

L-Ascorbic acid-3-aminopropane phosphoric acid diester 의 합성과 응용에 관한 연구

이옥섭, 이기화, 홍종언, 조윤기, 이윤식*

(주) 태평양 기술 연구원

*서울대학교 공업화학과

Studies on the Synthesis of L-Ascorbic Acid-3-Aminopropane Phosphoric Acid Diester and its Applications

Ok-Sub Lee, Ki-Wha Lee, Jong-Eun Hong, Youn-Ki Cho, Yun-Sik Lee*

Pacific R & D Center

***Dept. of Chemical Technology, Seoul National University**

요약

L-Ascorbic acid 및 그 유도체는 항산화 작용과 미백작용 및 섬유아세포의 생장 촉진과 콜라겐 생합성의 증가시키는 효과가 있으므로 화장품에서 오래 전부터 사용되어 왔다. 본 연구에서는 생체에 대한 안전성과 안정성이 우수한 L-Ascorbic acid 유도체를 개발하기 위하여 인지질과 유사하게 L-Ascorbic acid 에 3-Aminopropane phosphoric acid (3-APPA)를 결합하여 L-Ascorbic acid-3-aminopropane phosphoric acid diester (ASA-APPA)를 합성하였다. ASA-APPA 는 2-Chlorotetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine P-oxide 와 5,6-isopropylidene L-ascorbic acid 를 반응 시킨

후 산 가수분해 반응을 통하여 얻을 수 있었다. ASA-APPA 는 수용액에서 안정성이 우수하였으며, 독성실험에서 무독성 물질이며, 인체 첩포 실험에서도 무자극 물질임을 확인하였다. 그리고, ASA-APPA 는 L-Ascorbic acid 와 3-APPA 의 혼합물과 거의 유사한 섬유아세포의 증식효과를 나타내었으며, melanoma 에 대한 멜라닌 생성 억제 실험에서 L-Ascorbic acid phosphate magnesium salt 와 유사한 효과를 보였다. 따라서 ASA-APPA 는 멜라닌 생성 억제 효과와 섬유아세포의 증식 효과를 갖는 새로운 화장품 원료로서 사용이 가능할 것으로 생각된다.

I. 서론

아스코르브산 및 그 유도체는 오래 전부터 화장품에서 멜라닌 생성 억제제로서 기미나 주근깨의 치료물질로서 사용되어 왔으며, 피부 세포의 성장을 촉진시키는 물질로도 이용되고 있다. 이것은 아스코르브산이 강한 항산화 작용을 할뿐만 아니라, 섬유아세포의 성장촉진 효과 및 콜라겐 생합성을 증진시키는 효과가 있기 때문이다. Fig. 1 은 피부에서 멜라닌의 생합성과정을 나타낸 것이며[1], Table 1 은 피부내 멜라닌 생성 억제제로 이용되고 있는 물질들의 특징과 작용을 나타낸 것이다. 멜라닌 생성 억제에 관한 연구는 기미, 주근깨와 같은 비정상적인 색소 침착을 방지할 목적으로 널리 연구되고 있다. 이러한 목적으로 사용되고 있는 성분들 중 현재 피부에 가장 안전한 것으로 알려진 것이 아스코르브산 유도체이다. 그러나 아스코르브산은 수용액에서 쉽게 산화되어 색깔이 갈색으로 변할 뿐만 아니라, 효과도 없으므로 화장품에서 아스코르브산 자체를 수용액 상에서 사용하는 경우는 거의 없으며, 일반적으로 아스코르브산의 2,3,5,6 위치의 수산기에 다른 화합물을 결합시켜 안정화시켜 사용되고 있으며, 생체내에 흡수되면 효소에 의해 분해되어 아스코르브산의 효과로 멜라닌 생성 억제 효과를 갖도록 하고 있다.

이러한 아스코르브산 유도체로서 최초로 개발 사용된 것은 ascorbyl-6-monostearate 와 ascorbyl-2,6 dipalmitate 등 아실 유도체였다. 그러나 이러한 유도체들은 아스코르브산 보다는 안정성이 우수하나, 이것 역시 불안정하며, 결정성이 크기 때문에 화장품에서 효과가 있는 농도로 사용하기에는 문제점이 많다. 다음으로 개발된 것이 아스코르브산에 인산을 결합하고 마그네슘 염으로 만든 것이었다[2]. 이것은 아스코르브산 자체는 수용성 물질로서 진피층까지 흡수가 거의 되지 않으나 인산기를 도입하여 수용액에서 안정화는 물론 인산에 의해 경피흡수가 촉진되도록 개발한 것이다. 그러나 이것 역시 수용액에서 변색이나 결정으로 석출되며, 또 다른 성분, 즉 음이온의 고분자 물질이나 계면활성제 등과 결합하여 침전을 생성한다는 등의 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근 미생물 발효를 이용하여 아스코르브산 2번 수산기에 글루코우즈가 치환된 ascorbic acid 2-O- α -glucoside 가 개발되었다[3]. 이것은 안정성이 우수하며, 생체내에서 α -glucotase 에 의해 가수분해되어 아스코르브산을 서서히 유리시켜 멜라닌 생성억제, 콜라겐 생합성 증진 등의 약리작용이 기대된다고 보고되어 있다. 그러나 아직 ascorbic acid 2-O- α -glucoside 는 피부를 통한 흡수와 생체내에서 멜라닌 생성 저해 효과가 불확실하며, 또 고가인 단점이 있다. 그러므로 멜라닌 생성 억제 효과가 있으면서 안정한 아스코르브산 유도체의 개발이 필요하다. 이러한 점에서 Fig.2 에서와 같이 생체막의 성분인 인지질과 유사하게 아스코르브산에 3-APPA 를 합성한다면 화장품에서 3-APPA 에 의한 콜라겐 생합성의 증가 효과와 아울러 안정성이 높으며, 멜라닌 생성 억제 효과가 기대될 것이다.

