

In vitro SPF 측정법 개선에 관한 연구

안 성 연[†] · 배 지 현 · 이 해 광 · 문 성 준 · 장 이 섭

태평양기술연구원 피부과학연구소

Improvement of *in vitro* Sun Protection Factor Measurement

Sungyeon Ahn, Ji Hyun Bae, Hae Kwang Lee, Seong Joon Moon, and Ih-Seop Chang

Skin Research Institute, Amore Pacific R&D Center, 314-1, Bora-ri, Giheung-eup, Yongin-si,
Gyeonggi-do 449-729, Korea

요 약: *In vitro* method는 *in vivo* results를 예측하기 위해 사용되어지는 것이 가장 큰 목적이므로 지금까지 *in vitro* SPF test는 여러 formulations를 screen 하거나 self-tanners의 activity에 미치는 cosmetic ingredients의 영향을 연구하는 데에 이용되어져 왔다. *In vitro* SPF test는 신속하고 객관적이며 적은 비용으로 사람에게 *in vivo* test를 하기에 앞서 protective formulas를 pre-screen 하며, 따라서 *in vitro* test가 유용하게 원하는 역할을 하기 위해서는 *in vitro* SPF 평가법의 정확성이 무엇보다 중요하다. 본 연구에서는 건조시간을 15분으로 고정하면서 기존에 사용했던 substrate인 Transpore[®] tape을 이용, 도포 방법을 개선하기 위한 시도를 하였다. 우선 기존 시험법의 분석을 통한 현 수준을 파악하고, 사용되고 있는 Transpore[®] tape의 외측으로부터 일정 부위만 사용하도록 개선하였다. 또한 다양한 시도를 통해 광원의 scan 부위에만 국소적으로 도포하는 방법이 도포시 발생하는 오차를 줄일 수 있음을 확인하였으며, 개선된 시험법을 이용하여 반복성과 선형성이 뛰어난 시험 결과를 얻어낼 수 있었다. 통계 패키지 분석을 통한 시험법의 신뢰성 검토에서도 우수한 결과를 보여 이와 같은 시험법을 통해 *in vivo*와 *in vitro* SPF의 보다 정확한 예측 시스템 관계를 구축할 수 있을 것으로 기대한다.

Abstract: The major advantage of the *in vitro* test is that it is a rapid, objective and cost-effective screening methodology. *In vitro* tests can provide a formulation tool to identify new filters that are optimized by combinations of old ones and they can be used to pre-screen protective formulas prior to *in vivo* testing in humans. Therefore, the accuracy of *in vitro* SPF measurement is very important. In this study, improvement of application method of samples was tried to improve the accuracy of *in vitro* SPF measurement. The outer part of Transpore[®] tape was used to apply samples as the substrates and the standard drying time was set at 15 min. The new method, topical applications at light scan areas, results in more accurate and reliable results. This result suggests that more accurate prediction system can be established for *in vivo* SPF with *in vitro* SPF measurement.

Keywords:

1. 서 론

In vitro method는 *in vivo* results를 예측하기 위해 사용되어지는 것이 가장 큰 목적이다. 지금까지 *in vitro* SPF test는 여러 formulations를 screen 하기 위해 사용되어져 왔으며 self-tanners의 activity에 미치는 cosmetic ingredients의 영향을 연구하는 데에 이용되어져 왔다[1]. *In vitro* SPF test의 주요한 장점은 신속하고 객관적이며 적은 비용으로 methodology를 screening할 수 있다는 것으로, *in vitro* SPF test는 새로운 filters의 예전 것과의

최적화된 조합을 확인하기 위한 formulation tool을 제공하고, 사람에게 *in vivo* test를 하기에 앞서 protective formulas를 pre-screen 할 수 있다[2]. 따라서 *in vitro* test가 유용하게 원하는 역할을 하기 위해서는 *in vitro* SPF 평가법의 정확성이 무엇보다 중요한데, *in vitro* 결과와 *in vivo* 결과를 비교해 볼 때 아주 만족할만한 correlation을 찾기란 쉽지 않다. 때문에 *in vitro* SPF 결과의 정확성을 높이기 위한 다양한 시도가 이루어지고 있다. 시료를 도포하는 substrates를 다양화 하거나, 시료의 도포 양을 조절하고, 건조 시간을 변화시키는 시도들이 그것이다.

