

Güneşten Koruyucu Ürünlerin UVA Korunma Performansının Değerlendirmesinin İn Vitro Değerlendirilmesi[¶]

IN VITRO TESTING TO ASSESS THE UVA PROTECTION PERFORMANCE OF SUN CARE PRODUCTS

H. GERS-BARLAG*, E. KLETTE*, R. BİMCZOK**, C. SPRINGOB**, P. FINKEL***, T. RUDOLPH***, H.U. GONZENBACH****, Ph. SCHNEIDER****, D. KOCKOTT*****, U. HEINRICH*****, H. TRONNIER*****, R. BERNKLAU*****, W. JOHNCOCK*****, R. LANGNER*****, H.J. DRILLER*****, H. WESTENFELDER*****

*Beiersdorf AG, Hamburg, Germany, **Wella AG, Darmstadt, Germany, ***Sara Lee Deutschland GmbH, Düsseldorf, Germany, ****Roche Vitamins and Fine Chemicals, Switzerland, *****UV-Technik-Dr Kockott, Hanau, Germany, *****Institut für Experimentelle Dermatologie, Universität Witten/Herdecke, Germany, *****Bernklau Euroservice, Gauting, Germany, *****Haarmann & Reimer GmbH, Holzminden, Germany, *****Merck KGaA, Darmstadt, Germany, *****BASF, Ludwigshafen, Germany

©Gers-Barlag H, Klette E, Bimczok R, Springob C, Finkel P, Rudolph T, Gonzenbach HU, Schneider Ph, Kockott D, Heinrich U, Tronnier H, Bernklau R, Johncock W, Langner R, Driller HJ, Westenfelder H. In Vitro Testing to Assess the UVA Protection Performance of Sun Care Products. International Journal of Cosmetic Science, 2001; 23(1):3-14.

Özet

Güneşten koruyucularla sunulan UVA korunması, UVA-nedenli deri hasarıyla ilgili giderek artan bilgiye bağlı, önemi artan bir konudur. Avrupa’da, UVA korunmasının derecesini belirleyecek geçerli bir metod resmen kabul edilmemiştir. Bu nedenle şu anki çalışmanın amacı in vitro çalışmalarda geçerliliği bilinen görüşlerle basit ve kopya edilebilir bir in vitro modelin yararlılığını içeren bir protokolü tasarlamaktır. Prensip, test ürününün uygulandığı bir UV-transparan destek, bir (ön) radyasyon ve bir transmisyon ölçümüydü. Transpore® tape’in (SPF belirlemeleri için standart destek), uzamış ilişki sürelerinde birçok preparasyonlarla uyumsuz olduğu bulundu. Uygun bir alternatif olarak, kabartılmış quartz uyarlandı. Spektrofotometrelerin belirleme sınırlarına bağlı 2 mg cm^{-2} (SPF için standart)’lık bir tabakayla bu destek için transmisyon ölçümleri güvenilir olmadığından, 0.75 mg cm^{-2} ’lik azaltılmış bir tabaka uyarlandı. Dahası, uygun maddeler üzerinde kopya edilebilir ince bir tabaka içinde ürünleri uygulamak çok zordur. Sonuç olarak, transmisyon profilinden türetilen absolut parametreler relatif olarak geniş bir dağılım gösterirken, kritik dalga boyu λ_c (1) veya UVA/UVB oranı gibi relatif parametreler, tabaka kalınlığındaki önlenemez varyasyonlarına göre daha az hassastır. Ölçümden önce örnekler ışınlandığında, sapmalarda bir artış gözlemlendi. Işık kaynağının output’unu (spektral dağılım ve daha önemlisi ışınlama ve sunulan doz) dikkatlice kontrol etmek çok önemlidir. Yapararak ve daha önceki öğrenme basamaklarını gözönüne alarak, bir protokol kurulması mecbur edildi ve bir ringtestde (altı laboratuvarıda 4 örnek) test edildi. Sonuçlar cesaret vericidir ve eğer relatif parametreler (ör. λ_c UVA/UVB oranı) gözönüne alındığında, laboratuvar içi olduğu kadar laboratuvarlar arası kopya edilebilirlik, in vivo gözlenenenden açıkça daha iyidir.

Genel olarak, UVA korumasını belirlemede metodoloji hakkında gelecekte resmi tartışmaların gözönüne alınabileceği, uygun bir metodu tanımlıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Geniş spektrum kapsamı, Kritik dalga boyu, İn vitro test metodu, UVA korunma, Güneş ışığından koruyucu

T Klin Kozmetoloji 2002, 3:11-24

Summary

The UVA protection delivered by sunscreens is an issue of increasing importance due to the increasing knowledge about UVA-induced skin damage. In Europe there is no officially accepted method available to determine the degree of UVA protection. Therefore, the objective of the present study was to design a protocol combining the merits of an in vitro model, which are simple and reproducible, with aspects known to be relevant from in vivo studies. The principle is: an UV-transparent support to which the test product is applied, a (pre)irradiation and a transmission measurement. Transpore® tape (standard support for SPF determinations) was found to be incompatible with many preparations on prolonged contact times. Roughened quartz was adopted as a suitable alternative. Transmission measurements on this support are not reliable with a layer of 2 mg cm^{-2} (standard for SPF) due to detection limitations of spectrophotometers, hence a reduced layer of 0.75 mg cm^{-2} was adopted. Overall, it is very difficult to apply products in a reproducible thin layer on appropriate substrates. As a consequence, absolute parameters derived from the transmission profile show relatively large dispersion, whereas relative parameters, such as critical wavelength λ_c (1) or UVA/UVB ratio are much less sensitive to unavoidable variations in layer thickness. An increase in deviations was observed when the samples were irradiated before measurement. It is crucial to control the output carefully (spectral distribution and even more importantly irradiance and dose delivered) of the light source. By doing so and also taking into account the previous learning steps, a protocol was drafted and tested in a ringtest (four samples in six laboratories). The results are encouraging and show that if relative parameters (e.g. λ_c UVA/UVB ratio) are considered, the intra- as well as interlaboratory reproducibility is clearly better than can be obtained in vivo.

In general, we describe a suitable method, which can be considered in any future official discussions about the methodology to determine UVA protection.

Key Words: Broad spectrum rating, Critical wavelength, In-vitro test method, Sunscreen, UVA protection

T Klin J Cosmetol 2002, 3:11-24

Güneş ışığına özellikle de UV ışınlarına fazla maruz kalmanın, insan derisi üzerinde zararlı etkileri vardır. Bir grup son çalışmanın gösterdiğine göre, en zararlı UVB radyasyonuna (290-320 nm) ek olarak, UVA radyasyonu da (320-400 nm) deri hasarı oluşturur (2-4). Biyokimyasal, hücrel ve fonksiyonel seviyelerde değişiklik oluşur. UVA'nın etkileri, özellikle serbest radikallerle yayılır: ör. reaktif oksijen örnekleri. Görülebilen belirtiler, genellikle uzun süreli, birikmiş reaksiyonların sonucudur. UVA nedenli prematüre deri yaşlanmasının uzun yılların bir süreci olduğu düşünülmektedir.

Güneşten koruyucular, deriyi hem kısa dalga boylu UVB ve hem de uzun dalga boylu UVA radyasyonunun etkilerine karşı koruyacaktır. COLIPA standart protokolüne (5) göre Avrupa'da ölçülen güneş koruma faktörü (SPF) güneş yanıklarının etkinliğini veya spektrumun UVA kısmını yeteri kadar kapsamayan UVB korumasını tanımlar.

Şimdiye kadar, birçok in vivo metod tanımlanmıştır, en belirginini ani pigment kararması (İPD) ve devamlı pigment kararması (PPD)'dir (6,7). Bunların çoğu biyolojik son noktalarla dayanıyordu. Birikmiş, uzun süreli deri hasarına karşı koruma altında, bu son noktaların uygunluğu haklı bir ilgi uyandırdı.

