

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nicht-invasive Bestimmung des Lichtschuttfaktors von
Sonnenschutzmitteln auf der menschlichen Haut mithilfe eines
spektroskopischen Untersuchungsgeräts im gesamten UV-Bereich

Non-invasive determination of the sun protection factor on the human
skin with a spectroscopic device in the whole UV range

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Maria Throm

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

I. Abstract	3
II. Manteltext	5
1. <i>Einleitung</i>	5
1.1. UV-Licht.....	5
1.2. Biologische Effekte von UV-Licht.....	5
1.3. Der Lichtschutzfaktor (LSF) von Sonnencreme.....	7
1.4. Diffuse Reflexionsspektroskopie (DRS)	9
1.5. Zielsetzung.....	10
2. <i>Methoden</i>	10
2.1. DRS-Aufbau	10
2.2. In-vivo Messungen	12
2.3. HDRS-Berechnung und Photodegradation.....	12
2.4. Testprodukte	14
3. <i>Ergebnisse</i>	14
4. <i>Diskussion</i>	17
4.1. Berechnungsmethoden für das HDRS-Verfahren	17
4.2. Vergleich des LSF _{HDRS} -LED-Verfahrens mit der MED-basierten Referenzmethode.....	18
4.3. Vergleich des LSF _{HDRS} -LED-Verfahrens (Throm et al.) mit anderen HDRS-Verfahren.....	19
4.4. Einordnung der LSF-LED-Ergebnisse	21
5. <i>Schlussfolgerung</i>	22
6. <i>Eigenleistung</i>	22
7. <i>Referenzen</i>	22
III. Eidesstattliche Versicherung	27
IV. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen	28
V. Journal Summary List	29
VI. Publikation: Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source“; Journal of Biophotonics, 2020.....	33
VII. Lebenslauf	41
VIII. Publikationsliste:	43
IX. Danksagung	44

I. Abstract

Deutsch:

Die Bestimmung des Lichtschutzfaktors (LSF) von Sonnenschutzmitteln erfolgt aktuell durch ein invasives Verfahren, bei dem Proband*innen genau den UV-Strahlen ausgesetzt werden, vor denen die Testprodukte sie eigentlich schützen sollten. Eine alternative in-vitro Methode ist derzeit nicht verfügbar. Mithilfe eines Hybridverfahrens konnte in den letzten Jahren jedoch gute Ergebnisse erzielt werden: Dabei wird das von der Haut reflektierte Licht vor und nach dem Auftragen eines Sonnenschutzmittels verglichen (DRS), um ein Absorptionsspektrum im gesamten UV-Bereich zu bestimmen. Der UV-B-Bereich wird dabei jedoch nicht ausreichend erfasst; deshalb wird die Form der UV-Absorptionskurve zusätzlich in-vitro bestimmt und das Spektrum anschließend im UVA-Bereich an die in-vivo Messung angepasst, sodass der UVB-Teil des in-vitro Spektrums mit den in-vivo DRS-Ergebnissen kombiniert werden kann (HDRS). Hier wird ein neues LED-basiertes Testsystem zur Bestimmung des LSF und UV-A-Schutzes (UVA-PF) vorgestellt, das sowohl für HDRS- als auch für reine in-vivo Anwendungen geprüft wurde.

Dafür wurden insgesamt 11 Testprodukte mit je 10 Proband*innen untersucht. Die in-vivo Messungen wurden mit einer multi-lambda-LED-Lichtquelle, einer Glasfasersonde mit sieben Messpositionen und einem Spektrographen mit 84 Kanälen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Berechnungsmethoden zur Anwendung des HDRS-Verfahrens miteinander verglichen und schließlich ein Ansatz ausgewählt, der valide Ergebnisse mit guter Übereinstimmung zur Referenzmethode erzeugte (LSF_{HDRS} : $R^2 = 0,86$; UVA-PF: $R^2 = 0,92$). Dabei wurde das in-vivo Spektrum mit dem in-vitro Spektrum der nicht photogelalterten Creme verknüpft. Die Alterskorrektur erfolgte anschließend für das Hybrid-Spektrum mithilfe eines Wellenlängen-abhängigen Faktors. Für Sonnenschutzmittel mit $LSF \leq 26$ wurde im reinen in-vivo Modus ebenfalls eine gute Korrelation ($R^2 = 0,78$) erzielt.

Bei dem LSF_{HDRS} -LED-Verfahren handelt es sich um eine schnelle, nicht-invasive Methode zur Beurteilung des LSF von Sonnenschutzmitteln auf der menschlichen Haut. Die eingesetzte UV-Dosis beträgt maximal 0,2 der MED. Das kompakte LED-basierte Testsystem bietet im Vergleich zu anderen HDRS-Verfahren ein hohes Maß an zeitlicher und spektraler Flexibilität. Zusätzlich sind auch reine in-vivo Messungen im UV-A- und im UV-B-Bereich möglich. Diese lassen sich zu Forschungszwecken verwenden.

