

## 미백 기능성 성분의 혼합물에 대한 미백 활성 및 안정성에 관한 연구

이 윤 희<sup>†</sup> · 임 남 훈 · 정 민 석 · 김 중 회 · 심 상 수\*

한국화장품(주) 기술개발연구소, \*중앙대학교 의약식품대학원  
(2005년 11월 4일 접수, 2005년 12월 15일 채택)

### Chemical Stability and Whitening Activity of Mixture of Functional Ingredients

Youn Hee Lee<sup>†</sup>, Nam Hoon Lim, Min Seok Joung, Joong Hoi Kim, and Sang Soo Sim\*

R&D Center, Hankook Cosmetics Co. Ltd., 36-1, Samjeong-dong, Ojong-gu Bucheon-si, Gyeonggi-do, 421-808, Korea  
\*Chung-Ang University, Seoul, Korea

(Received November 4, 2005; Accepted December 15, 2005)

요 약: 알부틴, 유용성감초추출물(GLY), 아스코빌글루코사이드(AA2G), 에칠아스코빌에틸(EAE)은 현재 미백 기능성성분으로 가장 많이 사용되어지는 성분들이다. 위의 미백 성분 중 어느 성분을 같이 혼합하여 사용하였을 때 미백효과가 더 효과적인가를 알아 보기 위하여 tyrosinase 활성 억제와 B-16 melanoma cells에서 MSH에 의한 멜라닌 생성 억제 정도를 측정하였다. 알부틴과 유용성감초추출물은 농도 의존적으로 정제된 tyrosinase 활성을 저해하였다. 유용성감초추출물(GLY)과 아스코빌글루코사이드(AA2G)를 같이 사용하였을 때나 유용성감초추출물(GLY)과 에칠아스코빌에틸(EAE)을 같이 사용하였을 때는 유용성감초추출물(GLY)을 단독으로 사용하였을 때보다 tyrosinase 활성 저해효과가 상승하였으나 알부틴과 다른 성분들을 같이 사용하였을 때는 그러한 현상을 보여주지 못했다. B-16 melanoma cell을 이용한 MSH로 유도된 melanin 생성실험에서는 유용성감초추출물(GLY)과 에칠아스코빌에틸(EAE)을 같이 사용하였을 때 멜라닌 생성 억제 효과가 유용성감초추출물(GLY)을 단독으로 사용하였을 때보다 현저히 증가하였다. 유용성감초추출물(GLY), 알부틴, 아스코빌글루코사이드(AA2G), 에칠아스코빌에틸(EAE)의 복합물을 일반적인 크림제형에 혼합하여 25°C, 45°C에서 30일간 안정성(stability)을 관찰하였으며 특이한 함량변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 유용성감초추출물(GLY)과 아스코빌글루코사이드(AA2G), 에칠아스코빌에틸(EAE)은 같이 사용함으로써 미백효과를 더 상승시킬 수 있다고 사료된다.

**Abstract:** Recently, arbutin, oil soluble licorice extract (GLY), ascorbyl glucoside (AA2G), and ethyl ascorbyl ether (EAE) have been widely used as functional whitening ingredients. To investigate which combination between the above agents could be more effective for whitening effect, tyrosinase activity and MSH-induced melanin production in B-16 melanoma cells were investigated. Both GLY and arbutin dose-dependently inhibited purified tyrosinase activity. The inhibitory effects of GLY with AA2A or EAE on tyrosinase activity were more potent than those of GLY alone, whereas that of arbutin with other ingredients did not show those effects. In MSH-induced melanin production in B-16 melanoma cells, the mixture of Gly and EAE more significantly reduced melanin formation than Gly alone. Stability of mixture of GLY, arbutin, AA2A and EAE exposed at the temperature of 25°C or 45°C for 30 days were also investigated. All of the combinations of whitening agents did not show any critical changes in their composition stability. These data suggest that the combination of GLY and vitamin C derivatives such as AA2G and EAE may be useful for the promotion of whitening effect.

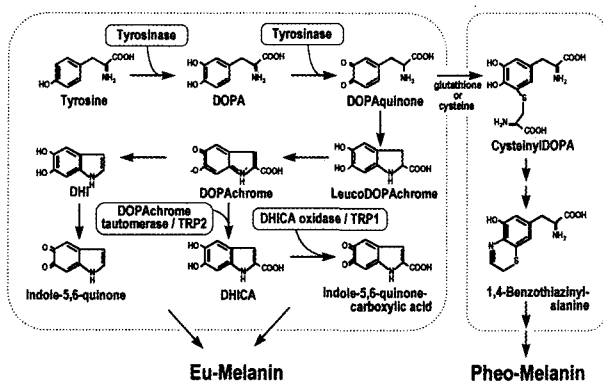
**Keywords:** arbutin, oil soluble licorice extract (GLY), ascorbyl glucoside (AA2G), ethyl ascorbyl ether (EAE), tyrosinase, MSH, B-16 melanoma cell

### 1. 서 론

하얀 피부를 가지고 싶어하는 여성의 소망과 더불어 미백화장품은 아주 오래전부터 개발되어져 왔고 2000년 7

월에 기능성화장품법이 시행되면서 미백화장품의 개발은 더 한층 발전하게 되었다. 피부의 색은 멜라닌 같은 피부 색소의 양과 분포에 따라 결정되며 멜라닌은 피부가 자외선에 노출되면 멜라노사이트의 멜라노솜에서 tyrosine 이 tyrosinase라고 하는 enzyme에 의해 산화되어 생성되는

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: liyounhi@hanmail.net)



Scheme 1. Pathway of melanin synthesis from tyrosine.