Böyle uzun süreli etkilerin aksiyon spektrumu hala bilinmemektedir ve olası test protokollerinden uzaklaştıran gerçek son noktalarla yalnızca uzun yıllar güneş ışığına maruziyetten sonra erişilir. Böylece, bütün geçerli in vivo testleri, gerçek durum için bir gösterge olarak kabul edilir. Bununla beraber test maruziyeti sırasında, bu in vivo modeller, ürünün bazı fotokimyasal değişikliklerini gözönüne alır ve bu iyi geliştirilen SPF belirlemesi olgusunda belirtilmiştir (CTFA ve NDMA üyeleri tarafından FDA'ya arzedilen yorum... Özellikle güneş ışınının engellenmesini önemsemeden, aktif içerikler bir formülde kullanılmıştır, ölçülebildiği kadar UV dozu boyunca, bütün performans sağlanmıştır. Herhangi bir nedenle istenen koruma seviyesini sağlayamayan veya erişilemeyen formüller, hızla tarama dışı bırakılmıştır. Eğer aktif içeriklerin fotokimyasal veya absorban özellikleri UV maruziyetlerinde belirgin olarak değişiyorsa ve

geri verilme nedeni olarak UV korunma sağlanmasında yetersiz ve fototoksikse, formül umulan SPF seviyesine erişemeyecektir... 6 Aralık 1996) (8).

Problem, böylece kolaylıkla ele alınabilecek biyolojik bir son noktadan (istatistiksel) daha fazla kopya edilmesi ve maruziyet sırasında fotokimyasal değişiklikler için gözönünde tutulabilecek bir in vitro metod tasarlamaktır (hayvan yok, gönüllü yok).

Bu yazıda bir yaklaşım önerilmektedir ve bir ringtestin sonuçlarını içererek tanımlanmaktadır ve aşağıdakilerini içerir:

*Örnek hazırlanması: Uygun ve UV transparan bir destek üzerinde ince tabaka bir test ürününün uygulanması.

*Örnek maruziyeti: Güneş ışığına benzeyen tanımlanan bir dozda.

*Işınlanan örneğin transmisyon ölçümü.

Sonuçlanan transmisyon profili bütün spektral aralıkta test ürününün etkinliğini yansıtır ve

*Kritik dalga boyu (λ_c) (1)

*UVA/UVB oranı (9) kullanarak UVA koruması terimlerinde yorumlanabilir.

Materyal ve Metod

Transmisyon ölçüm aygıtları

Laboratuvarda kullanılan her ölçüm aygıtının teknik tanımlamaları Tablo 1'de verilmiştir. Birçok farklı enstrüman sağlayıcılar ve ölçüm sırasında örneğin ışınlamanın ve UV ışınlarının yollarına uygun olarak karşılık gelen farklılıklar vardır. Şekil 1'de şematik olarak tanımlandığı gibi, tek ışın enstrümanları kullanıldığında, örnek soğuk bir xenon ark lambasının polikromatik ışığına maruz kalır. Emisyon spektrumu, uygun filtrasyonla yaklaşık olarak güneş ışığına daraltılır. Örnekten geçtikten sonra, ışık bir monokromatör ile ayrı dalga boylarına ayrılır ve bir fotomultiplier ile analiz edilir. Dual ışın spektrometreleri (Şekil 2) iki ışık kaynağı, UVB bölgesi için bir Deuterium lambası ve UVA ışığı için bir tungsten-halojen lambası ile daraltılır. Işık önce bir çift monokromatörden geçer. Bir ışın dağıtıcı ve bir chopper, monokromatik ışını örneğe veya referansa

Tablo 1. Ölçüm aygıtları

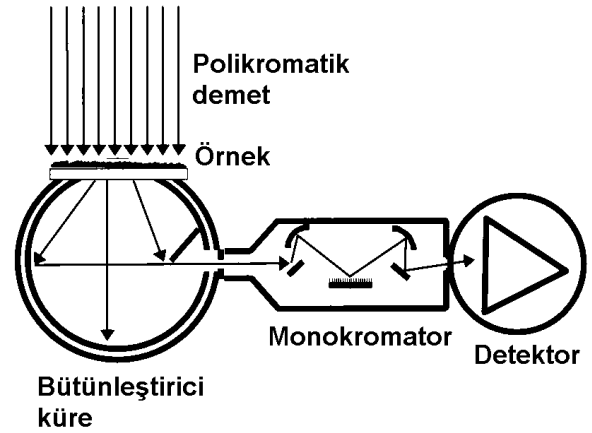
Laboratuvar Kodu	Enstrüman tipi	Işın tipi	Işık kaynağı	Bütünleyici aygıt	Belirleme sistemi
LAB1	Optometrics SPF290S	Tek ışın polikromatik	Xenon arc 125W	Bütünleyici küre	Monokromatör + fotomultiplier
LAB2	Varian, Cary 3	Çift ışın monokromatik	Deuterium D2/ Halogen H1	Bütünleyici küre	Örnekten önce çift monokromatör + fotomultiplier
LAB3	Optometrics SPF290	Tek ışın polikromatik	Xenon arc 125W	Bütünleyici küre ve quartz diffüzer	Monokromatör + fotomultiplier
LAB4	Optometrics SPF290	Tek ışın polikromatik	Xenon arc 125W	Bütünleyici küre	Monokromatör + fotomultiplier
LAB5 Lambda 16	Perkin Elmer	Çift ışık monokromatik	Deuterium D2/ Halogen	Bütünleyici küre	Örnekten önce çift monokromatör + fotomultiplier
LAB6	Dr Kockott	Tek ışık polikromatik	Xenon arc 150W	Bütünleyici küre veya dağıtıcı disk	Kafes, spektral detektör veya eritemal aksiyon spektrumuna ayarlanmış hassasiyetle bütünleyici belirleyici

yöneltir. Monokromatik radyasyon, olası termal kusurları önler.

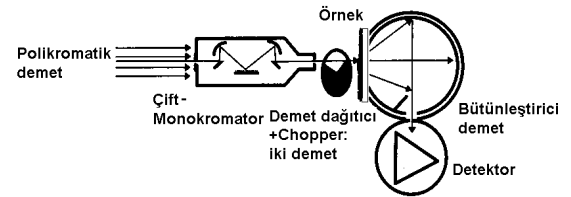
Bütün laboratuvarlarda, spektrometreler, ışık dağıtan filmlerin hassas olarak ölçümünde kullanılması istenen ışık toplayıcı bütünleyici kürelerle daraltılmıştır. Örnek taşıyıcılar, örnek yüzeyi ve kürenin yoğun olarak yansıtan iç yüzeyi arasında minimal mesafe olarak şekilde tasarlanmıştır. Bütünleyici aygıtla bağlı ışık yoğunluğunun belirgin kaybı, yüksek sensitif bir belirleyici sistem kullanılarak kompanse edilir.

Işınlama Aygıtları

Laboratuvar 6 hariç, bütün laboratuvarlar, örneklerin ışınlanması için "Heraeus Suntest" (Atlas, Material Testing Technology B.V., Germany) suntester horizontal bir xenon ark lambasıyla donatıldı ve ışınlama için parabolik bir kapalı oda oluşturuldu. Odanın alt yüzeyi soğutulmuş su örneklili bir tablodan oluşur. Sistem ek olarak bir hava soğutucu sistemi de içermektedir. Kaynak, güneşe yaklaşık gelen bir emisyon spektrumunu sağlamak üzere filtre edilir. Bu da Atlas tarafından sağlanan "Solar standart" filtreleri kullanılarak elde edilir (10). Bütün

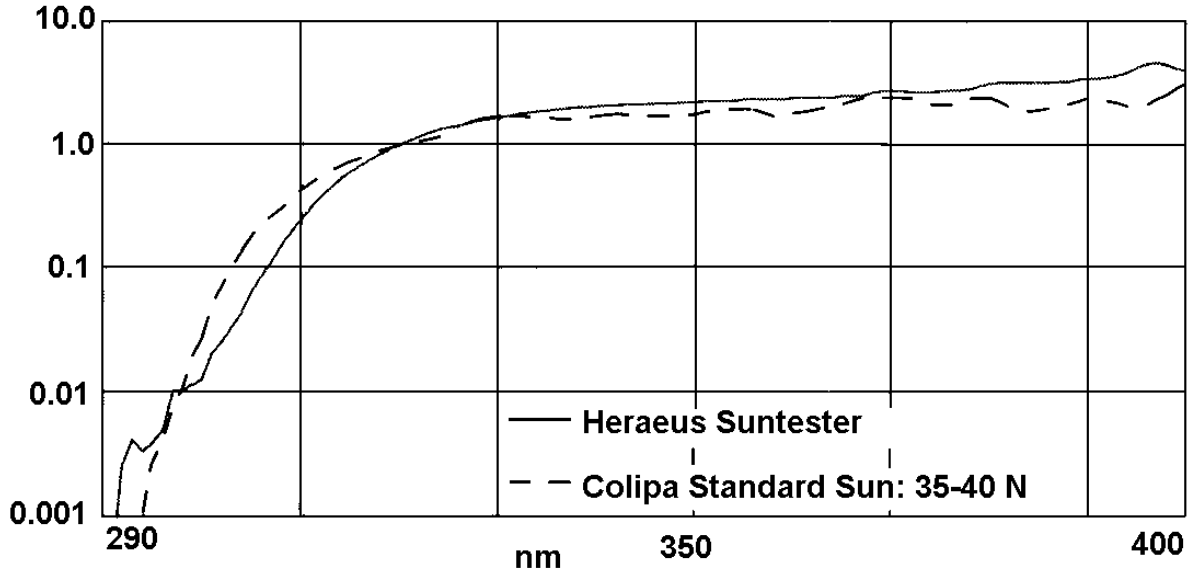


Şekil 1. Polikromatik ölçüm.



