

# 새로운 in vitro SPF 측정법 개발

오선진, 김진준, 김태현, 김명옥, 강세훈  
(LG화학 화장품연구소)

## Development of a novel in vitro SPF evaluation method

Sun-jin Oh, Jin-jun Kim, Tae-hyun Kim,  
Myoung-ok Kim, Se-hoon Kang  
(Cosmetics Research Center, LG Chemical Ltd.)

### 요 약

본 연구에서는 SPF 측정법에 있어서 널리 사용되어온 희석법과 박막법의 문제점에 대해 검토하였으며, 이들의 문제점을 극복하기 위하여 인체를 대상으로한 in vivo 평가법과 측정 및 평가등의 실험조건에 있어서 유사성을 갖는 in vitro 평가법을 개발하였다. 이 새로운 in vitro 평가결과는 in vivo 평가결과와 0.93의 높은 상관계수를 나타내었다. 한편 이 in vitro 측정법의 유용성을 더욱 확인하기 위하여 Transpore<sup>R</sup> tape에 시료를 도포한 후 SPF-290 분석기(Optometrics, USA)를 이용한 측정결과와 비교한 결과 SPF20 이하의 시료일 경우 0.95이상의 높은 상관계수를 얻을 수 있었다.

또한 광량(radiation exposure, 40mJ/cm<sup>2</sup>)을 일정하게 유지시키고 광세기(irradiance, 3x10<sup>-3</sup>-2.5x10<sup>-5</sup> W/cm<sup>2</sup>)를 변화시켜 홍반의 정도를 조사한 결과, 광세기와 홍반의 정도에는 관련이 없음을 알수 있었다.

### 1. 서 론

과도한 자외선에 인체가 노출되었을 때 발생하는 홍반이나 종양등의 광의학적 변화는 비교적 잘 알려져 있으며<sup>(1,2,3,4)</sup> 이를 방지하기 위한 자외선 차단제품들의 개발 또한 이미 상당한 수준에 이르고 있다. 자외선 차단 효과를 평가하는 방법은 나라마다 각기 다르며<sup>(5,6)</sup> 그 실험치도 나라마다 각기 상이한 데 1978년 FDA에 의해 도입된 SPF(Sun Protection Factor)개념이 보편적으로 널리 사용되고 있다<sup>(7)</sup>. 새로운 자외선 차단제품의 개발시 기준이 되는 SPF값을 결정하는 데에는 사람을 대상으로한 in vivo평가가 필수적으로 요구되나 많은 시간소모와 과도한 실험비용 및 피시험자 확보 등의 문제점 때문에 제품 개발단계에서 in vivo실험은 적절하지 못한 것으로 보인다. 따라서 in vivo SPF측정 결과와 좋은 상관관계를 가지는 in vitro SPF측정법 개발에 지금까지 많은 연구가 이루어졌다. 초창기 in vitro방법으로 사용된 희석법<sup>(8)</sup>과 박막법<sup>(9,10)</sup>은 in vivo결과와 많은 차이가 존재하는 것으로 확인되었으며, hairless mouse<sup>(11)</sup> 및 human cadaver skin<sup>(12)</sup>의 epidermis를 이용한 in vitro방법의 경우 in vivo결과와 높은 상관관계를 보이거나 mouse나 인체의 epidermis를 제조하는데 많은 어려움이 존재하여 효율적이지 못한 것으로 보고되었다. 한편 피부표면에서 자외선의 반사 및 산란으로 인한 측정오차를 보정하기 위해 Stockdale등<sup>(13)</sup>은 silicone rubber를 이용한 positive skin cast를 Diffey와 Robson<sup>(14)</sup>은 피부표면과 비슷한 굴곡을 보이는 Transpore<sup>R</sup> tape을 시료도포 대상물질로 각각 소개하였다. 특히 Diffey등은 Transpore<sup>R</sup> tape을 통과한 빛의 세기에 각 파장에서의 erythmal effectiveness를 곱한 후 자외선 차단제를 도포한 경우와 도포하지 않은 경우 각 측정값의 비율로써 in vitro SPF값을 정한 결과 in vivo data와 높은 상관관계를 보인다고 보고하였다<sup>(15)</sup>. 그러나 시험시료의 표본크기가 작고 in vivo SPF결과의 부정확성 및 UVA를 방출하지 않은 광원의 사용등으로 보고된 상관계수와는 상당한 차이가 존재하리라 생각된다. 이에 본 연구에서는 지금까지 사용된 in vitro SPF측정법의 문제점 및 광세기와 홍반의 정도조사 그리고 최근에 저자가 개발한 in vitro SPF측정법을 소개하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 광세기와 홍반의 정도

Table I 과 같이 광세기를 상이하게 하고 노출시간을 조정하여 피부에 최소홍반량

만큼의 광량을 각각 적용시켰을 때 나타나는 홍반의 정도를 Christopher등<sup>(16)</sup>의 방법으로 조사하였다. 광원으로는 Xenon Arc lamp를 사용하였고 1MED가 40mJ/cm<sup>2</sup>인 성인남자를 피시험자로 선택하였다.

