

Spektrofotometryczna ocena właściwości promieniochronnych produktów kosmetycznych zawierających filtry UV

Agata WAWRZYŃCZAK, Izabela NOWAK – Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

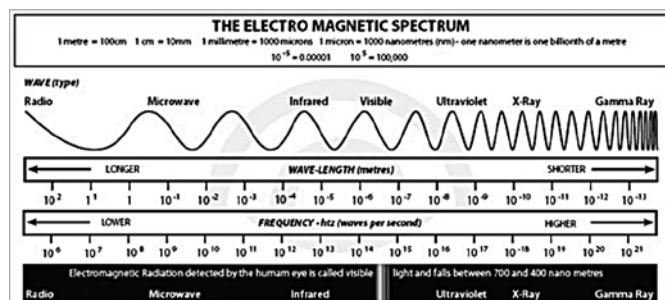
Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 7, 655-660

Wstęp

Powszechnie wiadomo, że nadmierna ekspozycja na promieniowanie z zakresu UV może powodować wiele problemów skórnych, takich jak: oparzenia, przedwczesne starzenie się skóry, obniżenie wydajności systemu odpornościowego organizmu oraz skórne choroby nowotworowe. Stosowanie filtrów UV jest rekomendowane przez lekarzy dermatologów już od wielu lat; mogą one bowiem skutecznie chronić przed nadmierną ilością promieniowania, a tym samym, zapobiegać uszkodzeniom skóry [1]. Produkty kosmetyczne zawierają filtry UV, które są tak skonstruowane, aby absorbować lub odbijać promieniowanie z zakresu UV i w ten sposób chronić komórki skóry przed uszkodzeniem, czy też całkowitym zniszczeniem.

Promieniowanie UV stanowi część promieniowania elektromagnetycznego o długości fali od 200 do 400 nm (rys. 1) i zazwyczaj dzieli się je na trzy zakresy: UVA: 320-400 nm; UVB: 280-320 nm; UVC: 200-280 nm.

Z całkowitej ilości promieniowania UV, które dociera do powierzchni Ziemi, zaledwie 6% stanowią fale z zakresu UVB, natomiast aż 96% to promieniowanie UVA. Zakres fal o najwyższej energii (UVC) jest całkowicie pochłaniany przez warstwę ozonową w stratosferze, gdyż fale te mają relatywnie krótki zasięg, zgodnie ze wzorem 1, który pokazuje wyraźnie, że im wyższa energia fali, tym krótsza jest jej długość.



Rys. 1. Widmo (spektrum) fal elektromagnetycznych

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{1}{\lambda} \quad (1)$$

Wzór 1. Zależność między energią kwantu promieniowania a długością fali (E – energia, h – stała Plancka, ν – częstotliwość fali, λ – długość fali)

Zdolność promieniowania UV do niszczenia komórek skóry rośnie wykładniczo wraz z malejącą wartością długości fali. Promieniowanie o długości fali 280 nm wykazuje 1000 razy większy potencjał niszczący niż fala o długości 340 nm, dlatego też skuteczna ochrona przed promieniowaniem z zakresu UVB wydaje się być najbardziej istotna w zapobieganiu negatywnym efektom nadmiernej ekspozycji na światło słoneczne [2]. Niemniej jednak, wiele badań wskazuje na to, że nie tylko promieniowanie UVB, ale również UVA może wywierać negatywny wpływ na komórki ludzkiej skóry [3-5]. Dlatego też niezwykle istotnym zagadnieniem stało się opracowanie metod pozwalających na ocenę stopnia ochrony przed promieniowaniem UVA.

W niniejszym artykule opisano różne metody pomiaru stopnia ochrony przed promieniowaniem UVB i UVA, ze szczególnym uwzględnieniem metod spektrofotometrycznych.

Pomiar stopnia ochrony przed promieniowaniem UV

Destrukcyjny wpływ promieniowania UV, a w szczególności UVA, na ludzką skórę przejawia się już na poziomie komórkowym i funkcjonalnym. Elementem powodującym te niekorzystne zmiany są wolne rodniki, a zwłaszcza niezwykle reaktywne formy tlenu rodnikowego. Z tego powodu niezwykle istotne jest, aby chronić skórę nie tylko przed powszechnie już znanym zagrożeniem ze strony UVB, ale również przed promieniowaniem UVA.