II. 실험

1. 재료 및 실험기기

본 실험에 사용된 3-아미노-1-프로판올은 Aldrich 사 시약을 합성 멜라닌, 아스코르브산은 Sigma 사 시약을, 클로로포름, 트리에틸아민, 메틸알코올은 Junsei 사 시약 1 급을 사용하였고, ascorbic acid phosphate magnesium salt 는 Wako pure chem.(일본)를 이용하였다. 이외의 모든 시약들은 시약급을 정제없이 그대로 사용하였다. 생물학적 실험에 사용된 섬유아세포는 신생아로부터 얻었으며, melanoma 는 murine melanoma B-16 는 ATCC 사에서 FBS,DMEM 은 Gibco BRL(USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 hairless mouse, guinea pig, rabbit 는 온도 21-25 °C, 상대습도 50-60%의 환경조건에서 (주) 태평양 기술연구원 부속 동물실험실에서 사육한 것을 사용하였다. IR 스펙트럼은 Bio-Rad 사 모델 FTS-40, UV 스펙트럼은 Bomen 사 모델 MB-100, NMR 스펙트럼은 Varian 사 모델 Gemini 2000 을 사용하였다.

2. ASA-APPA 의 합성

질소 주입기가 장착된 1,000 ml 3 구 플라스크에 POCl_3 34.1 ml (360mM)를 메틸렌 디클로라이드 400 ml 에 녹였다. 5 °C 얼음 중탕에서 메틸렌 디클로라이드 200ml 에 희석한 3-아미노-1-프로판올 30ml (390mM)과 트리에틸아민 102ml(730mM)를 2 시간 동안 적가하였다. 생성된 염을 제거하고 정제수 100 ml 를 사용하여 유기층을 세척하였다. 무수 Na_2SO_4 를 가하여 유기층을 건조한 후 불용물을 여과하고 여액을 감압 농축하고 톨루엔을 가하여 결정을 얻었다. 진공 건조하여 반응 생성물인 2-Chlorotetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine P-oxide 를 백색고체로서 53g(94.6%)을 얻었다. 이들의 확인은 IR, NMR 로서 하였으며 아래와 같다.

MP : 79 – 82 °C

IR (KBr, cm^{-1}) : 1477 (NH), 1274 (PO), 1036(POH), 996(PN)

^1H -NMR (CDCl_3) : 1.7(m, 1H), 2.1(m, 1H), 3.3(m, 2H), 4.4 (m,2H), 4.9(br, 1H)

^{13}C -NMR (CDCl_3) : 25.78, 25.85, 42.05, 71.69, 71.81

^{31}P -NMR (D_2O) : 0.54

별도로 500ml 플라스크에 5,6-isopropylidene-L-ascorbic acid 10g (46mM)을 메틸렌 디클로라이드 100ml 에 현탁 시켰다. 5 °C 얼음중탕에서 트리에틸아민 12.9ml (93mM)를 가하고, 메틸렌 디클로라이드 20ml 에 녹인 2-chlorotetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine P-oxide 8.6g (55mM)을 적가하고 하루동안 상온 교반한 후 회석 인산 수용액으로 유기층을 세척하였다. 무수 Na_2SO_4 와 활성탄을 가하여 건조탈색하고, 불용물을 여과하고, 여액을 감압 농축하였다. 잔유물을 정제수 30ml 에 녹이고 50 °C 항온수조에서 3 시간 동안 교반하였다. 이소프로판올 150ml 를 가하여 결정을 얻고, 진공 건조하여 반응물 ASA-APPA 6g (41.4%)을 백색 고체로서 얻었다. 이들의 확인은 IR, NMR 로서 하였다.

MP : 176 – 180 °C

IR (KBr, cm^{-1}) : 3500 – 2700 (OH, NH_2), 1747 (CO), 1141 (PO)

^1H -NMR (CDCl_3) : 1.9(m, 2H), 3.05(t, 2H), 3.62(m, 2H), 3.92 (m, 1H), 4.0(dd, 2H), 4.42 (s, 1H)

^{13}C -NMR (CDCl_3) : 22.63, 22.74, 57.71, 59.50, 59.56, 64.85, 73.84, 106.56, 171.26, 172.76

3. 안전성 실험

안전성 실험은 급성 경구독성 실험, 급성 경피독성 실험, 피부 1 차자극 실험, 안점막자극 실험, 피부 감작성 실험, 인체 첩포 실험, 누적 자극성 실험을 CTFA guideline[8]에 준하여 실험 하였다.

4. 섬유아세포(fibroblast)의 배양 및 측정

신생아 포피에서 얻은 피부로부터 지방층을 제거한 다음 2-4mm x 2-4mm 크기의

절편을 만들었다. 여기에 type I collagenase 용액을 가하여 37 °C 에서 12 시간 방치 후 콜라제나제 용액을 제거하였다. 표피를 완전히 제거한 진피를 잘게 썬 후 배지를 부어 섬유아세포를 배양하였다. 본 실험에서는 3-7 번 계대 배양한 섬유아세포를 사용하였다. 이 때 사용한 배지는 glutamine (0.48mg/ml), penicillin (100IU/ml), streptomycin (50µg/ml)과 FBS (fetal bovine serum)가 10% 비율로 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media)를 사용하였다. 96-well multi chamber 에 각 well 당 5×10^3 개의 섬유아세포를 넣고, 각 well 에 측정하고자 하는 물질을 1/10 씩 순차적으로 희석하여 3 일간 배양하였다. 3 일 후 MTT 를 2mg/ml 농도로 각 well 을 적가하고 4 시간 항온 배양한 후 생성된 formazan 을 DMSO 에 녹였다. 녹은 formazan 은 microplate reader 를 이용하여 540nm 에서 측정하였다.