English:

Sun protection factor (SPF) values are currently determined using an invasive procedure, in which subjects are exposed to high doses of ultraviolet (UV) light. There is no alternative in-vitro method available yet. But in the last years good results could be obtained by a hybrid approach: By measuring the amount of reflected light before and after the application of sunscreen, an absorption spectrum in the UV-range is calculated (DRS). Yet, the UVB-range cannot be captured sufficiently. Therefore the shape of the UV-absorption curve is additionally determined in vitro and scaled to the in-vitro spectrum in the UVA-range, so that the UVB-part of the in-vitro spectrum can be combined with the in vivo DRS-results (HDRS). Here, we present a novel LED-based test system for the determination of SPFs and UVA-PFs, that was examined using a pure in vivo and the HDRS approach.

Each of the 11 test products was investigated with 10 test subjects. The in vivo measurements were performed with a multi-lambda-LED light source, a fiber optic probe with seven detection subunits and an 84-channel imaging spectrograph. Having examined various approaches to apply the HDRS principle, the method we present was found to produce valid results, that were in good accordance with the reference method (LSF_{HDRS} : $r^2 = 0.86$; UVA-PF: $r^2 = 0.92$). The preexposure in vitro spectrum was fitted to the in vivo spectrum and a wavelength-dependent scaling factor of photodegradation was calculated. Pure in vivo values showed a good accuracy ($r^2 = 0,78$) in sunscreen products with SPF 26 and lower.

The LSF_{HDRS} -LED approach is a fast, non-invasive method for the determination of LSF values on the human skin. The UV-dose never exceeded 0,2 of the MED. The compact LED-based test system offers a high flexibility in terms of spectrum and time, compared to other HDRS methods. Additionally, pure in-vivo measurements can be performed in the UVA and the UVB range, which can be used for research purposes.

II. Manteltext

Nicht-invasive Bestimmung des Lichtschutzfaktors von Sonnenschutzmitteln auf der menschlichen Haut mithilfe eines spektroskopischen Untersuchungsgeräts im gesamten UV-Bereich

von Carolin Maria Throm

1. Einleitung

1.1. UV-Licht

Ultraviolettes (UV)-Licht ist elektromagnetische Strahlung. Es lässt sich in die Unterbereiche UV-A (400 - 320 nm), UV-B (320 - 290 nm) und UV-C ((290 - 100 nm)einteilen. Eine natürliche Quelle von UV-Licht ist Sonnenstrahlung. Durch Reflexion und Absorption in der Erdatmosphäre und der Ozonschicht dringt vom Sonnenlicht dabei nur UV-A (circa 5%) und ein wenig UV-B (circa 0,1%) zur Erdoberfläche, wobei die UV-B-Exposition durch Schädigung der Ozonschicht zum Beispiel (z.B.) durch Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) stellenweise zunehmen kann [1].

1.2. Biologische Effekte von UV-Licht

UV-Licht spielt für den menschlichen Organismus eine große Rolle. Trifft es auf die Haut, kommt es in der Epidermis zu einer photochemischen Veränderung des dort gespeicherten 7-Dehydrocholesterols zu Colecalciferol, das über weitere biochemische Reaktionen in der Leber und in den Nieren zu Calcitriol, dem biologisch aktiven Vitamin D₃, umgewandelt wird [2, 3]. Dieses lipophile Hormon steigert die retinale und intestinale Calcium-Resorption sowie die retinale Phosphat-Resorption und bewirkt einen gesteigerten Calciumeinbau in den Knochen [4, 5]. Eine unzureichende Zufuhr von Vitamin D₃ führt zu einem Ungleichgewicht im Calcium-Haushalt, wodurch es im Kindesalter zu Rachitis und im Erwachsenenalter zu Osteomalazie kommen kann [6, 7]. Ist die endogene Synthese z.B. durch einen Mangel an Sonneneinstrahlung eingeschränkt, sollte daher eine alimentäre Substitution des Vitamin D₃ erfolgen [8]. Es liegen zudem zahlreiche Assoziationsstudien vor, die einen Vitamin-D-Mangel mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko [9-11] sowie einer erhöhten Inzidenz von onkologischen [12-14] und Autoimmunerkrankungen [15-17] in Verbindung bringen. Es gibt jedoch bisher keine schlüssige Evidenz, dass betroffene Patient*innen von einer Vitamin-

D-Supplementation profitieren [18, 19]. Gut belegt sind hingegen therapeutische Effekte einer Lichttherapie bei einigen Hauterkrankungen wie z.B. Psoriasis [20] und atopischer Dermatitis [21]. Bekannt ist auch, dass Keratinozyten bei Kontakt mit UV-Licht vermehrt Beta-Endorphin exprimieren und produzieren, welches Wohlbefinden und eine erhöhte Stresstoleranz vermittelt [22-24].