Ochrona przed promieniowaniem UVB

Powszechnie znany czynnik ochronny SPF (*Sun Protection Factor*), stosowany do opisu preparatów kosmetycznych zawierających filtry UV, definiuje się najczęściej jako stosunek czasu, po którym pojawi się rumień na skórze chronionej kremem z filtrem do czasu powstania efektu rumienia na skórze nie chronionej (wzór 2).

$$SPF = \frac{\text{min. dawka UV wywołująca rumień na skórze chronionej filtrem}}{\text{min. dawka UV wywołująca rumień na skórze niechronionej filtrem}} \quad (2)$$

Wzór 2. Sposób obliczania czynnika SPF

Najczęściej parametr SPF mierzony jest zgodnie z tzw. procedurą *in vivo*, w której odpowiednie testy przeprowadzane są na ochotnikach. 2 mg badanego produktu nakłada się na niewielką powierzchnię skóry (1 cm²) ochotnika, po czym obszar ten poddaje się napromieniowaniu aż do momentu pojawienia się pierwszego zaczerwienienia skóry. Następnie całą procedurę powtarza się na innym kawałku skóry tego samego ochotnika, bez udziału preparatów promieniochronnych. Ten eksperyment pozwala na pomiar odcinków czasu, a wartości te mogą zostać podstawione do wzoru 2 w celu obliczenia czynnika SPF.

Jak już wcześniej wspomniano, ochrona przed promieniowaniem UV, jaką zapewniają preparaty kosmetyczne, określana jest przede wszystkim w testach przeprowadzanych na ochotnikach. Metody te są jednak niezwykle czasochłonne. Dlatego podjęto próby opracowania naukowych technik *in vitro*, które pozwoliłyby na szybkie i wiarygodne określenie czynnika SPF. Pierwsze badania z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych polegały na określeniu spektrum w zakresie UV dla rozcieńczonych roztworów lub cienkich filmów badanych preparatów promieniochronnych. Obecnie najczęściej stosuje się pomiary techniką tzw. rozproszonej transmitancji (*diffuse transmittance*), które uzyskuje się dzięki spektrofotometrom UV-Vis wyposażonym w specjalną przystawkę obciową (*a diffuse reflectance accessory*).

Za międzynarodowy standard w ocenie niekorzystnych efektów wywołanych przez promieniowanie UV w ludzkiej skórze uznaje się dokument wydany przez CIE (Commission Internationale de L'Eclairage): CIE Erythral Action Spectrum [6]. W celu obliczenia czynnika chroniącego przed UV, CIE zaleca określenie procentowego udziału transmitancji w całym zakresie UV dla badanej próbki preparatu. W na-

stępnym etapie obliczeń należy uwzględnić parametr korygujący, tzw. czynnik rumienia (*erythmal weighting factor*), który został wyznaczony dla różnych długości fali i zestawiony tabelarycznie [6].

Podstawową zaletą tej metody jest to, że preparat może być badany bezpośrednio w celi pomiarowej spektrofotometru, bez rozcieńczenia ani wstępnych przygotowań próbki. Niemniej jednak należy podkreślić, że wartości parametrów SPF określone technikami *in vitro* w przypadku filtrów chemicznych są często nieco zawyżone w stosunku do danych uzyskanych metodami *in vivo*. Problem ten nie jest jednak tak wyraźny w przypadku tzw. fizycznych filtrów UV [2].

Wszystkie metody pozwalające wyznaczyć parametr SPF zostały opisane oraz są standaryzowane, np. w dokumencie COLIPA International Sun Protection Factor Test [7]. Są one na bieżąco uaktualniane.

Ochrona przed promieniowaniem UVB

Parametr SPF, który mierzony jest zgodnie z zaleceniami COLIPA [7], wskazuje na zdolności promieniochronne danego preparatu tylko w zakresie UVB, jednak nie daje żadnych informacji na temat ochrony przed promieniowaniem UVA. Ze względu na to, że szkodliwy wpływ promieniowania UVA na ludzką skórę został już potwierdzony naukowo, potrzeba opracowania prostej i niezawodnej metody oceny działania filtrów w tym zakresie promieniowania UV staje się coraz bardziej pilna.

Do tej pory opisanych zostało kilka różnych metod *in vivo*: PPF (*Phototoxic Protection Factor*), PFA (*Protection Factor UVA*), IPD (*Immediate Pigment Darkening*) and PPD (*Persistent Pigment Darkening*), wśród których dwie ostatnie mają największe znaczenie aplikacyjne [8, 9].