Substrates는 가장 범용적으로 이용되는 것이 Transpore[®]

[†] 주 저자 (e-mail: syahn@amorepacific.com)

tape이나 그 외에도 roughened quartz plate, VITRO-SKIN™, PMMA plate, excised human epidermis 등이 빈번하게 이용되는 substrates이며 hydrated collagen substrate, poly(vinyl chloride) film 등도 사용된다고 한다.

시료 도포량의 조절은 *in vivo*에서 도포하는 것과 같은 2 mg/cm^2 의 양을 *in vitro* test에서 사용했을 때 일반적으로 결과 값이 높게 나오는 경우가 많아 $0.75 \text{ mg/cm}^2 \sim 2.0 \text{ mg/cm}^2$ 사이의 시료를 도포하여 시험한 결과 *in vitro* test에서는 도포량을 줄이는 것이 *in vivo* test와의 correlation을 더 좋게 만든다는 보고가 있다[3-6].

시료의 도포 후에는 수분이나 다른 휘발성 성분이 증발하여 남아있는 성분의 흡수 혹은 투과 특징에 영향을 미치게 된다. 도포 후 10분에서 20분 사이에는 안정한 MPF (monochromatic protection factor) 값을 나타내기 때문에, 도포 후 약 15분간 건조시키고 protection factor를 측정하는 것이 바람직하다는 의견이 있다[4].

이러한 개선 항목들을 동시에 모두 검토하는 것은 쉽지가 않다. 본 연구에서는 건조 시간을 즉시 개선항목으로 15분 준수하면서 기존에 사용해온 substrate인 Transpore® tape을 이용, 도포 방법을 개선하기 위한 시도를 하였다. 우선 기존 시험법의 분석을 통한 현 수준을 파악하고 사용되고 있는 Transpore® tape의 문제점을 해소한 후, 다양한 시도를 통해 균일하게 도포하며, 도포 시 발생하는 오차를 줄이는 방안에 대한 연구를 하였다. 이후 개선된 시험법을 이용하여 반복성과 선형성을 확인하였으며, 개선 시험법에 대한 신뢰성 여부를 분석해보았다.

2. 시험재료 및 방법

2.1. *In vitro* SPF test

2.1.1. 시험재료

본 연구에서는 시험법의 반복성을 확인하기 위해 일차적으로 가장 많이 선호되는 SPF 수치를 가진 시료(제품 D = SPF 32)를 사용하였다. 또한 자외선 차단 지수대별 제품의 직선성을 확인하기 위해 SPF가 10에서 50내의 범위에 있는 총 5종의 자외선 차단 제품을 시료로 사용하였다. (제품 A = SPF 10, 제품 B = SPF 20, 제품 C = SPF 29, 제품 D = SPF 32, 제품 E = SPF 45)

2.1.2. 시험기기

본 시험에서의 모든 *in vitro* SPF의 측정은 Optometrics사의 SPF 290 Analyzer (Optometrics Inc., USA)를 이용하여 수행되었다. SPF 290 Analyzer의 광원은 xenon arc lamp를 사용하며 측정 파장영역은 290~400 nm이다.

2.1.3. 시험방법

In vitro SPF를 측정하기 위한 시료를 준비한다. Sample holder에 아무 것도 도포하지 않은 3 M Transpore® tape (7.2 cm^2)을 부착시킨 후 SPF Analyzer의 calibration과 광량 및 감도를 조정된 후, reference scan을 한다. 측정 시료는 Micro-cream pipette를 이용하여 $2 \mu\text{l/cm}^2$ 을 취하고, 이 시료를 Transpore® tape 비접착면에 점적하고 골고루 펴 바른 후 15분간 건조 시킨다. Sample을 도포한 plate를 넣어 자외선 차단지수를 측정하며, 1개의 plate에서 1회 측정 시마다 위치를 바꾸어 총 6회 scan한다. 6회 scan 과정을 1회 측정으로 보고 시료마다 9~10회 반복 측정하였으며, 이 값을 평균하였다. SPF Analyzer는 항상 사용 전 30분 정도 warming up 시켜준다.

2.1.4. Transpore® tape의 내외측 비교

위의 기기측정법을 따르면서, 시료를 도포하는 Transpore® tape 1롤을 모두 사용하여 같은 시료를 반복하여 측정하여 tape의 위치가 SPF 결과값에 영향을 미치는지 확인한다.