## 2.2. 시료내용 및 도포방법

본 연구의 in vitro 및 in vivo SPF평가에 사용된 시료는 UV absorber 또는 UV blocker로 구성된 자외선 차단제품 8종이며 In vitro SPF 측정시 시료도포 대상물 질로서 표면굴곡이 피부표면과 유사한 Transpore<sup>R</sup> tape을 사용하였다. 수술용 장갑을 사용하여 in vivo 측정법의 경우와 동일하게 시료를 2mg/cm<sup>2</sup>로 도포하였으며 도포 15분 후에 SPF측정을 실시하였다.

## 2.3. In vitro 자외선 차단효과 측정방법

시료 도포물질로 Transpore<sup>R</sup> tape을 이용하였으며, 광원으로는 Multiport Solar UV Simulator (USA, Solar Light Co.)를, detector로는 UVB probe를 장착한 Radiometer (USA, International Light Ltd.)를 사용하였다. 측정방법은 3.7X10<sup>-3</sup>W/cm<sup>2</sup>의 광세기로 피부 type III의 최소홍반량에 해당하는 광량인 45mJ/cm<sup>2</sup>까지 도달하는 시간을 t<sub>0</sub>로 놓은 다음 각 시료를 2mg/cm<sup>2</sup>로 도포한 후 광량이 45mJ/cm<sup>2</sup>까지 도달하는 시간(t)을 측정하여 Fig.1에 나타낸 방법으로 SPF값을 정한다.

## 2.4. In vivo 자외선 차단효과 측정방법

### 2.4.1. 각 피시험자의 MED값 평가

각 피시험자의 등에 1x1cm<sup>2</sup> 넓이의 10개 소구획을 만들어 3.4x10<sup>-4</sup>W/cm<sup>2</sup>의 광세기로 등부위에 다음과 같은 광량을 조사하였으며, 광조사 24시간 후 육안에 의해 Erythema의 정도를 판정하여 MED값을 결정하였다.

### 2.4.2. SPF 판정을 위한 시료도포

수술용 장갑의 손가락 부위를 잘라 각 시료 48mg의 무게를 단 후 피시험자의 등부위 4x6 cm<sup>2</sup>의 넓이에 잘 문질러 2mg/cm<sup>2</sup>의 두께로 균일하게 도포한다.

### 2.4.3. SPF판정을 위한 일광조사

시료를 도포하지 않았을 때의 MED값이 40-50mJ/cm<sup>2</sup> 인 피시험자에 국한하여 1x1cm<sup>2</sup> 넓이로 6개의 소구획을 나눈 후 각각의 시료를 피시험자의 등에 도포하였다. 시료도포 15분 후 solar simulator(Oriel, U.S.A.)를 사용하여 광조사를 실시하였다.

### 2.4.4. 일광차단지수(SPF)의 측정

SPF는 일광조사 24시간 경과 후 아래의 공식으로 구한다.

$$SPF = \frac{\text{일광차단제를 도포한 곳의 MED}}{\text{일광차단제를 도포하지 않은 곳의 MED}}$$

## 2.5. 시료도포량에 의한 자외선 차단효과 측정방법

8% Homomenthyl salicylate(HMS, FDA공인시료)와 Powder type 시료를 다양한 도포량으로 피부에 적용한 다음 최소홍반량이 40mJ/cm<sup>2</sup>에 해당하는 피시험자에게 1MED만큼의 광량을 노출시키고 광노출 24시간 후 홍반의 발생정도를 육안과 Colorimeter(Minolta, Japan)로 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 광세기와 홍반의 정도

Table I과 같이 광량을 일정하게 조정한 후 홍반발생 정도를 조사한 결과 #1에서 #5까지 동일한 홍반을 나타내었다(Fig.2.). 이로부터 홍반의 발생정도는 광세기보다는 광량에 의존한다는 사실과 아래와 같은 등식을 확인할 수 있었으나 피부가 홍반을 나타내기 위한 최소 한계 광세기를 본 실험으로 구하지는 못하였다.

$$\text{to} \sum E(\lambda)I_o(\lambda) = t \sum E(\lambda)I(\lambda)$$

to, t : 광노출시간/ I<sub>o</sub>, I : 광세기/ E : Erythral effectiveness

### 3.2. 기존 in vitro SPF 측정법(희석법, 박막법)의 문제점

가장 효율적인 in vitro SPF 측정방법은 실험의 전 과정에 있어서 in vivo 상태와 유사한 조건을 만들어 주는 것이다. 그러나 지금까지 사용되어온 in vitro SPF 측정 방법은 in vivo의 경우와 여러부분에서 상이하고 많은 오차를 수반하였다. 이에 in vivo SPF 측정법으로 널리 사용되어온 희석법과 박막법의 원리 및 문제점 (Fig. 3, Fig.4.)을 살펴보았다.