Podobnie jak w przypadku czynnika SPF, również metody określania ochrony przed promieniowaniem UVA powinny być wykonywane zgodnie ze standardami opisanymi w literaturze, np. przewodnikiem COLIPA [10]. Testy *in vivo* są nadal najpopularniejszą techniką określania skuteczności preparatów kosmetycznych chroniących przed promieniowaniem UVA. Przeprowadzane są one na ochotnikach i w większości bazują na wizualnej ocenie zmiany zabarwienia napromieniowywanej skóry.

Immediate Pigment Darkening (IPD) – metoda ta bazuje na ocenie zmiany koloru pigmentu skórniego w momencie pojawienia się pierwszych oznak tworzenia rumienia pod wpływem naświetlania promieniowaniem UVA. Dość poważnym ograniczeniem w stosowaniu tej techniki jest fototyp skóry ochotnika, na którym przeprowadzany jest test. Reakcja pigmentu skórniego na promieniowanie UVA może być bez przeszkód zaobserwowana tylko w przypadku osób z III lub IV fototypem skóry. W przypadku ochotników o fototypie wyższym niż IV ściemnienie pigmentu jest dość trudne do zaobserwowania. Metoda ta jest również mało wiarygodna w przypadku osób z fototypem I i II.

Persistent Pigment Darkening (PPD), to metoda pomiaru ochrony przed promieniowaniem UVA, której zasada zbliżona jest do oceny czynnika SPF. Oznacza to, że filtr o wartości promieniochronnej UVA wynoszącej 5 powinien pozwolić na 5-krotnie dłuższą ekspozycję, niż miałoby to miejsce w przypadku skóry niezabezpieczonej. W trakcie przeprowadzania testu skóra ochotników naświetlana jest za pomocą źródła promieniowania UVA (320-400 nm), a następnie oznaczane są trwałe zmiany w zabarwieniu skóry, po upływie od 2 do 24 godzin od momentu zaprzestania napromieniowywania. Zmiany te rejestrowane są zarówno dla skóry chronionej, jak i niechronionej filtrem [9]. Zaletą tej metody, w porównaniu z techniką IPD, jest to, że zmiana koloru pigmentu wywołana promieniowaniem UVA jest już utrwalona i pozwala na zdecydowanie bardziej precyzyjne odczyty. Jednak, pomimo tego, że metoda PPD daje dość wiarygodne i powtarzalne wyniki, to jej znaczenie kliniczne może zostać podważone ze względu na to, że nie pokrywa ona zakresu o długości fal poniżej 320 nm, a dodatkowo ze względu na wydłużony czas jej trwania; odpowiedź skóry może zostać zakłócona przez inne źródła promieniowania UV, np. podczas pobytu na zewnątrz [9].

Jak już wspomniano, testy *in vivo* są metodami niezwykle czasochłonnymi, zwłaszcza w przypadku badania skuteczności filtrów chroniących przed promieniowaniem UV o większej długości fali (UVA). Z tego też powodu podjęto próby opracowania prostych i efektywnych metod *in vitro*, które pozwoliłyby na skuteczne określenie czynnika ochrony przed UVA.

Przewodnik COLIPA zawiera metody dedykowane głównie filtrom w formie cieczy lub emulsji [10]. Zgodnie ze wskazówkami zawartymi w tym dokumencie, test do oceny czynnika ochronnego przed UVA (UVAPF) powinien opierać się na ocenie transmitancji promieniowania przepuszczanego przez cienki film (0,75 mg/cm²) badanego preparatu, naniesionego na porowatą płytkę wykonaną z polimetakrylanu metylu (PMMA). Pomiar ten powinien być przeprowadzony dwukrotnie: przed oraz po ekspozycji próbki na promieniowanie UV pochodzące ze ściśle zdefiniowanego źródła. Wyniki pomiarów przeprowadzonych tą techniką są w znacznym stopniu zgodne z parametrami promieniochronnymi ustalonymi dla tych samych preparatów za pomocą opisanej metody *in vivo* (PPD). Metoda PPD stanowi odnośnik dla techniki *in vitro* zaproponowanej przez COLIPA [10].

