

## 3-O-Cetyl-L-Ascorbic Acid의 미백 개선 효과

박 창 민<sup>†</sup> · 배 지 영 · 정 민 석 · 최 종 완

(주)한국화장품제조 기술개발연구소  
(2011년 3월 14일 접수, 2011년 3월 18일 수정, 2011년 3월 20일 채택)

### Whitening Effect of 3-O-Cetyl-L-Ascorbic Acid

Chang-Min Park<sup>†</sup>, Ji-Young Bae, Min-Seok Jung, and Jong-Wan Choi

R&D Center, Hankook Cosmetics MAFG Co., Ltd., 76-1, Yongseong-Ri, Samseong-Myeon,  
Eumseong-Gun, Chungcheongbuk-Do 369-834, Korea

(Received March 14, 2011; Revised March 18, 2011; Accepted March 20, 2011)

**요약:** 외부 자극에 대하여 개개인의 건강한 피부를 유지하는데 있어서 악화 원인으로는 콜라겐 섬유 감소, 탄력섬유 변성, 멜라닌 생성, 활성산소종 등이 있다. 이로 인한 피부탄력감소 및 기미, 잡티 등의 피부 문제점을 개선하기 위해 대표적으로 비타민 A, C 및 그 유도체들이 화장품에 적용되고 있지만 안정성의 문제점이 있어 새로운 유도체들의 합성 개발에 노력을 기울이고 있다. 본 연구에서는 피부개선을 위한 화장품 원료로 비타민 C로부터 새롭게 합성된 3-o-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE)의 미백 개선과 관련된 효능·효과를 평가하였다. VCCE의 *in vitro* 실험 결과 멜라닌의 합성을 20 µg/mL에서 대조군과 비교하여 최대 44 % 억제시켰으며 세포 내 tyrosinase 발현을 저해하였다. 또한 인체적용시험에서 자외선 조사에 의한 인공 색소 침착을 유발한 후 8주 동안 피부 밝기를 측정한 결과 8주 후 통계적으로 유의한 수준의 피부 미백 효과를 나타내었다. 결론적으로 VCCE는 미백 개선을 위한 화장품 성분으로서 높은 응용 가치를 제시한다.

**Abstract:** Deficiency of collagen regeneration, denaturalization of fibers, increased melanin synthesis and reactive oxygen species are important factors inducing deterioration of healthy skin function. They induce freckles and decrease in skin elasticity. Vitamin C, vitamin A and their derivatives have been used as cosmetic ingredients for improvement of these problems but they have various problems. We have been developing the various derivatives of these ingredients. In this study, we investigated whitening effect of 3-o-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE), a new vitamin C derivative. The VCCE inhibited melanogenesis in a dose dependent manner(44 % at 20 µg/mL) and tyrosinase expression. For 8 weeks, we also investigated skin brightening effect of VCCE on pigmented spots in UV-irradiated human skin. In results, VCCE showed a statistically significant skin whitening effect by mechanical and visual evaluation. Taken together, our findings suggest that the VCCE has potential benefits as an active ingredient for whitening cosmetics.

**Keywords:** 3-o-cetyl-L-ascorbic acid, whitening, ascorbic acid

## 1. 서 론

Ascorbic acid의 효과는 항산화, 콜라겐 합성, 미백 3가지로 구분할 수 있다. 자외선은 피부에 가장 많은 영향을 미치는데, 자외선에 의해 피부는 늘 손상을 받고 있다.

자외선에 의해 발생되는 활성산소는 피부노화의 주범으로 ascorbic acid는 활성산소의 작용을 억제하는 항산화제로서 노화방지효과가 있다[1,2]. 그리고 진피의 주성분인 콜라겐 합성에 보조역할을 함으로서 주름개선과 예방효과를 지닌다. 또한 자외선 노출과 정상적인 노화에 의해 야기된 불균일한 색소 침착을 완화시키는데, 멜라닌 생성을 억제하고 산화된 멜라닌을 환원하여 색소 침

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: cmpark@ihkcos.com)

