

基于皮肤模型评价 VC 乙基醚与乙酰酪氨酸的协同美白效应及其对原型 VC 的优势

徐思伟^{*}, 周彪, 林琳, 陈丽, 王蕊蕊, 陆毅
(上海科黛生物科技有限公司, 上海, 201703)
DOI:10.61369/CDCST.2026020007

摘 要: 通维生素 C (Vitamin C, 抗坏血酸) 虽具有卓越的美白与抗氧化功效, 但其原型在水溶液中极不稳定, 限制了应用。为此, 本研究探讨了由 2% 维生素 C 乙基醚 (3-O-乙基抗坏血酸, VC 乙基醚, 一种高稳定、高透皮的 VC 衍生物) 与 1% 乙酰酪氨酸构成的复配体系。研究发现, 乙酰酪氨酸能有效缓冲 VC 乙基醚水溶液在高温 (45°C) 加速试验中出现的 pH 下降现象。基于 MelaKutis® 3D 黑素皮肤模型的功效评价表明, 该复配体系在提升模型亮度 (L^* 值) 和抑制黑素生成方面的效果, 均显著优于 3% 及 5% 的原型 VC 水溶液。本研究为开发兼具高稳定性与高效能的美白护肤品提供了新的配方策略与实验依据。

关键词: 维生素 C 乙基醚; 乙酰酪氨酸; 原型维生素 C; 化学稳定性; 美白功效; 3D 皮肤模型

作者简介: 徐思伟, 工程师, 主要从事化妆品配方的研究。E-mail: siwei.xu@corday.tech。



徐思伟

维生素 C (Vitamin C, VC, 抗坏血酸, Ascorbic Acid, AA) 通过抑制酪氨酸酶活性、还原黑色素中间体及清除自由基等多途径发挥美白与抗氧化作用^[1-2]。然而, 原型 VC 在光照、高温、中性或碱性水溶液中极不稳定, 易氧化变色失活, 从而限制了其应用^[3]。因此, 开发稳定的 VC 衍生物成为研究重点。VC 乙基醚通过在 VC 分子的 3 号位引入乙基醚键, 保护了其易氧化的烯二醇结构, 从而获得了卓越的化学稳定性, 在广泛的 pH 值 (3.0~6.0) 和温度条件下能长期保持无色与活性^[4-5]。同时, 其两亲性结构使其更易穿透角质层, 在皮肤内被酶解释放 VC, 发挥生物学功效^[6-8]。然而, 在配方研发中, 我们发现高纯度的 VC 乙基醚水溶液在高温 (如 45°C) 加速试验中, 虽未出现如原型 VC 般的明显黄变, 但其 pH 值会随时间显著下降。这表明 VC 乙基醚可能存在某种程度的水解或其他反应, 从而影响其长期稳定性或皮肤刺激性^[4]。乙酰酪氨酸作为一种氨基酸衍生物, 其结构中的羧基与氨基可能通过缓冲作用或分子间相互作用, 对 VC 乙基醚的微环境产生影响^[9-10]。基于此, 本研究提出假设: 乙酰酪氨酸的加入能够稳定 VC 乙基醚水溶液的理化环境, 从而可能协同提升其整体的配方稳定性和生物功效。为验证此假设, 我们设计并对比了“2% VC 乙基醚 + 1% 乙酰酪氨酸”复配体系与不同质量浓度 (3% 和 5%) 原型 VC 水溶液的化学稳定性 (高温加速试验) 及体外美白功效 (MelaKutis® 3D 皮肤模型)。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: 1260 型液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; FE28-Standard 型 pH 计, 梅特勒-托利多国际有限公司; CPA225D 型电子天平 (感量 0.01 mg), 赛多利斯科学仪器有限公司; GHP-9160 型隔水式恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 150I 型 CO₂ 培养箱, 赛默飞世尔科技公司; SW-CJ-2F 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; DCC1201 型皮肤颜色仪, 德尔芬技术有限公司; UVB 辐照仪 (飞利浦品牌特定型号), 皇家飞利浦公司; 单反相机 (型号: EOS 80D), 佳能公司; BX53 型正置显微镜, 奥林巴斯株式会社。