데 여기에는 tyrosinase의 합성 및 전달에 관여하는 세포 내 조절인자, tyrosinase, dopachrom tautomerase, peroxidase, catalase, glutathione reductase 등의 효소와 구리, 아연, 철 등의 금속이온 및 interferon (IFN), prostaglandin (PG), cyclooxygenase (COX) 등과 같은 mediator가 관여하는 것으로 알려져 있다[1-3]. 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌은 주위피부에 비해 비정상적으로 형성되면 기미나 주근깨가 되고 주위 피부에 비해 상대적으로 피부 멜라닌이 부족할 때는 저 색소 침착증이 생기며, 피부 멜라닌이 완전히 없을 때는 탈 색소증을 일으키게 된다. 그리고 멜라닌의 주요 기능을 보면 미생물에서의 멜라닌은 자외선 조사, 전자파, 건조, 극한 온도 등에 대한 생존 능력을 높여주며 동물에서 피부나 머리의 멜라닌은 자기 보호를 위한 위장 수단의 기능도 한다. 무척추동물이나 곰팡이에 존재하는 멜라닌은 미생물에 대한 면역체계의 역할을 수행하며 인체에서의 멜라닌은 아민, 유리기, 금속이온 등과 같은 독성 물질에 대한 제거제로 작용하여 세포를 보호한다. 멜라닌의 과잉 생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부 노화를 촉진하며 피부암의 유발에 관여하는 것으로 알려졌다. 멜라닌 생합성 경로를 살펴보면 Scheme 1에서와 같이 L-tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA로 전환되고 다시 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌이 된다. Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-DOPA로 변화하는 hydroxylase의 활성과 L-DOPA를 DOPA quinone으로 변환하는 DOPA oxidase의 활성을 다 가지고 있다[4]. 합성된 멜라닌은 멜라노솜이라는 세포소기관에 모이고 멜라닌은 melanocyte에서 dendrite를 통해 각질 형성 세포로 전달된다[14]. 따라서 멜라닌 생성을 억제하는 효소를 찾고 연구하는 것이 피부의 색소 침착을 막는 가장 중요한 과제라 할 수 있다[4].

멜라닌생성 메커니즘은 비교적 명확히 규명되어 졌고

현재 사용되는 미백원료는 거의 대부분이 tyrosinase 활성을 직·간접적으로 조절하여 멜라닌색소의 생합성을 방해하게 한다. 미백원료는 이전에는 vitamin C나 vitamin C유도체, 대반(placerta) 추출물, kojic acid 등이 많이 사용되었으나 원료의 안전성과 안정성 등의 이유로 현재에는 피부미백에 도움을 주는 원료로서 식약청고시 제 2001-44호에 알부틴, 유용성감초추출물, 에칠아스코빌에텔, 닥나무추출물의 함량 및 규격이 고시되었고 이후 식약청고시 제2005-4호에 아스코빌글루코사이드의 함량 및 규격이 추가 고시되어 총 5종의 미백기능성원료를 사용하고 있으며 이 밖에도 몇몇 미백원료들이 개별허가를 받아 사용되고 있다.

미백제품을 처방할 때는 미백효과를 극대화하기 위해 다른 성분을 보강하거나 또는 최대한의 미백효과를 이끌어 내기 위해 각 저조사마다 여러 가지 고유한 방법을 사용한다. 정확한 방법은 알 수 없으나 대부분은 nano-emulsion이나 liposome같은 DDS (drug delivery system)를 이용하여 유효성분의 피부 침투율을 높이거나 미백효과를 boosting할 수 있는 성분을 보강하는 방법을 사용한다. 이러한 성분들은 대부분 항산화효과를 가지며 tyrosinase의 활성을 억제할 수 있는 원료들을 많이 사용한다. 기능성화장품 시행 초기에는 대부분이 자외선 차단 제품이었으며 arbutin을 사용한 미백기능성화장품이었으며 제품의 수도 얼마 되지 않았다. 그 이유는 식약청고시 제 2002-74호 사용기한 표시대상 화장품지정에 의거 vitamin C나 그 유도체류들은 반드시 사용기한을 설정해야 하며 그 기간 안에는 주성분의 함량을 90% 이상 유지하여야만 하였다. 하지만 vitamin C나 그 유도체류들은 유산소 조건에서 쉽게 산화되기 때문에 제품의 유통에도 어려움이 있었고 상대적으로 성분의 안정성이 확인된 arbutin이나 유용성감초추출물(GLY)을 많이 사용하였고 비교적 가격이 저렴하며 안전성과 안정성이 뛰어난 arbutin을 가장 많이 사용하였다. 이후 안정화 기술의 발달과 지속적인 미백성분의 개발, 기능성화장품 허가 업무의 간소화 등의 영향으로 현재 3천품목 이상의 기능성화장품들이 시중에 출시되었다. 또한 기능성화장품 시행 초기 한 제품이 한 가지 기능을 가지는 단순한 기능성제품에서 벗어나 최근에는 한 제품이 2가지 이상의 기능을 다 가지고 있는 다기능성 화장품(multi-functional cosmetic) 개념의 2중 기능성 화장품(주름개선 + 미백, 미백 + 자외선 차단, 주름개선 + 자외선차단)을 비롯해 하나의 제품으로 기능성화장품 전 영역을 커버하는 3중 기능성화장품(주름개선 + 미백 + 자외선 차단)까지 개발되어 있다. 이렇듯 기능성화장품은 점점 다기능화, 고기능화로 발전하고 있다.

이 연구에서는 어떻게 하면 좀 더 효과적으로 미백효

과를 가지는 제품을 개발할 수 있을지, 또 미백기능성 성분들을 혼합사용 함으로서 미백 효과의 상승작용을 볼 수 있는지를 식약청고시 제2005-4호 기능성화장품 기준 및 시험방법에 고시된 미백성분들을 혼합사용하여 조사하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 재 료

유용성감초추출물(glabridin (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>: 324.38) 38% 함유, Marugen, 일본), arbutin (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>: 272.25, Bioland, 한국), 아스코빌글루코사이드((C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>:338.27), Hayashibara Biochemical Laboratories, INC, 일본) 에칠아스코빌에틸((C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>:204.18), Cosmol co. Ltd, 한국), L-tyrosine (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>: Fw 181.2, T-8909, 100 g, Junsei chemicals, 일본), L-DOPA (Fw 197.2, SIGMA, USA), tyrosinase (T-7755, 500000 units (2130 units), SIGMA, USA), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fw 136.09, 500 g, Lot No. SG-2334K, SHOWA Chem, 일본), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fw 174.18, 500 g, Lot No. SG-3425 G, SHOWA Chem, 일본), B-16 마우스 흑화세포(B-16 mouse melanoma cell), 동물세포 배양용 배지(dulbecco's modified egles medium (DMEM), GIBCOBRL, USA), 인산완충용액(dulbecco's phosphate -buffered saline (PBS), GIBCOBRL, USA), 트립신이디티에이 용액(trypsin-EDTA solution, GIBCOBRL, USA), 우태아 혈청(fetal bovine serum (FBS), Hyclone, USA), 멜라닌세포 자극 호르몬( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), SIGMA, USA), 테오필린(theophylline, SIGMA, USA), 수산화나트륨(NaOH, 특급시약), 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide (DMSO), SIGMA, USA)를 사용하였다.