Şekil 2. Monokromatik ölçüm.

Relatif spektral ışınım (320 nm)



Şekil 3. Herans Suntest CPS+(320 nm)'in nispi spektral ışınımı.

laboratuvarlar, ölçümlere başlamadan önce hızla böyle bir filtre ile donatıldı. Suntester oda içindeki örneklerin fazla yüklemesini önlemek için rutin olarak infrared filtre ile donatıldı. Heraeus Suntest emisyon spektrumunu, standart spektrum ile karşılaştıran bir örnek Şekil 3'de gösterilmiştir.

Laboratuvar 6 tarafından uygulanan ölçümde izlenen yöntem aşağıdaki şekilde yapıldı. Örnek, solar spektruma yaklaşan bir emisyon spektrumunu sağlamak için filtrelenmiş bir kaynakla ışınlandı. Detektörün yanıtı, insan cildinin eritemal aksiyon spektrumunun dalga boyu aralığı üzerine ayarlandı ve detektör okumaları, eritemal-eşdeğerlere yaklaştı. Örneğin spektral transmittansı bütünleyici bir spektrometre kullanılarak belirlendi.

Bütün laboratuvarlar boyunca radyasyon ayarlanması için, bütün ölçüm aygıtlarının spektral radyasyonu (290-400 nm) bir spektrometrelili (MSS 2040-UV, Dr. Kockott, UV-Technik, Hanau, Germany) bir nanometrenin basamaklarında belirlendi. Bu standardize ölçüm temelinde, 1 MED (minimal eritemal doz, 1 MED 250 J cm⁻²e

karşılık gelir) için bireysel radyasyon zamanı her laboratuvar için hesaplandı.

Güneşten Koruyucular

Avrupalı tüketicilerde yoğun olarak kullanılan, güneş koruyucu range'in çoğunu içeren bu araştırma için 4 preparat (iki ticari örnek + iki standart) seçildi. Standart P1 sadece UVB filtresi içerirken, diğer formüller en az bir organik UVB ve bir organik UVA filtresi ve bir örnek de (OTC2) ayrıca mikropigment de içeriyordu. Daha fazla ayrıntı için Tablo 2'ye bakınız.

Maddeler

Pürüzlü quartz yüzeyleri izleyen yöntemeye göre ayrı ayrı üretildi. Sert düz bir yüzeyde, örneğin bir cam tabakada, bir kaşık dolusu ezilmiş pudra (Carborundum (SiC), kalite: yeşil, tane örneğinde FEPA (100)) bir kaç milimetre su ile karıştırıldı. Oluşan macun cam yüzey üzerinde yayıldı. Parlatılmış quartz tabakanın yüzeyi (normal ölçüler: 76x26x1 mm, kalite >%95, 250-500 mm'de transimiyon, spektrosil 2000 from Thermal

Tablo 2. Güneşten koruyucular

Örnek	Etiketli SPF	Emülsiyon tipi	UV-filtre sistemi
Standart P1, DIN Std. K17N	4	O/W	%2.7 octyl methoxycinnamate
Standart P3	15	O/W	%3.0 octyl methoxycinnamate
Colpa Standart C202/101			%2.8 phenylbenzimidazole sulphonic acid
OTC1 ticari ürün	20	O/W	%0.5 butyl methoxydibenzoylmethane
			%5.5 octyl methoxycinnamate
			%3.0 phenylbenzimidazole sulphonic acid
OTC12 ticari ürün	30	O/W	%2.5 butyl methoxydibenzoylmethane
			%4.1 titanium dioxide
			%4.0 methylbenzylidene camphor
			%2.0 butyl methoxydibenzoylmethane
			%0.5 terephthalylidene dicamphorsulphonic acid

Quarz-Schmelze GmbH, Wiesbaden Germany) homojen bir kabarıklık yaratmak için 8 şekilde bir hareket kullanılarak, macun yüzeyine yumuşakça bastırıldı. Ezilme yöntemi, yüzeyi tamamen donmuş gibi gözüken kadar devam ettirildi. Ezilmiş materyal, pürüzlü yüzeyden bol su ile akıtıldı. Kuruduktan sonra, 400 nm'de transmisyon, kabartma yönteminin kontrolü için belirlendi.

Pürüzlü quartz yüzeyleri en az 5 kere, tekrar kabartma olmadan kullanılabilir. Quartz yüzeyler, oda sıcaklığında laboratuvar deterjan solüsyonunda 12 saat immersiyonda kullanıldıktan sonra temizlendi (Mucosal®, Merz & Co., Frankfurt, Germany). Sonradan deiyonize suyla çalkalandı ve 10 dakika isopropanole batırıldı. Yüzeylerin yeteri kadar temizlendiği hükmüne ancak (a) kalan transmisyon spektrumu (280-400 nm) düz olduğunda ve (b) T_{300nm}'nın yaklaşık, %95 T_{400nm} olduğunda, yeteri kadar temizlendiği hükmüne varıldı. TiO₂ ve ZnO gibi mikropigmentler yaygın olarak temizlemesine rağmen, pürüzlü yüzeye devamlı adsorbe oluyordu. Bunların yeni bir öğütme ile uzaklaştırılması gerekiyordu.

Transpore® bant (3M Company Health Care, Maine, U.S.A.) bant ve yüzey arasındaki hava kabarcıklarını önlemek için, düz quartz yüzey üzerine dikkatlice yapıştırıldı.

Örnek uygulaması

Aşağıda detaylıca anlatıldığı gibi, bu çalışmada, ürün dozunun etkisi araştırıldı. Rutin

uygulama, (latex) eldivenli parmağın 1 dakika boyunca ürünle satüre edilmesiyle başladı. Örnek uygulamasından önce, tabaka ağırlığı kaydedildi. Örnek sonra mikroenjektör veya kendi kendine yerdeğiştiren pipet gibi aletler yardımıyla tabaka yüzeyine, spotlar halinde yer yer dağıtıldı. Dağıtımdan hemen sonra, tabaka tekrar tartıldı, eğer uygulama sonrası ağırlık, hesaplanan ağırlığın $\pm \%10$ 'u içindeyse, ürün uygulaması kabul edildi. Uygulanan spot dağıtımlar, presatüre parmak örtüsü kullanılarak tekrar dağıtıldı.

Ürün başına 6 tabaka hazırlandı (üç referans tabaka ve UV ışığına maruziyet için 3 tabaka). Ölçülmeden veya çalışma tasarımına göre ışınlanmadan önce tabakalar 15 dk karanlıkta denkleştirildi.

Işınlama

Örnekler, Heraeus Suntest'te lamba yüzeyinden 21 cm mesafede soğutulmuş bir tabloya yerleştirildi. Lambanın olası heterojenite akışını kompanse etmek için, örneklerin yerleri, radyasyon sırasında döndürüldü. Işınlama zamanı ürün SPF'sine uyacak şekilde ayrı ayrı kuruldu ve izleyen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Süre (dakika)} = \frac{\text{MED} \times \Theta}{E_{\text{Uvery}} \times 60} \quad (1)$$

(MSS 2040-UV: Dr. Kockott kullanılarak standardize bir yöntemle belirlendi). SPF= güneş ışığından koruyucuların, güneş koruma faktörü; Θ = Standart güneşin eritemal dozu (250 J m⁻¹) (11) ve E_{Uvery}= ışık kaynağının eritemal ışınlaması (W m⁻²).

