

아세로라 추출물 혼합 리포솜의 주름, 미백 효과에 대한 연구

김수진¹ · 오원준¹ · 권성필² · 남개원^{3,†}

^{*}(재)한국화화용합시험연구원 헬스케어첨단화학연구소

^{**}청담씨디씨제이앤팜

^{***}서원대학교 바이오코스메틱학과

(2021년 12월 10일 접수, 2021년 12월 24일 수정, 2021년 12월 27일 채택)

Studies on Anti-Wrinkle and Whitening Effects of Liposomes Containing Acerola Extract Mixture

Su Jin Kim¹, Won Jun Oh¹, Sung Pil Kwon², and Gaewon Nam^{3,†}

¹Healthcare Advanced Chemical Institute, Korea Testing and Research Institute, 12-63, Sandan-gil, Hwasun-eup, Hwasun-gun, Jeollanam-do, 58141 Korea

²ChungdamCDC JNPharm LLC

³Department of Bio-cosmetics, Seowon University

(Received December 10, 2021; Revised December 24, 2021; Accepted December 27, 2021)

요약: 아세로라는 천연 비타민 C 함량이 높아 우수한 원료이지만 안정화하기가 어려워 화장품 소재로서의 연구가 거의 이루어지지 못하고 있다. 따라서 본 연구는 아세로라 추출물을 안정화시키는 혼합 리포솜 제형을 제조하여, 안전성 시험으로 BCOP assay 및 HET-CAM assay를 통한 안점막자극시험, 인체피부 일차자극시험을 통한 피부자극시험을 평가하였다. Tyrosinase 활성저해, melanin 생성저해를 통한 미백 효과 및 procollagen type-I C-peptide 생성을 통한 주름 효과를 평가하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 또한, 아세로라 추출물 혼합 리포솜이 함유된 크림을 제조하여 시험대상자를 대상으로 피부주름, 피부미백에 대한 인체효능평가를 진행하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 BCOP assay, HET-CAM assay 및 인체피부 일차자극 시험결과에서 모두 자극을 보이지 않아 피부 및 안자극에서 안전함을 확인하였다. Tyrosinase 활성저해능을 확인한 결과, 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 75.8%의 tyrosinase 활성 저해능을 확인하였으며, melanin 생성 저해시험에서 B16F10 세포주의 생존율에 영향을 미치지 않는 아세로라 추출물 혼합 리포솜 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 46.2%의 멜라닌 생성 저해능을 확인하였다. Procollagen type-I C-peptide에서 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 HS68 세포주의 생존율에 영향을 미치지 않는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 152.1%의 collagen 합성능을 확인하였으나, MMP-1 활성억제는 확인할 수 없었다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜이 함유된 크림에 대한 피부주름 및 피부멜라닌 인체효력평가에서 피부주름 지표와 피부멜라닌 지표에서 통계학적으로 유의하게 개선됨을 확인하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 아세로라 추출물 혼합 리포솜이 안자극과 피부자극을 나타내지 않는 안전한 천연 소재임을 확인하였으며, 피부 주름 개선 및 미백 화장품 소재로서 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Abstract: Acerola is an excellent ingredient because of its high natural vitamin C content, but it is difficult to stabilize and has hardly been studied as a cosmetic material. Therefore, this study developed a mixed liposome preparation for stabilizing acerola extract. As a safety test, the skin irritation test was evaluated by BCOP assay and HET-CAM assay. We evaluated the inhibition of tyrosinase activity, the whitening effect of melanin production, and the wrinkle effect of

† 주 저자 (e-mail: skarod@gmail.com)
call: 043-299-8494

prochloragetype-I C-peptide production, and confirmed the possibility of functional cosmetics. In addition, a cream of liposomes containing acerola extract mixture was developed to evaluate the clinical studies of skin wrinkles and whitening. BCOP assay, HET-CAM assay and human skin primary irritation test results of liposomes containing acerola extract mixture showed no irritation and were safe from skin and eye. The result of tyrosinase activity by 75.8% at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As a result of the melanogenesis inhibition test, liposome with acerola extract showed the melanin content by 46.2% at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ that does not effect the viability of the B16F10 cell line. The result of collagen production test using ELISA kit, liposomes containing acerola extract mixture showed collagen synthesis ability by 152.1% at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ that does not affect the viability of the HS68 cell line. But it did not showed any inhibition of collagenase (MMP-1) activity at all concentrations in the MMP-1 activity inhibition test in the HS68 cell line. We performed clinical studies for the whitening and skin-wrinkle activity of cream containing acerola extract mixes liposome, was showed that the melanin contents and wrinkle was statistically significant reduction. These results suggest that liposomes containing acerola extract mixture have safe natural material, and skin wrinkle, whitening effects allowing their application in cosmetics as a natural product.

Keywords: acerola extract, liposome, anti-aging, whitenign, cosmetics

1. 서 론

최근 화장품 원료 트렌드는 천연물질을 이용한 화장품이라 할 수 있다[1]. 의약품이나 화장품 원료로서 다양한 화학물질이 활용되고 있으나, 피부자극 및 안자극과 같은 다양한 부작용이 밝혀지고 있다[2-4]. 화장품은 의약품과 달리 건강한 사람들이 평생에 걸쳐 사용하는 제품으로 피부에 대한 안전성 확보가 더욱 중요하다[5]. 화장품의 안전성에 대한 소비자들의 요구는 증가하고 있으나 식약처에서 고시한 기능성원료에 대한 자료가 많지 않고 화학 원료의 부작용들이 보고되고 있어 소비자의 요구를 충족시키지 못하고 있다[6]. 이러한 부작용을 극복하기 위해 다양한 생리활성 기능을 보유한 식물체 유래 천연소재에서 기능성 화장품의 원료를 탐색하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다[7].

아세로라(acerola)는 *Malpighia glabra* (*M. glabra*)에서 추출된 것으로 천연비타민C의 함량이 높은 우수한 원료로서 영양적 가치, 건강증진 기능성과 의학적인 측면에서 매우 주목되는 과실이다[8].

아세로라에서 가장 많이 함유된 ascorbic acid는 신진대사 기능을 유지하는 유기물질로 인체에서 가장 풍부하고 수용성이 높은 항산화 물질이다[9,10]. Ascorbic acids는 인체의 다양한 신진대사 과정에 관여하며, 활성산소를 중화시키는 산화-환원 과정에서 효소 보조 인자로 작용한다. 또한, 햇빛에 노출되어 생성된 활성 산소 종(ROS)으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 이는 햇빛에 노출된 피부의 염증 반응을 최소화할 수 있으며, 티로시나아제 억제제로 피부 미백에도 사용되어 왔으며, 피부의 주요 구조 단백질

인 콜라겐의 합성을 위한 핵심적인 기능을 한다[11]. 그러나 ascorbic acid는 친수성이기 때문에 피부의 바깥층으로부터 침투될 수 없고, 산소, 빛, 열에 대한 안정성이 낮기 때문에 화장품 분야에서 상업적 사용을 위한 활성도를 개발하고 유지하기 어려운 점이 많다[12].