Neben der Produktion von Vitamin D und Beta-Endorphin, induziert eine UV-Exposition verschiedene hauteigene Schutzmechanismen, um lichtbedingte Hautschädigungen zu verhindern: Die Zellteilung im Stratum basale wird angeregt. Es kommt zu einer Verdickung des Stratum corneum („Lichtschwiele“), sodass mehr Sonnenlicht gebrochen bzw. absorbiert wird [25]. In den Melanozyten wird die Ausschüttung von Melanin (Bräunung) induziert, das sich um die Zellkerne der Keratinozyten legt, UV-Strahlung absorbiert und in Wärme umwandelt [26, 27].

Zusätzlich kann bei gesunder Ernährung eine Anreicherung von Antioxidantien UV-protectiv wirken. Vitamin C und E sowie Betacarotin können freie Radikale neutralisieren, bevor diese ihre schädigende Wirkung entfalten können. [28, 29]

Diese Eigenschutz-Mechanismen des Körpers können die Zeit, die jemand ohne Schäden in der Sonne verbringen kann, nur auf bestimmte Zeit verlängern. Zudem tritt die Schutzwirkung nicht sofort ein. So kommt es bei anhaltender oder hoher UV-Exposition nach 6 bis 24 h zunächst zu einer Erythembildung [30]. Die UV-Strahlung induziert über Mediatoren wie Histamin, Prostaglandin und Zytokine eine Entzündungsreaktion mit Gefäßerweiterungen, Rubor und Überwärmung durch verstärkte Durchblutung [31]. Die Schwere eines Sonnenbrands ist abhängig von der Gesamtenergie des Sonnenlichts, der die Hautareale ausgesetzt waren [32], sowie vom Hauttyp der betroffenen Person [33].

Auf langfristige UV-Exposition reagiert die Haut mit strukturellen und funktionellen Schädigungen. Diese lichtbedingte Hautalterung zeigt sich durch Falten, Hyperkeratosen, Hyperpigmentierungen und einen Elastizitätsverlust. UV-A-Strahlung dringt bis in die Dermis und schädigt u.a. durch Aktivierung von Metalloproteasen die Kollagenfasern sowie die Mikrozirkulation der Haut. Dies kann zu einer permanenten Erweiterung von kleinen Blutgefäßen führen, die als Teleangiektasien zu sehen sind. [34] UV-Exposition ist ein entscheidender Risikofaktor bei der Entstehung von malignem und nicht-malignem Hautkrebs [35, 36]. UV-B-Strahlung kann direkte DNA-Schäden wie Pyrimidin-Dimerisierungen verursachen. Je mehr dieser DNA-Schäden auftreten, umso höher wird die Wahrscheinlichkeit, dass zelluläre Reparaturmechanismen wie die Nukleotid-/Basen-Exzisions-Reparatur versagen, und geschädigte DNA repliziert wird. [37, 38] Dieser

Mechanismus wird oft durch UV-induzierte Mutationen im Tumorsuppressor p53 verstärkt [39]. UV-A-Strahlung hat eine indirekte kanzerogene Wirkung: Sie wird von intrazellulären Chromophoren absorbiert. Durch die Anregung dieser Atome kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese können über die Modifikation von Basen DNA-Schäden verursachen. [40] Auch die immunsuppressiven Eigenschaften von UV-Strahlung, z.B. die Reduktion der Langerhans-Zellen und eine vermehrte Zytokin-Produktion, tragen zur Kanzerogenese bei [41, 42].

Es lässt sich zusammenfassen, dass die hauteigenen Schutzmechanismen oft nicht ausreichen, um UV-induzierte Schäden zu vermeiden. Die Inzidenz von Hautkrebs ist in den letzten Jahrzehnten weltweit stetig gestiegen [43, 44]. Mögliche Gründe dafür sind das moderne Schönheitsideal eines gebräunten Körpers, vermehrtes Reisen, sowie die steigende Lebenserwartung, aber auch eine vermehrte Detektion durch präventive Screening-Programme [45]. In manchen Regionen könnte auch die Reduktion der Ozonschicht dazu beigetragen haben [1].