#### 3.2.1. 희석법의 문제점

In vitro SPF 측정에 사용된 희석법의 경우 시료를 일정농도로 희석한 후 spectrophotometric assay를 사용하여 초기 광세기와 시료를 투과한 광세기의 비율로써 SPF값을 정하였는데 이 방법의 문제점은 다음과 같다.

- 1) 광의 시료 투과거리가 in vivo의 경우 약 0.002cm이나 희석법의 경우 1cm로 Beer Lambert의 법칙에 적용되었을 때 오차가 발생할 수 있다(Fig.3.).
- 2) In vivo 측정에서는 체온 및 수분등으로 피부에 도포된 시료중 휘발성분의 증발이 일어난다. 이로 인해 시료가 in vitro 측정의 경우와는 상이한 상태가 되어 오차가 발생할 수 있다.
- 3) In vitro 방법과는 다르게 in vivo의 경우 표면굴곡을 갖은 피부에 도달한 광의 일부가 반사 및 산란작용을 일으켜 측정오차가 발생한다 (Fig.4.).

#### 3.2.2. 박막법의 문제점

박막법의 경우 광투과도가 좋은 두 판(석영판) 사이에 시료를 넣고 희석법과 동일하게 spectrophotometric assay를 사용하여 SPF값을 정한다. 박막법은 희석법과는 다르게 광의 시료 투과거리를 in vivo의 경우와 동일하게 조정할 수 있으나 희석법의 문제점으로 보고된 3.2.1의 2)와 3)을 극복하지 못해 오차가 발생한다고 본다.

### 3.3. 시료 도포량에 따른 자외선 차단효과

시험시료(8% HMS, powder type 시료)의 도포량에 따른 홍반의 정도를 측정한 결과 두시료 모두  $2\text{mg}/\text{cm}^2$ 의 도포량에서 최소홍반이 나타났다. 이로부터 SPF 평가시 시료도포 두께를  $2\text{mg}/\text{cm}^2$ 로 정한 FDA의 규정이 의미있음을 확인할 수 있었다(Fig.5). 이것은  $1\text{mg}/\text{cm}^2$ 의 도포량에서 일광차단효과가 현저히 감소한다는 오<sup>(17)</sup> 등의 결과와 일치되었다. 그러나 소비자가 실제로 사용할 때 일광차단제를 포함한 화장품 도포량은 문화적 차이로 인하여 동양과 서양이 서로 다르며 우리나라 사람에서도 나이, 직업 및 개인의 취향에 따라 많은 차이가 있을 것으로 판단되므로 화장품의 도포량에 대한 광범위한 조사가 새로운 일광차단제 개발 및 그 성능의 검정에 필요할 것으로 본다.

### 3.4. In vivo 및 in vitro 자외선 차단효과 비교

SPF 평가의 FDA공인 시료인 8% HMS를 control로 사용하였다. Control인 8% HMS의 SPF값( $\text{SPF } 4.24 \pm 1.14$ )을 in vivo방법으로 측정한 결과  $4.8 \pm 0.8$ 로써 in vivo 실험이 비교적 정확하게 측정되었음을 확인할 수 있었다. 또한 각 시료의 in vitro SPF값을 측정한 결과 in vivo결과와 0.93의 높은 상관계수를 나타내는 것으로 조사되었다(Table II.). 비록 이러한 상관관계는 in vivo결과의 정확성에 의존하지만 본 실험방법이 기존에 사용되어온 in vitro 측정방법의 근본적인 문제점(시료도포두께, 시료도포 대상물질의 표면굴곡, 순간적인 광노출 등)을 극복하였으며 실험의 전 과정이 in vivo SPF 측정 및 해석방법과 유사하므로 실험결과의 신뢰성은 높은 것으로 판단된다. 그리고 1990년대 이후 세계적으로 널리 보급되었으며 erythema effectiveness를 도입하여 in vivo 결과와의 높은 상관관계를 얻은 것으로 보고된 SPF-290 분석기(Fig.6.)와 본 실험방법을 20종의 시료에 대해 비교분석한 결과 0.89의 상관계수를 얻었으며, SPF-290 analyzer로 27이하의 SPF값을 나타낸 시료에서는 0.95의 상관계수가 얻어져 본 실험방법의 정확성을 확인할 수 있었다(Fig.7.). SPF-290 분석기는 시료중 분체에 의해 산란되어 투과되는 빛을 측정하지 못하기 때문에 in vivo 결과보다 높게 측정되는 단점이 있었으나 detector부분에 integrating sphere를 장착하여 in vivo와의 상관성을 향상시킨 것으로 보고하였다. 지금까지 사용되어온 in vitro SPF 측정방법의 공통점은 각 시료의 순간적인 광의 차단효과를 측정한 다음 이를 control인 8% HMS의 광차단 측정값과 비교하여 SPF값을 정하였다. 그러나 in vivo시험에서 나타나는 홍반은 일정시간 동안의 광노출에 의해 발생하므로 광 노출시간 동안 피부에 도포된 시료의 상태변화가 수반되