착을 예방하며 기미, 주근깨 치료 등에 사용된다[3-6]. 그러나 ascorbic acid는 열, 공기, 금속, 빛 등에 의해 쉽게 산화되어 파괴되는 단점이 있다. 특히, 화장품에 배합하면 경시변화가 일어나는 등의 문제가 발생한다. Ascorbic acid의 산화를 방지하기 위해서는 pH 2 ~ 3의 강산영역의 환경을 유지해 주어야 하므로 사용에 매우 제한적이다. 이와 같이 우수한 효과에도 불구하고 ascorbic acid를 화장품에 직접 적용하기는 쉽지 않다. 따라서 이런 문제점을 해결하기 위하여 안정성 및 피부투과성이 용이한 인산 에스테르, 지방산 에스테르 등을 결합한 ascorbic acid 유도체들이 사용되고 있다. Ascorbic acid의 유도체는 구조상 안정하고 수용액에서 안정화되기 쉬우며, 생체 내에서는 ascorbic acid로 대사되어 안전하다. 또한 기존 ascorbic acid를 정상적인 약산성 피부에 적용 시 산화가 촉진되는 문제점이 있어 피부 도포 시 효과가 없는 반면 ascorbic acid 유도체는 약산성에서도 안정성을 보인다[7-10]. Ascorbic acid 유도체를 screening 하는 과정에서 ascorbic acid의 3번 위치에 있는 수산기에 cetyl기가 ether 결합된 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid는 이전에 시행된 연구결과 의하면 procollagen peptide가 정상적으로 folding하게 하는데 관여하는 샤페론 단백질의 하나인 Heat Shock Protein 47 (HSP47)의 발현량을 높여 세포 외로 분비되는 콜라겐의 양을 증가시키는 물질로 보고되었다. 이러한 메커니즘을 토대로 주름개선효과를 알아보기 위하여 *in vitro*에서 콜라겐 합성 효과 및 임상실험 결과를 바탕으로 주름 개선에 탁월한 효과가 있다는 연구결과를 보고하였다[11,12]. 본 연구에서는 ascorbic acid의 유도체인 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid에 대하여 피부 개선을 위한 화장품 원료로 주름개선 뿐만 아니라 피부 미백개선과 관련한 효능·효과를 평가하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 세포배양 및 시약

한국세포주은행로부터 구입한 mouse melanoma (B16F10) 세포를 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)으로 10 cm cell culture dish에 10 mL의 배지로 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 세포가 70 ~ 80 % confluency가 되도록 배양한다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, confluency에 도달한 세포는 trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization한 후 계대 배양하여 유지한다. 시약으로 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE)

는 일본 NIKKO chemical사로부터 제공받았으며 L-ascorbic acid와 MTT (Sigma-aldrich, USA), trypsin-EDTA (Invitrogen, USA), DPBS (WelGENE, Korea), tyrosinase와 actin 항체 (Santa Cruz Biotechnology, USA), protein Assay solution (BIO-RAD, CA, USA) 제품을 사용하였다.

### 2.2. 세포독성측정

Mouse melanoma (B16F10) 세포를 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)으로 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 배양된 mouse melanoma 세포를 96-multiwell plate에 각각 1 × 10<sup>4</sup> cells/well로 접종하고 24 h 배양한다. 배양된 세포의 배지를 2 % FBS 배지로 교체하고 각각 시료를 처리 농도 별로 배지에 희석하여 처리한 후 48 h 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다. 배양이 끝난 세포에 PBS (phosphate buffered saline)에 용해한 MTT stock 용액(5 mg/mL)을 배양 배지 부피에 최종적으로 1/10되게 첨가하여 37 °C에서 4 h 반응시킨다. 반응 후 배양 상등액을 제거하고 각각의 well에 DMSO 200 μL를 첨가하여 세포에서 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시킨 후 ELISA reader (Molecular devices, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.3. 멜라닌 정량