试剂和耗材: 3D 黑色素皮肤模型 (MelaKutis®) (批号 MS251202), 广东博溪陕西分公司; 黑色素皮肤模型培养液, 广东博溪陕西分公司; PBS, 索莱宝; 曲酸, 源叶生物; 银染试剂盒, 索莱宝。VC 乙基醚标准品 (3-O-乙基抗坏血酸, 纯度 ≥ 98.0%), 武汉昱华科技有限公司; 乙酰酪氨酸 (生化纯), 乙腈 (色谱纯), 甲醇 (色谱纯), 磷酸 (优级纯), L-抗坏血酸 (原型 VC, 医药级), 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 6.5), 国药集团。所有试剂如无特殊说明均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 稳定性测试

为全面验证乙酰胺氨酸对 VC 乙基醚的稳定作用，本研究结合 pH 监测与高效液相色谱（HPLC）定量分析，系统评估了各体系在 45℃ 高温下加速老化一周后的化学稳定性。pH 测试结果显示，单一的 2% VC 乙基醚水溶液在老化后 pH 值从 4.13 显著下降至 3.31（ $\Delta\text{pH} = -0.82$ ），表明其存在水解导致酸度增加的趋势；而添加 1% 乙酰胺氨酸后，复配体系的 pH 值极为稳定（老化前后分别为 2.77 与 2.75， ΔpH 仅 -0.02），直观证明了乙酰胺氨酸的缓冲作用。为探究 pH 变化背后的本质，我们进一步采用 HPLC 对活性成分进行精确定量。

1.2.1.1 HPLC 方法学验证

为精确定量 VC 乙基醚与原型 VC 的含量，分别建立了相应的 HPLC 方法。首先进行了方法学验证，如图 1 所示，包括（1）线性关系：分别配制系列浓度的 VC 乙基醚标准品溶液（20、50、80、100、150、200 mg/L）和原型 VC 标准品溶液（10、20、50、80、100、200 mg/L）进行测定。以峰面积（Y）对浓度（X，mg/L）进行线性回归。结果显示（图 1），VC 乙基醚在 20~200 mg/L 浓度范围内线性关系良好，回归方程为 $Y = 17.7713X - 19.1208$ ，相关系数 $R^2 = 0.99987$ ；原型 VC 在 10~500 mg/L 浓度范围内线性关系良好，回归方程为 $Y = 35.1408X - 1.1295$ ，相关系数 $R^2 = 0.99973$ 。（2）精密度试验：取同一浓度的 VC 乙基醚及原型 VC 标准品溶液（分别为 50 mg/L 和 100 mg/L），于 1 日内连续进样 6 次，考察日内精密度；连续 3 日每日进样 2 次，考察日间精密度。结果表明，VC 乙基醚峰面积的日内、日间 RSD 分别为 0.35% 和 0.98%；原型 VC 峰面积的日内、日间 RSD 分别为 0.52% 和 1.21%。均小于 2.0%，表明方法精密度良好。（3）稳定性试验：取同一供试品溶液（复配体系与原型 VC 溶液），于室温下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析。结果显示，VC 乙基醚和原型 VC 峰面积的 RSD 分别为 0.91% 和 1.56%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。（4）加样回收率试验：在已知

含量的样品基质中，分别加入低、中、高 3 个浓度的 VC 乙基醚或原型 VC 标准品，按 1.2.1.2 项下色谱条件测定，计算回收率。结果表明，VC 乙基醚的平均回收率为 99.3%（ $\text{RSD}=1.2\%$ ， $n=9$ ），原型 VC 的平均回收率为 98.7%（ $\text{RSD}=1.5\%$ ， $n=9$ ）。