며, chromopore를 함유한 각질형성세포(Keratinocyte)가 UV-spectrometry에서 방출하는 광량으로는 반응을 보이지 않을 것으로 판단된다. 이에 Diffey등<sup>(14)</sup>은 시료를 투과한 광세기에 각 파장에 독특한 erythema effectiveness를 곱하여 in vivo결과와 높은 상관관계를 얻었다고 보고하였다. 그러나 이 방법 역시 광노출이 순간적이어서 노출시간 동안 일어나는 시료의 상태변화를 포함하지는 못하는 것으로 판단된다. 본 연구결과에 의해 소개된 in vitro SPF평가법이 많은 부분에서 in vivo SPF평가와 유사하지만 시료 도포대상 물질로 사용한 Transpore<sup>R</sup> tape은 피부의 생물학적인 성질을 함유하고 있지 않아 high-SPF 일광차단제품의 평가시에는 오차가 발생할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 향후 피부각질층과 생물학적 성질이 유사한 인공피부의 개발에 더욱 심도있는 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

## Abstract

We have recently developed a novel in vitro SPF evaluation method with a high correlation coefficient ( $r=0.93$ ) to in vivo SPF values(test sunscreen formulas : cream, foundation). In this method, the in vitro SPF value was determined by the ratio of the time taken to achieve the minimal erythema dose with and without the sunscreens applied. We also reviewed the dilution and thin-layer methods for in vitro SPF evaluation, and investigated the relationship between irradiance( $3 \times 10^{-3} - 2.5 \times 10^{-5} \text{W/cm}^2$ ) and the degree of erythema. The degree of erythema was similar if the radiation exposure( $40 \text{mJ/cm}^2$ ) was kept constant. It was obtained more than 0.90 correlation coefficient when it was compared the results by our new method with those from SPF-290 analyzer (Optometrics,U.S.A.).

## 참 고 문 헌

1. Ogawa K., Odagiri H. and Kumagai S., Development of novel in vitro SPF measurement method incorporating the UVA photoaugmentative effect,

- I.F.S.C.C., 623-640 (1994).
2. Rieger Martin M., Keratinocyte function and skin health, *Cosm.&Toil.*, 107, 35-43 (1992).
  3. Luciann L. H. and Pentland Alice P., Mechanisms of UV-induced Inflammation, *J.Invest.Dermatol.*, 1, 35-41 (1993).
  4. Parrish John A., Jaenicke Kurt F., Anderson R.Rox, Erythema and Melanogenesis action spectra of normal human skin, *Photochem.Photobiol.*, 36, 187-191 (1982).
  5. Stockdale M., Sun protection factors, *Int.J.Cosmet.Sci.*, 7, 235-246 (1985).
  6. Helmut Bremer, Sunscreen regulation outside the US, *Cosm. & Toil.*, 1045, 35-38 (1990).
  7. Food and Drug Administration, Federal Register, 43, 166-38206 (1978).
  8. Groves G.A., In vitro and in vivo methods to define sunscreen protection, *Austr. J. Dermatol.*, 20, 112-119 (1979).
  9. Robertson Donald F. and Groves Gordon A., The selection and use of topical sunscreens, *Med.J.Aust.*, 2, 1445-1451 (1972).
  10. Cumpelik Boris M., Sunscreens at skin application levels : Direct spectrophotometric evaluation, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 31, 361-366 (1980).
  11. Sayre Robert M., Patricia P.A., Gordon J.L. and Edward M., A comparison of in vitro and in vivo testing of suncreening formulas, *Photochem. Photobiol.*, 29, 559-566 (1978).
  12. Pearse A.D., Human stratum corneum as a substrate for in vitro sunscreen testing, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 15, 234-244 (1993).
  13. Stockdale M., A novel proposal for the assessment of sunscreen product efficacy against UVA, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 9, 85-89 (1987).
  14. Diffey B.L. and Robson J., A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 40, 127-133 (1989).
  15. Sayre Robert M., Sunscreen testing methods : In vitro protections effectiveness, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 31, 133-143 (1980).
  16. Christopher Y., Ying B.S., John A.Parrish and Pathak M.A., Additive



erythemogenic effects of middle(280-320nm) and long(320-420nm) wave UV,  
J. Invest. Dermatol., 63, 273-278 (1974).

