

Pomiar stopnia ochrony przed promieniowaniem UVA

Streszczenie

Znaczenie ochrony przeciw promieniowaniu UVA staje się coraz bardziej oczywiste w procesie przeciwdziałania niszczącemu wpływowi słońca na skórę. Mimo to, nie istnieją obecnie żadne oficjalne metody pomiaru stopnia ochrony przed promieniowaniem UVA w produktach kosmetycznych. Nowa metoda *in vitro* opisana w poniższym artykule pozwala na przewidywanie rezultatu pomiaru *in vivo*, dla wszystkich rodzajów produktów przeciwsłonecznych. Przystudowano czterdzieści pięć dostępnych na rynku produktów, używając szorstkich płyt polimetylometakrylanowych (PMMA) jako substratu. Metoda *in vitro* została określona na podstawie widma UVA dla produktu, obliczonego tak, aby zgadzało się ono z pomiarem wartości SPF metodą *in vivo*. Aby wykazać wiarygodność tej metody, skorelowano jej wyniki z punktami końcowymi zakresów UVA określonych metodą *in vivo*. W ten sposób wykazano, że jest możliwe bardzo trafne przewidywanie rezultatów *in vivo*. Nie zaobserwowano żadnej zależności od rodzaju emulsji, kompozycji filtrów, czy fotostabilności produktu. Dopasowanie widma światła UVA do pomiaru *in vivo* wartości SPF eliminuje konieczność dodatkowego wcześniejszego naświetlania produktu. Można wykazać, że nowa metoda *in vitro* pomiaru stopnia ochrony na promieniowanie UVA jest wiarygodna i może być stosowana dla wszystkich produktów dostępnych na rynku.

Wprowadzenie

Światło UV, które dochodzi do Ziemi składa się z promieniowania UVB (290nm – 320nm) oraz UVA (320nm – 400nm). Długości fal w zakresie UVB posiadają o wiele większą energię i dlatego są w stanie bezpośrednio wywoływać rumień. Efektywność ochrony przeciwsłonecznej produktu na promieniowanie UVB może być określone poprzez pomiar wartości SPF za pomocą metody COLIPA (1).

Światło UVA ma niższą energię niż UVB, ale zajmuje o wiele większą część zakresu UV. Co więcej, promieniowanie UVA penetruje skórę głębiej, a najnowsze badania pokazują, że promieniowanie UVA może powodować uszkodzenia skóry (2,3,4). Zmiany powstają w sposób niebezpośredni poprzez tworzenie się wolnych rodników (5). Widoczne zmiany skórne, spowodowane przez promienie UVA są zwykle wynikiem długotrwałego napromieniowywania oraz efektu kumulacji dawek (6).

W odróżnieniu od ochrony przed promieniowaniem UVB, wciąż nie istnieje żadna oficjalna metoda pozwalająca zmierzyć stopień ochrony przed promieniami UVA. Przeprowadzane testy *in vivo* i *in vitro* kończą się ogłaszaniem różnych wyników. Słynnymi przykładami takich różnic są Standard Australijski, metoda oceny poprzez ilość gwiazdek (UVA Star Rating) czy inne niż SPF współczynniki.

Różne wartości podawane dla stopnia ochrony przed UVA bardziej zaciemniają obraz konsumentom, niż służą jako użyteczna informacja. Dodatkowo, dane doty-

czące stopnia ochrony przed UVA, które osiągane są za pomocą różnych metod, nie mogą być porównywalne. Co więcej, nie ma wciąż powtarzalnych i wiarygodnych metod dla różnych form produktów o różnym składzie. Dlatego rozpoczęto badania w celu stworzenia prostszej, powtarzalnej metody *in vitro* dla określenia stopnia ochrony przed promieniowaniem UVA różnych produktów, niezależnie od ich składników oraz kompozycji filtrów. Dodatkowym celem było skorelowanie rezultatów nowej metody z już znanymi metodami pomiaru ochrony UVA przeprowadzanymi *in vivo*. Co więcej, wyniki nowej metody mogą stać się bazą dla wypracowania jasnego, standardowego sposobu określania stopnia ochrony UVA.