Tablo 3. Işınlama ışık kaynağının minimal eritemal dozu

Laboratuvar	1 MED için zaman (dk)	Eritemal radyasyon (mW m ⁻²)
Lab1	20	205.5
Lab2	21	202.8
Lab3	28	147.2
Lab4	27	156.2
Lab5	21	198.5
Lab6	Eritemal belirleme	-
Ortalama	25	171.6

Veri sonuçları Tablo 3’de gösterilmiştir. Bütün laboratuvarlar tarafından eşit teçhizat ve filtrasyon kullanılmasına rağmen bu doğadaki deneylerin kontrolünde çok önemli bir parametre olarak, 1 MED’lik bir dozun sunulma süresinin 20-28 dakika arasında değiştiği gözönünde tutulmalıdır.

Ölçüm

Farklı yazarlar tarafından tanımlandığı gibi (12-14), analizin prensibi, bir transmisyon ölçümüdür. Transpore® bantındaki ölçümlerin algısında, muamele edilmemiş madde bir referans olarak kullanılır. Uygun pürüzlü quartz yüzeyler, bütün tabakayı yeteri kadar örtecek şekilde, yüzey boyunca, küçük bir volüm gliserin (yüzeyin kabarıklık derecesine bağlı olarak, 20 µl) yayılarak hazırlanır. Gliserin, plaseboya benzer bir yolda pürüzlü, kuru yüzeyin yapay dağıntısını azaltan, herhangi bir ışık absorbe eden veya dağıtan bileşim içermeyen, “boş” bir emülsiyon olarak görev yapar. Transmisyon ölçümleri, tabaka başına en az 4 farklı pozisyonda uygulanır.

Hesaplamalar

İşlenmemiş verilerin değişmesi: İşlemden önce, transmisyon verisi, elektrik gürültüsü (I_{backgr}) gözönüne alınarak, aşağıdaki gösterildiği şekilde absorbans değerlerine çevrildi.

$$A = \log(MPF) = \log\left(\frac{I_{ref} - I_{backgr}}{I_{sample} - I_{backgr}}\right) \quad (2)$$

A= absorbans; I ref= güneş ışığından koruyucu olmadan madde boyunca transmisyon sinyalinin yoğunluğu; I sample= güneş ışığından koruyucu uygulanarak madde boyunca transmisyon sinyalinin yoğunluğu; MPF= monokromatök korunma faktörü (I/T)’dur.

Kritik dalga boyu: Kritik dalga boyu (λ_c), bütün UV spektrumu boyunca (290-400 nm), korunma genişliğini tanımlar. λ_c ’yi hesaplamak için, absorbans eğrisinin (AUC) altındaki alan %100 kullanılır. λ_c , AUC’nin (290 nm’den başlayarak) %90’ına eriştiği dalga boyudur. Aşağıdaki formül uygulanır (1).

$$\int_{290nm}^{\lambda_c} A(\lambda) * \delta\lambda = 0.9 * \int_{290nm}^{400nm} A(\lambda) * \delta\lambda \quad (3)$$

Burada, A= absorbans, λ_c = 290-400 nm arasında bütün alanın %90’ına erişen absorbans spektrumunun alt alanın dalga boyudur. UVA/UVB oranı olarak R, iki ayrı dalga boyu UVA (320-400 nm) ve UVB (290-320 nm)’nin ortalama absorbanslarının oranıdır.

$$R = \frac{\int_{320nm}^{400nm} A(\lambda) * \delta\lambda / \int_{320nm}^{400nm} \delta\lambda}{\int_{290nm}^{320nm} A(\lambda) * \delta\lambda / \int_{290nm}^{320nm} \delta\lambda} \quad (4)$$

İşlenmemiş veriler; λ_c hesaplanmadan önce 1 nm’lik intervallerle ara değerlendirme yapılan 5 nm’lik basamaklarda bazı aletlerle oluşturulur.

Güneş koruyucu faktör: İn vitro güneş koruyucu faktör (SPF) şöyle hesaplanır.

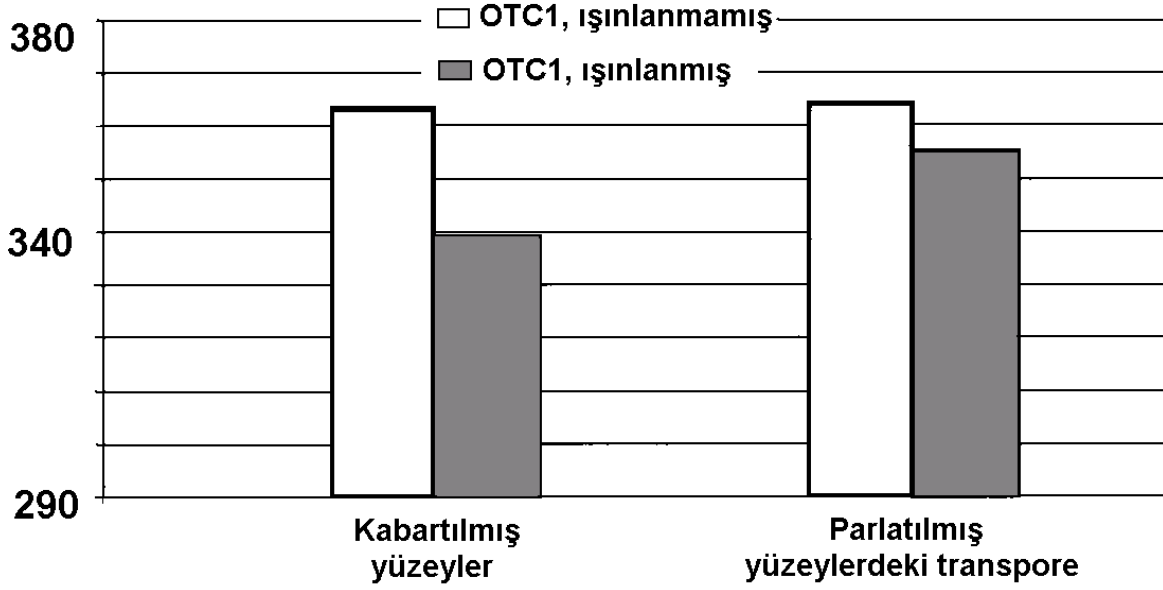
$$SPF = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E(\lambda) * s(\lambda) * \delta(\lambda)}{\int_{290nm}^{400nm} E(\lambda) * s(\lambda) * \delta(\lambda) / MPF(\lambda)} \quad (5)$$

Burada E(λ)= “standart” güneşin λ dalga boyunda ışınlanması; s(λ)= λ dalga boyunda eritemal etkinlik; MPF= monokromatök koruma faktörü (1/T)’dir.

Sonuçlar ve Tartışma

Maddeler

Kopya ve standardize edilebilir transmisyon ölçümleri için, aynı kalite ve yeterli kantitede



Şekil 4. OTC1 ışınlanmamış/ışınlanmış örnekler üzerinde Transpore® bandın etkisi.

maddenin sağlanması veya hazırlanması ihtiyacı doğabilir. Bu çalışmada, katılımcı laboratuvarlarda ayrı ayrı kabartılan quartz yüzeylerde ve benzer araştırmacılar arasında birkaç yıldır kullanılmakta olan Transpore® bantını seçtik. Bu uygulama için ideal olanın, quartz yüzey alanının $>10 \text{ cm}^2$ alanı olduğu ve alışımlı quartz mikroskopik lambası (26x76x1 mm) olduğunu bulduk.

Quartz yüzeyin kabartılması hakkında, deneysel veriler bu yöntemin çok kopya edilebilir bir şekilde yapılabileceğini kanıtlar. Örneğin, 8 ayrı teknikte hazırlanan yüzeylerin transmisyonunun (400 nm) ölçümü sadece %2.1'lik standart sapmayla sonuçlandı. Ayrıca, çok sayıda kullanımdan sonra quartz yüzeyinin tekrar ezilmesinin yüksek kalitede devamlı standart kalınlık sağladığını da bulduk.