2.1.5. 도포균일성 평가

위의 기기측정법과 동일하나, sample holder에 부착한 Transpore® tape의 전면에 시료를 도포하지 않고, 6개의 scan이 되는 위치에 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 의 사각형을 표시하고 그 위치에만 시료를 $2 \mu\text{l/cm}^2$ 국소 도포하여(Figure 1b), 전면에 시료를 도포한 결과와 비교한다.

2.1.6. *In vivo* vs. *in vitro* SPF 선형성 평가

각기 다른 자외선 차단지수를 갖는 5종의 시료를 개선된 시험법으로, 한 시료당 9~10회 반복 측정하여 이를 평균한 값을, 기 측정된 *in vivo* SPF 결과와 비교, 선형성을 확인한다.

2.2. Analysis

시험법의 개선 전 후 통계적 분석은 MINITAB Release 13 (Minitab Inc., USA)의 Gage R&R 분석법을 이용하여 수행하였으며, 자외선 차단지수별 선형성 검토는 Excel을 사용하여 확인하였다.

3. 결 과

3.1. Transpore® tape의 내외측 비교

Transpore® tape을 시료 도포용 substrate로 사용할 때 롤로 감겨진 tape의 외측부분을 절단하여 사용할 때와 내측 부분을 절단하여 사용할 때의 시험 결과 값 차이를 확인하기 위해, 동일 시료에 대해서 새 Transpore® tape 1

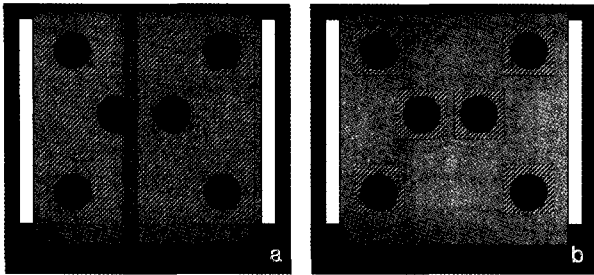


Figure 1. Application areas (slant line) and scan areas (circles). (a) Whole application of Transpore® tape. (b) Topical application at scan area.

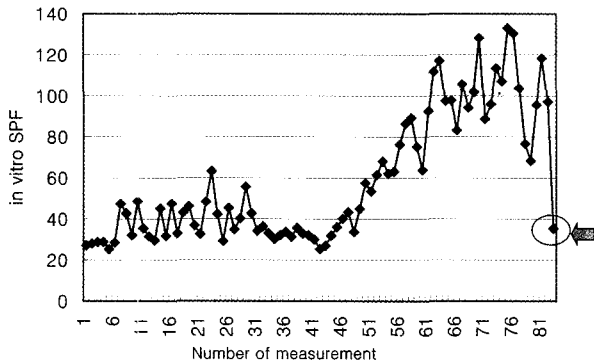


Figure 2. *In vitro* SPF dependent upon area of whole roll of Transpore® tape. The larger number means more inner side of tape. (Arrow = *In vitro* SPF for using outer area with new tape).

물을 사용하여 *in vitro* SPF 결과를 확인해보았다. 시험 결과, 일정 측정 횟수 이상에서 비정상적으로 *in vitro* SPF 값이 증가함을 볼 수 있었다(Figure 2). 본 결과에서 측정 횟수는 한 롤의 tape에 대해 절단해내는 횟수를 의미하며, 따라서 측정 횟수가 큰 것이 tape의 안쪽 부분임을 말해준다. *in vitro* SPF 값은 약 50회 이후부터 비정상적으로 증가하기 시작하며 불안정한 결과를 보여주었다. Tape의 가장 내측까지 사용하여 측정한 후 곧바로 새로운 tape의 외측 부분을 절단, 시료 도포에 이용하여 측정한 결과 다시 안정적인 SPF 값을 나타내었다(Table 1).