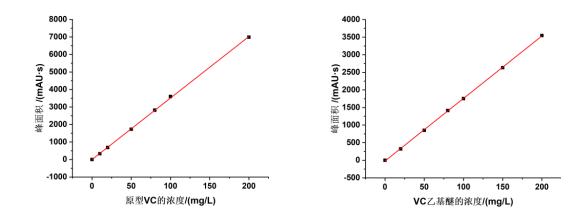


图1 原型 VC（左）和 VC 乙基醚（右）的 HPLC 标准曲线图

1.2.1.2 色谱条件与样品分析

针对 VC 乙基醚，采用 Agilent SB-C18 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5μm），流动相为乙腈 -0.1% 磷酸水溶液（体积比 5 : 95），等度洗脱，流速设定为 1.0 mL/min，柱温 30℃，在 242 nm 波长下进行检测^[4]。对于原型 VC，因其在常规 C18 柱上保留弱且峰形不佳，选用了更适于极性化合物的 AQ-C18 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5μm），流动相为甲醇 -0.1% 磷酸水溶液（体积比 2 : 98），以增强其保留并改善峰形，流速 1.0 mL/min，柱温 30℃，检测波长为 240 nm^[11]。两种方法的进样量均为 10μL，分析时间均控制在 15min 内完成。

1.2.2 体外美白功效评估（基于 MelaKutis® 3D 黑色素皮肤模型）

基于 3D 黑色素皮肤模型（MelaKutis®），通过检测皮肤模型的表观色度、表观亮度（L* 值）和黑色素分布 3 个维度指标的变化（表 1），评估待测样品的美白功效^[12]。实验前，准备 3 个样品：样品 1（2% VC 乙基醚 + 1% 乙酰胺氨酸水溶液）、样品 2（3% 原型 VC 水溶液）和样品 3（5% 原型 VC 水溶液）。根据测试分组准备 6 孔板，每孔添加 3.7mL 黑色素模型培养液，将模型接收当天（Day0）的模型转移至标记好的 6 孔板中；每个试验分组需要 3 个模型，将所有放有模型的 6 孔板转移至 CO₂ 培养箱中培养（37℃、5%CO₂）。

表1 测试分组

组别	样品名称	给药浓度 / (μg/mL)	刺激条件	检测模型	检测指标	检测方法
空白对照 (BC)	/	/	/			
阴性对照 (NC)	/	/				
阳性对照 (PC)	曲酸	500	UVB	MelaKutis®	1. 表观色度	1. 拍照
样品组	样品1	原样	(50mJ/cm ²)		2. L* 值	2. 色差仪
	样品2	原样			3. 黑色素分布	3. 银染法
	样品3	原样				

自模型接收当天 (Day0) 起, 阴性对照、阳性对照以及样品组每天进行 UVB 辐照处理 ($50\text{mJ}/\text{cm}^2$), 空白对照组不进行 UVB 辐照, 每天仅更换培养液。阳性对照组 (曲酸) 和样品组在 Day3, Day5 分别进行两次给药, 给药方式为表面给药^[13]。模型连续培养 7 天 (Day7) 后, 收样, 待测。模型培养结束后, 用相机进行表观拍照。具体拍照标准操作如下: (1) 相机模式: 手动; 拍照参数设置: 焦距 = 5.8 mm, 孔径 = f/8, 光圈 F22, 快门速度 = 1/80s, ISO=1600。(2) 将黑色素皮肤模型放于比色卡的中心位置进行拍照。

对表观色度检测结束后的模型, 进行 L^* 值检测。具体检测操作如下: 将模型置于平整坚硬的白色平面上, 角质层朝上放置, 将色差仪检测孔垂直对准模型表面进行检测, 每个模型重复读数 3 次, 取平均值作为单个模型的 L^* 值读数。取各试验组的模型, 4% 多聚甲醛溶液固定 24h, 包埋切片后, 根据银染试剂盒说明书进行染色, 显微镜下拍照^[14]。最后, 计算提升率和抑制率, 其中

提升率 = (样品组 - 阴性对照组) / 阴性对照组 $\times 100\%$;

抑制率 = (阴性对照组 - 样品组) / 阴性对照组 $\times 100\%$ 。

1.2.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism 作图, 结果表示为 Mean $\pm$ SD。各组间比较采用 t -test 统计分析。统计分析均为双尾。 $P \geq 0.05$ 认为无统计学意义, 标注为 “n.s.”, $P < 0.05$ 认为具有显著差异, 标注为 “*”, $P < 0.01$ 认为具有极显著差异, 标注为 “**”。