### 2.2. 기질에 따른 Tyrosinase 활성

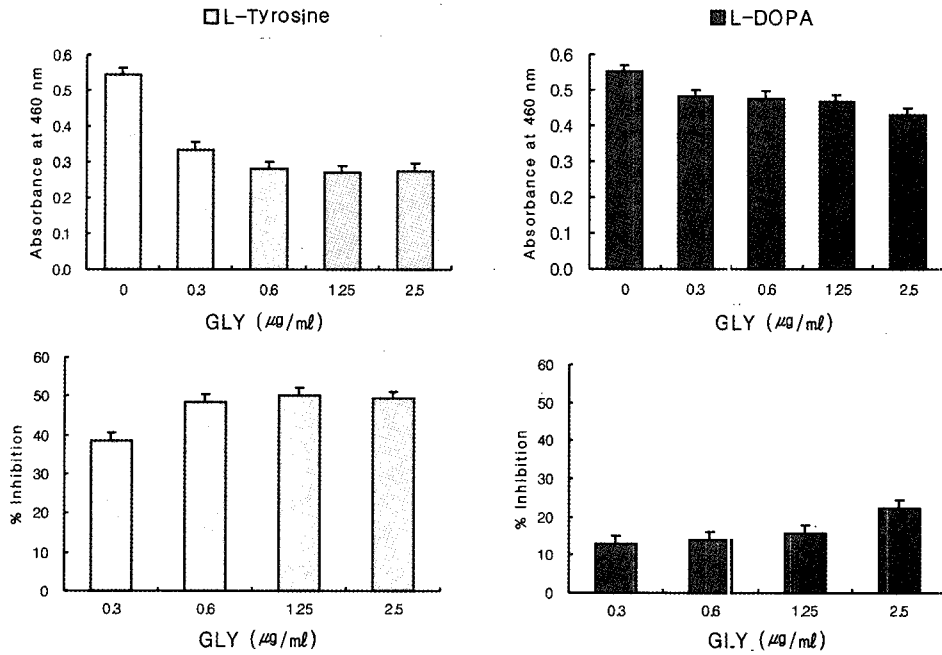
각 성분별 농도 의존도를 조사하였고 가장 적절한 농도를 선택하여 조합하였을 때의 상승효과에 대하여 조사하였다. 기질은 각 성분들이 어느 부분에서 더 효과적으로 작용하는가를 알아보기 위하여 아래와 같이 L-tyrosine일 때와 L-DOPA일 때를 각각 측정하였으며 기질을 L-DOPA로 사용하였을 때는 반응이 신속하게 일어나므로 enzyme의 양을 줄여서 실험하였다. 검체는 arbutin을 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8)로 단계적으로 희석하여 0.1  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL 농도로 하고, 유용성감초추출물(이하 GLY)은 소량의 DMSO를 사용하여 완전히 녹이고 단계적으로 희석하여 0.3  $\mu$ g/mL, 0.6  $\mu$ g/mL, 1.25  $\mu$ g/mL, 2.50  $\mu$ g/mL로 하였다. 아스코빌글루코사이드(이하 AA2G)와 에칠아스코빌에틸(이하 EAE)은 10  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL 농도로

희석하여 준비하였다. 기질은 L-tyrosine은 0.3  $\mu$ g/mL, L-DOPA는 2  $\mu$ g/mL를 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8)로 완전히 녹이고 tyrosinase는 125 units/mL 과 25 units/mL 두 농도로 준비하였다.

Tyrosinase (기질이 L-tyrosine일 경우 125 units/mL, 기질이 L-DOPA일 경우 25 units/mL) 80  $\mu$ L에 potassium phosphate buffer solution (pH 6.8, 0.1 M) 10  $\mu$ L와 농도별로 희석한 시료 10  $\mu$ L를 eppendorf tube 넣고 잘 섞어준 다음 96웰 플레이트에 40  $\mu$ L씩 분주하고 L-tyrosine (0.3 mg/mL) 200  $\mu$ L를 넣고 30 min간 반응시킨 후 460 nm에서 흡광도를 측정했다. 대조군은 시료 대신 phosphate buffer solution (pH 6.8, 0.1 M)를 10  $\mu$ L 넣었다. 색 보정은 tyrosinase 대신 potassium phosphate buffer solution (pH 6.8, 0.1 M)을 80  $\mu$ L 첨가했으며, 실험군과 동일한 농도의 시료를 10  $\mu$ L 첨가했다.

### 2.3. B-16 Melanoma 세포에서 Melanin 생성 억제율 측정

검체는 식약청고시 제 2005-4호 기능성화장품 기준 및 시험방법에 준하여 고시함량으로 arbutin 2.00% (20 mg/mL), GLY 0.05% (500  $\mu$ g/mL), AA2G 2.00% (20 mg/mL), EAE 2.00% (20 mg/mL), arbutin 2.00% (20 mg/mL) + GLY 0.05% (500  $\mu$ g/mL), arbutin 2.00% (20 mg/mL) + AA2G 2.00% (20 mg/mL), arbutin 2.00% (20 mg/mL) + EAE 2.00% (20 mg/mL), GLY 0.05% (500  $\mu$ g/mL) + AA2G 2.00% (20 mg/mL), GLY 0.05% (500  $\mu$ g/mL), EAE 2.00% (20 mg/mL)의 농도로 각각 준비한 다음, B-16 마우스 흑화세포를 6 웰 플레이트에 세포수가 웰 당 20000개가 되도록 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM-F10 (1:1)배지로 각각 2 mL 씩 분주하고 37°C에서 5% 이산화탄소농도 조건하에서 24 h 동안 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 24 h 배양된 세포에 10% 우태아 혈청, 2 mM 테오필린, 0.2  $\mu$ M 멜라닌 세포 자극 호르몬이 포함된 배지로 교환하고 무균 적으로 미리 칭량한(w/w %) 각 시료를 동일 배지로 단계적으로 희석하여 1/50의 농도로 첨가하고 세포가 웰 바닥에 80% 이상 될 때까지 배양했다(약 4일 ~ 5일). 이 때 시료는 한 농도당 최소 3개씩 시행했다. 배양이 끝난 세포를 인산 완충 용액으로 세척한 후 트립신이디티에이용액으로 처리하여 세포를 회수했다. 회수한 세포를 미니튜브(1.5 mL)에 넣고 5000 rpm에서 10 min간 원심 분리한 다음 상등 액을 제거한 후 60°C 항온기에서 24 h 건조시켰다. 건조시킨 세포 펠렛에 10% 디메틸설폭사이드가 함유된 1 N 수산화나트륨 300  $\mu$ L을 첨가하여 60°C 항온기에 20 min 정도 방치시켜 세포내의 멜라닌을 완전히 용해시켰다. 용해된 멜라닌을 효소면역 분석기로 490 nm에서 생성된 멜라닌



**Figure 1.** Effect of GLY on purified tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with GLY and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine or 2 mg/mL L-DOPA for 30 min at 37°C. Results are means ± SD from 3 separate experiments. \* Significantly different from control (p < 0.05).