17. 오 선진, 김 진준, 강 세훈, 윤재일, 일광차단제의 도포량에 따른 광방어지  
수의 변화, 대한 피부연구학회지 (1995).

Table I The relationship between irradiance and radiation exposure

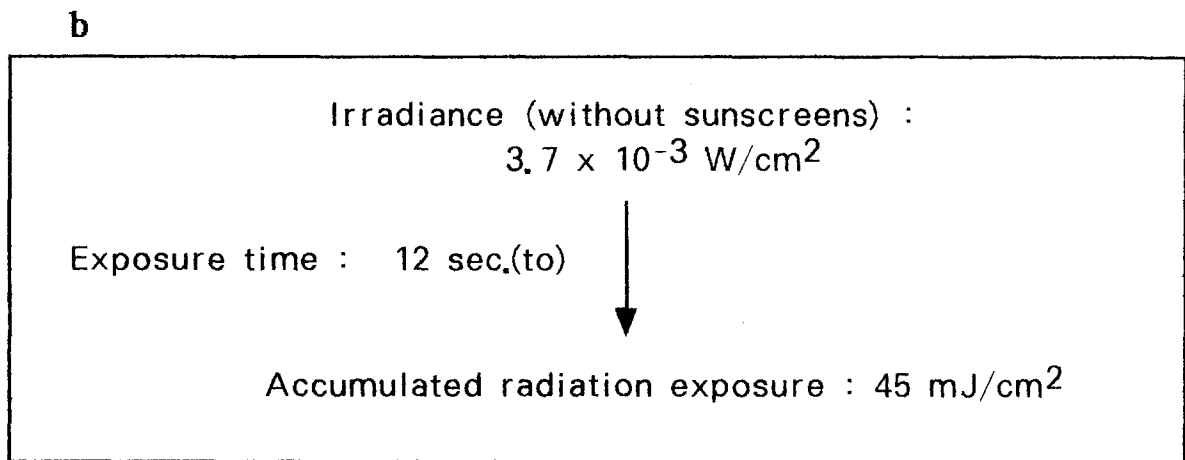
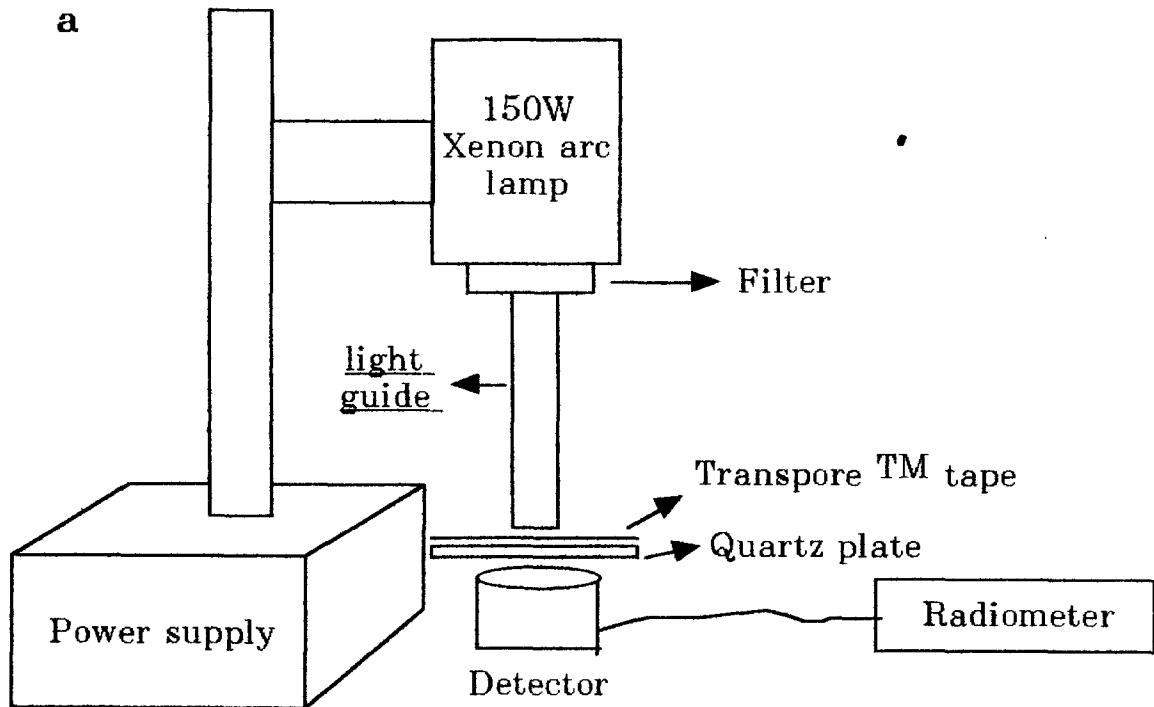
Radiation exposure = irradiance X exposure time