Mouse melanoma (B16F10) 세포를 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지로 6 well-plate에 well당 1 × 10<sup>5</sup> cells/mL씩 접종한 후 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 하에서 세포가 well 바닥에 약 80 % 이상 부착될 때까지 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 각각 세포독성을 일으키지 않는 농도(5, 10, 20 μg/mL)로 배지에 희석하여 교체 처리한 후 72 h 동안 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 하에서 배양한다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 trypsinization하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 10,000 rpm으로 10 min 동안 원심 분리한 다음 상등액을 제거하여 세포 pellet을 얻었다. 이 세포 pellet을 60 °C에서 건조한 후 10 % DMSO가 함유된 1 M 수산화나트륨액 200 μL를 넣어 60 °C 항온조에서 세포 내 멜라닌을 얻었다. 이 액을 가지고 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포 일정 수당 멜라닌 양을 구하기 위하여 위와 동일한 조건하에서 각

각 농도에 대하여 MTT assay를 수행하여 세포 일정 수당 멜라닌 양을 구하였다.

#### 2.4. Western Blot Analysis

각각의 시료를 48 h 처리한 B16 melanoma 세포를 lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -glycerolphosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mg/mL leupeptin, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기에서 얻은 상층액을 12 % SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 분리하고 이를 nitrocellulose membrane (0.2 mm, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 이전시켰다. Membrane을 5 % skim milk 함유된 TBS-T를 이용하여 blocking한 후 1차 및 2차 항체를 반응시켰다. 반응 후 ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (Amersham, UK)를 이용하여 화학발광 후 발현량을 관찰하였다.

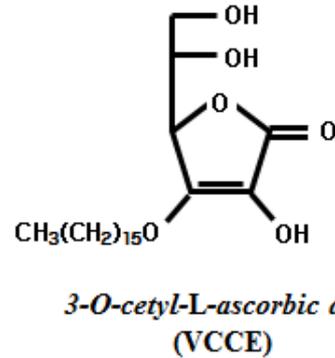
#### 2.5. VCCE 함유 크림의 피부 미백 개선 효과

##### 2.5.1. 육안평가

미백 개선 효과 육안 평가를 위하여 22명의 피검자를 대상으로 최소 홍반량을 판정한 후에 인공 색소 침착을 위해 인공자외선 방출기 (Multi-port Solar simulator 601-300 W Solar Light, USA)를 사용하여 2.5 MED 광량으로 1회에 걸쳐 광조사를 실시하였다. 시험부위의 피부 색상은 두 명의 전문의에 의해 이중 맹검법으로 평가되었다. 평가는 인공색소 침착 7일 경과 후(0 week), 시료도포 4주 경과 후(4 week), 시료도포 6주 경과 후(6 week), 시료도포 8주 경과 후(8 week)로 8단계로 구분하여 평가하였다. 시험시료와 대조시료간의 평균값 차이를 구하여 paired t-test를 통해 95 % 신뢰구간에서 \*  $p < 0.05$ 로 유의성 여부를 확인하였다.

##### 2.5.2. 기기적 평가

육안평가단계에서 인공자외선 방출기를 사용하여 2.5 MED 광량으로 광조사된 인공 색소 침착 부위의 피부미백효과 측정은 Chromameter CR-400 (Minolta, Japan)을 이용하여 22명의 피검자를 대상으로 색소 침착된 부위의  $L^*$  value (채도인자) 변화를 측정하여 미백 개선 효과를 평가하였다. 평가는 자외선 조사 7일 경과 후(0 week), 시료 도포 4주(4 week), 6주(6 week), 8주(8 week) 경과 후 측정 하였다. 측정 후 최대값과 최소값을 제외한 3회의 평균값을 구하였다. 시험시료와 대조시료 간의 평



**Figure 1.** Chemical structure of 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE).

값 차이를 구하여 paired t-test를 통해 95 % 신뢰구간에서 \*  $p < 0.05$ 로 유의성 여부를 확인하였다.