Karşılaştırmak amacıyla, UV ışığına maruz kalmadan önce ve sonra OTC1 ürününün λ_c 'sinin belirlenmesine paralel olarak Transpore® bant ve pürüzlü quartz yüzeylerini kullandık. Test edilen güneş ürünleri, quartz veya Transpore®'de ışınlamadan önce belirgin farklılıklar göstermedi ama ışınlama sırasında farklı davrandı: λ_c düşüşleri, Transpore® bandıyla karşılaştırıldığında

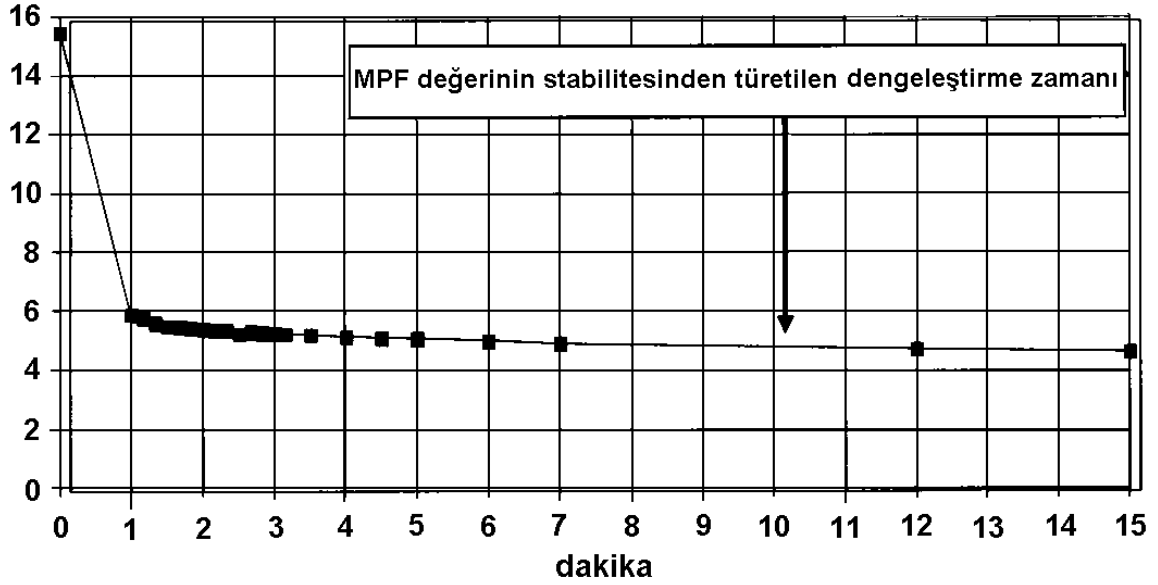
quartz yüzeylerde belirgin olarak daha fazlaydı (Şekil 4). Bu olguda, Transpore® bandın, bir ışınlama öncesi sırasında kullanımını hükümsüz kılacak, uygulanan ürün örneğiyle birbirini etkilemesi olasıydı. Eğer bir ışınlama basamağı kastedilmişse, band uygun değildir. Bu bulguların ışığında grup, pürüzlü quartz yüzeylerle devam kararı aldı.

Dengelenme zamanı

Bir emülsiyon uygulamasından sonra, su ve diğer uçucu unsurlar buharlaşır ve ürünün kalan ince tabakasının absorpsiyon veya transmisyon özelliklerini etkiler. Belirlemeler sırasında, rutin amaçla örnekler, stabil ve karşılaştırılabilir ürün şartlarını garanti etmek için yeterli bir süre için dengelenmelidir. Kurumuş ürünün ince tabakasının spektral absorpsiyon özelliklerindeki olası değişiklikleri çalışmak için, dağıtmadan sonra birçok zaman aralığında ağırlık ve transmisyonu (MPF spektrum)'u kaydettik. OTC1 için veriler Şekil 5 ve 6'da verilmiştir.

Şurası gayet açıktır ki, ağırlıktaki değişiklikler, başlıca ilk birinci dakikada oluşur ve sonradan da güneşten koruyucuların kalan miktarı tamamen stabil kalır. Uygulamadan 10 dakikadan

mg / yüzey



Şekil 5. OTCI için tabaka ağırlığında zaman süresince değişiklik (LF20).

sonra MPF'lerde bir düşüş varken, ürün tabakasının bir homeostazını gösterircesine 10-20 dakikalar arasında bir farklılık belirlenemez. Standart dengelenme zamanı, 15. dakikada kurulmuştur.

Örnek hazırlanması

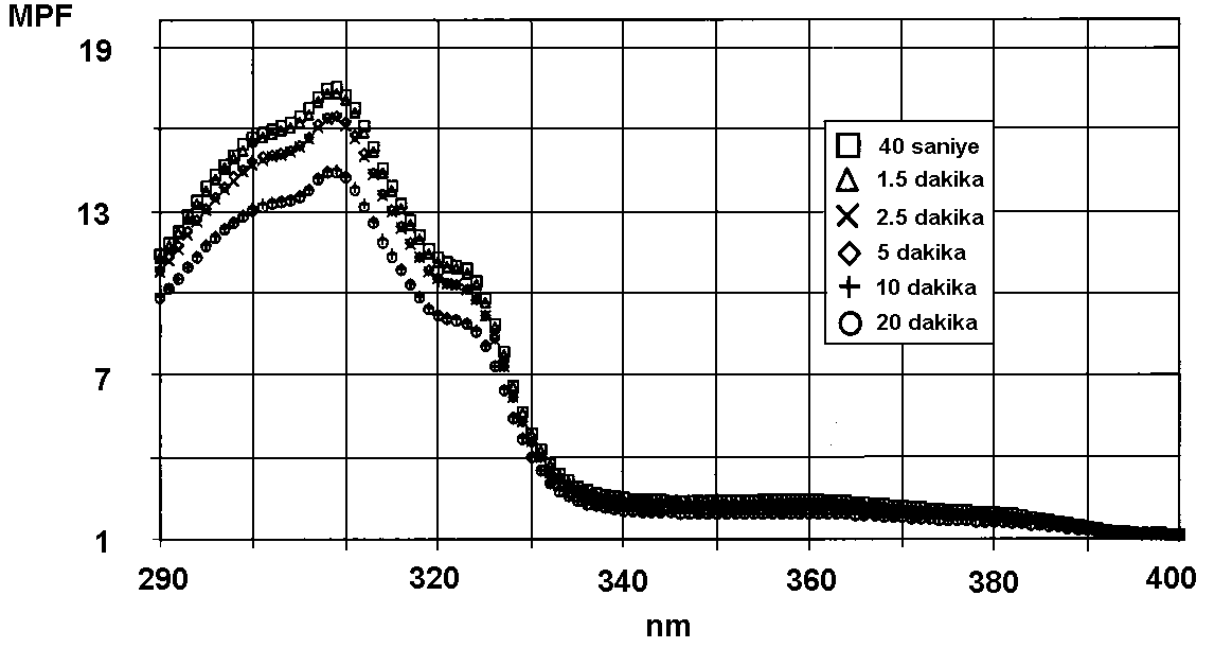
Yüksek seviyelerde UV korumalı ürünler için uygun olabilecek metodu gözönüne alarak, ölçüm transmisyonu için uygun miktarı belirlemek için pürüzlü quartz yüzeylere, değişik miktarlarda ürün, $0.75-2.0 \text{ mg cm}^{-2}$ uygulandı. Bu ürünler önemsiz miktardan büyük derecelere UV absorbe ettiğinden, belirleyici için eşik değer sinyali sınırlayıcı bir faktör haline gelebilir. Testler OTC2 ile beraber çalışıldı, örneklerden en yüksek korunma kapasitesi olan, bu çalışmada kullanıldı.

MPF-spektrumun incelenmesi, yüksek (UVB) MPF range'inde (Şekil 7) hatırlanacağı gibi, bu SPF 30 ürününün, belirleme sınırına yaklaşacağı ölçüsünü gösterir. Ek olarak, transmisyon profilinde de bir değişiklik vardır. Şekil 8'de gösterildiği gibi, UVB'deki maximum MPF şekli, artan tabaka kalınlığıyla daha uzun dalga boylarına yer değiştirir.

λ_c için değerler, düşük dalga boylarında sinyal azalması olan UVB korunmasının daha düşük tahmin edilmesini göstererek, giderek artan ürün miktarlarında (Tablo 4) önemsiz bir artış gözlenir.

Uygun uygulama miktarı 0.75 mg cm^{-2} olarak tasarlanmıştır. Anlatılan şekilde, değişik operatörler kullanarak sonuç değişikliğinin relatif etkisi ve parmak örtülerinin kullanımı araştırıldı. 10 teknisyen, pürüzlü yüzeylerde 0.75 mg cm^{-2} standart ürün P3'ü ölçtü ve standart bir protokolde fikir birliğine vardılar. Çalışmanın ileri aşamalarında, yüzeyler taze olarak hazırlandı ve transmisyon ölçümleriyle kontrol edildi. Aynı spektrometre ile, yüzey başına 6 farklı yer değişikliğinde ölçümler yapıldı. İn vitro gerçek SPF değerleri hesaplandı ve sonra λ_c değerleriyle karşılaştırıldı. Şekil 9 bir yüzey için temsili bir sonuç göstermektedir.