	#1	#2	#3	#4	#5
Irradiance (W/cm <sup>2</sup> )	$3.0 \times 10^{-3}$	$6.7 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-4}$	$7.4 \times 10^{-5}$	$2.46 \times 10^{-5}$
Exposure time	13sec	1min	3min	9min	27min
Radiation exposure (mJ/cm <sup>2</sup> )	40	40	40	40	40

Table II Comparison of SPF values determined by in vivo and the new in vitro method.  
 (#1~#5: Cream, #6~#8: Foundation)

	in vivo SPF value	in vitro SPF value
8% HMS	4.8	4.7
1	35	35
2	12	13
3	35	44
4	8	10
5	35	51
6	24	21
7	24	21
8	18	25

$r = 0.93$



$$\text{In vitro SPF Value} = \frac{t}{t_0}$$

- (t : the time taken to achieve the MED when the sunscreen product was applied  
 t<sub>0</sub> : the time taken to achieve the MED when the sunscreen product was not applied)

Figure 1 Diagrammatical representation of the equipment used (a) and the calculation of SPF values by this in vitro method (b)

#1

#2

#3

#4

#5

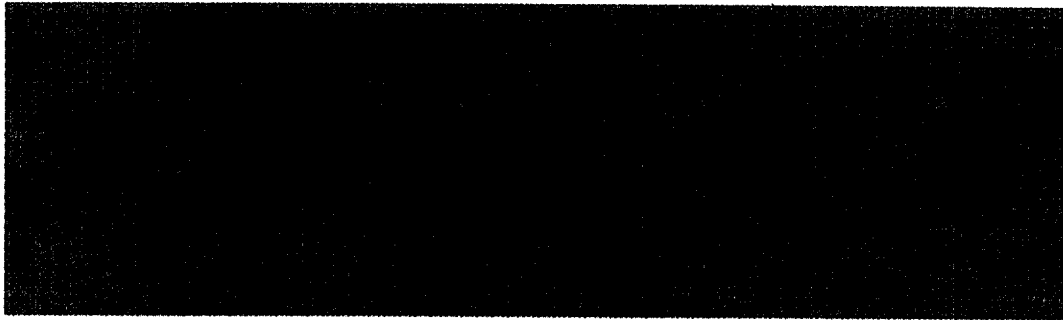
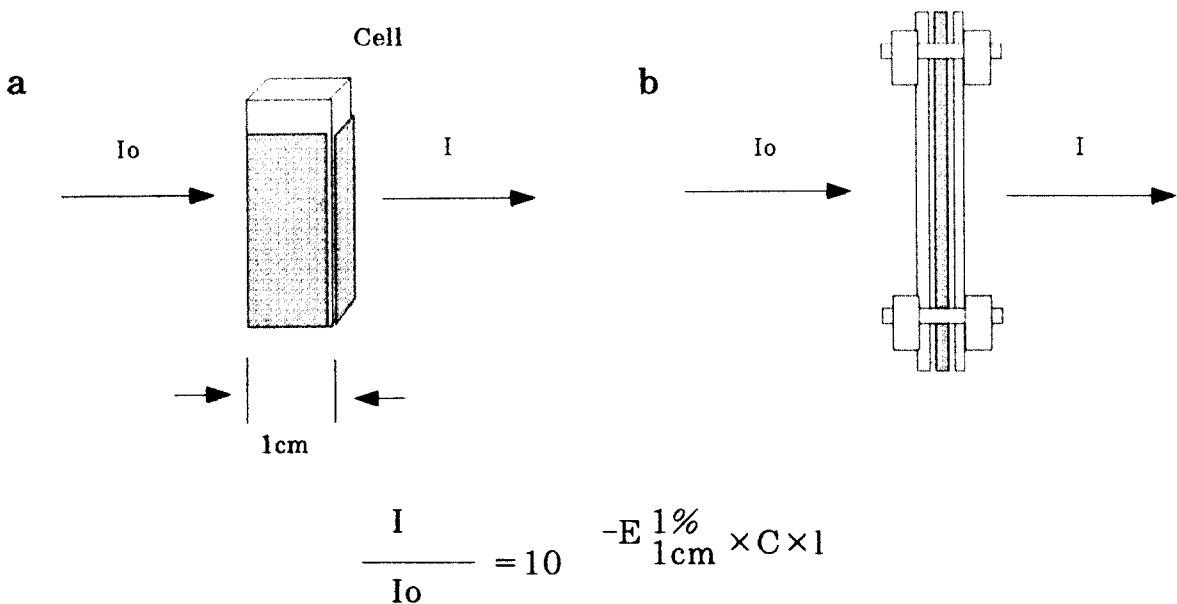