2 结果与讨论

2.1 化学稳定性结果

2.1.1 HPLC 方法学验证结果

如 1.2.1.1 所述, 所建立的 HPLC 方法在线性、精密度、稳定性和回收率等方面均符合定量分析要求, 可用于样品中 VC 乙基醚和原型 VC 的准确含量测定。

2.1.2 pH 稳定性与含量保持率

如图 2 所示, 标准品原型 VC 和 VC 乙基醚的驻留时间分别为 2.144min 和 6.136min。为验证乙酰酪氨酸对 VC 乙基醚微环境的稳定作用, 测定了各样品在 25°C (初始) 及 45°C 加速老化一周后的 pH 值。结果如图 3 所示, 单一的 2% VC 乙基醚水溶液在 45°C 老化 6 天后, pH 值由 4.13 显著

下降至 3.31 ($\Delta\text{pH} = -0.82$), 证实其在高温下可能发生水解等反应, 导致体系酸度增加。与之相对, 1% 乙酰酪氨酸水溶液的 pH 值则保持高度稳定 ($\Delta\text{pH} \approx 0$)。关键的是, 在二者复配后, “2% VC 乙基醚 + 1% 乙酰酪氨酸” 体系的 pH 值在老化前后几乎未发生改变 (仅下降 0.02), 其稳定性远优于 VC 乙基醚单独存在时。该结果证明了乙酰酪氨酸能够通过其分子结构中的羧基与氨基提供的缓冲能力, 有效稳定 VC 乙基醚的局部微环境, 抑制其水解导致的 pH 下降, 从而从物理化学层面提升配方的整体稳定性。

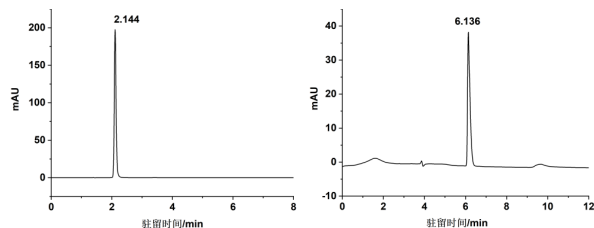


图2 标准品原型 VC (左) 和 VC 乙基醚 (右) 的 HPLC 色谱图

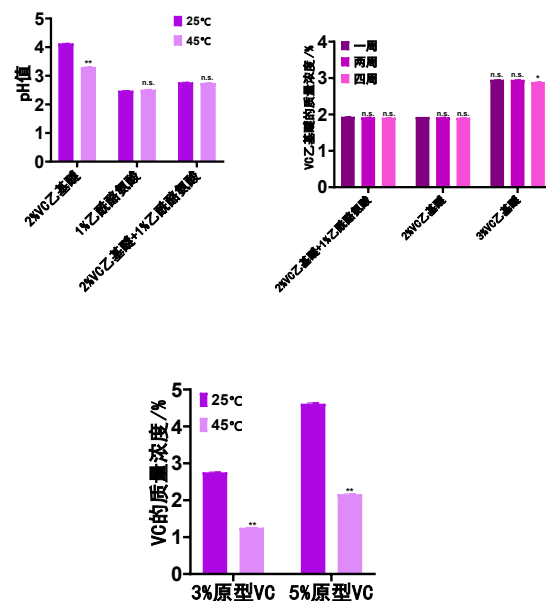


图3 各样品在高温老化过程中的 pH 值变化

2.2 体外美白功效结果 (MelaKutis® 模型)

2.2.1 表观色度结果

通过对比模型表观照片 (图 4) 可以发现, 与未受刺激的空白对照组 (BC) 相比, 经 UVB 刺激的阴性对照组 (NC) 模型颜色显著加深, 表明黑化模型构建成功。阳性对照曲酸 (PC) 及所有样品组 (样品 1-3) 均能不同程度地改善由 UVB 引起的肤色加深。其中, 样品 1 (复配体系) 的模型在视觉上较样品 2 (3% VC)、样品 3 (5% VC) 更为明亮, 接近阳性对照的效果。