양을 측정하고 무처리 군과 비교하여 멜라닌생성 저해율 (%)을 구했다.

$$\text{멜라닌생성저해율(\%)} = 100 - \frac{\text{시료첨가군의 O.D at 490 nm}}{\text{시료 무처리군의 O.D at 490 nm}} \times 100$$

**2.4. 세포독성(MTT Assay)**

배양 후 각 웰에 MTT 용액(0.1 mg/mL)을 첨가하고 4 h 동안 37°C 세포배양기에서 반응시켰다. MTT 용액이 생존세포의 환원력에 따라 미토콘드리아 내에 존재하는 환원효소에 의해 포마잔으로 결정화되고 이것을 0.03 N 염산이 포함된 이소프로필알코올로 추출하였다. 추출된 포마잔 결정체를 효소면역분석기를 이용하여 540 nm ~ 630 nm의 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 구하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도로 보정하였고 시료를 처리하지 않은 무처리 군을 100%로 하여 생존율을 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 O.D. at 540 nm ~ 630 nm}}{\text{시료 무처리군의 O.D. at 540 nm ~ 630 nm}} \times 100$$

**2.5. 시간 경과에 따른 안정성에 관한 측정**

기능성화장품으로서 식약청고시농도인 GLY 0.05% (500 μg/mL) + arbutin 2.00% (20 mg/mL), GLY 0.05% (500

μg/mL) + AA2G 2.00% (20 mg/mL), GLY0.05% (500 μg/mL), EAE 2.00% (20 mg/mL), arbutin 2.00% (20 mg/mL) + AA2G 2.00% (20 mg/mL), arbutin 2.00% (20 mg/mL) + EAE 2.00% (20 mg/mL)를 포함하는 크림을 보관조건 25°C, 45°C에서 차광, 보관하면서 매 2주마다 30일간 HPLC로 함량의 변화를 측정하였고 pH와 점도, 색상의 변화를 관찰하였다. 각 성분의 분석조건은 식약청고시 제 2005-4호 기능성화장품 기준 및 시험방법에 준하여 실시하였다.

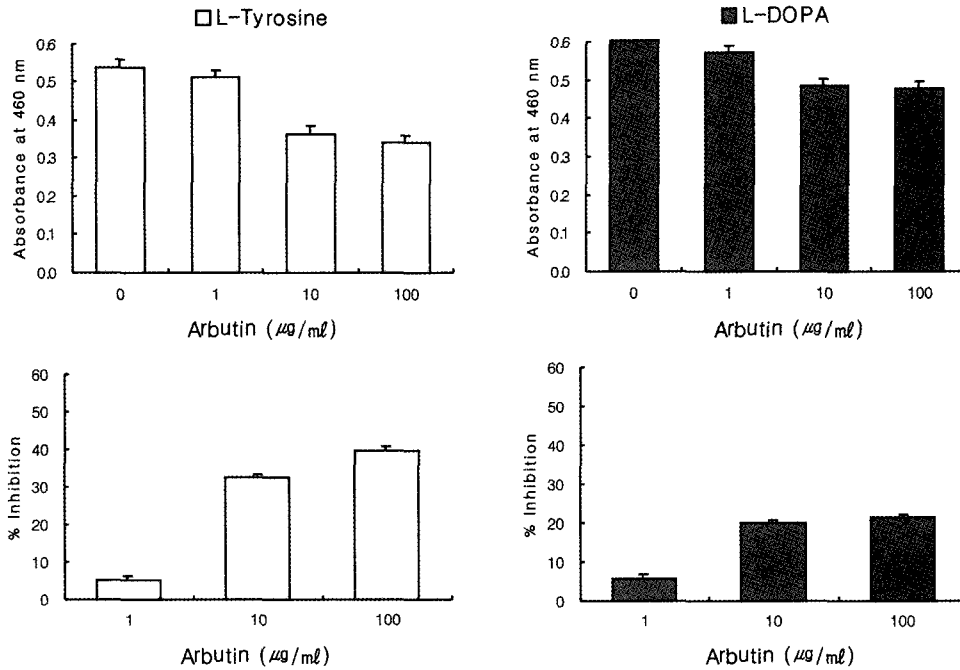
**2.6. 자료 분석 및 통계적 검정**

실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t test로 검정하였고 P값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

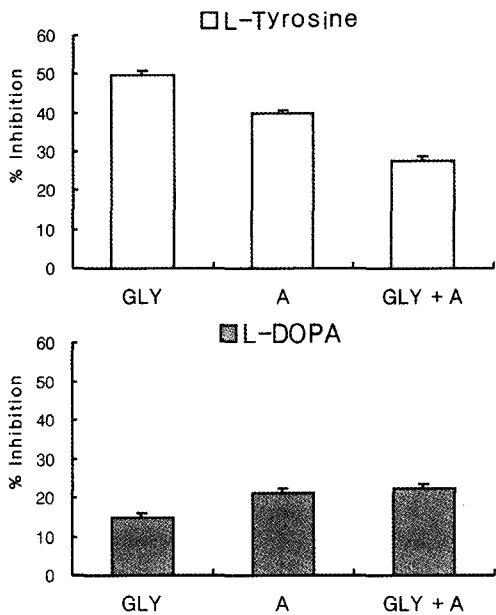
**3. 실험결과**

**3.1. 기질에 따른 미백제들의 Tyrosinase 억제 효과**

현재 미백제로 사용되고 있는 성분을 조합하여 사용 시 미백효과의 변화를 관찰하였으며, tyrosinase의 기질을 L-tyrosine과 L-DOPA를 사용하여 melanin 생성과정에서 어느 단계에서 작용하는지를 규명하였다. 유용성감초 추출물(GLY)은 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성을 억제하였으며, 1.25 μg/mL에서 tyrosinase 활성을 50%



**Figure 2.** Effect of arbutin on purified tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with arbutin and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine or 2 mg/mL of L-DOPA for 30 min at 37°C. Results are means ± SD from 3 separate experiments.