인체의 외부 표면을 덮고 있는 조직인 피부는 신체 중 가장 큰 기관으로 물리적, 화학적인 외부요인로부터 신체를 보호하고 대사에 필요한 생화학적 기능을 영위하는 매우 중요한 기관이다[13].

피부는 크게 표피, 진피, 피하지방으로 구성되어 있으며 표피에는 피부색을 결정하는 멜라닌 세포가 분포하고 진피층에는 피부의 주름 및 탄력과 관련된 콜라겐이 존재한다[14].

피부에 외부로부터 자극을 받거나 자외선에 영향을 받으면 멜라닌형성세포가 멜라닌(melanin)을 형성한다[14]. 이러한 melanin은 각질형성세포로 전달되고, 각질형성세포로 이동함에 따라 melanin으로 인한 피부색의 변화를 육안으로 확인할 수 있게 된다[14]. 이처럼 피부색을 나타내는 주요 인자인 melanin은 주로 tyrosinase 효소에 의해 합성된다. Melanin 생합성에 관련된 인자는 tyrosinase, dopachrome conversion factor, prostaglandin (PG), interferon (IFN), melanocyte stimulating hormone (MSH), vitamin D3, histamine 등으로 확인되었다 [15]. Melanin은 단백질인 tyrosinase 및 tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의하여 tyrosine hydroxylase, DOPA oxidase 등의 합성과정을 통하여 형성된다[16].

진피층에는 type I collagen과 type III collagen이 존재하며 type I collagen은 자외선에 의해 노화된 피부에서 함량이 감소되며 피부노화 과정에서 관찰되는 중요한 콜라겐

타입이다[17]. 일반 피부에서는 type I collagen의 합성과 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 효소에 의한 분해가 균형을 이루며, 콜라겐 합성과 분해의 불균형은 피부의 주름을 형성하게 된다[18]. 콜라겐은 fibroblast에서 procollagen을 거쳐 합성되며 진피섬유아세포에서 발현된 pro-alpha 1과 pro-alpha 2 사슬은 삼중나선(triple helix) 구조를 이루면서 콜라겐의 전구체인 procollagen으로 만들어져 세포 밖으로 분비된다[14]. Procollagen은 N-말단과 C-말단이 propeptidase와 endopeptidase에 의해 분리된 후 각각의 사슬이 중합되어 콜라겐 섬유를 형성하게 된다[19]. 진피섬유아세포는 matrix metalloproteinase (MMP) 중 하나인 콜라겐분해효소 collagenase를 생성하여 콜라겐의 양을 조절한다[14].

피부의 침투성을 높이고 불안정한 생리활성 물질을 안정화하기 위해 다양한 제형기술이 활용되고 있다[19]. 이러한 방법 중 하나인 리포솜 제형은 유효성분을 화장품을 통해 안정하게 피부에 흡수시킬 수 있는 대표적인 방법이다[20].

따라서 본 연구에서는 생리활성 성분들의 불안정성으로 인해 활용성이 제한받아온 아세로라에 대해 리포솜 제형 기술을 활용하여 아세로라 추출물의 안정화를 개선하고 안점막자극시험과 인체피부자극시험을 통한 안전성평가, 콜라겐생성시험 및 콜라게나제 활성억제시험을 통한 주름 효능, 타이로시나제 활성저해시험 및 멜라닌생성억제시험을 통한 미백 효능을 확인하여 기능성 화장품 원료로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에서 사용된 아세로라 추출물은 아세로라 열매를 팬아시아 마케팅(Korea)에서 구입하여 제이앤팜유한책임회사(Korea)로부터 공급 받은 아세로라 열매 추출물을 사용하였다. 열매 추출물로 만들기 위해 아세로라 열매는 다음과 같은 방법으로 추출하였다.

아세로라 열매 동결건조 분말을 초임계 추출법으로 지용성 성분이 제거된 pellet을 만들고 이 pellet을 증류수와 1 : 20 비율로 용해하여 수용액으로 제조 후 질소퍼징추출법으로 추출물의 유효 성분의 파괴를 최소화하여 상온에서 추출하였다. 이 추출액을 4 °C, 3,500 rpm으로 10 min 동안 원심분리하여 침전을 제거하였다. 얻어진 상층액을 1.0 μm 필터를 사용하여 여과하여 제조하였다.

2.2. 아세로라 추출물 혼합 리포솜 제조

아세로라 추출물(Mglabra extract)을 함유하는 리포솜을 제조하기 위해 bangham method (BM)을 응용하였다. BM은 레시틴을 지용성 성분을 함유한 유기용매에 녹여 500 rpm에서 30 min 동안 교반하고 감압농축기(Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, USA)로 40 °C에서 감압 조건으로 플라스크의 내부에 지질막이 형성되도록 충분히 건조한 후 수용성 성분을 녹인 증류수 또는 buffer 용액으로 수화하고 균질화하여 리포솜을 제조하는 방법을 응용하여 다음과 같이 리포솜을 제조하였다.

형성된 지질막의 안정성과 일정한 분산을 위해 레시틴 및 레시틴 함유 유효제를 마누카 오일(melaleuca oil, 팬아시아 마케팅, Korea)을 함유한 유기용매에 첨가하고 500 rpm에서 교반하여 1차 균질화 하였다. 충분히 균질화된 용액에 자연 침전법으로 준비된 아세로라 추출물 수용액을 첨가하여 5,000 rpm에서 10 min 간 homogenizing하여 2차 균질화 하였다. 2차 균질화된 용액을 감압 농축기를 사용하여 지질막을 형성하도록 충분히 건조하였다. 이후 생성된 지질막에 수용성 용매를 첨가하고 5,000 rpm에서 10 min 간 homogenizing하여 3차 균질화하는 거정을 거쳐 제조하였다.

2.3. 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 함유한 크림 조성물 제조

아세로라 추출물 혼합 리포솜(M glabra liposome)이 함유된 크림 조성물에 대한 피부 효능을 확인하기 위해 Table 1에 표시된 방법으로 제조하였다. 유용성인 A phase와 수용성인 B phase를 각각 20 min 간 80 °C로 가온하였다. 후첨인 C phase를 칭량하여 상온보관하였다. B phase에 A phase를 투입하고 3,000 rpm의 속도로 homogenizing하였고, 온도가 50 °C로 내려가면 C phase를 투입하여 균질화하고 5 min 간 다시 균질화하여 크림 제형을 제조하였다.