Podstawowa technika pomiaru (7) oraz powtarzalność metody (8) została już opisana w literaturze. Poniższa praca skupia się na możliwości stosowania metody względem różnych składników oraz kompozycji filtrów w produktach jak również na sprawdzeniu jej użyteczności jako bazy dla ustalenia jednego sposobu określania stopnia ochrony przeciw promieniom UVA produktu.

Materiały i metody

Spektrometr

W badaniu użyto spektrometr dwuwiązkowy (Cary 3 Bio, Varian). Spektrometr wyposażono w zbierającą światło głowicę integracyjną, wymaganą dla pomiarów rozproszenia światła.

Substrat

Do badania użyto szorstkich płyt polimetylmetakrylanowych Plexiglas® (typ XT, bezbarwne, 24770 UVD, Röhm GmbH, Darmstadt, Germany). Jedną z powierzchni każdej płyty poddano procedurze piaskowania (ziarna szklane, 80-120µm, 2 bar, 30cm), aby uzyskać szorstką powierzchnię. Jako punktu odniesienia użyto szorstkich płyt PMMA z jednorodną warstwą gliceryny.

Aplikacja próbki i pomiar

Produkt ochronny został równomiernie rozmieszczony w małych porcjach na powierzchni płyty PMMA w ilości 0.75 mg/cm² za pomocą mikrostrzykawki (50µl, Hamilton 1705/RN) lub samoopróżniającej się pipety (Varipette 4810, 20µl – Geloader Tips, Eppendorf).

Powyższa ilość zapewnia, że absorbancja wszystkich badanych próbek produktów ochronnych jest mierzona w optymalnym paśmie dynamicznym ($E < 2$) spektrometru.

Następnie rozmieszczone porcje produktu zostały bardzo równomiernie rozprowadzone za pomocą palca zabezpieczonego specjalną nasadką. Przez pierwszych 30 sekund do rozprowadzenia produktu używano jedynie lekkiego nacisku. Kiedy substancje lotne wyparowały konieczne było zastosowanie większego nacisku.

Tak, jak opisują to różni autorzy (9,10,11), metoda opiera się na pomiarze transmisji. Transmisja została zmierzona w paśmie światła UV (290-400nm) w odstępach 1nm. Przeprowadzono pomiary na przynajmniej trzech

plytkach przy czterech różnych pozycjach każdej z płyt.

Pomiary PPD

Pomiary UVA-PPD zostały przeprowadzone *in vivo* w formie testu zewnętrznego/powierzchniowego na wszystkich badanych produktach w okresie trzech miesięcy, w celu uniknięcia różnicowań sezonowych. Zakres długości fali lampy użytej w badaniach PPD *in vivo* (Multiport 601, Fa Solar Light Philadelphia Penns. USA, filters: WG335 3mm, UG 111mm), został wykorzystany do obliczenia stopnia ochrony produktu przed promieniami UVA w metodzie *in vitro*.

Obliczenia

Obliczenia stopnia ochrony przed promieniami UVA w metodzie *in vitro* są szczegółowo opisane w artykule *Wendel'a* (7).

Produkty przeciwsłoneczne

Przebadano czterdzieści pięć produktów ochrony przeciwsłonecznej dostępnych na rynku europejskim i amerykańskim. Produkty zawierały wszystkie powszechnie używane filtry UV oraz kombinacje filtrów korespondujące z ochroną przed promieniowaniem UVB w zakresie SPF 2 do 50. Co więcej, badania objęły także różne typy emulsji. 45 badanych produktów podzielono na następujące kategorie:

- 13 emulsji typu woda w oleju
- 22 emulsji typu olej w wodzie
- 2 olejki
- 6 dyspersji wodnych
- 2 roztwory alkoholowe