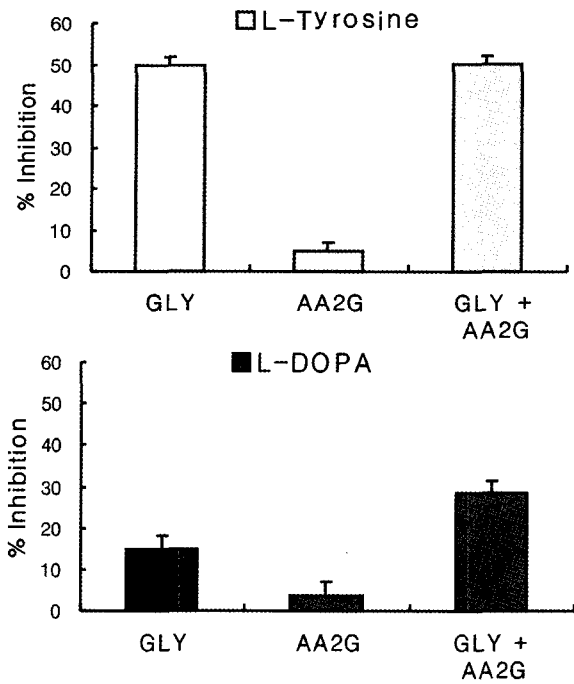


**Figure 3.** Combination effects of GLY and arbutin on tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with GLY (1.25 µg/mL) and arbutin (A, 100 µg/mL), and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine or 2 mg/mL of L-DOPA for 30 min at 37°C. Results are means ± SD from 3 separate experiments.

억제하였다(Figure 1). L-tyrosine을 기질로 사용 시 L-DOPA를 기질로 사용할 때 보다 2배 정도 억제 효과가 더 크게 나타났다. Arbutin도 농도 의존적으로 정제한 tyrosinase 활성을 억제하였으며, 기질을 L-tyrosine으로 사용할 때 L-DOPA를 사용할 때 보다 억제 효과가 더 크게 나타났다(Figure 2). 그러나 vitamin C 유도체인 AA2G와 EAE는 사용한 기질 종류에 관계없이 정제한 tyrosinase 활성을 유의하게 억제하지 않았다.

### 3.2. 유용성감초추출물과 다른 미백제들 조합에 의한 Tyrosinase 억제효과

농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하는 GLY와 arbutin을 조합하고 자체만으로는 tyrosinase 억제 효과가 미약한 vitamin C 유도체를 GLY와 arbutin과 조합하여 정제한 tyrosinase 효소 활성을 측정하였다. GLY와 arbutin을 동시에 처리한 tyrosinase 활성은 L-tyrosine을 기질로 사용 시 각각의 억제효과보다 오히려 억제효과가 약하게 나왔으며, L-DOPA를 사용 시 각각의 억제 효과와 유사한 정도로 나타났다(Figure 3). GLY와 vitamin C 유도체인 AA2A와 EAE를 같이 처리 시 L-tyrosine에서는 별 다른 차이가 나타나지 않았지만, L-DOPA를 사용 시 GLY 억제효과보다 유의하게 더 억제하였다(Figure 4, 5).



**Figure 4.** Combination effects of GLY and AA2A on tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with GLY (1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and AA2A (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine or 2 mg/mL of L-DOPA for 30 min at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments.

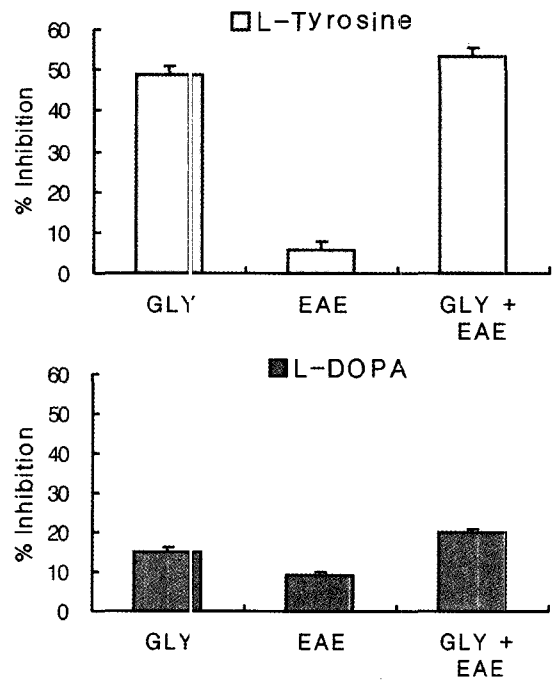
3.3. Arbutin과 Vitamin C 유도체 조합에 의한 Tyrosinase 억제 효과

Arbutin과 vitamin C 유도체인 AA2A와 같이 처리 시 기질에 상관없이 별 다른 차이를 나타내지 않았지만(Figure 6), arbutin과 EAE를 같이 처리 시 L-tyrosine과 L-DOPA 모두에서 arbutin의 억제 효과를 오히려 감소시켰다(Figure 7).

3.4. B-16 Melanoma 세포에서 미백제들의 Melanin 합성 억제 효과

이 실험에서 사용한 미백제들이 B-16 melanoma 세포에서 melanin 생성에 미치는 영향을 규명하기 위해 먼저 세포에 대한 독성을 MTT assay로 측정하였다. 세포 독성에서 사용한 미백제의 농도는 미백효과를 관찰한 농도보다 높은 농도를 사용하였다. 이 실험에서 사용한 미백제의 농도는 B-16 melanoma 세포에서 세포 독성을 일으키지 않았다.

B-16 melanoma 세포에서 MSH에 의한 melanin 생성을 GLY (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )는 82%, arbutin (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )은 50%, AA2G (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )는 18%, EAE (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )은



**Figure 5.** Combination effects of GLY and EAE on tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with GLY (1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and EAE (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine or 2 mg/mL of L-DOPA for 30 min at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments.