2.4. Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay

Bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay를 이용해 안점막자극을 측정함으로써 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 안전성을 평가하고자 하였다. 본 시험은 OECD guidelines for the testing of chemicals No. 473 (OECD, 2013) 및 식품의약품안전처 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(III) - 소각막을 이용한 안점막자극시험법(BCOP 시험법, 2017)을 바탕으로 수행하였다. 실험당일 도축된 소의 안구를 100 IU/mL의 penicillin과 100 μg/mL의 streptomycin

Table 1. Cosmetic Formulation of Cream Containing Acerola Extract

Phase	Trade name	INCI name	% (w/w)
A	TCG-M	Caprylic/capric triglyceride	3.00
	Dermofeel senolv	Isoamyl laurate	2.00
	Organic grape seed oil	<i>Vitis Vinifera</i> (grape) seed oil	1.00
	Organic argania spinosa oil	<i>Argania spinosa</i> kernel oil	0.50
	Organic jojoba oil	<i>Simmondsia chinensis</i> (jojoba) seed oil	0.50
	Dermofeel Toco 50	Tocopherol; <i>Helianthus annuus</i> (sunflower) seed oil	0.50
	Lecithin	Lecithin	1.50
	D.I water	water	80.88
B	Liposome Acerola Extract	<i>Malpighia glabra</i> (acerola) fruit extract	2.00
	Diglycerin	Diglycerin	3.00
	IPG-S	Isopentylidol	2.00
	GE-26	Glycerth-26	2.00
C	BG400	Ethylhexylglycerin	0.02
	1,2-hexanediol	1,2-hexanediol	1.00
	Aroma flavor	Flavor	0.01

(sigma, USA)을 첨가한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Life Technologies, USA)에 담근채로 냉장운반하였다. 운반된 소의 각막적출 후 각막홀더에 장착하였다. 각막홀더는 (32 ± 1 °C) eagle's minimal essential medium (EMEM with out phenol red; Life Technologies, USA) 배지를 채우고, 32 ± 1 °C 배양기에서 1 h 동안 적응시켰다. 양쪽 챔버의 EMEM 배지를 새로운 32 °C 배지로 교체한 후 opacitometer OP 3.0 (BASF, Germany)를 이용하여 opacity 측정하였다. 전방 챔버의 EMEM 배지를 제거한 후, 아세로라 추출물 혼합 리포솜 $750 \mu\text{L}$ 를 도포하고 32 °C에서 10 min 간 노출시켰다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 제거한 후 EMEM (with phenol red) 배지로 3 회 이상 세척하였다. 세척이 끝나면 마지막으로 EMEM (without phenol red)을 사용하여 1 회 추가 세척을 진행한 후 세척액을 완전히 제거하였다. 전/후방 챔버의 배지를 새로운 EMEM (without phenol red)로 교체한 후 2 h 동안 (32 ± 1 °C)에서 배양하였다. Opacitometer로 혼탁도를 측정된 후, 전방챔버의 EMEM을 제거하고 fluorescein solution 4 mg/mL 을 1 mL 주입하였다. (32 ± 1 °C) 배양기에서 (90 ± 5) min 동안 배양하고, 후방 챔버의 EMEM 배지를 모두 수거하여, 96 well plate의 한 sample 당 3 개 well에 $360 \mu\text{L}$ 씩 분주하였다. Microtiter plate reader (Synergy HT, BioTek)를 사용하여 파장 490 nm 에서의 흡광도 (optical density, OD)를 측정하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 안자극 평가를 위해

Table 2. The Opacity and Permeability Assessments of the Cornea after Exposure to the Acerola Extract

<i>In vitro</i> irritancy score (IVIS)	UN GHS
≤ 3	No Category
$> 3 ; \leq 55$	No stand alone can be made
> 55	Category 1

IVIS = mean opacity value + ($15 \times$ mean permeability value)

안점막자극지수 (*in vitro* irritancy score, IVIS) 점수를 도출하였다(Table 2).

2.5. Hen`s Egg Test-CAM assay

Hen`s Egg Test-CAM (HET-CAM) assay를 이용해 안점막 자극을 측정함으로써 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 안전성을 평가하고자 하였다. 본 시험은 NIH / ICCVAM - HET-CAM BRD (2006) 및 ECVAM DB-ALM : INVITTOX n°96 (2007)을 바탕으로 수행하였다. 유정란(다솔농장, Korea)을 온도 37.5 ± 0.5 °C, 습도 $55 \pm 7\%$ 의 조건의 부화기에서 10 일간 배양하였다. 배양 10 일째에 검란을 실시한 후 기실 및 혈관계가 형성된 유정란만을 선택하여 실험에 이용하였다. 난각을 제거한 후 멸균생리식염수(daihan pharm, korea)를 난각막에 적서 난각막과 CAM이 잘 분리될 수 있도록 하였다. CAM 표면의 혈관을 다치지 않게 난각막을 제거하여 CAM을 노출시켰다. 아세로라 추출물 혼

Table 3. The End Point Scores and Possible Reactions by Analogy to Reference Substance Testing

End point score	Reaction	Reference substance
0	No reaction	-
1	Slight reaction	Texapon ASV 50 (0.5%)
2	Moderate reaction	Texapon ASV 50 (1%)
3	Severe reaction	Texapon ASV 50 (5%)

Table 4. The Classification Scheme of Test Substance by Sum of All Standard End Point Scores of Reaction

[S] Score	Irritation
-	Non irritating
S < 6	Slightly irritating
6 ≤ S ≤ 12	Moderately irritating
12 < S < 16	irritating
16 ≤ S	Severely irritating

합 리포솜을 적용하기에 앞서, 기준물질인 Texapon[®] ASV 50 (BASF, Germany)을 멸균생리식염수에 희석하여 0.5, 1 및 5% 농도를 이용하여 자극기준을 선정하였다(Table 3).

아세로라 추출물 혼합 리포솜은 마이크로피펫을 사용하여 유정란 CAM 표면에 0.3 mL를 5 min 간 적용하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 적용하는 5 min 간 CAM의 변화를 관찰하여 출혈, 응해 및 응고의 정도를 기준물질과 비교하여 점수로 기록하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 진갈색의 제품으로, 시험물질 처리 후 혈관에서 반응 관찰하는데 지장이 있으므로 HET-CAM 시험을 평가하는 방법 중 하나인 종결반응평가법을 실시하여 평가하였다. 종결법에 의한 평가 결과는 [S] score로 산출하였고, Table 4에 따라 안점막자극 정도를 판정하였다([S] score: 군별 유정란 6 구의 자극점수의 합).