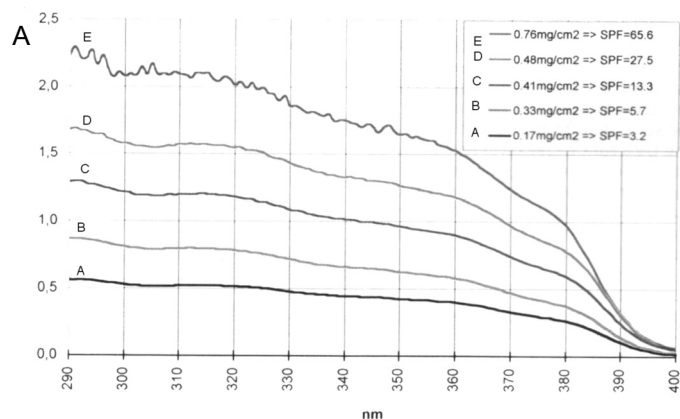
Dwadzieścia trzy przebadane próbki zawierały również pigmentowe filtry UV, a dziesięć zawierało fotoniestabilne kombinacje filtrów UV.

Wyniki oraz dyskusja

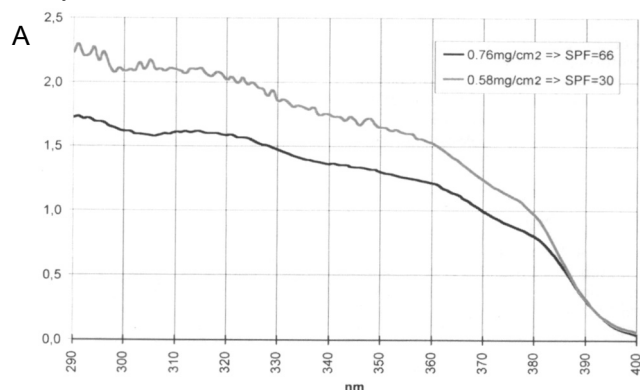
Najważniejszym krokiem w nowej metodzie *in vitro* w określeniu stopnia ochrony produktu przed promieniami UVA jest dostosowanie widm używanych w metodzie *in vitro* do sytuacji *in vivo*. Zasadę oraz wiarygodność tej matematycznej procedury ilustruje następujący przykład. Na szorstkie powierzchnie płyt PMMA zaaplikowano różne ilości produktu ochronnego. Zastosowana ilość maksymalna była tak określona, aby absorbancja przy maksymalnych wartościach widma mieściła się w optymalnym paśmie pomiarowym spektrometru. Tą górną granicę można łatwo i szybko określić według metody opisanej przez *Klette* (12), wykorzystując płyty PMMA zawierające szerokopasmowe filtry UV dla produktów ochronnych.

Zaczynając od maksymalnej zaaplikowanej ilości, ilość tą redukuje się do 0.17 mg/cm² w taki sposób aby zachować równomierne rozproszanie produktu. Wartość SPF w metodzie *in vitro* można obliczyć na podstawie wszystkich zakresów długości fal (7). Zakresy długości fal dla korespondujących zaaplikowanych ilości oraz związane z nimi wartości SPF w metodzie *in vitro* przedstawia rysunek 1.

Dodatkowo, aplikowana ilość była zmieniana aż do momentu, kiedy wartość SPF w metodzie *in vitro* korespondowała w pomiarach wartości SPF *in vivo*, tak jak to przedstawia rysunek 2.



Rysunek 1. Zależność wartości SPF w metodzie *in vitro* od zaaplikowanej ilości.



Rysunek 2: Dostosowywanie zaaplikowanej ilości aby wartości SPF w metodzie *in vitro* korespondowały z wartościami SPF *in vivo* (ciemniejsza krzywa).

Do przekształcania wszystkich zarejestrowanych zakresów długości fal w dane liczbowe używa się prostych obliczeń matematycznych, w czasie modyfikowania aplikowanych ilości do momentu, kiedy wartość SPF w metodzie *in vitro* koresponduje z wartością SPF *in vivo*. Wszystkie krzywe na rysunku 1 mają ten sam charakterystyczny kształt, który jest specyficzny dla testowanych filtrów. Jest to raczej warunek wstępny dla zastosowania prostej kalkulacji, aniżeli powtarzane pomiary w celu dopasowania wartości SPF *in vitro* do wartości SPF *in vivo*. Co więcej, pomiar *in vitro* musi być dopasowany do sytuacji *in vivo* za pomocą różnych ilości aplikowanego produktu oraz przy zachowaniu pewności, że widmo absorpcji mieści się w optymalnym paśmie pomiarowym spektrometru. Następnie pomiar ten musi być przeniesiony na poziom pomiaru *in vivo* za pomocą procedury matematycznej.