5. 쥐 흑색종양 세포주 배양과 멜라닌 생성량 측정

쥐 흑색종양 세포(murine melanoma B10F0 ; ATCC cRL 6322 (ATCC ; American Type Culture Collection)를 10% FBS 를 함유한 배지 (minimum Essential Medium Gibco BRL 41500-034)에 일정농도의 시험물질을 함께 배양하였다. 먼저 B16 흑색종양세포를 세포배양 접시 (100 x 20mm, Falcone 3003)에 10^5 cells/dish 농도로 접종하고, 그 다음 날 세포의 부착을 확인한 뒤 시험물질을 함유한 배지로 교환하여 5% CO₂, 95% 공기조건 37 °C 에서 2 일간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 뒤 트립신 0.25%(Gibco Co.)로 처리하여 세포들을 떼어 튜브에 모은 후 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 배지 10 ml 에 풀어서 균일한 상태로 한 뒤에 Hemacytometer,에 넣고 역상현미경으로 관찰하면서 세포 수를 세었다. 수확한 세포 Pellet 에 1N NaOH 수용액 1ml 를 넣고 1 시간 동안 잘 흔들어 녹인 다음 475nm 에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 멜라닌 양을 계산하였다. 표준곡선은 합성 멜라닌 1, 2.5, 7.5, 15, 30, 60, 120 µg 을

1ml 의 1N NaOH 수용액에 녹여 475 nm 에서 흡광도로 표준곡선을 구하였다.

III. 결과 및 고찰

1. ASA-APPA 의 합성

ASA-APPA 의 합성은 scheme 1 과 같은 합성하였다. 즉 3-아미노-1-프로판올을 클로로포름 용매에서 POCl_3 과 직접 반응시켜 고리 화합물인 2-chlorotetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine P-oxide (화합물 (2))를 얻었다. 이것은 3-아미노-1-프로판올의 아민기가 POCl_3 과 결합하고 문자간 반응 보다 분자내 반응이 훨씬 빠르게 진행되며 분자내 나머지 알코올기가 POCl_3 의 염소와 치환함으로 인하여 열역학적으로 안정한 6 membered ring 구조를 형성하기 때문이다. 이 합성은 저온 ($0-5^\circ\text{C}$)에서 진행하였는데, 이것은 POCl_3 분자내의 3 개의 염소 원자중 2 개의 염소 원자가 3-아미노-1 프로판올의 2 관능기, 즉 수산기와 아민기에 의해 치환되어 2-chlorotetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine P-oxide 가 생성되며, 나머지 하나의 염소 원자는 5°C 이하의 저온에서 반응성이 감소되어 더 이상 반응하지 않고 그대로 남아있기 때문이다. 반응 온도가 5°C 이상으로 높을 경우에는 2 당량 이상의 3-아미노-1-프로판올이 POCl_3 에 치환되어 부산물의 생성이 많았으며, 또 0°C 이하에서는 반응물의 용해도가 감소되어 반응의 진행이 어려웠으며, 미반응물이 증가되었다. ASA-APPA 의 합성은 isopropylene L-ascorbic acid (화합물 (3))를 화합물 (2)로 인산화하여 얻었다. 이러한 인산화 반응은 화합물(3)의 2-수산기 또는 3-수산기 모두 가능하다. pH 10 이상의 수용상에서는 2-수산기에 인산화 반응이, 유용상에서 유기 염기를 사용하는 경우에는 3-수산기에 인산화 반응이 일어나며, 수용상의 산 조건에서 3-인산화 유도체는 보다 안정한 2-인산화 유도체로 전이한다고 알려져 있다

[4]. 본 연구에서는 화합물 (3)을 TEA 염기하에서 화합물 (2)로 반응시켰다. 최종 반응물은 TLC 에서 하나의 화합물만이 존재함을 확인할 수 있었으나, 인산화된 위치가 아스코르브산의 2-수산기인지, 3-수산기인지는 확인할 수 없었다. 판크로마 토그래피 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 4:1$)로 순수하게 분리한 화합물 (4)는 1% 수용액에서 pH 2 를 나타내었다. 문헌[5]에 의하면 2-수산기에 인산화가 일어나면 3-수산기의 산도가 높아지고, 3- 수산기에 인산화가 일어나면 2-수산기는 탄산 정도의 산도를 보이는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 화합물은 2-수산기에 반응이 일어난 것으로 추정할 수 있었다. 이를 확인하기 위하여 scheme 1 의 반응에서 트리에틸아민을 각각 1 당량과 2 당량을 가하여 반응시키고, 이를 TLC 로 확인하였다. TLC 에서 출발 물질 외에 2 개의 spot 가 생겼으며, 트리에틸아민 1 당량으로 반응시켰을 경우는 위쪽의 spot 가 주 생성물이었고, 2 당량으로 반응시켰을 때는 아래쪽 spot 가 주 생성물이었다 ($R_f = 0.62 : 0.34$, 클로로포름 : 에탄올 : 초산 = 80 :15 : 5). 그리고 1 당량으로 반응시킨 반응물에 다시 트리에틸아민 1 당량을 추가하여 반응시키면 점점 위쪽의 spot 는 작아지면서 아래 쪽 spot 가 증가하였다. 이러한 실험 결과로부터 3-수산기의 산도가 크기 때문에 염기는 먼저 3-수산기에 반응할 것이며, 염기를 1 당량 사용할 경우는 주로 3-수산기와 반응할 것으로 예측된다. 즉 TLC 에서 위쪽의 spot 는 3-O-phosphate 이고, 아래쪽의 spot 는 2-O-phosphate 로 생각할 수 있고, 또한 염기 존재하에서 3-O-phosphate 는 2-O-phosphate 로 전이됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로 염기를 1 당량 사용하였을 때는 3-O-phosphate 가 주생성물이나 scheme 1 과 같이 트리에틸아민을 2 당량 사용하였을 때는 2-O-phosphate 가 주 생성물이었다. 이것은 반응 중간 단계에서 3-O-phosphate 가 생성되고, 이것이 2-O-phosphate 로 전이되는지, 직접 2-O-phosphate 가 생성되는지는 알 수 없으나 scheme 1 의 주 생성물은 2-O-phosphate 임을 확인할 수 있었다. 마지막으로 화합물(4)의 탈보호 및 P-N 결합의 가수분해 반응으로 ASA-APPA 를 합성하였다. 일반적으로