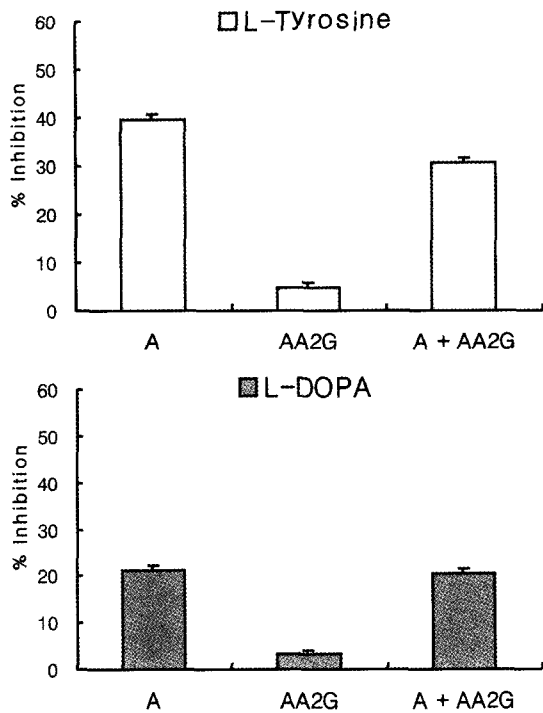
17% 억제하였다. GLY과 EAE를 같이 처리한 군은 GLY를 단독으로 처리하였을 때 보다 MSH에 의한 melanin 생성을 더 많이 유의하게 억제하였다(Figure 8). 그러나 arbutin과 vitamin C 유도체를 같이 처리하였을 때 arbutin의 단독 억제와 비교할 때 별 다른 차이를 나타내지 않았다(Figure 9).

3.5. 미백제 혼합물의 안정성

미백제 혼합물의 안정성을 확인하기 위하여 각 성분들을 식약청 고시 함량으로 친수형 크림 제형에 혼합하여 25°C와 45°C에 노출시키면서 30일 동안 매 2주마다 각각 성분 함량을 측정하였다. 30일 경과 후에 각 성분들을 측정된 결과 25°C에서는 거의 모든 미백제에서 함량의 변화가 없었고 45°C에서도 대부분의 성분들은 95% 이상의 함량을 유지하는 매우 안정한 경향을 보였으나 기간이 너무 짧아 지속해서 관찰해야 할 것으로 판단된다.

4. 고 찰

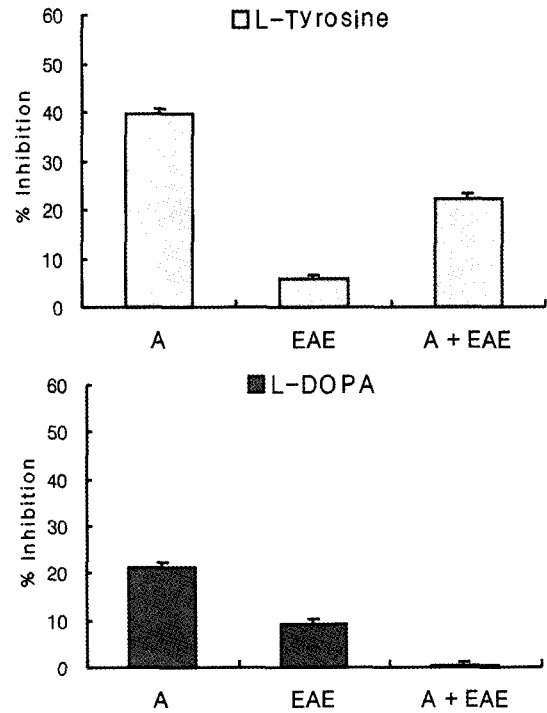
식약청고시 제2005-4호에 피부미백에 도움을 주는 성분



**Figure 6.** Combination effects of arbutin and AA2A on tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with arbutin (A, 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and AA2A (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine or 2 mg/mL of L-DOPA for 30 min at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments.

으로 고시된 알부틴(arbutin), 유용성감초추출물(glabridin), vitamin C 유도체인 아스코빌글루코사이드(ascorbyl glucoside), 에틸아스코빌에틸(ethyl ascorbyl ether)을 혼합하여 사용하였을 때 melanin 생성에서 중요하게 작용하는 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. Tyrosinase는 2가지 활성을 갖는 복합 효소로서 1단계인 L-tyrosine에서 L-DOPA로 전환되는 과정에 관여하는 tyrosine hydroxylase와 다시 L-DOPA에서 DOPA quinone으로 산화되는 과정에 관여하는 효소인 DOPA oxidase의 기능을 한다[4].

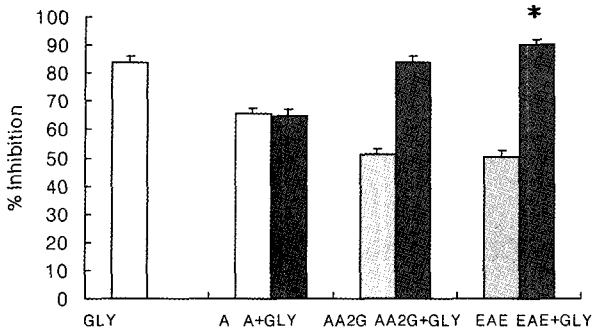
알부틴과 유용성감초추출물(glabridin)은 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성을 억제하였으며 특히 유용성감초추출물(glabridin)은 알부틴(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 비해 상당히 낮은 농도(1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서도 효과가 우수한 것으로 나타났다[13]. 또한 두 성분은 L-tyrosine을 기질로 사용했을 경우 tyrosinase의 억제효과가 잘 나타나는 것으로 보아 melanogenesis의 tyrosinase-related step 중 가장 처음 단계인 L-tyrosine에서 L-DOPA로 진행되는 과정을 주로 억제하는 것으로 판단된다. vitamin C 유도체(as-



**Figure 7.** Combination effects of arbutin and EAE on tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with arbutin (A, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and EAE (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine or 2 mg/mL of L-DOPA for 30 min at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments.