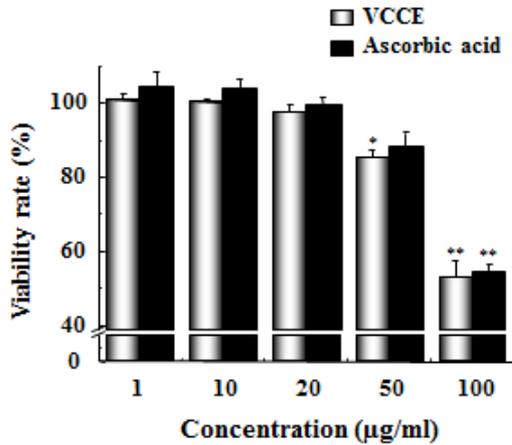
### 3. 결 과

#### 3.1. VCCE의 구조 및 세포독성 측정 결과

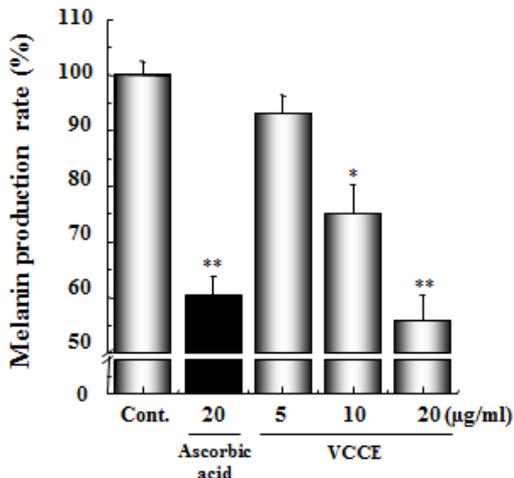
새로운 비타민 C 유도체인 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE)의 화학적 구조의 특징은 비타민 C의 3번째 수산기에 cetyl기가 ether 결합을 한 구조이다(Figure 1). 비타민 C와 다른 구조적 특징을 보이는 VCCE의 *in vitro* 미백 효과를 평가하기 위하여, 일차적으로 세포 자극을 일으키지 않는 VCCE의 농도 범위를 평가하였다. B16F10 mouse melanoma 세포에 대하여 농도 변화에 따른 VCCE와 ascorbic acid의 세포독성을 평가한 결과, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도 처리시 세포생존율이 95 % 이상으로 세포자극이 없음을 확인하였지만 그 이상의 농도에서는 세포 생존율이 저하되었다(Figure 2). 이러한 세포 독성 실험 결과를 바탕으로 이후 *in vitro* 실험에서는 최대 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도까지 처리하여 VCCE의 미백 개선 효능 평가를 실시하였다.

#### 3.2. 세포 내 멜라닌 생합성 저해 효과

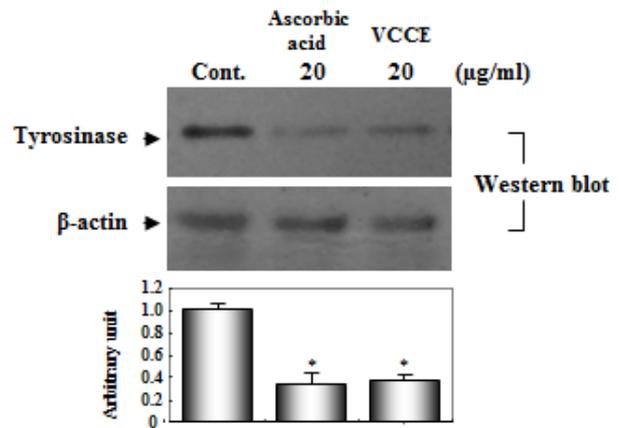
VCCE의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 평가함으로써 미백 개선 효과를 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성 억제 효과를 측정하였다. 세포에 VCCE를 농도별로 5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하고 세포를 수립하여 멜라닌 양을 측정된 결과, 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 최대 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 44 % 멜라닌 합성이 억제됨을 알 수 있었다. 상대적으로 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid는 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약



**Figure 2.** Cell viability of 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE) and ascorbic acid. B16F10 mouse melanoma cells were treated with various concentrations and cell viability measured by MTT assay described in Materials and Methods. The results are represented as mean standard deviation (SD) of three independent experiments. Bars represent the mean ± S. D. \* 0.01 < p < 0.05, \*\* 0.005 < p < 0.01 versus control.



**Figure 3.** The effect of 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE) and ascorbic acid on melanin production in B16 mouse melanoma cells. B16 melanoma cell treated with melanization inducer (0.2 µM α-MSH, 2 mM theophylline) for melanin synthesis. B16 melanoma cells were treated with indicated concentration and compared with arbutin. The results are represented as mean standard deviation (SD) of three independent experiments. Bars represent the mean ± S. D. \* 0.01 < p < 0.05, \*\* 0.005 < p < 0.01 versus control.