1N 염산, 또는 황산 촉매 첨가 방법과 양이온 교환 수지를 이용하는 방법이 알려져 있으며, 여기서도 쉽게 적용할 수 있었다. 그러나 화합물 (4)의 수용액 자체가 강산성을 나타내는 점에 착안하여 본 연구에서는 무촉매 반응을 시도하였다. 문헌 [6,7]에 의하면 이소프로필리덴 보호기는 실온에서 1N 염산으로 2시간 반응시키면 탈보호되며 P-N 결합의 절단은 보다 격렬한 조건인 70°C, 1N 염산에서 2시간 반응으로 일어난다고 보고되어 있다. 그러나 화합물 (4)의 경우는 NMR tube 반응으로 확인한 바에 의하면, P-N 결합이 먼저 가수분해되며, 탈보호 반응이 느리게 진행됨을 알 수 있었다. 그래서 본 반응에서는 화합물 (4)을 물에 녹여 20% 수용액으로 한 후 50°C 에서 3시간 동안 가수분해 시켜 완전히 이소프로필리덴 그룹의 탈보호 및 P-N 결합이 가수분해되는 것을 확인하였고, 최종적으로 이 용액에 이소프로판올을 가하여 ASA-APPA 를 고체로 석출시켜 얻을 수 있었다.

2. ASA-APPA 의 안전성

ASA-APPA 의 생체에 대한 안전성 실험에 앞서 섬유아세포의 증식에 미치는 효과를 검토하였다. 결과 ASA-APPA 는 10mM 농도까지 오히려 섬유아세포의 증식 효과를 나타냄을 알았다. 이로 미루어 이 물질은 세포 독성은 거의 없는 것을 추정할 수 있었다. 그리고 이들의 독성 및 피부에 대한 자극 실험 결과는 Table 2 와 같다.

3. 섬유아세포의 증식 효과

ASA-APPA 는 아스코르브산과 3-APPA 가 결합되어 있는 것이다. 그러므로 이들이 세포 내에서 phosphatase 에 의해 분해되면 아스코르브산과 APPA 로 변화할 것으로 예측할 수 있다. 그러므로 ASA-APPA 의 섬유아세포의 증식에 미치는 효과를 아스코르브산, 3-APPA, 아스코르브산 + 3-APPA 혼합물과 비교하였다. 그 결과 Fig.

3 과 같이 섬유아세포의 증식 효과를 나타내었다. 여기서 보는 바와 같이 ASA-APPA 는 아스코르브산 + 3-APPA(1:1) 혼합물과 거의 유사한 섬유아세포 증식 효과를 나타내었다. 이 결과로부터 ASA-APPA 가 세포 내에서 일부 분해되어 섬유아세포의 증식에 효과가 있는 것으로 예상되며, 이들의 혼합물이 세포의 증식에 효과를 갖는 것으로 추정된다. 그리고 ASA-APPA 는 아스코르브산이나 3-APPA 보다 높은 농도에서 섬유아세포의 증식 효과가 나타났으며, 이것은 효소에 의해 APPA 와 아스코르브산으로 분해되어 효과를 나타내는 것으로 보다 높은 농도에서 효과가 나타난 것으로 생각된다.

4. 멜라닌 생성에 미치는 효과

일반적으로 생리활성 물질의 멜라닌 생성억제 효과를 보기 위하여는 우선 *in vitro* 에서 타이로시나제의 저해 효과가 있는지를 살펴보는 방법이 있다. 그러나 항산화 능이 있는 물질이거나 또는 금속이온들도 타이로시나제의 활성을 저해할 수 있으므로 타이로시나제의 저해효과가 있다고 하더라도 *in vivo* 에서 멜라닌 형성 저해 효과가 전혀 없는 경우가 많다. 또 다른 방법으로는 melanoma 나 멜라노사이트를 세포 배양하여 실제 어떤 물질이 멜라닌 생성을 얼마나 저해하는지를 실험하는 방법이 있다. 이 방법은 타이로시나제 저해효과를 살펴는 방법보다는 생체에 가까운 방법이나, 이 역시 실제의 *in vivo* 에서의 멜라닌 생성과는 차이가 있을 수 있다. 그러므로 실제로 동물실험이나, 사람에게 직접 임상실험을 하여 멜라닌 생성을 저해하는 효과를 실험하여야 한다. 이러한 임상 실험은 우선 자외선 등을 이용하여 미리 과잉의 멜라닌을 형성하게 한 후 실험 물질을 도포하여 멜라닌의 생성 저해 또는 원상태의 회복을 측정하는 방법과, 이상 멜라닌 색소 침착을 보이고 있는 대상자에게 직접 사용하여 피부색의 변화를 보는 방법 등이 있다. 본 연구에서는 우선 melanoma 에 대한 ASA-APPA 의 멜라닌 생성저해 효과를 이미 알려진 아