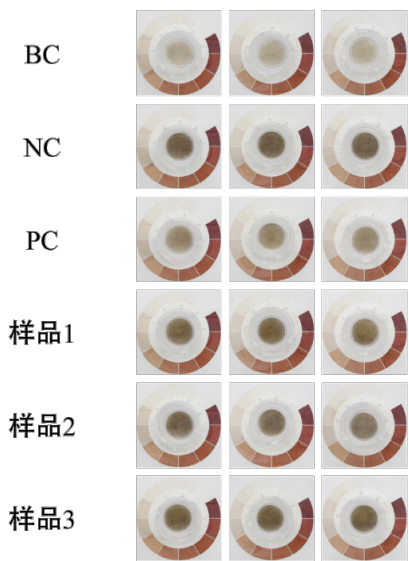


图4 各实验组 MelaKutis® 模型的表现色度照片

2.2.2 表观亮度 (L^* 值) 测试结果

为量化肤色亮度，进一步测定了模型的 L^* 值，数据如表2与图5所示。与 BC 组相比，NC 组 L^* 值显著下降，再次验证刺激有效。与 NC 组相比，所有样品组 L^* 值均显著回升。值得注意的是，样品1（复配体系）的亮度提升率（7.73%）显著高于样品2（3% VC, 4.25%）与样品3（5% VC, 5.33%），甚至达到阳性对照（曲酸）提升率的一半以上。这表明，尽管复配体系的总活性物浓度（3%）与样品2相当，但其提亮效果却优于浓度更高的5%原型 VC。

表2 各实验组 MelaKutis® 模型的 L^* 值及提升率

组别	Mean	SD	<i>P</i> -value	提升率 (vs NC) /%
BC	52.11	1.26	/	/
NC	41.67	0.33	0.000 ##	/
PC	47.33	0.33	0.000 **	13.58
样品1	44.89	0.51	0.001 **	7.73
样品2	43.44	0.51	0.007 **	4.25
样品3	43.89	0.19	0.001 **	5.33

注：用 t -test 方法进行统计分析时，与 BC 组相比，显著性以 # 表示， P -value < 0.05 表示为 #， P -value < 0.01 表示为 ##；与 NC 组相比，显著性以 * 表示， P -value < 0.05 表示为 *， P -value < 0.01 表示为 **。

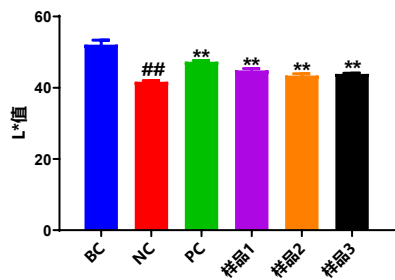


图5 各实验组 MelaKutis® 模型的 L^* 值比较

2.2.3 黑色素分布测试结果

通过组织切片银染法评估黑色素颗粒的沉积情况（图6），并进行半定量分析（表3），从细胞层面揭示了样品的美白机制。分析显示，NC 组黑色素沉积面积是 BC 组的 3.75 倍。与 NC 组相比，样品1对黑色素生成的抑制率高达 37.07%，分别约为样品2（15.73%）的 2.4 倍和样品3（24.53%）的 1.5 倍。这一结果与 L^* 值数据高度吻合，共同表明：2% VC 乙基醚与 1% 乙酞酪氨酸的复配体系，在抑制黑色素合成的关键美白通路上，展现出显著优于等量及更高浓度原型 VC 的效能。