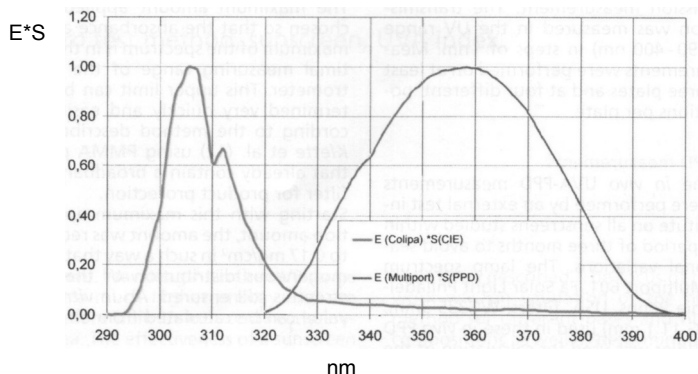
Wynik pomiaru stopnia ochrony, otrzymany przy danej krzywej absorbancji, którą dostosowano do wartości SPF w metodzie *in vivo*, koresponduje ze stopniem ochrony osiągniętym w bezpośrednich pomiarach wartości SPF *in vivo*. Dlatego wewnętrzna normalizacja informacji dotyczących zakresów długości fal do pomiarów wartości SPF *in vivo* zachodzi przy przeniesieniu interakcji *in vivo* między światłem/produktem przeciwsłonecznym/skórą na sytuację *in vitro*.

Krzywa absorbancji, która została znormalizowana do sytuacji *in vivo* jest podstawą dla dalszych pomiarów stopnia ochrony przed promieniami UVA w kolejnych badanych produktach.

Pasma UVB (SPF) nie będzie już badane tylko pod względem spektralnego zachowania się właściwości

ochronnych produktu w paśmie UVA (320 – 400nm). Czynniki PPD *in vitro* będzie obliczony na podstawie widma, które zostało przekształcone do wartości SPF *in vivo*, wykorzystując aktywne widmo PPD oraz widmo źródła promieniowania UVA użytego do pomiaru promieniowania UVA *in vivo*.

Analiza ta bierze pod uwagę obszary krytyczne w paśmie światła UV. Oprócz pomiaru rumienia w paśmie



Rysunek 3: Wynik użytego źródła światła (E) oraz PPD (S PPD) lub widma wywołującego rumień (S CIE).

UVB poprzez aktywny zakres fal wywołujących rumień, inny środkowy obszar około 360nm pokrywa się z aktywnym zakresem PPD, którego znaczenie potwierdzają najnowsze badania (13,14). Rysunek 3 przedstawia iloczyn zakresu fal wywołujących rumień lub aktywnego widma PPD oraz źródła promieniowania.

Wynikiem tego jest względny współczynnik ochrony przed promieniami UVA obliczony na podstawie zmierzonej całkowitej wartości SPF *in vivo*.

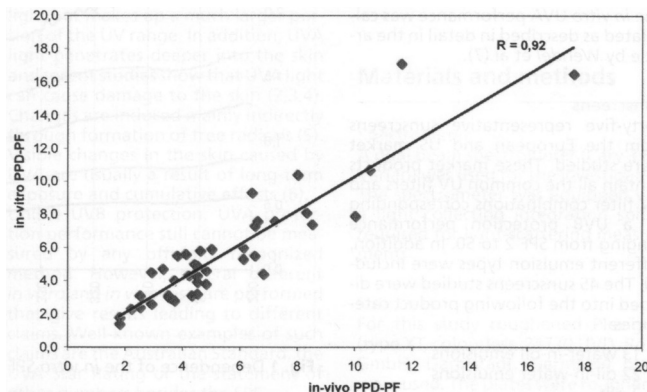
Wszystkie przetestowane produkty ochronne zostały włączone do badań mających na celu sprawdzenie wiarygodności wyników *in vitro*. Współczynnik PPD został określony jako statystyczny punkt końcowy w paśmie światła UVA.