스코르브산과 도 ASA-APPA 와 구조가 유사한 PMg (ascorbic acid phosphate magnesium salt) 와 비교하여 측정하였다. 이 때 생성된 멜라닌 양은 475nm 에서의 흡광도로 측정하였다. Fig. 4 는 멜라닌 양과 흡광도와의 상관관계를 나타낸 것이다. Fig. 4 의 정량선으로부터 세포 배양에서 얻어진 멜라닌 양은 아래 식으로 계산하였다.

$$g/ml = (A_{474} - 0.011657) / 0.011917$$

Melanoma 에 각 시료를 첨가하였을 때 생성된 멜라닌량은 Table 3 과 같다. Table 3 의 결과에 의하면 ASA-APPA 는 melanoma 의 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다으나 아스코르브산에 비하여 작으며, PMg 와 거의 유사한 수준이었다. 이것은 ASA-APPA 가 melanoma 를 배양할 기간 내에 충분히 아스코르브산으로 분해되어 작용하지 못한 것이 아닌가 생각된다. 그러나 화장품에서 사용할 경우 melanoma 에서와는 달리 실제 그 효과는 경피를 통한 흡수되는 양과 진피 내에서 대사가 일어나지 않고 작용하는 시간과 관련이 있다. 그러므로 ASA-APPA 의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 이들의 경피흡수도 차이를 측정하고, 또 실제 *in vivo* 에서 실험이 진행되어야 하며, 임상을 포함한 경피 흡수 실험은 진행 중에 있다. 상기 melanoma 를 이용한 실험에서 알 수 있듯이 *in vivo* 에서는 ASA-APPA 가 지속적으로 멜라닌 형성 저해 작용을 나타낼 것으로 기대된다.

5. ASA-APPA 수용액의 안정성

ASA-APPA 가 화장품에 사용되었을 때 이들의 안정성을 살펴보기 위하여 현재 화장품에서 사용되고 있는 아스코르브산 유도체중 수용액에서 비교적 안정한 것으로 알려진 PMg 의 수용액과 안정성을 비교하였다. ASA-APPA 와 PMg 를 각각 1% 수용액으로 만든 후 5°C, 25°C, 45°C 각각에서 색상 및 침전의 변화를 육안으로 관찰하였다. 실험결과는 Table 4 와 같다. 즉 ASA-APPA 수용액은 후 5°C, 25°C 에서는

침전 형성이 거의 없었으며, 45°C 에서 30 일간 보관하여 비교하면 알 수 있을 정도로 약간 노란색으로 색상이 변화하였다. 그러나 이 정도의 색상 변화는 실제 화장품에 사용할 경우 색상의 변화로는 거의 문제가 없는 수준이었다.

IV. 결론

1. 화장품의 새로운 미백 원료로서 ASA-APPA 를 isopropylene L-ascorbic acid 와 2-chlorotetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine P-oxide 를 이용하여 고리 열림 반응을 이용하여 합성할 수 있었다.
2. ASA-APPA 는 안전성 실험에서 무독성이며, 무자극 물질이었다.
3. ASA-APPA 는 아스코르브산과 3-APPA 혼합물과 유사한 섬유아세포 증식 효과를 나타내었다.
4. Melanoma 를 이용한 멜라닌 생성 억제 효과는 ascorbyl phosphate magnesium salt 와 비슷하였다.
5. ASA-APPA 는 수용액은 ascorbyl phosphate magnesium salt 수용액에 비하여 침전 및 변색에서 안정성이 우수하였다.

V. 참고문헌

- [1]. G. Prota, "Melanin and Melanogenesis", Academic Press, NY. (1992)
- [2]. 일본공개특허 平 3-63211, 平 2-62810, 平 1-22810, 昭 62-19511, 昭 62-207312, 昭 62-19511, 昭 60-199810, 昭 58-26726
- [3]. H. Nomura, Chem. Pharm. Bull., 17, 381 (1969)

- [4]. S. M. Edwards, T. A. Donnelly, R. M. Sayre and L. A. Rheins, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **10**, 111 (1994)
- [5]. J. Ternow and J. Blount, *Tetrahedron*, **35**, 1483 (1979)
- [6]. US. Pat. 4,179,445 (1979)
- [7]. R. Li and R. A. Pascal, *J. Org. Chem.*, **58**, 1952 (1993)
- [8]. A. S. Curry, S. D. Gettings and G. N. McEween, (Ed.) "*CTFA Technical Guideline, Safety Testing Guideline*" CTFA, Washington (1991)
- [9]. 서기범, 윤소영, 이우재, 이증훈, 박장규, *대한피부과학회지*, **34(2)**, 279 (1996)
- [10]. T. Mosmann, *J. Immunological Methods*, **65**, 55 (1983)