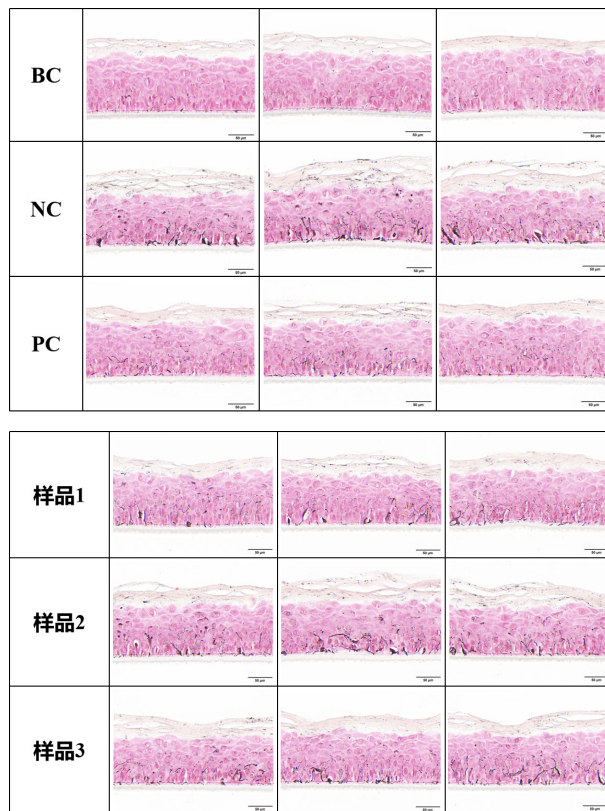


图6 各实验组 MelaKutis® 模型切片黑色素银染图（示例）

表3 各实验组 MelaKutis® 模型的黑色素相对面积及抑制率

组别	相对面积平均值	SD	<i>P</i> -value	抑制率 (vs NC) /%
BC	1.00	0.06	/	/
NC	3.75	0.07	0.000 ##	/
PC	1.83	0.04	0.000 **	51.20
样品1	2.36	0.07	0.000 **	37.07
样品2	3.16	0.15	0.003 **	15.73
样品3	2.83	0.15	0.001 **	24.53

注：用 t -test 方法进行统计分析时，与 BC 组相比，显著性以 # 表示， P -value < 0.05 表示为 #， P -value < 0.01 表示为 ##；与 NC 组相比，显著性以 * 表示， P -value < 0.05 表示为 *， P -value < 0.01 表示为 **。

分析显示（图7），NC 组黑色素沉积面积是 BC 组的 3.75 倍。与 NC 组相比，样品1对黑色素生成的抑制率高

达37.07%，分别约为样品2（15.73%）的2.4倍和样品3（24.53%）的1.5倍。这一结果与 L^* 值数据高度吻合，共同表明：2% VC 乙基醚与1% 乙酰酪氨酸的复配体系，在抑制黑色素合成的关键美白通路上，展现出显著优于等量及更高浓度原型 VC 的效能。

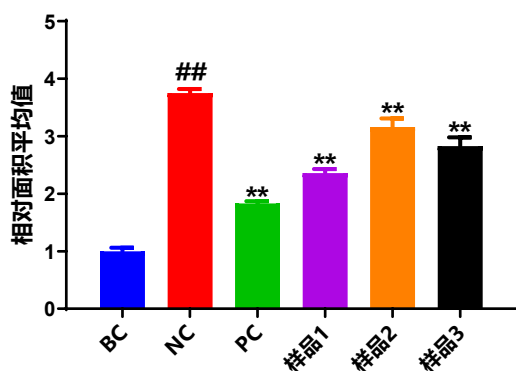


图7 基于 MelaKutis® 模型的各项实验组观亮度 (L^* 值) 比较

3 结论

本研究成功构建并评估了1种由2% VC 乙基醚与1% 乙酰酪氨酸组成的新型复配美白体系。化学稳定性测试表明，乙酰酪氨酸能有效缓冲 VC 乙基醚在高温下的 pH 下降，显著提升了体系的物理化学稳定性，使其核心活性成分保持率高达99.0%，远超原型 VC（约43%）。基于 MelaKutis® 3D 黑素皮肤模型的功效评价进一步证实，该复配体系在提升皮肤模型亮度 (L^* 值提升7.73%) 和抑制黑色素生成（抑制率37.07%）两方面，其效果均显著优于3%（提升率4.25%，抑制率15.73%）及5%（提升率5.33%，抑制率24.53%）的原型 VC 水溶液。综上所述，该复配策略通过乙酰酪氨酸的缓冲稳定与 VC 乙基醚的高透皮特性协同增效，成功克服了高浓度原型 VC 固有的不稳定、透皮差等应用瓶颈，为开发高效、稳定且温和的下一代 VC 类美白护肤品提供了创新的配方思路与坚实的实验依据。

参考文献

[1]Telang P. S. Vitamin C in dermatology[J]. Indian Dermatol Online, 2013, 4(2):143-6.