In Deutschland erkrankten laut Robert-Koch-Institut (RKI) im Jahr 2016 23.200 Menschen am Malignem Melanom der Haut und rund 230.000 Menschen erstmalig an nicht-melanotischem Hautkrebs. Seit den 1970er Jahren hat sich die Inzidenz des malignen Melanoms mehr als verfünffacht, und auch für hellen Hautkrebs ist von einem deutlichen Anstieg der Erkrankungshäufigkeit in den letzten Jahrzehnten auszugehen. Der wichtigste exogene Risikofaktor für malignen und nicht-melanotischem Hautkrebs ist UV-Strahlung. [46, 47]

1.3. Der Lichtschutzfaktor (LSF) von Sonnencreme

Um sich vor akuten Entzündungsreaktionen und langfristig vor Hautkrebs zu schützen, wird empfohlen, die Mittagssonne zu meiden, protektive Kleidung zu tragen, und Sonnenschutzmittel zu verwenden [48]. Die Effektivität eines Sonnenschutzmittels muss dabei quantifizierbar sein. Je nach Auswahl und Menge der verwendeten UV-Filter [49], der Trägersubstanz [50, 51] und der Fähigkeit des Produkts einen kontinuierlichen Film auf der Haut zu bilden [52], hält die Schutzwirkung unterschiedlich lange vor.

Nachdem der Chemiker Franz Greiter 1962 begonnen hatte, Sonnenschutzmittel zu verkaufen, denen er einen Lichtschutzfaktor (LSF) zugeordnet hatte, führte die US Food and Drug Administration (FDA) 1978 erstmals eine standardisierte Methode zur Bestimmung des LSF ein [53]. Dabei ist der LSF ein relatives Maß dafür, wie viel länger sich eine Person

durch Anwendung von Sonnenschutzmitteln der Sonne ausgesetzt kann, ohne dabei ein Erythem auszubilden, als dies allein durch die individuelle Eigenschutzzeit möglich wäre [54]. Ursprünglich ist natürliches Sonnenlicht für die LSF Bestimmung verwendet worden. Da die Intensität von Sonnenlicht jedoch stark von der Jahres- und Uhrzeit, wie auch von der Messposition auf der Erde abhängig ist, ist man bald zur Verwendung von Sonnensimulatoren übergegangen, um LSF-Testungen unter standardisierten Bedingungen im Labor zu ermöglichen. [53] Dabei wird heutzutage in der Regel eine Xenonbogenlampe verwendet. Für jede Testperson wird die Hautrötungsschwelle, auch minimale Erythemdosis (MED), bestimmt. Jedes Produkt wird dabei an mindestens 10 Proband*innen getestet und ein Mittelwert berechnet. Da es hauptsächlich UV-B-Strahlung ist, die eine Erythembildung verursacht, bleibt die UV-A-Strahlung dabei weitgehend unberücksichtigt [55].

In Deutschland gelten Sonnenschutzmittel als Kosmetika und unterliegen der europäischen und der ergänzenden deutschen „Verordnung über kosmetische Mittel“ [56, 57]. Für die Bestimmung des LSF gilt die Richtlinie der International Organisation for Standardization (ISO), in der das Bestrahlungsspektrum (290 - 400 nm), Endpunkte, sowie Kriterien zur Auswahl von Testpersonen genau definiert sind, um Unterschiede zwischen verschiedenen Testlaboren möglichst gering zu halten. [54] Das in-vivo Verfahren für die Bestimmung des LSF ist schon lange umstritten, da die Proband*innen dabei den UV-Strahlen ausgesetzt sind, vor denen Sonnenschutzmittel sie ja eigentlich schützen sollen. So hat die Europäische Kommission bereits 2006 zur Entwicklung eines nicht-invasiven Verfahrens aufgerufen [58]. Das Sortiment an Sonnenschutzmitteln weitet sich ferner weiter aus. Es werden stetig Produkte mit immer höheren LSFs und verbesserter Wasserfestigkeit entwickelt, aber auch spezielle Präparate für Säuglinge, Kinder und Menschen mit Hautkrankheiten hergestellt [59]. Zusätzlich müssen neue umweltfreundliche UV-Filter entwickelt werden. In ersten Urlaubsregionen sind Octinoxat und Oxybenzon, die in 70 bis 80 % aller Sonnenschutzmittel enthalten sind, aufgrund ihrer potentiell schädlichen Wirkung auf Korallenriffe verboten worden [60]. Dabei muss für jedes neue Produkt der LSF mit dem MED-basierten Verfahren bestimmt werden.

In den vergangenen Jahrzehnten sind zahlreiche Bemühungen unternommen worden, um ein in-vitro Verfahren für LSF-Testungen zu entwickeln. Dafür wurden Versuche mit unterschiedlichen Substraten gemacht, die der menschlichen Haut in ihren optischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften möglichst nahekommen. Oft wurden aufgeraute Polymethylmethacrylat (PMMA)- oder Quartz-Platten, Mäuse-Epidermis, Transpore™ und Vitro-Skin® verwendet. [61, 62] Keine dieser Methoden zur Bestimmung des LSF konnte sich

bis jetzt durchsetzen [63]. Zwar entsprach die Form der Absorptionskurve der der Sonnenschutzmittel; jedoch wurde das eigentliche Absorptionsniveau teils zu hoch und teils zu niedrig eingeschätzt. Dieses ist nämlich stark abhängig von einer makroskopisch und mikroskopisch homogenen Verteilung des Sonnenschutzmittels [50, 64]. Zwei Sonnenschutzmittel mit den gleichen UV-Filtern, aber unterschiedlicher Galenik können deshalb verschiedene LSF aufweisen. Bisher konnte kein künstliches Substrat die Interaktion zwischen der menschlichen Haut und der großen Vielfalt existierender Sonnenschutz-Formulierungen adäquat imitieren [53].