Table 1. The Action Mechanism of the Depigmentation Materials

Depigmentation materials	Mechanism	Remarks
Sunscreen agent	Cuts off UV	No effect on pigmentation except blocking UV
SOD Glutathione	Scavengers free radicals	Obscure effect, not stable
Glucosamine, Galactosamine, Manosamine, Tunicamycin	Inhibits tyrosinase synthesis	No specificity to tyrosinase, Potent cytotoxic effect
Arbutin	Inhibits tyrosinase activity	Obscure effect
Kojic acid	Interrupts intermediates in melanin biosynthesis	Slightly skin irritation & allergy reaction, not stable
Hydroquinone	Cytotoxic effect on melanocytes	High toxicity to the skin
Tocopherol, Vitamin C der.	Reduces melanin formation	Not stable
Azelaic acid	Stimulates melanin elimination through the keratinocytes	Obscure effect

Table 2. Safety Data of ASA-APPA

Test		Result
Acute oral toxicity	LD50 > 5g/Kg	Non-toxicity
Acute dermal toxicity	LD50 > 2g/Kg	Non-toxicity
Primary skin irritation	0	Non-irritating
Eye irritation	PH = 1.5	Practically non-irritating
Skin sensitization	0	Weak sensitizer
Human patch	0.24	Non-irritating
Repeat insult human patch	0.29	Non-irritating

Table 3. The Effects of Melanin Synthesis on Melanoma Cell

Sample	Melanin (pg/cell)
Control	6.9
Ascorbic acid (0.05 mM)	5.9
ASA-APPA (1 mM)	6.2
PMg (1mM)	6.1

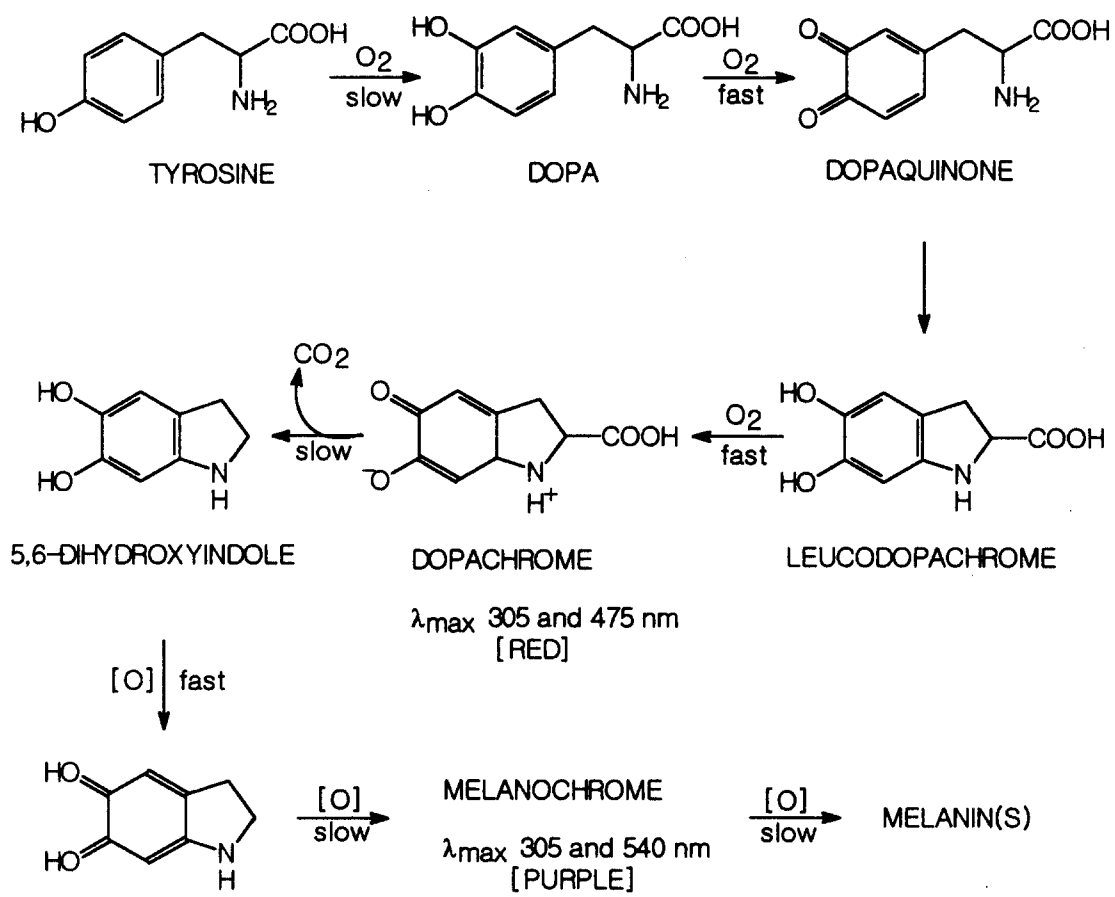
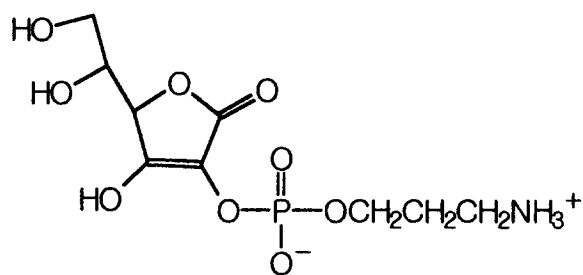
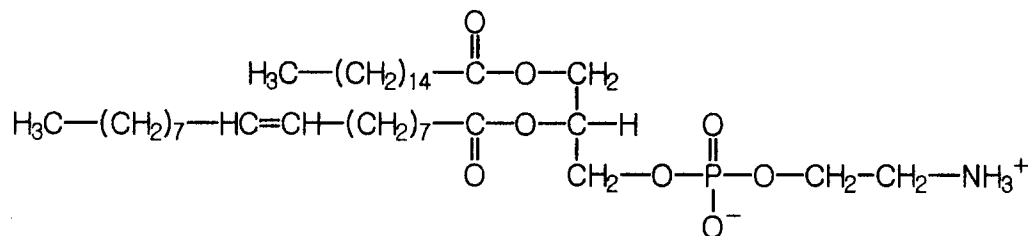