2.6. 인체피부 일차자극시험

피부안전성을 확인하기 위해 인체피부 일차자극시험을 진행하였다(IRB Number. TEK-5IOXVBI W-2020). 본 시험은 기능성화장품 심사에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제 2017-42호), International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)의 판정기준에 따라 실시하였다. 선정기준 및 제외 기준에 부합한 피부질환 및 알러지가 없는 32 명의 시험대상자(남자 8 명, 여자 24 명)을 대상으로 실시하였으며, 연령 분포는 20 ~ 56 세, 평균 연령은 38.1 세였다. 첩포부위인 등 피부를 증류수로 닦아내고 건조시켰다. 아세로라 추출물

혼합 리포솜을 20 μL 적하시킨 IQ chamber (Chemotechnique Diagnostics, Sweden)를 시험부위에 24 h 동안 첩포하였다. 24 h 후에 첩포를 제거하고 첩포 제거 30 min 후 1 차 판정을 진행하고, 24 h 후에 2 차 판정을 진행하여 1, 2 차 판정의 평균 피부 반응도를 기준으로 안전성을 평가하였다. 평가기준은 International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) 기준에 따라 실시하였으며, 피부 자극 유발 가능성의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다.

$$\text{Skin reaction} = \frac{\Sigma(\text{Score} \times \text{No. of Responders})}{4(\text{Maximum score}) \times \text{No. of evaluation} \times N(\text{Total subjects})} \times 5$$

Score = 판정점수
 No.of Responders = 판정 횟수
 Maximum score = 최고 판정점수
 No.of evaluation = 패치 제거 후 평가 횟수
 Total subjects = 총 시험대상자 수

2.7. Tyrosinase 활성저해 시험

Tyrosine을 수산화(hydroxylation)시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 변화하는 tyrosinase의 활성 저해능을 평가하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 멸균증류수로 녹이고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 희석하여 100, 500, 1,000 μg/mL의 시험액을 각각 준비하였다. 96 well plate에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 170 μL, 희석한 시험액 10 μL, 2,000 unit/mL mushroom tyrosinase (sigma, USA) 10 μL 및 10 mM L-DOPA (sigma, USA) 10 μL를 순차적으로 넣은 후 혼합하여 37 °C에서 15 min 동안 반응시킨 후 475 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 공시험액의 흡광도는 시험액 대신 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 넣어 동일한 방법으로 반응하여 측정하였다. 효소 활성 억제율은 아래의 식으로 산출하였다.

$$\text{효소 활성 억제율 (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

(A: 공시험액의 반응 후 흡광도, B: 시험액의 반응 후 흡광도)

2.8. Melanin 생성억제 시험

2.8.1. 세포배양

생쥐에서 유래한 흑색종 세포인 B16F10 세포는 한국세포주은행(Korea)에서 구입하여 사용하였다. B16F10 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco-Invitrogen, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin 과 100 μg/mL streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용

하여 37 °C 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂/ 95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양접시의 80% 정도 찼을 때, phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, Merck, USA)으로 세포 단층을 씻어낸 후 세포배양액을 첨가하여 세포를 떼어내어 계대 배양하였고, 배지는 2 일마다 교환하였다.

2.8.2. 세포독성시험(MTT assay)

B16F10 세포의 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra zolium bromide, Amresco) 방법으로 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM (Welgene, Korea) 배지를 이용하여 인간유래 피부 섬유아세포인 HS68 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 seeding하고 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. FBS를 첨가하지 않은 배지로 교체하여 시료를 첨가하고 24 h 배양한 뒤, MTT (Amresco, USA)용액을 1 mg/mL의 농도로 가하여 2 h 추가 배양시켰다. 미 반응된 MTT 용액을 제거하고 MTT가 미토콘드리아 dehydrogenase에 의해 환원되어 생성된 푸른색의 formazan을 isopropanol을 첨가하여 형성된 반응물을 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정해 시료의 세포독성을 확인하였다.

2.8.3. 멜라닌 생성억제 측정

B16F10 세포를 0.5×10^5 cells/well이 되도록 12 well plate에 분주하여 24 h동안 배양하였다. 세포를 24 h 배양한 후 100 nM α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH, Sigma-Aldrich, USA) 및 농도(100, 500, 1,000 μ g/mL)의 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 함유한 배양액으로 세포배양액을 교환하여 세포를 배양하였다. 72 h 동안 세포를 배양한 후 세포 단층을 PBS로 세척한 후 0.25% trypsin-2.65mM EDTA를 처리하여 세포를 회수하였고, 12,000 rpm에서 10 min 간 원심분리 하여 pellet을 얻었다. 획득한 pellet에 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA)를 함유된 1 N NaOH를 넣어 60 °C에서 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 합성 melanin을 이용한 검량선으로부터 melanin의 양을 산출하였고, Lowry 법 (Lowry OH *et al.*)으로 단백질을 측정하여 melanin 생성량을 단백질 양으로 표준화한 후 α -MSH 만을 처리한 군의 값을 100으로 하여 상대적인 값으로 나타내었다.

2.9. Collagen 생성시험 및 MMP-1 활성 억제시험

2.9.1. 세포배양

인간에서 유래한 피부 섬유아세포인 HS68 세포는 한국

세포주은행(Korea)에서 구입하여 사용하였다. HS68 세포는 DMEM 배지(Welgene, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS, Life science), 100 units/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin (Sigma, USA)을 첨가한 세포 배양액(complete DMEM 배양액)을 사용하여 37 °C 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양접시의 80% 정도 찼을 때, phosphate buffer saline (PBS, pH7.4, Lonza, USA)으로 세포 단층을 씻어낸 후 trypsin-2.65 mM EDTA (Sigma, USA)를 첨가하여 세포를 떼어내어 계대 배양하였고, 배지는 2 일마다 교환하였다.

2.9.2. 세포독성시험(MTT assay)

HS68 세포를 1×10^4 cells/well 이 되도록 48-well plate에 분주하고 24 h 세포를 배양하였다. 세포를 24 h 배양한 후 각각의 시험물질을 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1,000 μ g/mL로 함유한 serum-free 세포 배양액으로 교환하여 세포를 24 h 배양하였다. 세포를 24 h 배양한 후 MTT assay를 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다. MTT 방법은 미토콘드리아의 dehydrogenase가 MTT (Amresco, USA)를 환원시켜 푸른색 물질인 formazan을 만드는 원리에 기초한 것으로 본 시험에서는 formazan을 isopropanol에 용해시킨 다음 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.9.3. Collagen 생성 및 MMP-1 활성억제 측정

HS68 세포를 1×10^5 cells/well 이 되도록 24 well plate에 분주하고 24 h 세포를 배양하였다. 세포를 24 h 배양한 후 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 100, 500, 1,000 μ g/mL로 함유한 serum-free 세포 배양액으로 교환하여 세포를 24 h 배양하였다. 세포를 24 h 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 각각 procollagen type I C-peptide (PIP) EIA kit (Takara, Japan)와 human MMP-1 ELISA kit (Sigma, USA)를 사용하여 collagen 및 MMP-1 함량을 측정하였다.