Für die Bestimmung des UV-A-Schutzes (UVA-PF) hat sich hingegen ein in-vitro Verfahren mit aufgerauten PMMA-Platten durchgesetzt [65]. Dieses setzt jedoch die Kenntnis des LSF voraus. Während der LSF die Effektivität eines Sonnenschutzmittels gegenüber UV-B-Strahlung bestimmt, gibt der UVA-PF die Schutzwirkung gegenüber UV-A-Strahlung an. Der Anteil an UVA-PF muss, entsprechend den Richtlinien der europäischen Kommission, in kommerziellen Sonnenschutzmitteln mindestens ein Drittel betragen [66]. UV-A hat zwar im Vergleich zu UV-B einen sehr geringen Anteil an der Entstehung von Sonnenbrand [55], verursacht aber wie in 1.2. erläutert eine lichtbedingte Hautalterung und wirkt indirekt kanzerogen. Im Rahmen des in-vitro Verfahrens zur Bestimmung des UV-PFs wird zunächst ein Absorptionsspektrum ermittelt. Um das eigentliche Absorptionsniveau zu bestimmen, das sich wie oben erläutert auf Substraten nicht zuverlässig messen lässt, wird der anhand des in-vitro Spektrums berechnete LSF so skaliert, dass er dem in-vivo gemessenem LSF entspricht [65].

1.4. Diffuse Reflexionsspektroskopie (DRS)

Ebenfalls zur Bestimmung des UVA-PFs wurde von *Gillies et al.* ein in-vivo Ansatz mittels diffuser Reflexionsspektroskopie (DRS) vorgestellt [67]. Dabei wird das von der Haut reflektierte Licht vor und nach dem Auftragen eines Sonnenschutzmittels verglichen, sodass ein Absorptionsspektrum im UV-A-Bereich erstellt werden kann. *Ruvolo et al.* zeigten 2009 mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,99$ eine sehr gute Korrelation zwischen dem DRS-Ansatz und Referenzmethoden [68]. Im UV-B-Bereich wird viel Licht von Proteinen und DNA in der Epidermis absorbiert, sodass eine nur schwer detektierbare Menge an Licht reflektiert wird [69]. Deshalb entwickelten *Ruvolo et al.* 2014 einen Hybrid-Ansatz (HDRS): Dabei wird die Form der UV-B-Absorptionskurve in-vitro bestimmt und anschließend skaliert, sodass sie an die in-vivo DRS-Ergebnisse geknüpft werden kann. [70] Mithilfe von HDRS kann also der

LSF und der UVA-PF durch eine nicht-invasive Messung direkt auf der menschlichen Haut bestimmt werden. Mittlerweile haben auch *Rohr et al.* 2018 und *Cole et al.* 2019 HDRS-Ansätze mit sehr guter Korrelation zu Referenzmethoden veröffentlicht [71, 72].

1.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein neues DRS-Verfahren zu entwickeln, bei dem die in-vivo Messungen nicht wie bisher mit zwei Monochromatoren oder einem Polychromator, sondern mit einer multi-lambda-Leuchtdioden (LED)-Lichtquelle durchgeführt werden. Daraus ergeben sich mehrere Vorteile: LEDs können gepulst betrieben werden und erlauben es, das UV-A- und das UV-B-Spektrum getrennt voneinander zu adjustieren. Zudem kann der Geräteaufbau sehr kompakt gehalten werden.

Geprüft wurde, ob sich das multi-lambda-LED-Gerät zur Bestimmung des LSF und des UVA-PFs von Sonnenschutzmitteln eignet. Dabei wurden sowohl verschiedene Varianten der Anwendung des HDRS-Verfahrens, aber auch die reinen in-vivo Ergebnisse untersucht.