Wytyczne COLIPA zawierają również dość dokładną specyfikację spektrofotometru UV-Vis, który może zostać użyty w pomiarach UVAPF [10]. Jednym z najważniejszych wskazań jest to, aby układ optyczny aparatu mógł pracować w trybie zarówno rozproszonego naświetlania (*diffuse illumination*), jak i odbierania (*diffuse collection*) promieniowania, które zostaje skierowane na porowatą płytkę z naniesionym preparatem.

Lampa stosowana w tego typu pomiarach musi emitować ciągle spektrum promieniowania w zakresie 290-400 nm. Jednocześnie poziom promieniowania powinien być na tyle niski, aby nie naruszyć fotostabilności badanego preparatu. Takie rozwiązanie zapewnia m.in. ksenonowa lampa błyskowa. Warto więc podkreślić, że dawka UV w trakcie pojedynczego cyklu pomiarowego nie powinna przekraczać wartości 0,2 J/cm².

Szczegółowe dane specyfikacyjne oraz opis metody pomiarowej i sposobu opracowania wyników zawarte są m.in. w opublikowanym w 2007 r. przewodniku COLIPA [10].

Norma australijska (AS/NZS 2604.1993) opiera się na spektrofotometrycznych pomiarach procentu transmitancji promieniowania, którym naświetlana jest badana próbka. Zgodnie z tą metodą preparat zapewnia odpowiednią ochronę tylko wtedy, gdy przepuszcza mniej niż 10% promieniowania z zakresu 320 – 360 nm.

Technika opisana w normie australijskiej zapewnia zatem, że badany preparat posiadać będzie szerokie spektrum ochrony przed promieniowaniem, niemniej jednak nie może ona zagwarantować skutecznej obrony przed UVA osobom ze skórą o podwyższonej wrażliwości. Dodatkową wadą tego testu jest to, że nie uwzględnia on w ogóle fotostabilności badanego preparatu.

Boots Star Rating System opiera się na określeniu stosunku dwóch zakresów promieniowania UV: UVA oraz UVB. Dla każdego z badanych filtrów obliczane są powierzchnie pod widmem w zakresie UVA i UVB, co pozwala uzyskać współczynnik, którego wartość zawiera się przedziale od 0 do 1. Każdemu przedziałowi wartości liczbowej takiego współczynnika została też przypisana odpowiednia liczba gwiazdek (tab. 1).

Tablica 1

Wartości współczynników określających stosunek UVA/UVB oraz przypisana im liczba gwiazdek w systemie Boots Stars

UVA/UVB	0 – 0,2	0,21 – 0,4	0,41 – 0,6	0,61 – 0,8	0,81 – 0,9	> 0,91
Boots Stars	żadna	*	**	***	****	*****
Kategoria ochrony	żadna	minimalna	umiarkowana	dobra	superior	ultra

Broad Spectrum Rating (krytyczna długość fali) bazuje na spektrofotometrycznej analizie próbki naniesionej na powierzchnię płytki, pozwalając na całkowite wyeliminowanie testów prowadzonych na ludziach. W metodzie tej spektrum uzyskane z pomiaru spektrofotometrycznego jest zredukowane do jednej wartości liczbowej poprzez określenie tzw. wartości krytycznej długości fali (λ_c). Wartość ta odpowiada długości fali, przy której absorpcja promieniowania przez próbkę osiąga poziom 90% całkowitej powierzchni pod krzywą w zakresie 290 – 400 nm.

Warto podkreślić, że metoda Broad Spectrum Rating opiera się jedynie na kształcie krzywej widma spektroskopowego, natomiast nie uwzględnia jej amplitudy. Dodatkowo, wadą tego testu jest jego dość niska zgodność z rezultatami uzyskanymi w metodach *in vivo* [11].

APP method (UVA Protection Percentage) – test zaproponowany przez Sayre i Agina w celu określenia procentu promieniowania UVA zablokowanego przez badany filtr. Pomimo tego, że technika ta dostarcza cenne informacje, nie znalazła szerokiego zastosowania ze względu na możliwość znacznego wpływu błędu operatora, dość trudną technikę przygotowania preparatu oraz brak uznania w oczach FDA (US Food and Drug Administration) [12].

Wnioski

W ciągu ostatnich lat szkodliwy wpływ nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UVA został potwierdzony naukowo. Ze względu na to, że powszechnie stosowany w preparatach kosmetycznych o właściwościach promieniochronnych parametr SPF określa tylko stopień ochrony przed promieniowaniem z zakresu UVB, pojawiła się konieczność opracowania szybkich i wiarygodnych testów pozwalających na określenie stopnia blokowania promieniowania UVA.