2.10. 인체효능평가시험

아세로라 추출물이 함유한 크림을 제조한 후 4 주간 시험대상자들에게 사용하게 하여 인체효능시험을 진행하였다(IRB Number. TEK-2018-000158). 시험대상자는 시험의 목적, 내용 등에 대해 이해하고 자발적으로 참여 의사를 밝힌 사람으로서 시험기간동안 추적관찰이 가능한 사람을 대상으로 진행하였다. 건강한 성인 여성 21 명의 시험대상자를 대상으로 실시하였으며, 연령 분포는 34 ~ 55 세, 평균 연령은 46.0 세였다. 화장품의 사용 특성으로 인하여 건

강한 성인여성으로만 대상으로 인체효력 시험을 진행하였다. 제품은 4 주 동안 1 일 2 회 아침, 저녁으로 얼굴에 사용하게 하였으며, 사용 전 및 사용 2 주 후, 4 주 후에 기기 측정을 하였다. 시험대상자는 센터의 준비된 세정제로 세안하고 일정한 항온항습조건(20 ~ 24 °C, 40 ~ 60%)에서 30 min 대기한 후 측정하였다. 기기 측정 항목은 피부주름, 피부멜라닌이다. 두 항목 모두 Antera 3D® CS (Miravex, Ireland)를 이용하여 측정하였다. Antera 3D® CS는 피부 표면을 비추는 여러 다이오드와 다파장 LED 광원이 60 mm 정사각형 영역을 비추고 주변 조명 조건에 관계없이 반사광을 사용하여 피부 사진을 촬영하는 장비로 사진의 2 차원 및 3 차원 재구성이 가능하며 Antera cs software (Miravex, Ireland)를 이용하여 주름, 색소침착의 측정값을 평가하였다. 주름 및 색소침착에 대한 측정 수치는 기기 소프트웨어에서 측정되는 wrinkle small value 및 melanin value 의 기기의 임의의 값(arbitrary unit, AU)으로 측정되었다.

2.11. 통계 분석

본 데이터의 통계적 유의성 검정은 SPSS package program (IBM, USA)를 이용하였다. Tyrosinase 활성 저해, 멜라닌 생성 억제, collagen 생성 및 MMP-1 활성억제시험은 총 3 회 이상 반복 측정하였으며, 시험물질 투여군과 대조군의 차이를 비교하기 위하여 student's t-test 및 one-way analysis variance (ANOVA)를 이용하였다. 인체효능평가 결과 값은 정규성 검정(Shapiro-Wilk)을 통해 정규 분포로 추정되는 경우 repeated measure ANOVA로 유의성을 확인하며, 정규성이 기각되는 경우 mann-whitney U test 로 유의성을 확인하였다. 통계분석은 95% 신뢰구간에서 유의확률 $p < 0.05$ 이하일 때 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 아세로라 추출물 혼합 리포솜 제조 결과

BM (bangham method)을 응용하여 아세로라 추출물을 함유하는 리포솜을 제조하였을 때 멀티라멜라구조의 입자가 관찰되었으며 입자의 크기와 형태가 균일한 모습을 보였다(Figure 1). 이를 바탕으로 유효성분을 안정화시킬 수 있음을 확인하였다.

3.2. 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Assay 결과

BCOP assay에 의한 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 안점막자극을 확인한 결과, 아세로라 추출물 혼합 리포솜에 의한 혼탁도 및 투과도 증가는 관찰되지 않았으며 안점막 자극지수는 0.7 ± 0.9 로 산출되어 'UN GHS Category : No Category' 에 해당함을 확인하였다(Table 5). 이를 바탕으로 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 안점막 자극에 안전한 소재로 사용할 수 있음을 확인하였다.

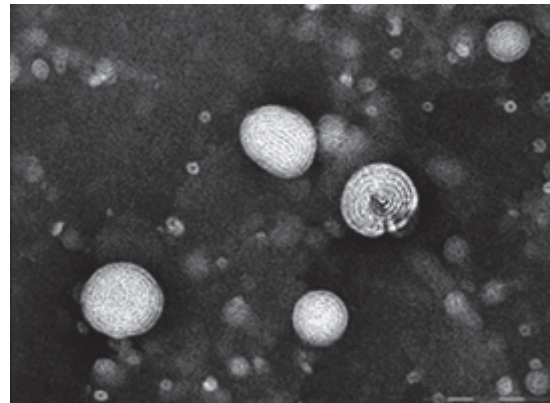


Figure 1. Multilamellar formulation photomicroscopy by SEM. (bar, 100 nm).

Table 5. Results of the Eye Irritation Test Using BCOP Assay of Liposome Containing Acerola Extract Mixture

Group	Dose (%)	Opacity score ^a (mean ± SD ¹)	Permeability score ^b (mean ± SD ¹)	IVIS ^c (mean ± SD ¹)
G1	neat ²⁾	-1.1 ± 0.8	0.005 ± 0.003	-1.0 ± 0.9
G2	neat ²⁾	19.4 ± 0.6	1.199 ± 0.037	37.4 ± 0.9
G3	neat ²⁾	0.7 ± 0.8	0.006 ± 0.004	0.7 ± 0.9

^a : mean opacity value (unit), ^b : mean OD490 value (optical density), ^c : Opacity score + (15 × Permeability score),

¹⁾ : standard deviation, ²⁾ : un-diluted form

G1 : negative control, G2 : positive control, G3 : test substance

3.3. 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 HET-CAM assay 결과

HET-CAM assay에 의한 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 안점막자극을 확인한 결과, 아세로라 추출물 혼합 리포솜 적용에 의한 출혈, 용해 및 응고를 육안 관찰한 결과, 2 개의 개체에서 미세한 출혈이 관찰되었으며, 용해 및 응고는 관찰되지 않았다. 나머지 4 개의 개체에서는 출혈, 용해 및 응고는 관찰되지 않았다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜 적용 후, 유정란 6구에 대한 자극지수 (S score)는 '2' 로 산출되어 'Non irritant or Slightly irritating'에 해당함을 확인하였다(Table 6). 따라서, 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 안점막 자극에 안전한 소재로 사용할 수 있음을 확인하였다.

3.4. 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 인체피부 일차자극 시험 결과

아세로라 추출물 혼합 리포솜을 24 h 폐쇄접포하고, 첩포 제거 30 min 후, 24 h 후 피부반응을 관찰하여 피부자극지수 및 피부자극정도를 판정하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜에 대한 피부 반응도는 '0.00' 으로 '무자극 범주'에 해당함을 확인하였다(Table 7). 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 피부자극에 안전한 소재로 사용할 수 있음을 확인하였다.