Table 1. *In vitro* SPF Dependent Upon Area of Roll of Transpore® Tape

Number of measurement	1	40	82 (last)	1 (new tape)
<i>In vitro</i> SPF	27.14	32.19	97.24	35.31

3.2. 도포균일성 평가

Sample holder에 부착하는 tape의 전면에 시료 도포 시 (Figure 1a)의 도포 불균일성을 해소하기 위해 도포면적을 최소화하여 비교해 보고자 하였다. 도포면적을 최소화하기 위해 광원이 조사되어 scan하는 위치에만 각각 2×2 cm²의 면적을 표시하여 2 μl/cm²의 시료를 도포하였을 때, CV 값이 tape의 전체에 도포한 경우의 25.69에서 부분 도포 시 14.74로 감소하였다(Table 2). Minitab을 이용한 산포 분석 결과에서도 두 방법의 개선 결과가 유의차 있음을 확인할 수 있었다(Figure 3). 미량 시료 도포 시의 오차 확인을 위해 시료를 pipetting하는 대신 2 mg/cm²로 weighing 하여 취하는 방법을 이용한 결과 CV (coefficient of variation)가 15.42로 pipetting으로 취했을 때의 14.74와 큰 차이가 없었다. 손가락을 사용하는 대신 작은 붓을 이용하여 도포하는 경우의 CV는 25.49로 손가락 도포 시 보다 산포가 큼을 알 수 있었다.

3.3. *In vivo* SPF vs. *in vitro* SPF의 선형성 평가

비교적 *in vitro* SPF 값의 변화가 적은 tape의 바깥 부분을 시료 도포 substrate로 이용하고, 도포 균일성 test에서 가장 오차가 적은 방법으로 확인된 국소 도포 방법을 이용하여 자외선 차단지수가 다른 5종의 시료로 *in vivo* vs. *in vitro* SPF의 선형성을 확인하였다.

5종의 시료의 *in vitro* SPF 반복 측정 결과 CV는 5.76~8.04 사이에 있어 매우 정확한 반복성을 가짐을 알 수 있었으며(Table 3), *in vivo* SPF와 *in vitro* SPF 선형성은 R²=0.9583으로 매우 좋은 상관관계를 보였다(Figure 4).

3.4. Analysis

기존 시험법과 방법 개선 후 시험법의 결과를 통계적으로 분석해보기 위해 MINITAB Release 13 (Minitab

Table 2. *In vitro* SPF and CV (coefficient of variance) According to Application Methods

Sample D	<i>In vitro</i> SPF	CV
Method of application	mean ± SD	
Whole application with finger (pipetting, n=10)	28.74 ± 7.38	25.69
Topical application with finger (weighing, n=9)	32.71 ± 5.04	15.42
Topical application with finger (pipetting, n=9)	35.93 ± 5.30	14.74
Topical application with stick ball (pipetting, n=9)	41.01 ± 10.45	25.49

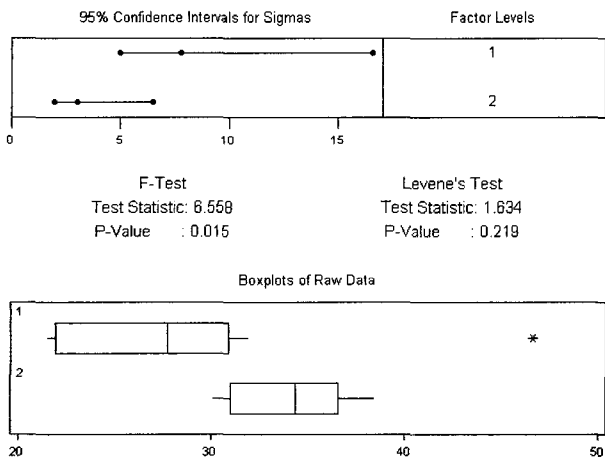


Figure 3. Variation analysis by Minitab (F-test, p-value = 0.015). 1 = Whole application, 2 = Topical application.

Inc., USA)의 Gage R&R 분석법을 이용하였다. 기존의 방법으로 9개의 제품을 3회씩 반복 시험을 수행한 결과로 반복성만을 평가해 보았을 때, total gage R&R 값이 40.43%로 안정화된 측정 시스템이라 받아들여질 수 있는 30%에 미치지 못하였다. 방법 개선 후 시험법은 5종의 제품을 5회씩 반복 수행하여 역시 반복성을 평가해 보았을 때 6.99%라는 놀라운 개선 결과를 가져왔다(Table 4).

4. 고 찰

In vitro SPF의 안정화된 결과의 도출은 *in vivo* SPF의 결과를 예측하여 다양하게 활용하려는 데에 가장 중요한 요소이라 할 수 있다. 현재 수행되고 있는 *in vitro* SPF 평가법은 얼마나 안정되어 있는지 현 수준을 확인하는 분석과정을 거친 결과, 시험법이 안정적이라고 받아들일 수 있는 수준에 미치지 못하여 시험법의 개선이 불가피한 상황이었다. *In vitro* test를 수행하는 각 단계별로 결과 값에 영향을 미치는 인자들이 존재하기 때문에 이러한 방해요소를 최소화하는 방향으로 시험법을 개선하려는 시도를 해보게 되었다.