**Figure 4.** Inhibition of tyrosinase by 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE) and ascorbic acid in B16 mouse melanoma cells. B16 melanoma cell treated with melanization inducer (0.2 µM α-MSH, 2 mM theophylline) for tyrosinase expression. Cells were lysed in lysis buffer and subjected to Western blot for the detection of tyrosinase expression as described in Materials and Methods. B16 melanoma cells were treated with indicated concentration and compared with arbutin. Western blot bands were subjected to densitometric scanning using the Scion image NIH image software. The results are represented as mean standard deviation (SD) of three independent experiments. Bars represent the mean ± S. D. \* p < 0.01 versus control.

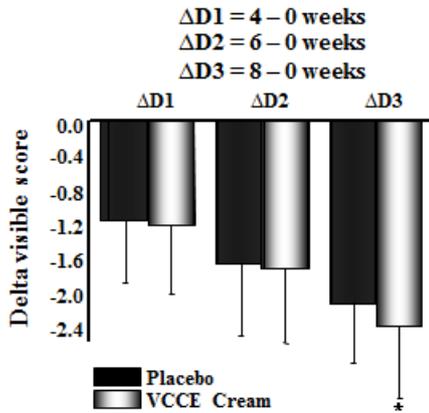
39 % 멜라닌 합성 억제 효과로 유의한 수준의 억제율을 나타내었다(Figure 3).

### 3.3. 세포 내 Tyrosinase 단백질 발현 저해 효과

3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE)의 미백 효과를 증명하기 위하여 melanocyte의 멜라닌 합성에 있어서 tyrosine을 dopa와 dopaquinone으로 전환시켜주는 주요한 조절 단계에 관여하는 tyrosinase의 발현 억제 효과를 조사하였다. VCCE와 양성 대조군인 ascorbic acid를 처리한 세포의 전체 단백질을 얻어 tyrosinase 항체를 이용하여 western blot을 수행하였다. 실험 결과 VCCE와 양성대조군인 ascorbic acid는 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase 발현을 유의한 수준으로 억제하였다(Figure 4).

### 3.4. VCCE를 함유한 크림의 육안 평가에 의한 미백 개선 효과

In vitro 실험에서 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE)의 tyrosinase 발현 및 멜라닌 합성 억제 효과가 실제적으로 사람 피부의 미백 개선에 도움을 주는지 확인하기

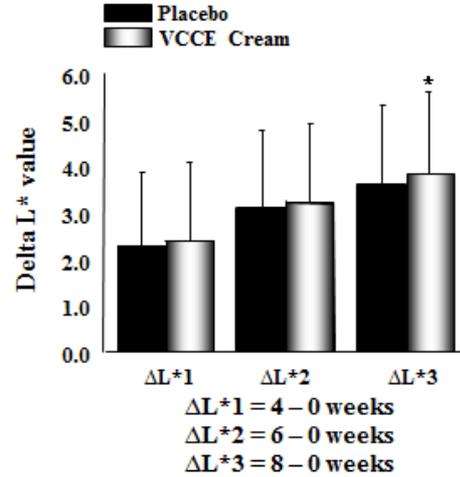


**Figure 5.** Whitening effect of cream containing 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE) by visual evaluation, we investigated skin bright value during 8 weeks after induction of pigmentation in human skin from UV irradiation as described in Materials and Methods. The results are expressed as \*  $p < 0.05$  versus placebo.

위하여 VCCE를 0.5 % 함유한 화장료에 대하여 인체 적용 시험을 실시하였다. 자외선 조사에 의한 마지막 인공 색소 침착 7일 경과 후, 시료 도포 4주, 6주, 8주 경과 후 시험자들을 대상으로 8단계로 구분하여 VCCE를 포함한 화장료와 포함하지 않은 화장료 간의 판정값 차이를 구하여 paired t-test를 통해 95 % 신뢰구간에서  $p < 0.05$ 로 유의성 여부를 확인한 결과 통계학적으로 유의한 미백 효과를 나타내었다(Figure 5).