3.5. 아세로라 추출물 혼합 리포솜이 Tyrosinase 활성 저해에 미치는 영향

아세로라 추출물(*Malpighia glabra extract*)에 대한 tyrosinase 활성 저해를 평가한 결과, 아세로라 추출물은 100, 500,

1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 54.5, 57.58, 60.65 %의 수치를 나타내었다(Figure 2E). 아세로라 추출물 혼합 리포솜 제형에 대한 tyrosinase 활성 저해를 평가한 결과, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 72.0, 74.0, 75.8 %의 수치를 나타내었으며, 통계학적으로 유의하게 증가하였음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 혼합 리포솜 제형이 아세로라 추출물 단독 사용보다 tyrosinase 활성 저해에 더 효과적인 미백개선편 소재로 사용할 수 있음을 확인하였다.

3.6. 아세로라 추출물 혼합 리포솜이 Melanin 생성 억제에 미치는 영향

아세로라 추출물 혼합 리포솜의(*M. glabra liposome*) melanin 생성 억제 평가에 앞서 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 B16F10 세포 생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, 모든 처리에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Figure 2D). 아세로라 추출물에 대한 melanin 생성 억제를 평가한 결과, 아세로라 추출물은 세포 생존율을 저해하지 않는 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 68.7, 58.4, 56.3 %의 수치를 나타냈다(Figure 2F). 아세로라 추출물 혼합 리포솜에 대한 melanin 생성 억제를 평가한 결과, 세포 생존율을 저해하지 않는 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 53.3, 47.1, 46.2 %의 수치를 나타내었으며, 농도에 따라 통계학적으로 유의하게 저해되었음을 확인하였다. 이러한 결과를

Table 6. Results of the Eye Irritation Test Using HET-CAM Assay of Liposome Containing Acerola Extract Mixture

Group	Test materials	Dose (%, v/v)	S score ^a	Classification
G1	Sterilized physiological saline	neat ¹⁾	0	Nonirritant or Alightly irritating
G2	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	1	15	Irritating
G3	Acerola extract	neat ¹⁾	2	Nonirritant or Alightly irritating

^a : sum of all irritancy scores

S score : S < 6 : Nonirritant or Slightly irritating, 6 ≤ S ≤ 12 : Moderately irritating, 12 < S < 16 : Irritating, 16 ≤ S : Severely irritating

¹⁾ : un-diluted form

G1 : negative control, G2 : positive control, G3 : test substance

Table 7. Results of the Skin Irritation Test Using Human Skin Irritation Test of Liposome Containing Acerola Extract Mixture

Test materials	Skin reaction		Skin irritation	Determination
	30 min	24 h		
Acerola extract	0.00	0.00	No irritation	Non-irritating category
Non-treatment	0.00	0.00	No irritation	Non-irritating category

바탕으로 혼합 리포솜 제형이 아세로라 추출물 단독 사용보다 melanin 생성 억제에 더 효과적인 미백 개선 소재로 사용할 수 있음을 확인하였다.

3.7. 아세로라 추출물 혼합 리포솜이 Collagen 생성에 미치는 영향
아세로라 추출물 혼합 리포솜(M glabra liposome) collagen

생성 평가에 앞서 HS68 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL로 처리하여 HS68 세포 생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, 모든 처리에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Figure 2A). 아세로라 추출물에 대한 collagen 함량을 평가한 결과, 아세로라 추출물은 세포 생존율을 저해하지 않는 100, 500, 1,000 µg/mL 농도