In vitro SPF의 측정에서 시료의 도포 시 Transpore[®]

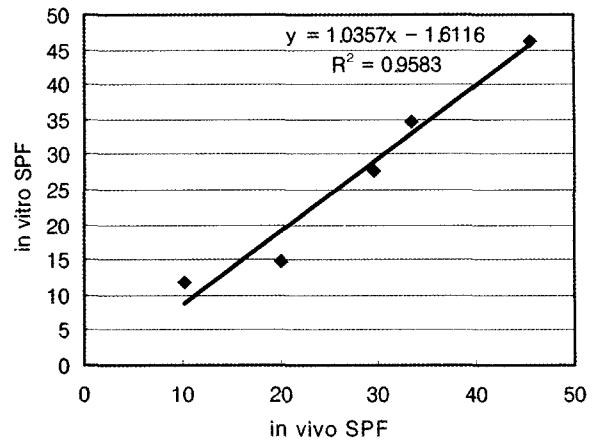


Figure 4. Correlation between *in vivo* SPF and *in vitro* SPF on new method.

Table 4. % Study Variation Between Two Methods (by Gage R&R Analysis of Minitab)

Source	% Study Variation (% SV)	
	Old method	New method
Total Gage R&R	40.43	6.99
Repeatability	40.43	6.99
Part-to-Part	59.57	99.76
Total Variation	100.00	100.00

tape의 안쪽 부분을 사용하게 될 때 결과 값이 높아지는 경향이 있으며 불안정해지는 경우가 잦아, 그와 관련된 문제점을 검토해 볼 필요가 있었다. 이를 위해 Transpore[®] tape의 1롤을 최외곽 부분부터 내측 부분까지 전체를 사용하여 한 종류의 시료를 측정하였을 때의 SPF 값 추이를 확인하고자 하였다. 시험 결과, 예측했던 대로 일정 길이 이상의 tape을 사용하였을 때 비정상적으로 *in vitro* SPF 값이 증가함을 볼 수 있었다. 이러한 결과가 장비의 불안정성이 아님을 확인하기 위해 바로 이어 새 tape의 바깥쪽을 절단하여 재 측정해 보았을 때 안정적인 범위 내의 SPF 값과 동일한 결과를 보여주었다. 기존 문헌에서 Transpore[®] tape은 제조 시 batch에 따라 quality 변화가 있을 수 있고, 내 외측의 pore size가 다르며 tape에

Table 3. Repeatability of *in vitro* SPF on New Method and Correlation with *in vivo* SPF

Sample	Mark SPF	<i>In vivo</i> SPF	<i>In vitro</i> SPF	CV (<i>In vitro</i> SPF)
		mean ± SD	mean ± SD	
Sample A	10	10.16 ± 1.94	11.96 ± 0.81	6.79
Sample B	20	20.01 ± 1.47	14.78 ± 1.13	7.64
Sample C	28	29.50 ± 2.84	27.68 ± 2.12	7.65
Sample D	32	33.31 ± 4.46	34.77 ± 2.80	8.04
Sample E	45	45.56 ± 5.25	46.24 ± 2.66	5.76

있는 접착제의 영향을 받아 결과 값에 영향을 미칠 수도 있다는 보고가 있었다[5,4,7]. 본 시험에서도 tape의 내 외측을 따로 떼어내서 현미경으로 관찰해 본 결과 tape의 내측은 물이 감기면서 힘을 가해 접착제가 눌러 pore를 많이 막고있는 모습을 확인할 수 있었다(결과는 제시하지 않음). 이런 접착제의 엉겨진 상태가 시료의 균일한 도포를 방해하는 요인으로 생각되어졌다. 따라서 안정적인 결과값을 줄 수 있는 범위인 약 40~45회 범위 내의 길이까지만 tape을 사용하는 것으로 시험법에 새로운 규정을 마련하였다.