Rysunek 4 przedstawia korelację pomiędzy współczynnikiem stopnia ochrony przed promieniowaniem UVA określonym *in vitro*, a współczynnikiem PPD określonym *in vivo*. Korelacja w całym paśmie jest bardzo wysoka przy współczynniku korelacji $R=0,92$. Taka sama wysoka korelacja została osiągnięta dla różnych kategorii produktów ochronnych. Rysunek 5 przedstawia oddzielne wyniki dla emulsji OW oraz W/O, które to emulsje są najczęściej wykorzystywane w produktach ochronnych. Rysunek ukazuje, że wzdłuż krzywej regresji występuje równomierne rozmieszczenie i dlatego nie pojawia się selektywna zależność od bazy (podstawowych składników) emulsji.

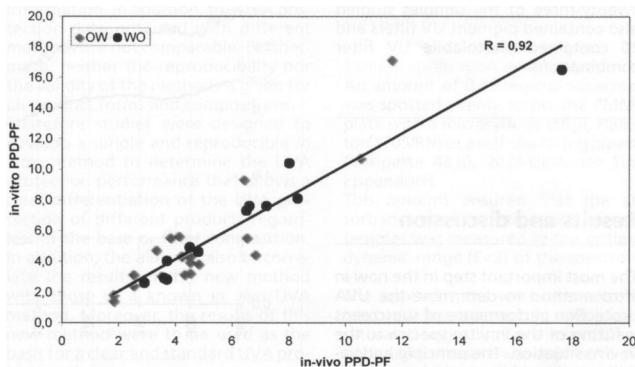
Wyniki dla emulsji zawierających pigment są podobne. Losowe rozmieszczenie danych wzdłuż krzywej regresji przedstawia rysunek 6.

Produkty ochronne, które nie są fotostabilne w związku z zawartą w nich kompozycją filtrów również wykazują wysoką korelację danych *in vitro* i *in vivo*, gdzie losowo rozmieszczone wyniki wzdłuż krzywej regresji znajdują się tuż nad lub pod krzywą.

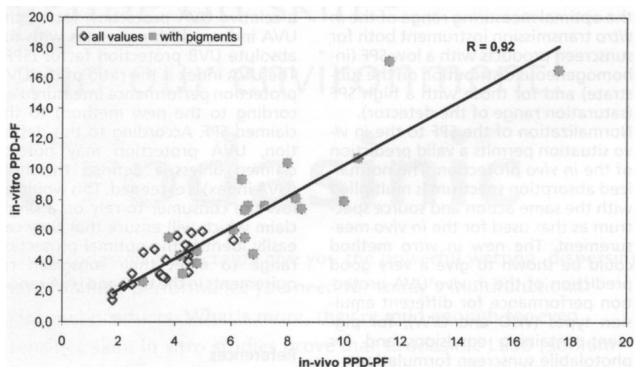
Wyniki te dowodzą, że możliwe jest trafne przewidzenie stopnia ochrony przeciw promieniom UVA w metodzie *in vivo*, na podstawie metody pomiaru stopnia tej ochrony *in vitro*.



Rysunek 4: Korelacja wszystkich wyników *in vitro* z wynikami PPD określonymi *in vivo*.



Rysunek 5: Korelacja wyników *in vitro* oraz *in vivo* dla emulsji OW i W/O.



Rysunek 6: Receptury zawierające pigmenty.