Figure 2 The effect of irradiance on erythema production  
#1~#5 is identical with that of Table I



E : extinction coefficient,

C : the concentration of sunscreen in the film or solution,

l : the thickness of film or path length of a solution

Figure 3 The principle of calculating SPF values from in vitro transmission measurement

(a: the dilution method b: the thin film method)

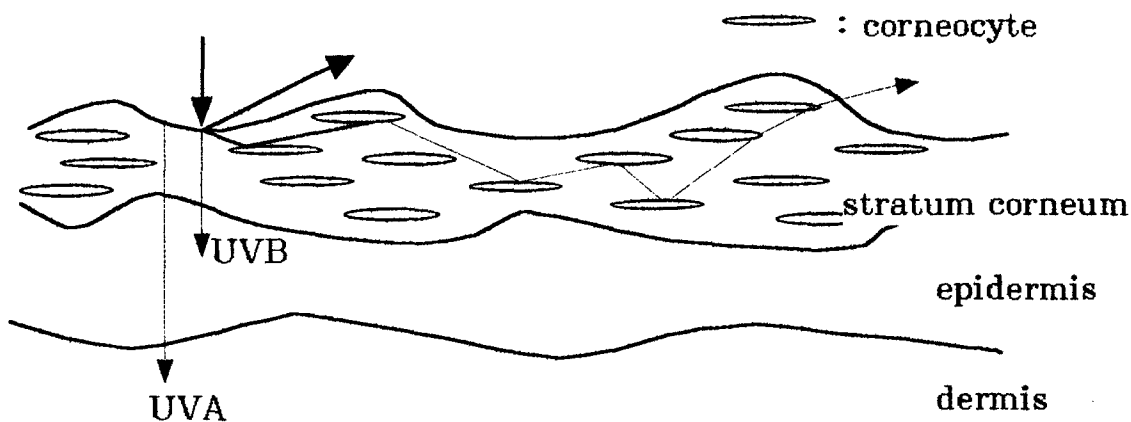


Figure 4 Possible pathway for UV radiation in the skin

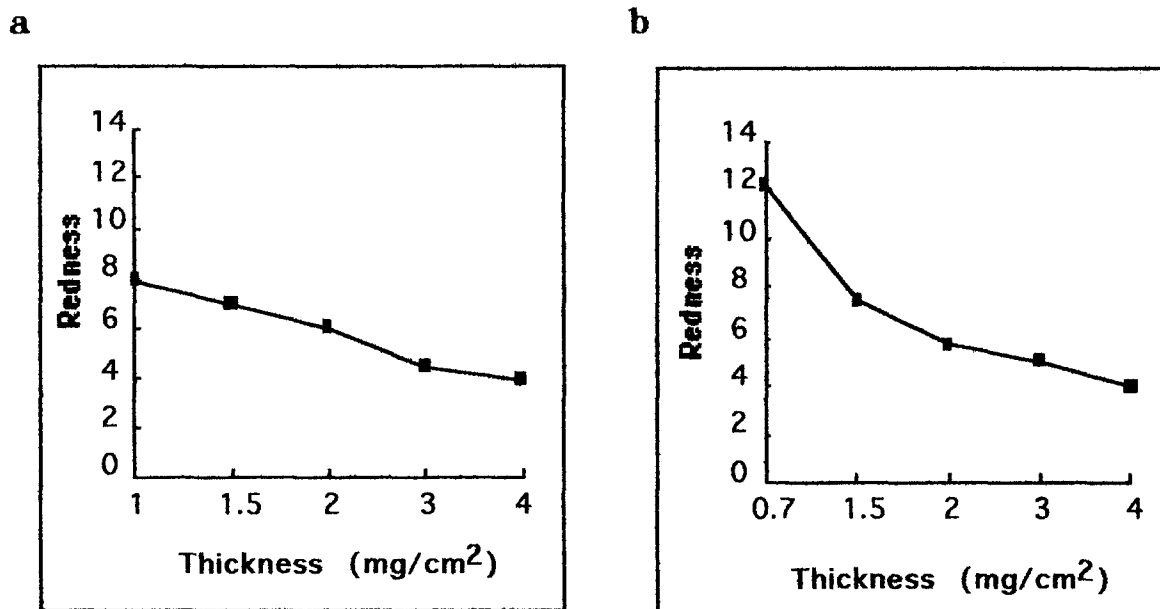
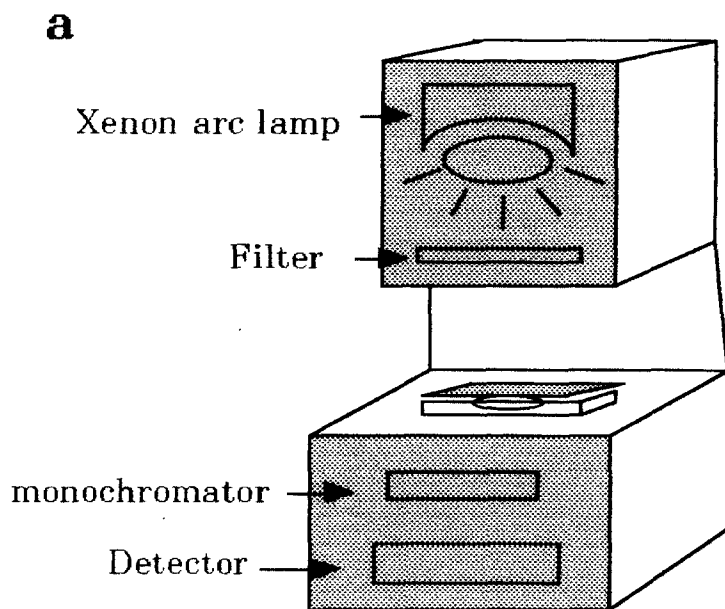