Hatta teknisyenler yüzey üzerinde örneğin homojen bir dağılım hedefi üzerinde konsantr olduğu zaman, değişik teknisyenlerce tek bir veya diğer yüzeylerde oluşan, sonuçlanan SPF değerleri için tabaka kalınlığında belirli farklılıklara dikkat çekti. Sonuçlardaki farklılıklar, uygulandığı basınç ve dağılma zamanı gibi faktörlere dayanabilir.



Şekil 6. OTC1 için dengeleştirme (SPF20), zamanla gelişen spektral değişiklikler.

Etkin örnek miktarı, kırma ve dengeleştirmeden sonraki örnek miktarı olduğundan, Tablo 5'de gösterildiği gibi kalan tabaka sadece kalınlıkta değil ayrıca ağırlıkta da değişti. Aynı miktarda (14.9 mg) ıslak örnek uygulamasına rağmen, yüzey başına (19.8 cm²) farklılık 2.7 ve 4.4 mg arasında umulduğu gibi, dramatik farklılık SPF değerini yaklaşık %60 etkiler (Tablo 5) ve bu süre zarfında in vivo SPF değerlerinin önceden söylemesi için in vitro metodun uygunsuz olduğunu ortaya çıkarır.

Absolute parametrenin (SPF) tersi olarak, relatif parametrelerde (λ_c ve UVA/UVB oranında) biz belirgin bir farklılık gözlemedik. Değişik tekniklerle hazırlanan tek bir yüzeyde ve ayrıca diğer yüzeyler arasında farklı yerlere rağmen, çok sabit dururlar. Böylece relatif parametreler, kolayca kopya edilebilir bir şekilde güneşten koruyucu ürünün ışın koruyucu profilini tanımlarlar. Anlatılan belirleme yöntemi bireysel ele alıp farklılıklarından etkilenmeyecek şekilde düşünülmelidir.

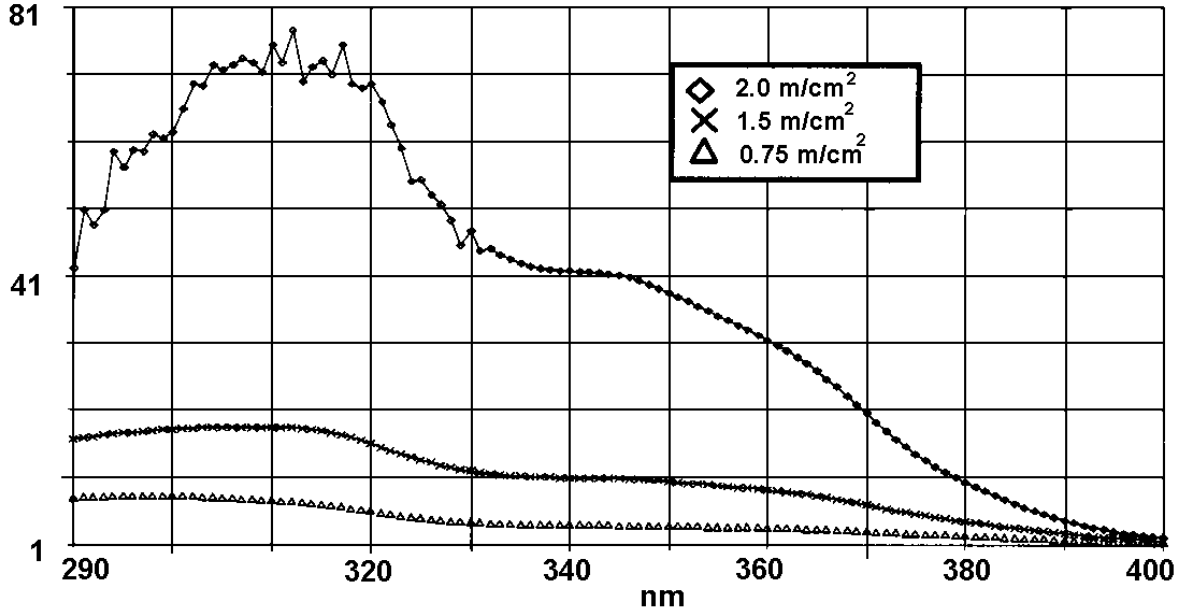
Işınlama

Bazı UV filtrelerin kısmen UV maruziyeti sırasında (15,16) bozulabileceği ve doğal olarak bu

reaksiyonun güneş ışığından koruyucuların koruma etkinliğini etkileyebileceği bilinmektedir. Işığa bağlı değişiklikleri gözönünde tutmak için yeterli ışınlama dozunun önemi konusunda bilgi elde etmek için, farklı ışınlama dozlarından sonra örneklerin λ_c 'lerini araştırdık. Şekil 10, UV dozunu fonksiyonuna balğı olarak λ_c değişikliğini göstermektedir.

Test edilen ürünler için, λ_c 'deki en kuvvetli etki 0.3 MED x SPF'ye karşılık gelen zaman içindeki olmaktadır. Bu doz, diğer grupların (CTFA, in vitro UVA koruması için COLİPA geçici işbirliği) yöntemiyle fikir birliği içindedir. COLİPA in vivo SPF belirleme metodunda 2 mg cm⁻²'lik bir miktarla, azalmış tabaka kalınlığı ve 0.75 mg cm⁻²'lik azaltılmış dozun uygulanmasının, karşılaştırılmasıyla bu UV dozu belirgin olarak fazla olacaktır (tabaka kalınlığı ve koruma faktörü arasındaki doğrusal-olmayan ilişkiyi gözönüne alarak).

Güneşten koruyucu bir ürünün transmisyonundaki UV nedeniyle olan değişiklikler, ışık kaynağının spektral dağılımıyla (UVA/UVB oranı)

MPF absolut skalası

Şekil 7. CTC2: spektrometre sınırlamalarına bağlı spektrum çarpıklıkları: tabaka kalınlığının etkisi.

ve ışınlamayla doğal olarak etkilenecektir. Karşılaştırmalı sonuçlar için standardize bir ışınlamaya tamamen ihtiyaç vardır. Biri hariç bütün test merkezlerinde, aynı ışınlama aletlerini kullanmasına rağmen, ışınlama basamağının bir sonucu olarak standart sapma belirgin olarak artmaktaydı.

Yukarıdakileri gözönünde tutarak, katılımcılar tarafından kullanılan ışınlama aygıtları tek bir spektrometre kullanılarak standardize edildi (MSS 2040-UV, Dr. Kockott; Materyal ve Aletler, ışınlamayı görün). Verilerin kopyalanmasında belirgin bir gelişme ile sonuçlandı. Tablo 6 ışınlamadan önce ve sonra ve ışık kaynaklarının standartlaştırılmasından önce ve sonra, λ_c ve karşılık gelen standart sapma verilerini göstermektedir.

Laboratuvarlar arası ring çalışması**Kritik dalga boyu**

Ölçümün en kritik parametrelerinin (uygulama miktarı, dağılıma, dengeleştirme, ışınlama ve diğer) geliştirilmesi ve standardize edilmesiyle, 6