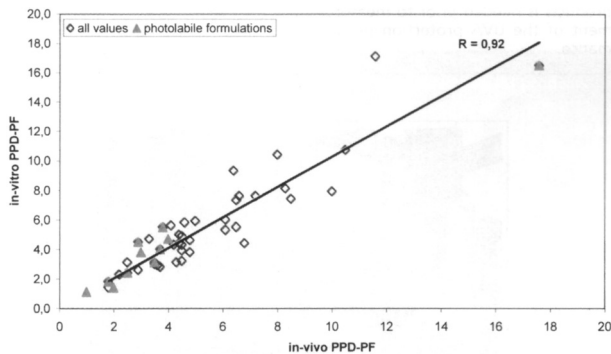
Wyniki nowej metody *in vitro* są bardzo przydatne jako podstawa dla oznaczania stopnia ochrony. Aby móc zaoferować konsumentom jak najlepszą ochronę, poziom stopnia ochrony UVA powinien być równoległy do wartości SPF *in vivo* a sposób jego oznaczania powinien zostać jednoznacznie ustalony. Można to osiągnąć

$$\text{Indeks UVA} = \frac{\text{współczynnik } in\text{-vitro UVA}}{\text{deklarowana wartość SPF}} \times 100$$

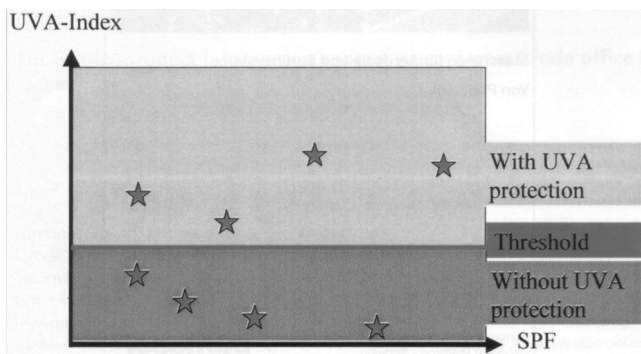
Równanie 1. Definicja indeksu UVA

przez zastosowanie indeksu UVA (równanie 1). Im wyższa wartość, tym wyższy poziom stopnia ochrony przed UVA.

Według tego podejścia, produkt może deklarować ochronę UVA tylko wówczas, jeżeli indeks UVA prze-



Rysunek 7: Receptury charakteryzujące się brakiem fotostabilności.



Rysunek 8: Zasada nadawania oznaczenia stopnia ochrony przed promieniowaniem UVA.

wyższą ustaloną wartością progową. Rysunek 8 ukazuje podstawową definicję tego indeksu.

Wnioski

Nowa metoda pomiaru *in vitro* stopnia ochrony produktu przed promieniami UVA opiera się na pomiarze transmisji w optymalnym paśmie pomiarowym spektrometru. Uzyskany zakres długości fal, w których występuje zjawisko absorpcji jest dostosowywany do zmierzonej *in vivo* wartości SPF za pomocą procedur matematycznych. Umożliwia to konwersję danych spektralnych dotyczących stopnia ochrony produktu do sytuacji *in vivo*, bez potrzeby wypróbowywania różnych ilości produktu, aż do momentu kiedy wartość SPF *in vitro*, koresponduje z wartością SPF *in vivo*. Daje to gwarancję, że zmierzone wartości znajdują się zawsze w optymalnym paśmie pomiarowym instrumentów transmisyjnych użytych w metodzie *in vitro*, zarówno dla produktów ochronnych o niskiej wartości SPF (nierównomierne rozmieszczenie preparatu), jak i o wysokiej wartości SPF (nasycone pasmo detektora).

Normalizacja wartości SPF do sytuacji *in vitro* pozwala na wiarygodne przewidzenie stopnia ochrony w sytuacji *in vivo*. Znormalizowany zakres długości fal odpowiedzialnych za absorpcję mnoży się przez ten sam zakres długości fal widma aktywnego i widma źródła światła, który został użyty w pomiarach *in vivo*. Nowa metoda *in vitro* pozwala na trafne przewidzenie wyników stopnia ochrony UVA w metodzie *in vivo* dla różnego rodzaju emulsji (W/O oraz O/W), zarówno tych zawierających pigmenty, jak i formuł ochronnych reagujących na światło.

W szczególności, równomierne rozmieszczenie wzdłuż krzywej regresji, które obserwuje się dla formuł zawierających składniki, które nie są fotostabilne dowodzi, że nie ma potrzeby przeprowadzania dodatkowo wcześniejszego naświetlania produktu przed pomiarami stop-

nia ochrony przed UVA.