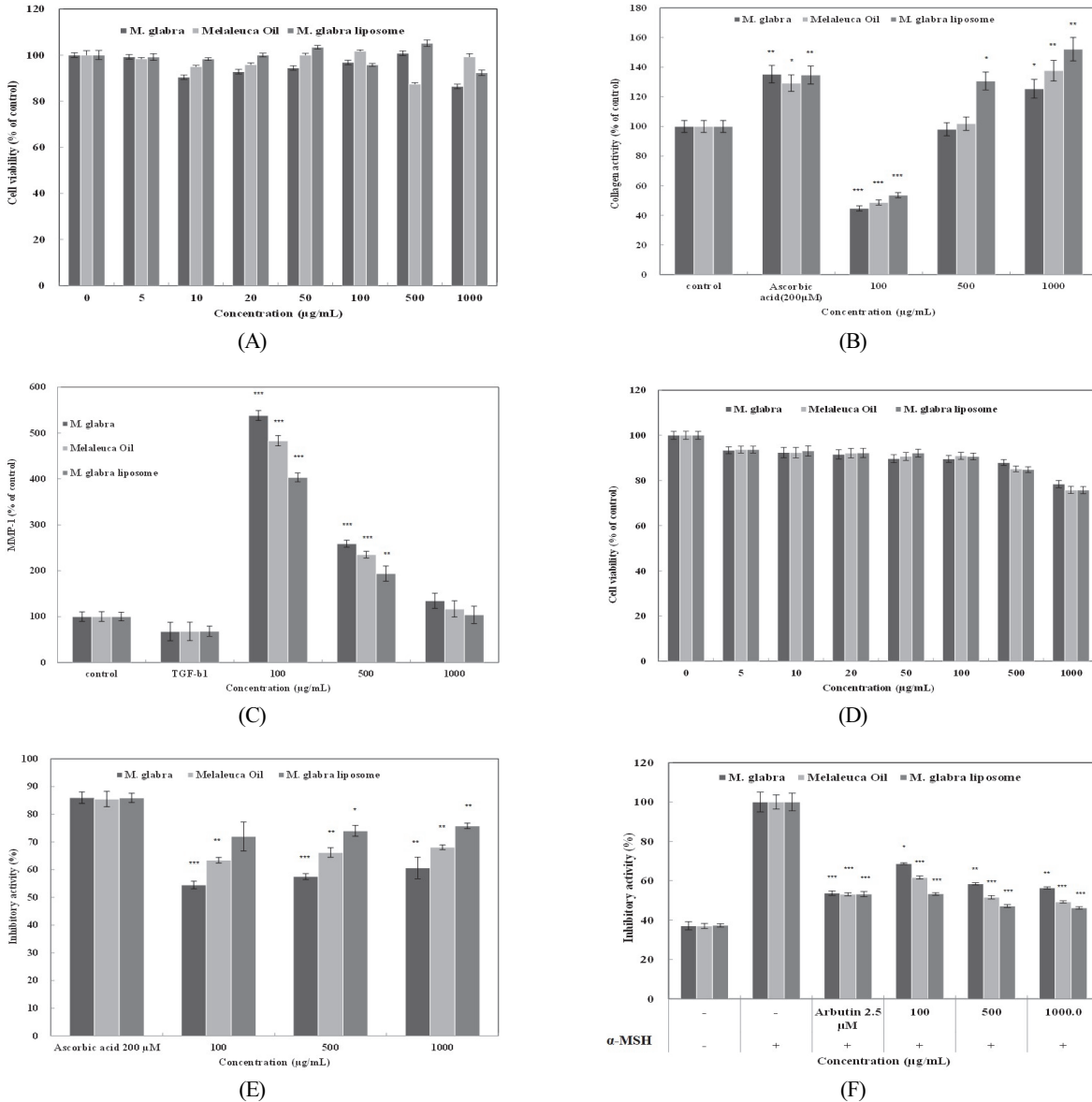


Figure 2. Results of anti-aging and whitening effect on *in vitro* condition. (A) HS68 cell viability on various concentration, (B) collagen production of HS68 cell, (C) MMP-1 inhibitor activity of HS68 cell, (D) B16F10 cell viability on various concentration, (E) tyrosinase inhibition activity, (F) melanin production inhibition activity of HS68 cell, M. glabra(Acelora extract), control vs. (A, B, C, D), ascorbic acid vs. (E), α -MSH vs. (F), student's *t*-test, significant value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

에서 각각 44.7, 98.1, 125.4 %의 수치를 나타냈다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜에 대한 collagen 함량을 평가한 결과, 세포 생존율을 저해하지 않는 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 53.6, 130.69, 152.1 %로 확인하였다(Figure 2B). 아세로라 추출물 대비 혼합 리포솜 제형 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 경우 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가함을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 혼합 리포솜 제형이 아세로라 추출물 단독 사용보다 콜라겐 생성 증가에 더 효과적인 주름 개선 소재로 사용할 수 있음을 확인하였다.

3.8. 아세로라 추출물 혼합 리포솜이 MMP-1 활성

억제에 미치는 영향

아세로라 추출물 혼합 리포솜의 MMP-1 활성 억제 평가에 앞서 HS68 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜을 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하여 HS68 세포 생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, 모든 처리에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Figure 2A). 아세로라 추출물에 대한 MMP-1을 평가한 결과, 아세로라 추출물은 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 양성대조군 대비 각각 538.4 %, 258.8 %, 134.5 %로 확인하였다. 아세로라 추출물 혼합 리포솜 제형에 대한 MMP-1을 평가한 결과, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 양성대조군 대비 각각 403.3 %, 193.7 %, 103.8 %로 하였다. 모든 농도에서 MMP-1 활성억제를 확인할 수 없었다(Figure 2C). 이러한 결과를 바탕으로 혼합 리포솜 제형과

아세로라추출물은 MMP-1 활성 억제를 통한 효과는 나타나지 않는다고 확인되었다.

3.9. 아세로라 추출물 혼합 리포솜 제형 크림이 인체피부 주름개선에 미치는 영향

아세로라 추출물 혼합 리포솜 제형을 처방하여 크림 조성물을 제조하였고 이를 활용하여 인체피부에 대한 주름 개선 평가를 진행하였다. 해당 크림 조성물을 4 주간 사용한 후 피부 눈가주름을 측정된 결과, 사용 전과 비교하여 사용 2 주, 4 주 후에 통계학적으로 유의하게 감소하였다(Figure 3A).

3.10. 아세로라 추출물 혼합 리포솜 제형 크림이

인체피부 미백개선에 미치는 영향

아세로라 추출물 혼합 리포솜 제형을 처방하여 크림 조성물을 제조하였고 이를 활용하여 인체피부에 대한 멜라닌 평가를 진행하였다. 해당 크림 조성물을 4 주간 사용한 후 피부 멜라닌을 측정된 결과, 사용 전과 비교하여 사용 2 주, 4 주 후에 통계학적으로 유의하게 감소하였다(Figure 3B).

4. 결 론

본 연구에서는 화장품 소재로서 활용하기 위하여 천연 비타민 C 함량이 높아 우수한 원료인 아세로라 추출물에 대해 연구하고자 하였다. 아세로라 추출물을 이용하여 미백효과, 콜라겐 합성 및 콜라게나제 활성억제 효과를 확인

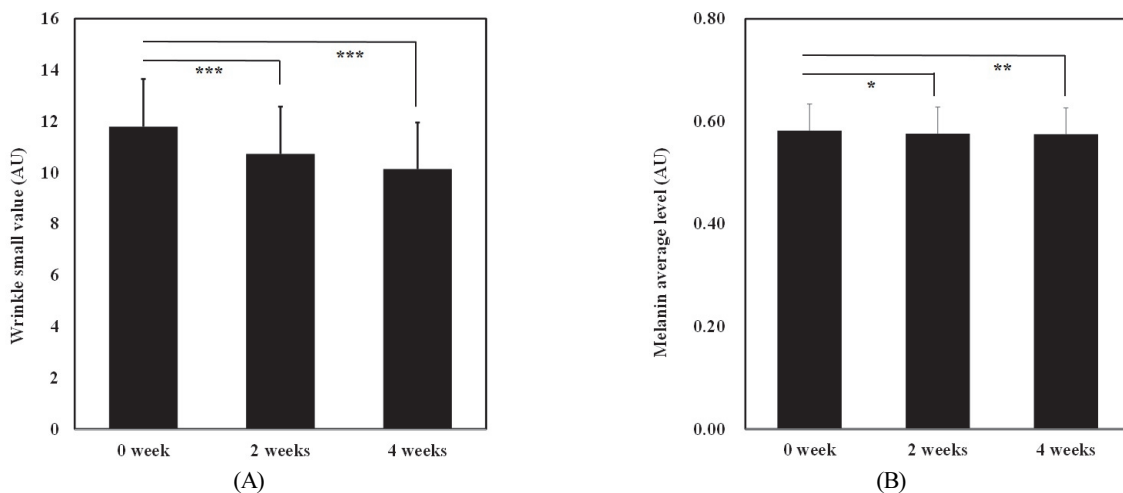


Figure 3. Results of skin wrinkle value (A) and melanin level (B) during 4 weeks application. 0 week vs. 2 weeks, 4 weeks, Repeated measures ANOVA, significant value * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