2. Methoden

2.1. DRS-Aufbau

Das DRS-Gerät verfügt über eine multi-lambda-LED-Lichtquelle, die sich aus 8 LEDs mit Wellenlängen von 290 bis 400 nm zusammensetzt. Das ausgesendete Licht durchquert die Sonnencremeschicht auf der Hautoberfläche, wird in den oberen Schichten der Epidermis zerstreut und zurückgeworfen, wobei es erneut durch die Sonnencreme tritt. Das reflektierte Licht wird von einer Glasfasersonde aufgenommen, die simultan an sieben verschiedenen Messpositionen mit jeweils zwei verschiedenen Erfassungsabständen, also insgesamt mit 14 Kanälen, arbeitet, siehe Abbildung 1. Zur Detektion des reflektierten Lichts dient ein Spektrograph mit 84-Kanälen. Der Aufbau des DRS-Geräts ist in Abbildung 2 dargestellt. Um eine hohe Bestrahlung an Positionen mit hoher Reflexion zu verhindern, wurde an jeder Messposition die optimale Belichtungszeit (max. 4s) durch eine kurze Probemessung bestimmt. Die effektive Erythemdosis war dabei insgesamt auf unter 30 J/m^2 beschränkt. Das entspricht einer relativen Dosis von etwa 0,2 der MED bei Hauttyp I [33, 73]. Werden vier Sonnenschutzmittel an einem Probanden getestet, beträgt die Gesamtdosis 160 mJ und die bestrahlte Hautoberfläche etwa 22 mm^2 . Die gewählten LED-Einstellungen, und somit auch

das gesamte UV-Bestrahlungsspektrum, stellen ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis sicher. Da das reflektierte Licht zweimal durch die Sonnencremeschicht tritt, wurde aus den Reflexionswerten die Quadratwurzel gezogen, um eine transmissionsähnliche Wichtung der Werte vorzunehmen. Die Reflexionswerte mit und ohne Sonnencreme wurden jeweils über alle Messpositionen gemittelt, um für jedes Testprodukt und jede Testperson ein robustes durchschnittliches Transmissionsspektrum zu erhalten. Jenes wurde anhand folgender Gleichung berechnet, in der R für die diffuse Reflexion nach dem Auftragen des Testprodukts und R_0 für die diffuse Reflexion vor dem Auftragen des Testprodukts steht:

$$T(\lambda) = \sqrt{\frac{R}{R_0}} \quad (1)$$



Abbildung 1: Glasfasersonde mit 7 Messpositionen.

Aus Wiora, G.R., Carina; Lademann, Jürgen; Schanzer, Sabine; Kobylinski, Susanna; Throm, Carolin; Karrer, Hans; Khazaka, Georg; Meinke, Martina C, *Development of a fast non-invasive in vivo measurement of UVA-PF and SPF with new Diffuse Reflectance Spectroscopy device*. IFSCC.[74].

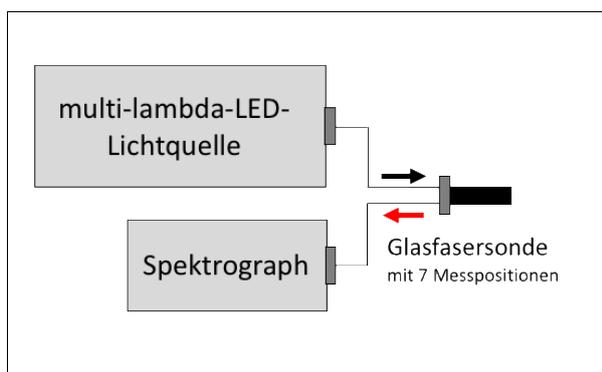


Abbildung 2: Aufbau des multi-lambda-LED-Geräts.

Nach Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „*In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source*“; Journal of Biophotonics, 2020 [75].

2.2. *In-vivo Messungen*

Dem Studiendesign wurde von der Ethik-Kommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin zugestimmt (EA1/161/18). Jedes Testprodukt wurde mit zehn Proband*innen untersucht. Diese wurden entsprechend der Vorgaben aus der ISO 24444 - Richtlinie [54] ausgewählt. So wurden Personen im Alter von 18 bis 70 Jahren eingeschlossen, die Hauttyp I, II oder III [33] haben, keine disqualifizierenden Hauterkrankungen wie Pigmentstörungen aufweisen, und auf dem Rücken ungebräunt sind. Alle Proband*innen haben im Vorfeld ihre schriftliche, informierte Einwilligung zur Teilnahme an der Studie gegeben. Vor jeder Messreihe wurde das DRS-Gerät kalibriert, um eine gleichmäßige Lichtemission sicherzustellen. Pro Testperson wurden vier Sonnenschutzmittel gemessen. Auf jedem Testfeld à 10x10 cm wurden fünf native Messungen durchgeführt. Es wurde eine Auftragsmenge von 2,0 mg/cm² verwendet. Nach einer Einwirkzeit von 25 bis 30 min wurden je 20 Messungen pro Testfeld vorgenommen. Es zeigten sich während und nach der Durchführung der Messungen keine Veränderungen auf dem Rücken der Proband*innen.