Figure 5 The effect of applied thickness on sunscreen protection (in vivo method) a: 8% HMS b: powder type sample



**b**

$$SPF = \frac{\sum_{290}^{400} E\lambda \times B\lambda}{\sum_{290}^{400} (E\lambda \times B\lambda / \overline{MPF\lambda})}$$

$$MPF\lambda = 1/T\lambda = T_{ref} / T_{un}$$

$$\overline{MPF\lambda} = \frac{n}{\sum_{i=1}^n (MPF\lambda)_i} / n \quad (n=18)$$

Figure 6 : Diagrammatic representation of the SPF-290 analyzer(a)  
and calculation formulas of SPF by the SPF-290 analyzer(b)

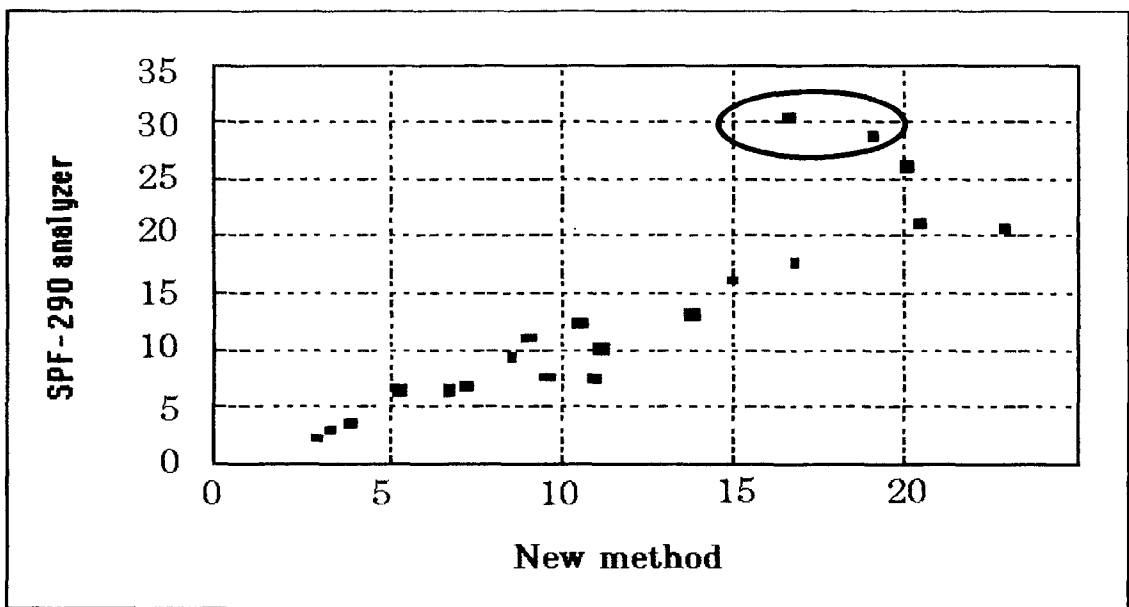


Figure 7 Comparison of SPF values obtained by SPF-290 analyzer and the new in vitro method  
 (  $R=0.89$ ,  $R=0.95$  : Except two data which was circled)