하였으며, 화장품 소재로서 활용성을 위해 동물대체실험을 통한 안자극시험 및 사람을 대상으로 일차자극시험을 수행하였다. 안전성, 유효성 시험을 수행하였다. 아세로라 추출물 제형의 안전성평가를 위해 BCOP assay 및 HET-CAM assay를 이용한 안점막자극시험에서 아세로라 추출물 제형은 안손상을 유발하지 않아 자극을 보이지 않음을 확인하였다. 피부에 대한 안전성평가를 위해 인체피부 일차자극 시험을 이용한 아세로라 추출물 제형의 피부자극 결과 무자극 범주에 해당함을 확인하였다. 이러한 안자극 및 피부자극에 대한 결과를 바탕으로 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 기능성 화장품 소재로서 안전성을 입증하였다. 아세로라 추출물 및 아세로라 추출 혼합 리포솜의 미백효과를 측정된 결과, tyrosinase 활성 저해능 시험에서 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 양성대조물질인 ascorbic acid와 비교하여 우수한 저해능을 나타내지 못했으나, 아세로라 추출물 대비 126% 활성저해능을 확인하였다. B16F10 세포에서 α -MSH (100 nM) 유도에 의한 melanin 생성 저해율을 측정된 결과, 아세로라 혼합 리포솜 제형은 양성대조물질인 arbutin 보다 우수한 melanin 생합성 저해능을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 tyrosinase 활성 저해를 통한 melanin 생합성을 억제함으로써 미백효과를 나타낸다고 사료된다. 피부미백 인체효능평가에서 아세로라 추출물 혼합 리포솜 함유 크림에 대해 피부 멜라닌을 측정된 결과, 사용 전과 비교하여 사용 2주, 4주 후에 통계적으로 유의한 피부 미백효과를 확인하였다. 아세로라 추출물 및 아세로라 추출 혼합 리포솜의 주름효과를 측정된 결과, 콜라겐합성 및 콜라게나제 활성억제 시험에서 아세로라 추출물 혼합 리포솜의 콜라겐 합성능을 HS68 세포에서 procollagen type I C-peptide 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정된 결과, 아세로라 혼합 리포솜 제형은 양성대조물질인 ascorbic acid의 콜라겐 합성능과 비교하여 보다 우수한 콜라겐 합성능을 확인하였다. 콜라게나제 활성저해 측정을 위해 HS68 세포에서 MMP-1 발현 저해 측정 시험에서 MMP-1 활성억제를 확인할 수 없었다. 이러한 결과를 바탕으로 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 콜라겐 생합성 증가를 통한 주름개선 효과를 나타낸다고 사료되며 콜라겐 분해 억제를 통한 효과는 나타나지 않는다고 사료된다. 피부주름 인체효능평가에서 아세로라 추출물 혼합 리포솜 함유 크림에 대해 피부 주름을 측정된 결과, 사용 전과 비교하여 사용 2 주, 4 주 후에 통계적으로 유의한 피부 주름효과를 확인하였다.

이러한 연구 결과를 바탕으로 아세로라 추출물 혼합 리포솜은 안자극과 피부자극을 보이지 않는 안전한 소재임을 확인하였으며, 미백 및 주름개선 효능을 활용한 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부의 경제협력개발기구산업육성사업 창의융합 R&D(R0005985)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Y. Lee, E. K. Ahn, H. J. Ko, Y. R. Cho, W. C. Ko, Y. H. Jung, and J. S. Oh, Anti-melanogenic, anti-wrinkle, anti-inflammatory and anti-oxidant effects of *Xylosma congesta* leaf ethanol extract, *J. Appl. Biol. Chem.*, **57**(4), 365 (2014).
2. M. Nakagawa, K. Kawai, and Kawai, K, Contact allergy to kojic acid in skin care products, *Contact dermatitis*, **32**(1), 9 (1995).
3. S. L. Cheng, R. H. Liu, J. N. Sheu, S. T. Chen, S. Sinchaikul, and G. J. Tsay, Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin, *J. Biomed. Sci.*, **14**(1), 87 (2007).
4. E. T. Makino, R. C. Mehta, A. Banga, P. Jain, M. L. Sigler, and S. Sonti, Evaluation of a hydroquinone-free skin brightening product using *in vitro* inhibition of melanogenesis and clinical reduction of ultraviolet-induced hyperpigmentation, *J. Drugs. Dermatol.*, **12**(3), 16 (2013).
5. D. Kim. The new technology development strategy of cosmeceuticals with use advanced materials resources, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **30**(3), 427 (2004).
6. J. E. Shin, Master's Thesis dissertation, Sook myung Women Univ, Seoul, Korea (2012).
7. M. J. Jang, S. J. Cheon, H. Y. Kim, D. J. Kwoen, H. Y. Kim, S. H. Kim, and J. T. Lee, The anti-wrinkle and whitening effect of extracts of *Castanea crenata* inner shell, *J. Life. Sci.*, **21**(5), 734 (2011).
8. I. Nagamine, M. Fujita, I. Hongo, H. T. T. Nguyen, M.

- Miyahara, J. Parkanyiova, and H. Sakurai, Hepatoprotective effects of acerola cherry extract powder against D-galactosamine-induced liver injury in rats and its bioactive compounds, *Czech. J. Food. Sci.*, **22**(1), 159 (2004).
9. S. S. Traikovich, Use of topical ascorbic acid and its effects on photodamaged skin topography, *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, **125**(10), 1091 (1999).
 10. R. M. Colven and S. R. Pinnell, Topical vitamin C in aging, *Clin. Dermatol.*, **14**(2), 227 (1996).
 11. B. Rozman and M. Gašperlin, Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy, *Drug. Deliv.*, **14**(4), 235 (2007).
 12. S. Farahmand, H. Tajerzadeh, and E. S. Farboud, Formulation and evaluation of a vitamin C multiple emulsion, *Pharm. Dev. Technol.*, **11**(2), 255 (2006).
 13. J. Y. Kim. Master's Thesis dissertation, Yosei Univ, Seoul, Korea (2005).
 14. M. G. Lee, G. H. Jo, M. N. Kim, Dermatology 5th Edition, Korean Dermatology Association Textbook Compilation Committee, 11, Ryo Moon Gak, Seoul, Korea (2008).
 15. G. Imokawa and Y. Mishima, Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells, *Cancer. Res.*, **42**(5), 1994 (1982).
 16. H. B. Lee, H. B. Lee, C. Y. Lee, and E. K. Kim, Trend of depigmenting research based on patent analysis. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(4), 209 (2007).
 17. L. Maumann, Cosmetic dermatology, principles and practice, 10, McGraw-Hill Co., New York (2002).
 18. S. A. M. Shuster, M. M. Black, and E. V. A. McVitie, The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density, *Br. J. Dermatol.*, **93**(6), 639 (1975).
 19. S. H. Han. Nanotechnology and cosmetics, *Trends in Health industry & technology*, **5**(5), 47 (2001).
 20. G. Chansiri, R. T. Lyons, M. V. Patel, and S. L. Hem, Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization, *J. Pharm. Sci.*, **88**(4), 454 (1999).