다음으로 시료를 도포하는 과정에서 균일하게 퍼지지 않아 scan하는 위치에 시료가 과하게 몰리거나 부족하게 되는 현상을 해소하기 위한 시험을 수행하였다. 균일한 시료의 도포란 시료를 도포하는 전체 면적에 동일한 두께로 발라짐을 의미하지만 손가락으로 얇게 펴 바르는 것으로는 한계가 있다고 여겨져, knife coater를 높이 2 mm로 맞춰 시료를 평평하게 도포하려는 시도를 하였다. Knife coater를 이용한 다양한 시도는 2 mm의 높이로 시료를 도포하는 데에 한계가 있어 좋은 결과를 얻을 수 없었다(결과는 제시하지 않음). 시료를 펴 바르는 과정에서 불균일함이 발생되므로 도포면적을 최소화하여 비교해 보고 시험을 추가로 수행하였다. 도포면적을 최소화하여 손가락으로 도포했을 때, CV 값이 tape의 전체에 도포한 경우의 25.69에서 부분 도포 시 14.74로 감소, 변동 폭을 많이 줄일 수 있었다. 이는 광원이 조사되어 scan하는 위치에만 시료를 도포하게 되면 광원이 도포된 면적의 대부분을 통과하게 되므로 도포의 불균일성을 작은 면적 내에서 어느 정도 극복한 것으로 보여진다.

위와 같이 개선한 평가법으로 서로 다른 SPF를 가진 5종의 시료에 대해 반복성을, *in vivo* SPF와 *in vitro* SPF의 상관관계를 보기 위해 선형성을 확인하였다. 비교적 *in vitro* SPF 값의 변화가 적은 tape의 바깥 부분을 시료 도포 substrate로 이용하고 도포 균일성 test에서 가장 오차가 적은 방법으로 확인된 국소 도포 방법을 이용하여 자외선 차단지수가 다른 5종의 시료로 시험한 결과 5종의 시료의 *in vitro* SPF 반복 측정시 CV는 모두 8.04 이하로 매우 정확한 반복성을 가짐을 알 수 있었으며, 선형성은 $R^2=0.9583$ 으로 매우 좋은 상관관계를 보였다.

최종적으로 기존 시험법의 현 수준을 평가했던 것과 마찬가지로 개선된 *in vitro* SPF 평가법의 결과를 MINITAB Release 13 (Minitab Inc., USA)의 Gage R&R 분석법을 이용하여 통계적으로 분석해 보았다. 방법 개선 후 시험법은 5종의 제품을 5회씩 시험하여 반복성을 평가해 보

았을 때 6.99%라는 놀라운 개선 결과를 나타내었다.

그밖에 항상 고려해야 하는 즉시 개선항목으로 '건조시간 15분 준수'와 '광원의 안정화를 위한 주기적인 lamp calibration'을 제시하였다.

본 시험을 통해 도출한 개선 측정법 및 측정 결과는 측정법에 대한 validation data 확보 뿐 아니라, *in vivo* SPF와 *in vitro* SPF 상관성 분석 측면에서의 좋은 결과도 기대할 수 있도록 해주었다. 추가적으로 Transpore[®] tape 이외의 다른 substrates의 validation 시험을 통해 변동을 줄이는 방안도 고려한다면 *in vivo*와 *in vitro* SPF의 보다 정확한 예측 시스템 관계를 구축할 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1. R. Jermann, M. Toumiat, and D. Imfeld, Development of an *in vitro* efficacy test for self-tanning formulation, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **24**, 35 (2002).
2. E. P. Santos, Z. M. Freitas, K. R. Souza, and S. Garcia, *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octyl-methoxy cinnamate, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **21**, 1 (1999).
3. V. wendel, E. Klette, K.-P. Wittern, and H. Gers-Barlag, The influence of pre-irradiation on the predictability of *in vivo* UVA protection with a new *in vitro* method, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **19**, 93 (2003).
4. L. Ferrero, M. Pissavini, S. Marguerie, and L. Zastrow, Sunscreen *in vitro* spectroscopy: application to UVA protection assessment and correlation with *in vivo* persistent pigment darkening, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **24**, 63 (2002).
5. A. Springsteen, R. Yurek, M. Frazier, and K. F. Carr, *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance, *Analytica Chimica Acta*, **38**, 155 (1999).
6. R. Tarroux and M.-F. Assalit, Influence of applied quantity, water-immersion and air-drying on covering and microstructure of physical sunscreen films, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **22**, 447 (2000).
7. S. R. Spruce and J. P. Hewitt, *In vitro* SPF: methodology and correlation with *in vivo* data, *Euro. Cosmetics*, **14** (1995).