2.3. *HDRS-Berechnung und Photodegradation*

Die in-vitro Daten wurden vom Hersteller der Sonnenschutzmittel zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Datenanalyse wurden verschiedene Varianten des HDRS-Verfahrens untersucht. Dabei wurde die Wellenlänge variiert, bei der die in-vitro und in-vivo Spektren miteinander verknüpft wurden und verschiedene Methoden zur Berücksichtigung der Photodegradation verglichen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird hier zunächst nur das Verfahren mit den stabilsten Ergebnissen und der besten Übereinstimmung der LSF-Werte zur Referenzmethode detailliert dargestellt. Dabei erfolgt die Verknüpfung des in-vivo Spektrums mit dem in-vitro Spektrum der nicht photogeleiterten Creme zwischen 320 und 330 nm und die Photodegradation wird anschließend durch eine spektral abhängige Alterskorrektur berücksichtigt. Für die anderen HDRS-Varianten siehe Tabelle 2. Die in-vivo Transmissionswerte $T_{\text{DRS}}(\lambda)$ werden zwischen den Wellenlängen 320 und 330 nm durch die entsprechenden Transmissionswerte des in-vitro Spektrums der nicht photogeleiterten Creme geteilt, womit der Skalierungsfaktor $C_{\text{HDRS}}'_{\lambda}$ bestimmt wird. Der Skalierungswert $C_{\text{HDRS}}'_{0}$ ist das arithmetische Mittel dieser 11 Skalierungsfaktoren $C_{\text{HDRS}}'_{\lambda}$. Die Transmissionswerte $T_{\text{PMMA}}(\lambda)$ zwischen den Wellenlängen 290 und 320 nm werden mit

dem Skalierungswert $C_{\text{HDRS}} \cdot 0$ multipliziert und mit den Transmissionswerten $T_{\text{DRS}}(\lambda)$ zwischen 321 und 400nm zusammengefügt, sodass sie das Transmissionsspektrum $T_{\text{HDRS}}(\lambda)$ formen, das die Wellenlängen 290 und 400 nm ($T_{\text{HDRS}}(\lambda)_{290-400\text{nm}}$) abdeckt. In Abbildung 3 sind die einzelnen Schritte des HDRS-Verfahrens optisch aufbereitet.

Um die Photodegradation des Testprodukts zu berücksichtigen, werden die in-vitro Transmissionswerte nach der Bestrahlung $T'_{\text{PMMA}}(\lambda)$ durch die in-vitro Transmissionswerte vor der Bestrahlung $T_{\text{PMMA}}(\lambda)$ auf jeder Wellenlänge zwischen 290 und 400 nm einzeln geteilt. Daraus ergibt sich ein wellenlängen-abhängiger Skalierungsfaktor für die Photodegradation $C_{\text{PD}}'(\lambda)$.

$T_{\text{HDRS}}(\lambda)_{290-400 \text{ nm}}$ wird mit $C_{\text{PD}}'(\lambda)$ multipliziert, bevor der SPF_{HDRS} anhand der folgenden Formel (2) berechnet werden kann. Dabei ist $E(\lambda)$ = Erythem-Wirkungsspektrum, $I(\lambda)$ = spektrale Bestrahlungsstärke nach ISO 24443, $T'(\lambda)$ = Transmission nach Bestrahlung und $T_{\text{HDRS}}(\lambda)_{290-400 \text{ nm}}$, und $d(\lambda)$ = Wellenlängenintervall.

$$SPF = \frac{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda)I(\lambda)d\lambda}{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda)I(\lambda)T'(\lambda)d\lambda} \quad (2)$$