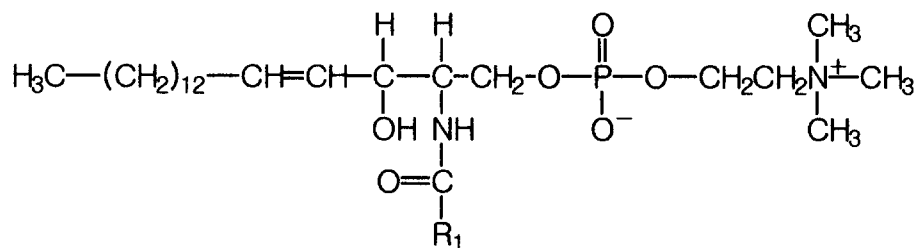
Fig. 1. Biosynthesis pathway of melanin



(1)



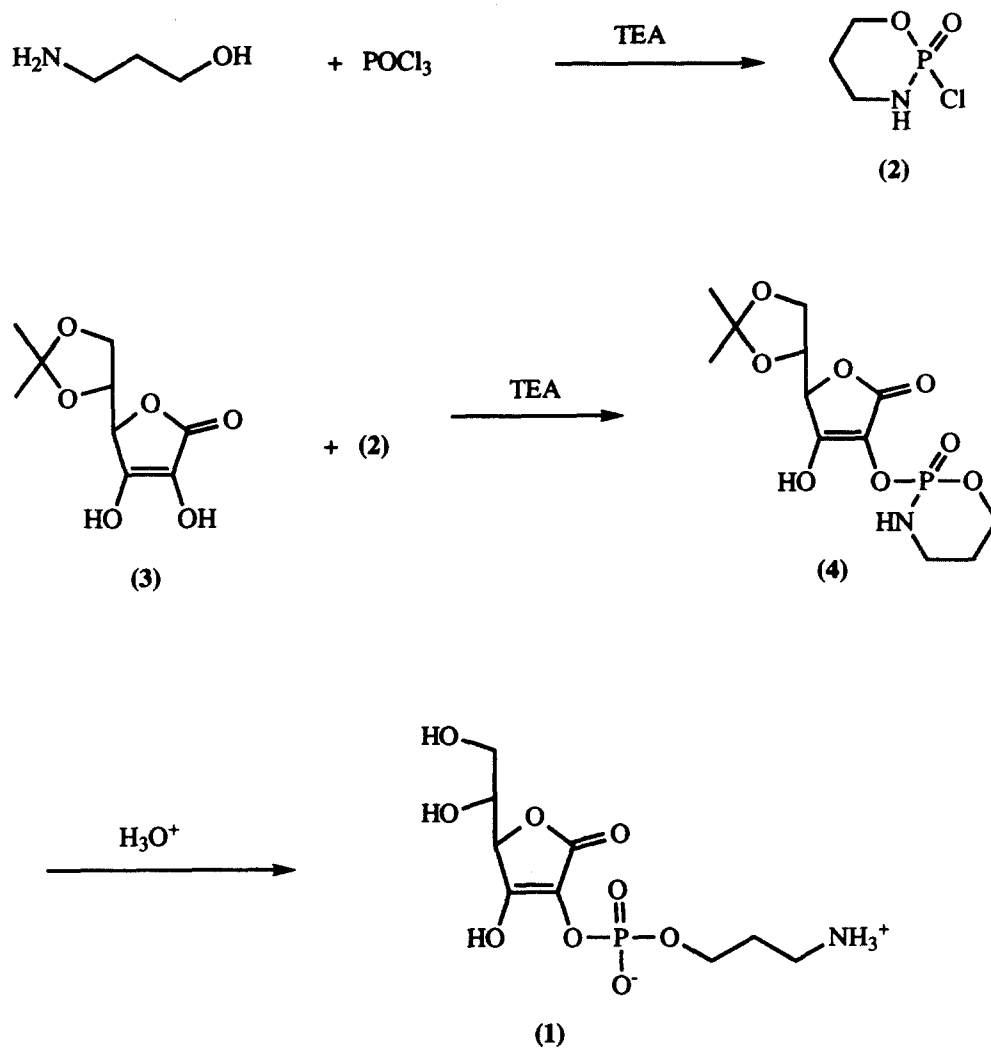
(2)



(3)

Fig. 2. Chemical structures of ascorbic acid-aminopropane phosphoric acid diester and phospholipids

- (1) Ascorbic acid-aminopropane phosphoric acid diester
- (2) PC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl ethanolamine)
- (3) Sphingomyelin