Pierwsze metody *in vitro*, które określałyby stopień ochrony przed UVA zostały już opracowane, jednak jak do tej pory nie udało się ustanowić jednej, uniwersalnej procedury, która dawałaby nie tylko wyniki wiarygodne i powtarzalne, ale również zgodne z rezultatami testów *in vivo*. Dodatkowym problemem jest to, że wszystkie opisane metody *in vitro* nie dają ilościowych informacji na temat bezwzględnej ochrony przed UVA, a jedynie pozwalają określić względny wzrost absorpcji w badanym zakresie promieniowania.

Literatura

1. Tarras-Wahlberg N., Stenhagen G., Larko O., Rosen A., Wennberg A.M., Wennerstrom O.: J. Invest. Dermatol. 1999, **113**, 547.
2. Allen M.W., Bain G., Thermo Fisher Scientific, Appl. Note nr 51463, www.thermo.com.
3. Kligman L.H., Akin F.J., Kligman A.A.: J. Invest. Dermatol. 1985, **84**, 272.
4. Kligman L.H.: J. Soc. Cosmet. Chem. 1994, **45**, 21.
5. Diffey B.L.: Phys. Med. Biol. 1980, **25**, 405.
6. CIE (International Commission on Illumination) Research Note, A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin, CIE J. 1987, **6**, 1722.
7. COLIPA, European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, Colipa SPF Test Method, 94/289, 1994.
8. Cole C., VanFossen R., Skillman: J. Acad. Dermatol. 1992, **26**, 178.
9. Chardon A., Moyal D., Hourseau C., Sunscreens, Marcel Dekker Inc.: 1997, **559**.
10. COLIPA, European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, Colipa Method for the *in vitro* determination of UVA protection provided by sunscreen products, Guideline 2007.
11. Diffey B.L.: Int. J. Cosmet. Sci. 1994, **16**, 47.
12. Sayre R.M., Agin P.P.: J. Am. Academy. Dermatol. 1990, **23**, 429.

Dr Agata WAWRZYŃCZAK jest adiunktem w Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu. W 2003 r. otrzymała tytuł magistra chemii, a w 2007 r. stopień naukowy doktora w zakresie chemii. Jej obecne zainteresowania naukowe dotyczą syntezy, modyfikacji oraz charakterystyki katalizatorów heterogenicznych, a także chemii kosmetycznej. Jest współautorką 20 publikacji naukowych, 1 patentu oraz 38 prezentacji na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych.

Prof. UAM Dr hab. Izabela NOWAK jest profesorem nadzwyczajnym i kierownikiem Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu. W ramach stypendium TEMPUS przebywała w latach 1992-1993 na Uniwersytecie w Reading, UK, gdzie napisała pracę magisterską. W 1993 r. otrzymała tytuł magistra chemii, zaś w 1997 r. stopień naukowy doktora w zakresie chemii. Otrzymała także staż doktorski w Leverhulme Centre for Catalysis w Liverpool. W 2006 r. otrzymała stopień naukowy doktora habilitowanego za badania nad syntezą, charakterystyką i katalitycznymi właściwościami nanoporowatych materiałów w procesach utleniania w fazie ciekłej. Jej obecne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy i modyfikacji uporządkowanych materiałów, ich właściwościach teksturalnych/ strukturalnych/ powierzchniowych/ kwasowo-zasadowych/redoks, heterogenicznie katalizowanych syntezach wysokowartościowych chemikaliów oraz nowoczesnych strategiach syntez dla celów kosmetycznych. Jest współautorem ponad 80 prac naukowych, 3 patentów i przedstawiła ponad 140 prezentacji na sympozjach i konferencjach naukowych.

Młodzi wynalazcy u Premiera

Premier Donald Tusk spotkał się 9 czerwca br. z młodymi konstruktorami, zwycięzcami międzynarodowych konkursów. Studenci zaprezentowali swoje wynalazki, w tym między innymi sztucznego satelitę, roboty, raketę czy elektryczny bolid. W spotkaniu uczestniczyły także: Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego, prof. Barbara Kudrycka i Minister Edukacji, Katarzyna Hall. Zwracając się do młodych naukowców i studentów Premier powiedział, że międzynarodowe sukcesy pomagają budować dumę wszystkich pokoleń Polaków.

(<http://www.nauka.gov.pl/10.06.2011>)