### 3.5. VCCE를 함유한 크림의 기기적 평가에 의한 미백 개선 효과

육안 평가를 통하여 통계학적으로 유의한 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE)의 미백 개선 효과 결과를 더욱 확인하기 위하여 기기적 평가에 의한 미백 개선 효과를 조사하였다. 육안 평가 방법과 동일하게 VCCE를 0.5 % 함유한 화장료에 대하여 인체 적용 시험을 실시하였다. 자외선 조사에 의한 마지막 인공 색소 침착 7일 경과 후, 시료 도포 4주, 6주, 8주 경과 후 시험자들을 대상으로 chromameter CR-400을 이용하여 색소 침착된 부위의 밝기 변화를 총 4회 측정하여 평균값을 얻었다. 결과는 VCCE를 포함한 화장료와 포함하지 않은 화장료 간의 평균값 차이를 paired t-test를 통해 95 % 신뢰구간에서  $p < 0.05$ 로 유의성 여부를 확인한 결과 화장품 도포 8주 후 통계학적으로 유의한 수준의 미백 효과를 나타내었다(Figure 6).



**Figure 6.** Whitening effect of cream containing 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE) by mechanical evaluation, we investigated skin bright value using chromameter CR-400 after induction of pigmentation in human skin from UV irradiation as described in Materials and Methods. The results are expressed as \*  $p < 0.05$  versus placebo.

## 4. 고 찰

피부노화, 주름개선 및 변함없이 고운 피부를 유지하기 위한 기능성 화장품에 대한 소비자의 니즈가 증가되면서 새로운 기능성 성분에 대한 지속적인 연구개발이 매우 활발하게 진행되어 오고 있다. 따라서 본 연구는 비타민 C 유도체인 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid (VCCE)의 기능성 화장품 원료로서의 이용 가능성과 관련하여 미백 개선에 대한 효능·효과를 평가하였다. *In vitro* 및 인체 적용시험 결과 ascorbic acid의 불안정성의 단점을 극복한 VCCE는 미백 개선 효과가 우수하였으며, 인체 적용 시험에서도 VCCE를 함유한 화장료는 피부자극이 없으면서, 매우 우수한 미백 개선 효과를 보였다. 결론적으로 VCCE에 대한 세포 및 인체 시험 연구 결과를 바탕으로 VCCE는 미백 개선에 탁월한 효과를 보이는 새로운 Vitamin C 유도체임을 증명하였다.

## 참 고 문 헌

1. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects, *J Dermatol Sci.*, **58**(2), 85 (2010).
2. M. P. Lupo, Antioxidants and vitamins in cosmetics, *Clin Dermatol.*, **19**(4), 467 (2001).

3. O. Sorg, C. Antille, G. Kaya, and J. H. Saurat, Retinoids in cosmeceuticals, *Dermatol Ther.*, **19**(5), 289 (2006).
4. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function, *Clin Geriatr Med.*, **17**(4), 617 (2001).
5. B. A. Gilchrest, A review of skin ageing and its medical therapy, *Br J Dermatol.*, **135**(6), 867 (1996).
6. H. Torras, Retinoids in aging, *Clin Dermatol.*, **14**(2), 207 (1996).
7. J. H. Saurat, Retinoids, and ageing. *Horm Res.*, **43**(1), 89 (1995).
8. K. E. Burke, Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals, *Dermatol Ther.*, **20**(5), 314 (2007).
9. M. Kessler, G. Ubeaud, T. Walter, F. Sturm, and L. Jung, Free radical scavenging and skin penetration of troxerutin and vitamin derivatives, *Dermatolog Treat.*, **13**(3), 133 (2002).
10. M. P. Lupo, Antioxidants and vitamins in cosmetics, *Clin Dermatol.*, **19**(4), 467 (2001).
11. S. Hashimoto, New active ingredient and complex emulsifying agent, *Fragrance J.*, **10**, 46 (2006).
12. C. M. Park, S. Y. Lee, M. S. Joung, and J. W. Choi, Anti-wrinkle effect of 3-*o*-cetyl-L-ascorbic acid, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(4), 303 (2008).