[2]Gegotek Agnieszka, Skrzydlewska Elzbieta. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid[J]. Antioxidants, 2022: 1993.

[3]Caritá A. C., Fonseca-Santos B., Shultz J. D., et al. Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability[J]. Nanomedicine, 2020: 24102117.

[4]Liao W. C., Huang Y. T., Lu L. P., et al. Antioxidant Ability and Stability Studies of 3-O-Ethyl Ascorbic Acid, a Cosmetic Tyrosinase Inhibitor[J]. J Cosmet Sci, 2018, 69(4):233-243.

[5]Oormila Sasidharan, Anjali Gholap and Rachna Rastogi. A Review of Clinical Efficacy of Topical Vitamin C and Its Derivatives[J]. Pharmaceutical Science and Technology, 2023, 7(2):20-26.

[6]Iliopoulos F., Sil B. C., Moore D. J., et al. 3-O-ethyl-L-ascorbic acid: Characterisation and investigation of single solvent systems for delivery to the skin[J]. Int J Pharm X, 2019: 1100025.

[7]Liston Lord S., Rivas Precious L., Sakdiset Pajaree, et al. Chemical Permeation Enhancers for Topically-Applied Vitamin C and Its Derivatives: A Systematic Review[J]. Cosmetics, 2022: 85.

[8]Enescu C. D., Bedford L. M., Potts G., et al. A review of topical vitamin C derivatives and their efficacy[J]. J Cosmet Dermatol, 2022, 21(6):2349-2359.

[9]Gao Wei, Tang Weikun, Jin Yuchao, et al. Weak interaction-driven equilibrium solubility of N-acetyl-L-tyrosine in thirteen mono-solvents: Molecular simulation, model correlation, and comparative analysis with structurally similar substances[J]. Journal of Molecular Liquids, 2025: 437128422.

[10]Kasai S., Sugimoto K., Miura R., et al. 8-Fluoro-8-demethylriboflavin as a potential active-site-directed reagent for flavoprotein. Reaction with some amino acids[J]. J Biochem, 1983, 93(2):397-402.

[11]Maia A. M., Baby A. R., Yasaka W. J., et al. Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants[J]. Talanta, 2007, 71(2):639-43.

[12]Yang X., Peng F., Huang J., et al. Particulate matter 2.5 induced hyperpigmentation in reconstructed human epidermis model (MelaKutis®)[J]. CHINESE MEDICAL JOURNAL, 2022, 135 (4): 502.

[13]Cui X., Mi T., Zhang H., et al. Glutathione amino acid precursors protect skin from UVB-induced damage and improve skin tone[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2024, 38: 312-20.

[14]何林燕, 李想, 钱绍祥, 等. 3D 皮肤模型法评估库拉索芦荟花的美白功效研究 [J]. 香料香精化妆品, 2021(4):4.

An Evaluation of the Synergistic Skin-Lightening Effects of Ethyl Ascorbic Acid and Acetyl Tyrosine Versus Pure Ascorbic Acid: An in Vitro Skin Model Study

Xu Si-wei*, Zhou Biao, Lin Lin, Chen Li, Wang Rui-rui, Lu Yi
(Shanghai Corday Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201703, China)

Abstract : Although vitamin C possesses excellent skin-lightening and antioxidant efficacy, its prototype is highly unstable in aqueous solutions, limiting its application. This study investigated a composite system consisting of 2% ethyl ascorbic acid (3-O-ethyl ascorbic acid, a highly stable and skin-permeable VC derivative) and 1% acetyl tyrosine. It was found that acetyl tyrosine effectively buffered the pH decrease observed in the ethyl ascorbic acid aqueous solution during high-temperature (45°C) accelerated testing. Efficacy evaluation based on the MelaKutis® 3D pigmented skin model demonstrated that the composite system significantly outperformed both 3% and 5% prototype VC aqueous solutions in enhancing model brightness (L^* value) and inhibiting melanin generation. This study provides a new formulation strategy and experimental basis for developing skin-lightening products with both high stability and high efficacy.

Keywords : ethyl ascorbic acid; acetyl tyrosine; prototype vitamin C; chemical stability; skin-lightening efficacy; 3D skin model