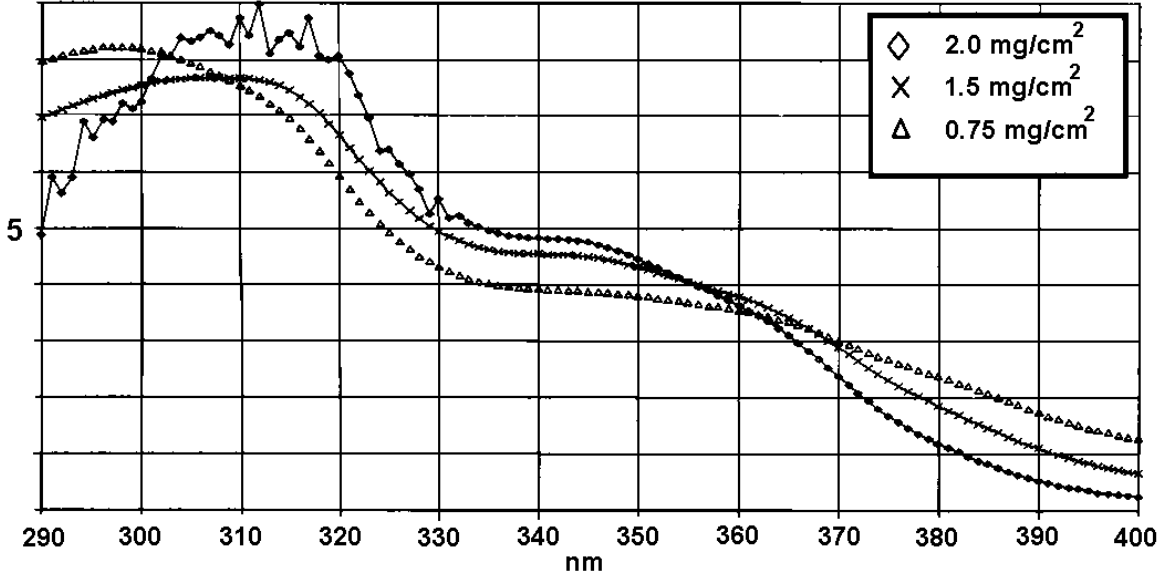
Tablo 4. λ_c ve uygulanan miktar

Uygulanan miktar (mg cm ⁻²)	λ_c
0.75	375
1.5	376
2.0	377

laboratuvarda 4 örneklili bir ring-test (Round Robin Test), bir güneş ışığından koruyucunun UV koruma genişliğini tanımlamak için metodun uygulanabilirliğini göstermek için gerçekleştirildi. UVB korumasıyla bağlantılı olarak bir güneş ışığından koruyucunun UVA koruma etkinliğini tanımlamak için, kritik dalga boyu relatif bir parametre olarak hesaplandı. Bu göstergenin sonuçları Tablo 7 ve 8'de verilmiştir.

Veriler, λ_c 'nin çok az kopya edilebilir şekilde belirlendiğini göstermektedir. Bütün örnekleri mükemmel ve ışınlama basamağında hafifçe artan küçük standart sapmalar bulduk. Metod, UVA koruma özelliklerine bağlı olarak güneş ışığından koruyucuları ayırt edebiliyordu.

**MPF,
normalleştirilmiş alan**



Şekil 8. OTC2: spektrometre sınırlamalarına bağlı spektrum çarpıklıkları: tabaka kalınlığının etkisi. Spektrumun relatif şeklinin karşılaştırılması için, eğrinin altındaki alanla ilgili olarak çizgiler normalleştirilmiştir.

Standart P1, ışınlamadan hesaplanan UVA koruma parametrelerinde hafif bir artış göstermektedir. İlk bakışta, bu davranış kesinlikle beklenmiyordu, çünkü özel emülsiyon sadece tek bir UVB filtresi, octyl methoxycinnamate ve UVA absorbe etmeyen madde içermektedir. Bununla beraber, cinnamate'ların UV ışığı (17,18) maruziyeti sırasında kısmen bir cis-transizomerasyonuna uğradıkları iyi bilinmektedir. Bu fotoizomerasyon, değişmiş koruma parametrelerinde bir artış yaratarak, absorpsiyon spektrumunun şeklinde hafif bir artışla beraber olur.

P3 ve OTC1 ürünleri olgusunda, ışınlamadan sonra, önemli bir UVA filtrasyon kapasitesinin kaybı etkisi altında kaldığından λ_c düşer. Diğer ürün OTC2, UVA korumasında daha yavaş bir azalmaya atfedilen daha az belirgin değişiklikler gösterir.

UVA/UVB oranı

Bir güneşten koruyucunun genişliğini tanımlamak için ikinci bir relatif parametre olarak UVA/UVB oranını hesapladık. Bu sonuçlar Tablo 9 ve 10'da gösterilmektedir.

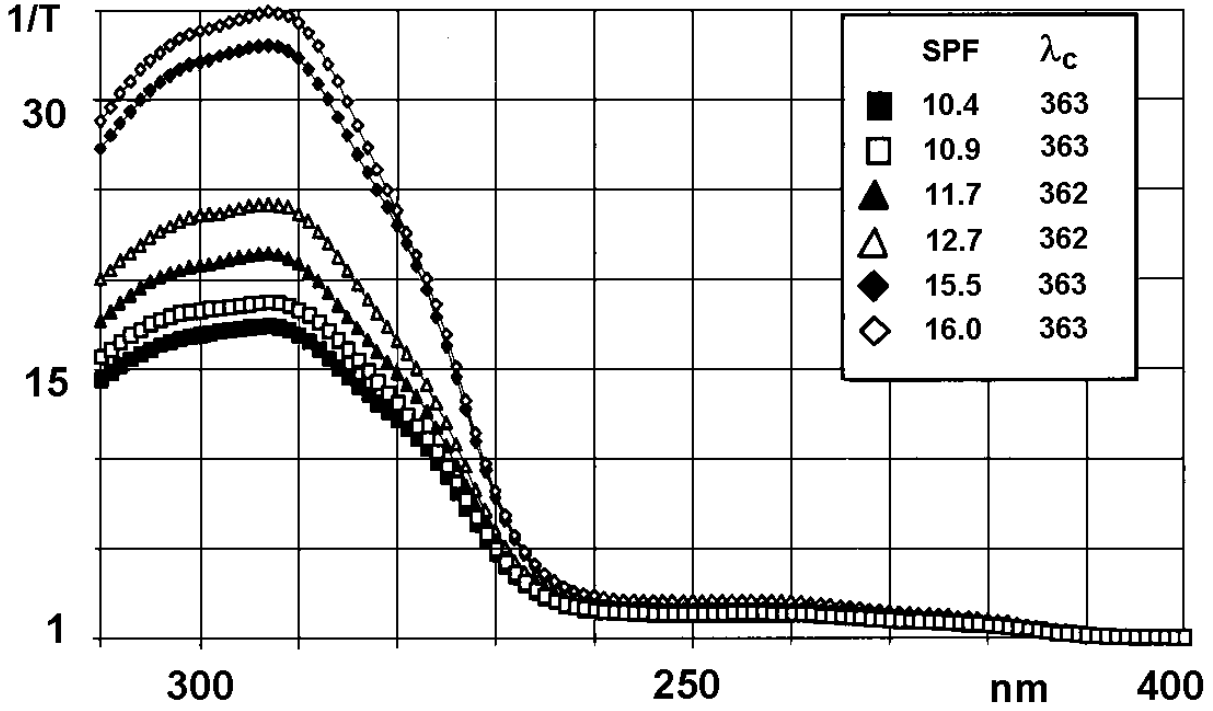
Bu veriler aynı zamanda önerilen metodla da tespit edilebilir. λ_c ile türetilen örneklerin yapısı ve muameleleri bakımından UVA korumadaki eğilimler UVA/UVB oranı ile doğrulanabilir.

Sonuç

Dört ürünün relatif bir UVA koruma göstergesinin belirlenebilirliğinin uygulanabilirliğini inceledik. Çalışmalar 6 laboratuvarında, metod içinde kritik yöntemlerin standartlaştırılmasının önemi gösterilerek, gerçekleştirildi, bunlar;

- Madde tertibi
- Ürün uygulanabilirliği
- Işınlama öncesi yöntem
- Transmisyonun ölçümünün kendisi

Bu gelişmeleri izleyerek son bir ring çalışmasıyla iki relatif parametrenin, kritik dalga boyu ve UVA/UVB oranının, in vivo son noktada herhangi birinin üstün olduğu laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası kopya edilebilirlikle ölçülebildiği gösterildi.

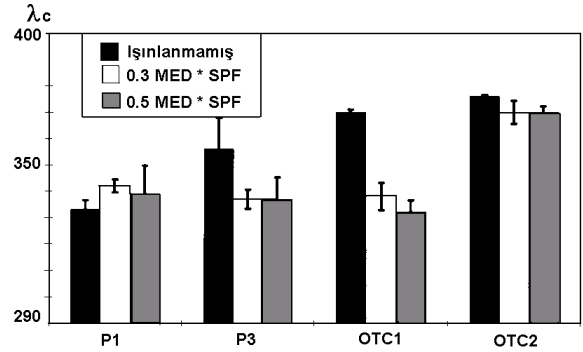


Şekil 9. Standart P3: Tek bir yüzeyde MPF'lar 6 noktada ölçülmüştür.