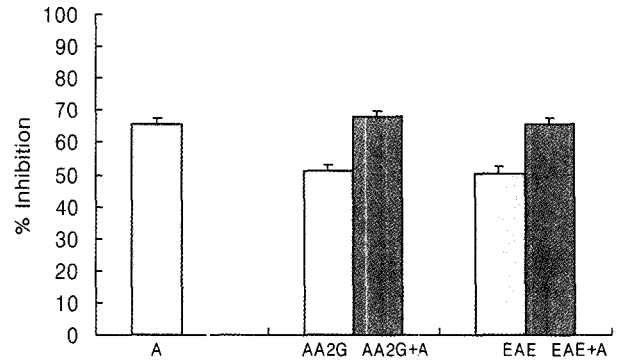
corbyl glucoside, ethyl ascorbyl ether)들은 다른 성분에 비하여 비교적 높은 농도(1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서도 tyrosinase의 억제 효과가 미약하게 나타났다. 그러나 B16 melanoma 세포에서 melanin 생성을 유의하게 억제하는 것으로 보아 이들 vitamin C 유도체들은 tyrosinase에 직접적으로 작용하지 않는 것으로 사료된다. 그러나 vitamin C 자체는 알부틴이나 유용성 감초추출물에 비해 tyrosinase 억제효과는 상대적으로 낮지만 tyrosinase 활성을 유의하게 억제하는 것으로 알려져 있으며[13] vitamin C의 tyrosinase에 대한 inhibition mechanism은 active form인 oxytyrosinase를 deoxytyrosinase로 환원시켜 inhibition한다고 알려져 있다[15]. 이 실험에서 사용한 vitamin C 유도체들은 ascorbic acid의 active sites인 2번과 3번 위치의 하이드록시기를 치환시킨 안정형 vitamin C이기 때문에 active sites가 차단되어 있는 상태에서는 tyrosinase 억제효과가 나타나지 않은 것으로 생각된다.

미백제로 사용되는 물질을 조합하여 사용시 이들의 미백효과가 더 강해지는지를 확인하기 위하여 각각의 미백제를 조합하여 tyrosinase 억제 효과와 B-16 melanoma



**Figure 8.** Combination effects of GLY with arbutin, AA2A and EAE on melanin production in MSH-stimulated B-16 melanoma cells. The cells were incubated with 10  $\mu\text{g/mL}$  Gly (Oil soluble Licorice extract), 400  $\mu\text{g/mL}$  arbutin (A), 400  $\mu\text{g/mL}$  AA2G (Ascrobyl Glucoside) and 400  $\mu\text{g/mL}$  EAE (Ethyl Ascorbyl Ether), and then stimulated with 0.2  $\mu\text{M}$  MSH. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* Significantly different from GLY alone ( $p < 0.05$ ).

세포에서 melanin 생성을 측정하였다. 단일 성분에서는 효과가 가장 우수했던 유용성감초추출물(1.25  $\mu\text{g/mL}$ )과 알부틴(100  $\mu\text{g/mL}$ )을 혼합하였을 때는 오히려 유용성감초추출물(1.25  $\mu\text{g/mL}$ ) 단일로 사용했을 때보다도 효과가 떨어지는 것으로 나타났으며 알부틴(100  $\mu\text{g/mL}$ )과 vitamin C 유도체(ascorbyl glucoside (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), ethyl ascorbyl ether (1000  $\mu\text{g/mL}$ ))들과의 조합에서도 알부틴(100  $\mu\text{g/mL}$ ) 단독 사용 시 보다 tyrosinase 억제 효과가 떨어지는 것으로 나타났다. 반면에 유용성감초추출물(1.25  $\mu\text{g/mL}$ )과 단일 성분에서는 유의한 효과를 관찰할 수 없었던 vitamin C 유도체(ascorbyl glucoside (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), ethyl ascorbyl ether (1000  $\mu\text{g/mL}$ ))들과의 조합에서 tyrosinase 억제 효과가 상승하는 현상을 관찰할 수 있었다. 유용성감초추출물(1.25  $\mu\text{g/mL}$ )과 ascorbyl glucoside (1000  $\mu\text{g/mL}$ )의 조합에서는 기질을 L-tyrosine을 사용하였을 때는 미미하거나 의미 있는 상승효과가 관찰되지 않았으나 substrate가 L-DOPA 일 경우는 약 2배 이상의 상승효과가 관찰되었고 유용성감초추출물(1.25  $\mu\text{g/mL}$ )과 ethyl ascorbyl ether (1000  $\mu\text{g/mL}$ )의 조합에서는 L-tyrosine test에서는 10% 정도의 상승효과가 관찰되었으며, L-DOPA test에서는 25% 정도의 상승효과를 관찰하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 유용성감초추출물(1.25  $\mu\text{g/mL}$ )과 vitamin C 유도체(ascorbyl glucoside (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), ethyl ascorbyl ether (1000  $\mu\text{g/mL}$ ))들의 조합은 melanogenesis의 tyrosinase-related reaction인 1<sup>st</sup>과 2<sup>nd</sup> step을 control하는 hydroxylase의 기능과 DOPA oxidase



**Figure 9.** Combination effects of arbutin with AA2A and EAE on melanin production in MSH-stimulated B-16 melanoma cells. The cells were incubated with 400  $\mu\text{g/mL}$  arbutin (A), 400  $\mu\text{g/mL}$  AA2G (Ascrobyl Glucoside) and 400  $\mu\text{g/mL}$  EAE (Ethyl Ascorbyl Ether), and then stimulated with 0.2  $\mu\text{M}$  MSH. Results are means  $\pm$  SD from 3 separate experiments.

의 기능 모두를 효과적으로 저해함으로써 상승효과를 가져올 수 있는 것으로 판단된다.

이러한 결과는 B-16 melanoma 세포에서도 유사하게 나타났다. MSH에 의한 melanin 생성을 유용성감초추출물(GLY) (10  $\mu\text{g/mL}$ )은 82%, 알부틴(arbutin) (400  $\mu\text{g/mL}$ )은 50%, 아스코빌글루코사이드(AA2G) (400  $\mu\text{g/mL}$ )은 18%, 에칠아스코빌에텔 (EAE) (400  $\mu\text{g/mL}$ )은 17% 억제하였으며 GLY과 EAE를 같이 처치한 군은 GLY를 단독으로 처치하였을 때 보다 MSH에 의한 melanin 생성을 더 많이 유의하게 억제하였다. 그러나 arbutin과 vitamin C 유도체를 같이 처치하였을 때 arbutin의 단독 억제와 비교할 때 별 다른 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 알부틴은 다른 미백제와 같이 사용 시 arbutin 단독 효과와 같거나 오히려 효과가 감소하는 경향을 나타냈으나 GLY의 경우 EAE와 조합 시 미백 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 상승효과는 tyrosinase에 대한 inhibition mechanism이 서로 다른 두 성분의 복합효과라고 판단되며 어떻게 vitamin C의 tyrosinase에 대한 저해효과가 activation 되었는지와 왜 알부틴과 같이 사용 시에는 tyrosinase에 대한 저해효과가 왜 감소하는지는 좀 더 연구되어야 할 것이다.