Scheme 1. Synthesis of ascorbic acid-aminopropane phosphoric acid diester

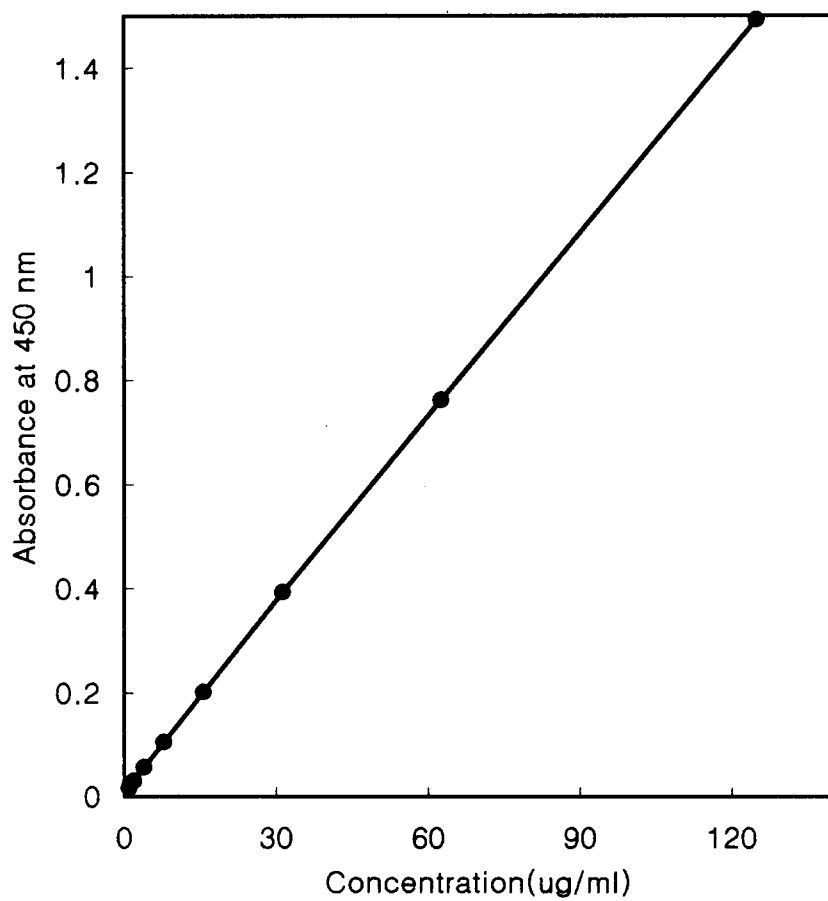


Fig. 3. Standard calibration curve of melanin at 475 nm

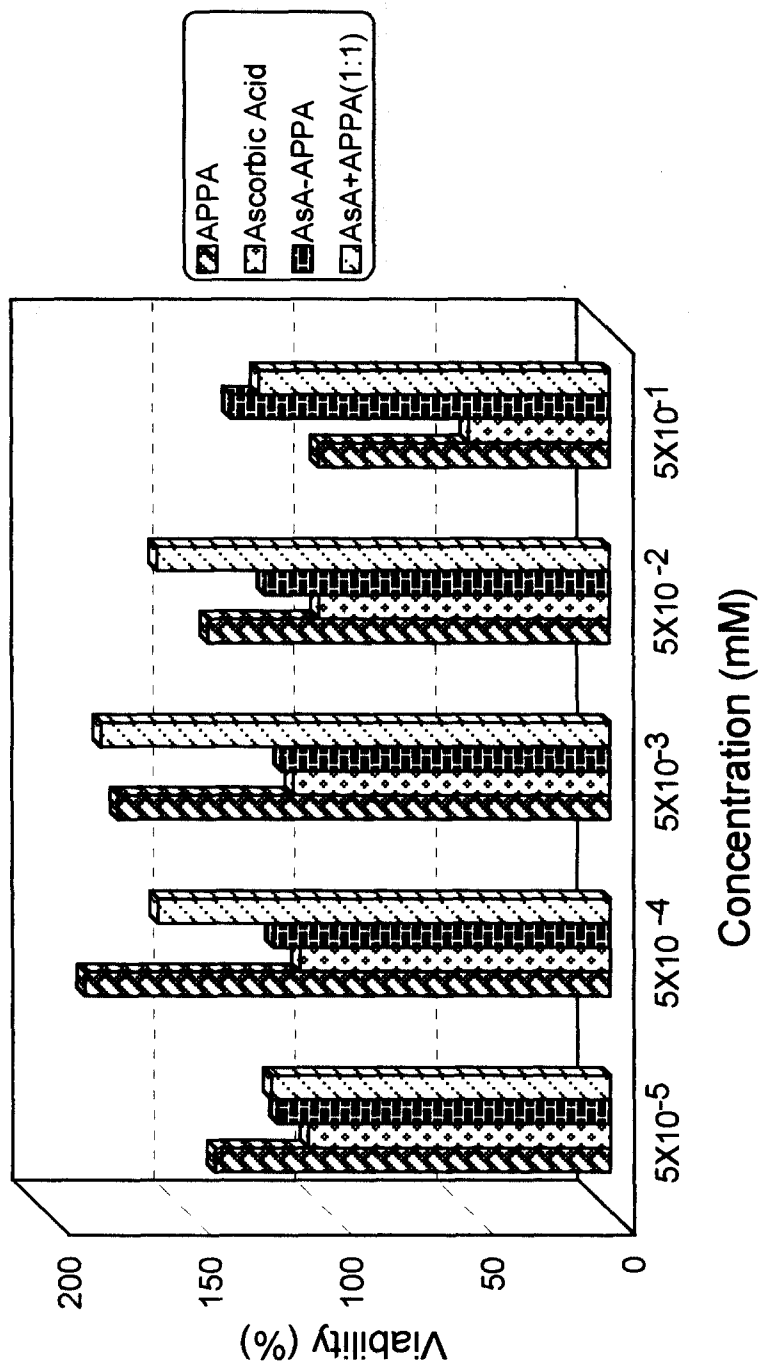


Fig. 4. The effects of ascorbic-aminopropane phosphoric acid diester on fibroblasts proliferation