Tablo 5. SPF vb. etkili örnek miktarı

Teknisyen	Etkili örnek miktarı (mg/yüzey*)	SPF	λ_c	UVA/UV B oranı
A	2.60	6.8	360	0.28
B	2.70	4.5	357	0.25
C	2.90	7.7	361	0.28
D	3.10	12.7	363	0.32
E	3.30	10.2	361	0.28
F	3.30	8.1	360	0.27
G	3.80	11.3	363	0.31
H	4.00	11.9	364	0.33
I	4.30	11.1	361	0.30
J	4.40	9.8	363	0.32

* Yüzey alanı=19.8 cm²



Şekil 10. Geniş spektrum sınıflamasında ışınlamanın etkisi.

İn vitro ölçümlerdeki veriler, matematiksel olarak türetilen herhangi bir sayıya değişebilir, bu korumanın relatif ifadelerinin absolut belirtmelerden daha belirgin fazla kopya edilebilirlik gösterdiği anlamına gelir. Ör. in vitro SPF değerleri ve bunların ürün kalınlığı vb. diğer şaşırtıcı faktörlerden fazlaca etkilenir.

Quartz; Transpore® band üzerinden bir madde seçeneği olarak uyarlandı. Bu materyal ışınlama öncesi bir basamak kullanarak çalışmalar için uygun olmadığı gösterilerek, Transpore® bandla birbirini etkilemek için güneşten koruyucular ve yumuşatıcıların gözlemine dayanıyordu.

Tablo 6. Standartlaştırılmadan önce ve sonraki λ_c standart sapmalar

Örnek	Standartlaştırılmadan önce \pm SD		Standartlaştırılmadan sonra \pm SD	
	Işınlanmamış	Işınlanmış	Işınlanmamış	Işınlanmış
Standart P1	3.7	10.7	5.2	8.6
Standart P3	1.9	8.2	2.0	3.6
OTC1	1.1	9.6	1.3	6.0
OTC2	0.5	2.1	1.2	2.2

Tablo 7. Standartlaştırmadan önce ve sonraki standart sapmalar

Laboratuvar	Standart P1				Standart P3	
	Işınlanmamış		Işınlanmış		Işınlanmamış	Işınlanmış
	Işınlanmamış	Işınlanmış	Işınlanmamış	Işınlanmış		
1	-	-	-	-	362	339
2	335	340	340	340	359	335
3	342	347	347	347	363	337
4	328	361	361	361	361	335
5	334	343	343	343	364	330
6	332	342	342	342	359	340
Ortalama	334	346	346	346	361	336
SD	5.2	8.6	8.6	8.6	2.0	3.6

Tablo 8. Standart OTC1 ve OTC2 için kritik dalga boyu. 0.3 MED x SPF ile ışınlanmış

Laboratuvar	OTC1				OTC2	
	Işınlanmamış		Işınlanmış		Işınlanmamış	Işınlanmış
	Işınlanmamış	Işınlanmış	Işınlanmamış	Işınlanmış		
1	371	334	334	334	376	373
2	371	331	331	331	374	373
3	370	345	345	345	377	369
4	370	329	329	329	377	374
5	373	329	329	329	377	373
6	369	335	335	335	375	369
Ortalama	371	334	334	334	376	372
SD	1.3	6.0	6.0	6.0	1.2	2.2

Tabaka kalınlığı; analitik nedenlerle (dinamik range/optik dansite); 2 mg cm⁻²'den 0.75 mg cm⁻²'ye indirildi.

UV dozu, 0.3 MD SPF ve eşlik eden UVA ışınlanması benzer yaklaşımlarla uyumluydu. Bu enerji yüksek bir doz olduğu düşünülerek inceltilmiş tabakaya uygulandı. Işık kaynağının

enerjisini dikkatlice izlemek çok önemlidir. Bununla beraber sıraya dizilmiş ışık kaynaklarıyla ek bir ışınlama basamağı, metodun hassaslığını hafifçe düşürür.

Yazarlar, önerilen modelin, UVA metodolojisi hakkında sürüp gitmekte olan tartışmaya, önemli bir katkı olacağını düşünmektedirler.

Tablo 9. Standart P1 ve P3 için UVA/UVB oranı. Işınlama 0.3 MED x SPF ileydi

Laboratuvar	Standart P1		Standart P3	
	Işınlanmamış	Işınlanmış	Işınlanmamış	Işınlanmış
1	-	-	0.29	0.18
2	0.18	0.19	0.27	0.17
3	0.21	0.21	0.31	0.17
4	0.13	0.21	0.29	0.17
5	0.19	0.21	0.34	0.15
6	0.16	0.19	0.28	0.19
Ortalama	0.17	0.20	0.30	0.17
SD	0.032	0.013	0.029	0.013

Tablo 10. Standart OTC1 ve OTC2 için UVA/UVB oranı. 0.3 MED x SPF ile ışınlanmıştı

Laboratuvar	OTC1		OTC2	
	Işınlanmamış	Işınlanmış	Işınlanmamış	Işınlanmış
1	0.44	0.15	0.65	0.52
2	0.46	0.14	0.58	0.51
3	0.41	0.19	0.65	0.43
4	0.43	0.14	0.65	0.54
5	0.50	0.14	0.62	0.47
6	0.39	0.15	0.61	0.43
Ortalama	0.44	0.15	0.63	0.48
SD	0.042	0.021	0.030	0.049

KAYNAKLAR

- Diffey BL. A method for broad spectrum classification of sunscreens. *Int J Cosmet Sci* 1994; 16:47-52.
- Kligman LH, Akin FJ and Kligman AA. The contribution of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice. *J Invest Dermatol* 1985; 84:272-6.
- Kligman LH. 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* 1994; 45:21-33.
- Diffey BL. Ultraviolet radiation physics and the skin. *Phys Med Biol* 1980; 25:405-26.
- COLIPA. European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. COLIPA SPF Test Method 1994; 94/289.
- Cole C, VanFossen R, and Skillman MS. Measurement of sunscreens UVA protection: an unsensitized human model. *J Acad Dermatol* 1992; 26:178-84.
- Chardon A, Moyal D, and Hourseau C. Persistent pigment-darkening response as a method for evaluation of ultraviolet A protection assays, sunscreens. New York: Marcel Dekker Inc. 1997: 559-82.
- Gonzenbach HU and Pittet GH. Photostability, a must? Broad spectrum sun protection: issues & status. London: Summit Events Ltd, 1997.
- The Boots Company. The guide to practical measurement of UVA/UVB ratios. The Boots Co plc, Nottingham. UK 1991.
- Commission Internationale l'Eclairage. Recommendations concernant l'eclairage énergétique et la répartition spectrale du rayonnement solaire en vue de sa reproduction artificielle pour des essais (International Commission on Illumination). Technical Report Solar Spectral Irradiance. CIE 1989; 85.

- German Industrial Standard (DIN) no. 5050. Beuth Verlag GmbH, Berlin, Part 1, 1992: 1-8.
- Pearse AD and Edwards C. Human stratum corneum as a substrate for in vitro sunscreen testing. *Int J Cosmet Sci* 1993; 15:234-44.
- Diffey BL and Robson J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *J Cosmet Chem* 1989; 40:127-33.
- Sayre RM, Agin PP, Levee GJ and Marlowe E. A comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas. *J Photochem Photobiol* 1979; 29:112-9.
- Deflandre A and Lang G. Photostability assessment of sunscreens benzyldene camphor and dibenzoylmethane derivatives. *Int J Cosmet Sci* 1988; 10:53-62.
- Schwack W and Rudolph T. Photochemistry of dibenzoylmethane UVA filters. *J Photochem Photobiol* 1995; 28:229-34.
- Morlière PP, Avicé O, Melo SE, Giraud M and Santus R. A study of the photochemical properties of some cinnamate sunscreens by steady state and laser flash photolysis. *Photochem Photobiol* 1982; 36:395-9.
- Nadim A, Shaath NA and Klein K. Photodegradation of sunscreen chemicals: solvent considerations. *Cosmet Toilet* 1990; 105:41-4.

*Orijinal İngilizce şekliinden Türkiye Klinikleri tarafından tercüme edilmiştir. Türkçeye tercümesinin doğruluğundan Türkiye Klinikleri sorumludur, Blackwell Science Limited veya Society of Cosmetic Chemists sorumluluk kabul etmemektedir.

Translated by Türkiye Klinikleri Publishing House from the original English language version. Responsibility for the accuracy of the translation in the Turkish language rests solely with Türkiye Klinikleri Publishing House and is not the responsibility of Blackwell Science Limited or the Society of Cosmetic Chemists.