미백제 조합에 따른 성분의 안정성을 관찰한 실험에서 관찰일이 짧아 모든 조합에서 눈에 띄는 함량의 변화는 관찰되지 않았지만 아스코빌글루코사이드(AA2G)의 경우 자신은 함량의 변화가 전혀 없는 반면 같이 사용한 알부틴, 유용성감초추출물(GLY)에서 약간의 함량변화가 관찰되었으며 에칠아스코빌에텔의(EAE)의 경우는 알부틴, 유용성감초추출물(GLY)의 함량은 변화가 없고 에칠아스코



빌에텔의(EAE)의 함량이 약간 감소하는 상반된 경향을 보였다.

## 5. 결 론

고시된 미백원료들의 tyrosinase 억제효과의 상승작용을 알아보기 위하여 각 성분들을 조합하여 substrate를 L-tyrosine을 사용하였을 때와 L-DOPA를 사용하였을 때, B-16 melanoma 세포에서 melanin 합성 저해율과 독성(MTT assay) 비교 및 혼합사용하였을 때의 안정성을 측정하였다.

유용성감초추출물과 알부틴(arbutin)은 정제한 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제하였으나 아스코빌글루코사이드(AA2G)와 에칠아스코빌에텔(EAE)은 억제 효과가 미약하게 나타났다. 단독 사용 시 효과가 가장 뛰어났던 유용성감초추출물(GLY)과 알부틴(arbutin)의 조합에서는 효과가 떨어지는 현상이 관찰되었으며 알부틴(arbutin)과 다른 성분들과의 조합에서도 오히려 단독 사용 시 보다 억제 효과가 감소하는 경향을 보였다. 그러나 유용성감초추출물(GLY)과 vitamin C 유도체인 아스코빌글루코사이드(AA2G)와 에칠아스코빌에텔(EAE)의 조합에서는 상승효과를 나타냈다. 이러한 결과는 B-16 melanoma 세포를 이용한 실험에서도 유사한 결과가 나타났다. 이 실험에서 사용한 미백성분 모두 MSH에 의한 melanin 생성을 유의하게 억제하였으며 유용성감초추출물(GLY)과 에칠아스코빌에텔(EAE)을 같이 처치한 군은 유용성감초추출물(GLY)을 단독으로 처치하였을 때 보다 MSH에 의한 melanin 생성을 더 많이 유의하게 억제하였다. 그러나 알부틴(Arbutin)과 vitamin C 유도체를 같이 처치하였을 때 알부틴(arbutin)의 단독 억제와 비교할 때 별 다른 차이를 나타내지 않았다.

성분의 안정성에 관한 실험에서는 안정도 관찰 기간이 짧긴 하나 알부틴(arbutin)과 유용성감초추출물(GLY), 에칠아스코빌에텔(EAE), 아스코빌글루코사이드(AA2G) 모두 혼합사용 시에도 95% 이상의 함량을 유지하였으며 특이한 함량변화는 아직 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 미백제들의 미백 효과를 상승시키며 제품의 안정성을 고려 시 유용성감초추출물(GLY)과 에칠아스코빌에텔(EAE), 아스코빌글루코사이드(AA2G)같은 비타민 C 유도체들과의 배합이 가장 좋은 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. K. Maeda and M. Fukuda, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765 (1996).
2. R. Saruno, F. Kato, and T. Ikeno, Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1337 (1979).
3. J. H. Park, Y. G. Shin, U. K. Shin, S. K. Baek, S. K. Lee, M. H. Chung, and Y. I. Park, Tyrosinase inhibition activity of some herbal drug, *Yakhak Hoji*, **41**, 518 (1997).
4. Y. J. Park and S. S. Sim: Effect of hot-water extract from *Laminaria japonicus* on production of melanine and inflammatory mediators, The Graduate School of Food & Drug Administration, Chung-Ang University, Jun (2004).
5. H. K. Hansen, S. H. Hansen, M. Kraunsoe, and G. M. Petersen, Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizinic acid in pharmaceutical preparations, *J. Euro Pharm. Sci.*, **9**, 41 (1999).
6. J. Vaya, P. A. Belinky, and M. Aviram, Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation, *J. Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 302 (1997).
7. Y. A. Jung, K. J. Lee, M. J. Kwun, and H. O. Row, Separation of glabridin from licorice by RP-HPLC, *KOREAN J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 408 (2003).
8. K. Nishioka and T. Seguchi, Contact allergy due to oil-soluble licorice extracts in cosmetic products, *Contact Dermatitis*, **40**, 56 (1999).
9. N. Muto, T. Nakamura, and I. Yamamoto, Enzymatic formation of a non-reducing L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucoside: purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine, *J. Biochem.*, **107**, 222 (1990).
10. I. Yamamoto, S. Suga, Y. Mitoh, M. Tanaka, and N. Muto, Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs, *J. Pharmacobiodyn.*, **13**, 688 (1990).
11. K. Murakami, J. Akiyama, and I. Yamamoto, Abstracts of Papers, the Annual Meeting of the Japan Society for Pharmaceutical Science, Sapporo, Aug., **21**, 68 (1990).
12. I. Yamamoto, N. Muto, K. Murakami, S. Suga, and H. Yamaguchi, L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed  $\alpha$ -glucosidase: its im-

- proved stability and structure determination, *Chem Pharm Bull* (Tokyo), Nov; **38**(11) : 3020 (1990).
13. 이정표, 김영옥, 장정윤, 손경훈, 양성준, 이경신, 백옥진, 김원희, 홍진태, 최상숙, *In vitro* tyrosinase 활성 저해시험을 이용한 피부미백 화장품의 효력평가방법 연구, 화장품안전성관리사업 연구보고서, **2** (2002).
  14. 中山秀夫 (198.).
  15. W. G. Cho, Cosmeceuticals in skin care, *대한화장품학회지*, **24**, 2 (1998).