Rezultaty tej metody dostarczają względnego współczynnika ochrony przed promieniowaniem UVA, indeksu UVA, który koreluje z całkowitym współczynnikiem ochrony przed promieniowaniem UVB (czynnik SPF). Indeks UVA jest stosunkiem stopnia ochrony przed promieniami UVA (zmierzonym za pomocą nowej metody), oraz deklarowanej wartości SPF. Według tej definicji, stopień ochrony UVA nie może być określony, jeżeli nie została przekroczona ustalona wartość progowa (indeks UVA). To pozwala konsumentowi polegać na pojedynczym oznaczeniu produktu, na podstawie którego dokonuje on identyfikacji optymalnego dla siebie zakresu ochrony.

Literatura

1. COLIPA, European Cosmetics, Toiletry and Perfumery Association, Colipa SPF Test Method, 94/289 (1994)
2. L.H. Klingman, F.J. Akin, A.A. Klingman, The contribution of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice, *J. Invest. Dermatol.*, 84, 272 – 276 (1985)
3. L.H. Klingman, The protective effect of a broad-spectrum sunscreen against chronic UV-A radiation in hairless mice: A histologic and ultrastructural assessment, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 45, 21 – 33 (2001)
4. B.L. Diffey, Ultraviolet radiation physics and the skin, *Phys. Med. Biol.*, 25, 405 – 426 (1980)
5. E. Bohn, Free Radicals and Aging of the Skin, *Cosmetic Dermatology*, 14, 37 – 40 (2001)
6. B. Guarneri, M. Vacaro, G. Moretti, A. Valenti, F. Guarneri, P. Morganti; Photoaging and free radicals: correlations between skin biomechanical properties and plasmatic levels of skin oxidative species and antioxidant compounds, *J. Appl. Cosmetol*, 18, 65 – 71 (2000)
7. V. Wendel, E. Klette and H. Gers – Barlag, A new *in vitro* test method to assess the UVA protection performance of sun care products, *SOFW*, 127, 12 – 31 (2001)
8. H. Gers – Barlag, V. Wendel, E. Klette, R. Bimczok, C. Springob, P. Finkel, T. Rudolph, H.U. Gozenbach, H. Westenfelder, P. Schneider, D. Kockott, U. Heinrich, H. Tronnier, W. Johncock, R. Langner, H.J. Driller, F. Pflucker, T. Wunsch, The reproducibility of an *in vitro* determination if the UVA INDEX describing the relative UVA protection of sun care products; submitted
9. A.D. Pearse, C. Edwards, Human stratum corneum as a substrate for *in vitro* sunscreen testing, *Int. J. Cosm. Sci.*, 15, 234 – 244 (1993)
10. B.L. Diffey, J. Robson, A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum, *J. Cosmet. Chem.*, 40, 127 – 133 (1989)
11. R.M. Sayre, P.P. Agin, G.J. Levee, E. Marlowe, A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas, *Photochem. Photobiol.*, 29, 112 – 19 (1979)
12. E. Klette, V. Wendel, H. Gers – Barlag; A quick, practical test procedure to evaluate instrument performance for *in vitro* UV measurements; submitted
13. A. Anders, H.J. Altheide, M. Knalman, H. Tronnier, Action spectrum for erythema in humans investigated with dye lasers; *Photochem. Photobiol.* 61, 200 – 205 (1995)
14. A. Anders, H.J. Altheide, H. Tronnier, Actions – spectroscopy of skin with tunable lasers; CIE Collection in Photobiology and Photochemistry IV.6 reportship

Adres korespondencyjny:

Dr. Volker Wendel
4243—F&E Lichtschultz
Beiersdorf AG
Unnastrasse 48
20245 Hamburg
Niemcy
E-mail: Volker.Wendel@beiersdorf.com

Oryginalny tekst wraz z rysunkami i wykresami ukazał się w czasopiśmie **SOFW-Journal**, 6 (128) 2002, 20—23