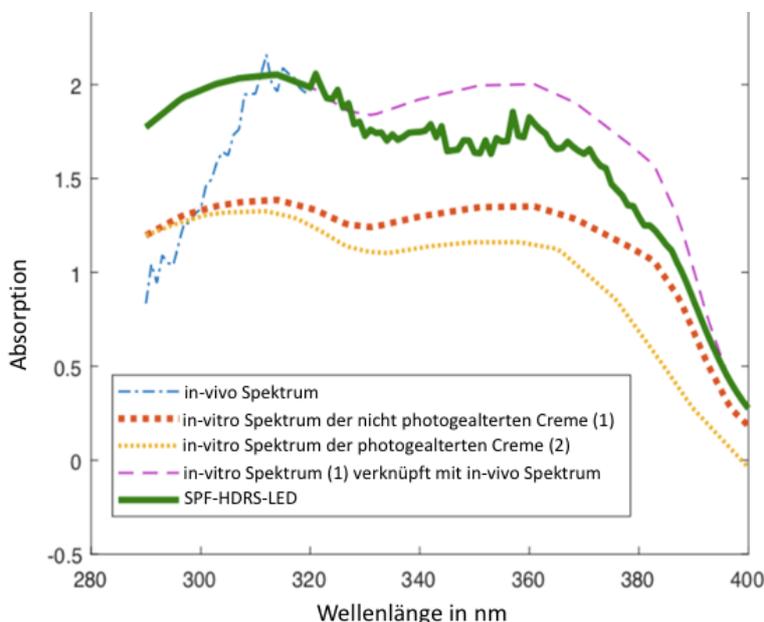


Abbildung 3: Das in-vitro Spektrum vor der Bestrahlung (orangene, dicke, gepunktete Linie) wird zwischen den Wellenlängen 320 und 330 nm auf das Absorptionsniveau des in vivo Spektrums gehoben (blaue, gestrichelt-gepunktete Linie), sodass die violette, gestrichelte Linie entsteht. Um die Photodegradation zu berücksichtigen, wird ein Skalierungsfaktor, der mithilfe der in vitro Spektren vor und nach der Bestrahlung (gelbe, dünne, gepunktete Linie) berechnet wird. So kann der LSF_{HDRS} -

LED (grüne, kontinuierliche Linie) bestimmt werden. Dies wird hier für eine Lotion mit LSF 30 gezeigt.

Abbildung und Text übersetzt aus Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „*In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source*“; Journal of Biophotonics, 2020 [75].

2.4. Testprodukte

Es wurden 11 kommerziell verfügbare Testprodukte untersucht, die die Vielfalt des Angebots an Sonnenschutzmitteln abbilden sollten. Die Produkte hatten einen LSF zwischen 12 und 73 und einen UVA-PF zwischen 5,8 und 36,6 und unterschieden sich auch in ihrer Photostabilität. Unter den Sonnenschutzmitteln waren Lotionen, Sprays, Produkte ohne physikalische Filter und ein Produkt mit Titandioxid (nano) und Zinkoxid. Siehe dazu auch Tabelle 1. Sowohl die Testprodukte als auch die Testprotokolle von zertifizierten Testinstituten wurden vom Hersteller zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

Die LSF- und UVA-PF-Werte, die mithilfe des multi-lambda-LED-Geräts bestimmt worden sind, wurden mit Referenzwerten von zertifizierten Testinstituten verglichen. Siehe dazu Abbildung 4 und 5. Die lineare Einfachregression ohne Interzept von den LSF-Referenzwerten auf die $LSF_{HDRS-LED}$ -Werte hat eine Steigung von 1,43 und $R^2 = 0,86$. Die lineare Einfachregression ohne Interzept von den UVA-PF-Referenzwerten auf die UVA-PF-LED-Werte hat eine Steigung von 1,29 und $R^2 = 0,92$. Die Fehlerbalken der Referenzwerte entsprechen dem maximalen Standardfehler von 17%, der laut ISO 24444 [54] zulässig ist. Die Fehlerbalken der UVA-PF-LED- und $LSF_{HDRS-LED}$ -Werte entsprechen der Standardabweichung ($n = 10$).

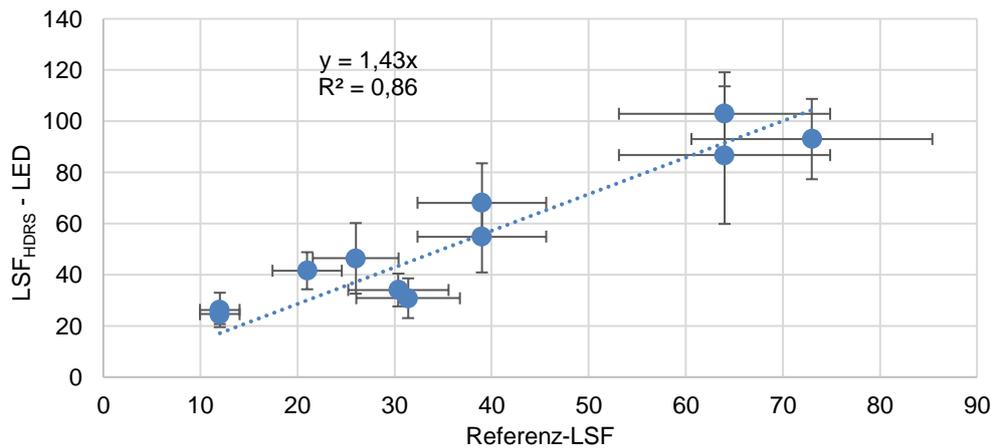


Abbildung 4: Korrelation der LSF_{HDRS}-Werte, die mithilfe des multi-lambda-LED-Geräts bestimmt worden sind, und den LSF-Referenzwerten, die von Testinstituten mit der MED-basierten Methode gemessen worden sind. Die Fehlerbalken der Referenzwerte entsprechen einem maximalen Standardfehler von 17%. Die Fehlerbalken der LSF_{HDRS}-LED-Werte entsprechen der Standardabweichung (n = 10).

Abbildung und Text übersetzt aus Thom, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „*In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source*“; Journal of Biophotonics, 2020 [75].

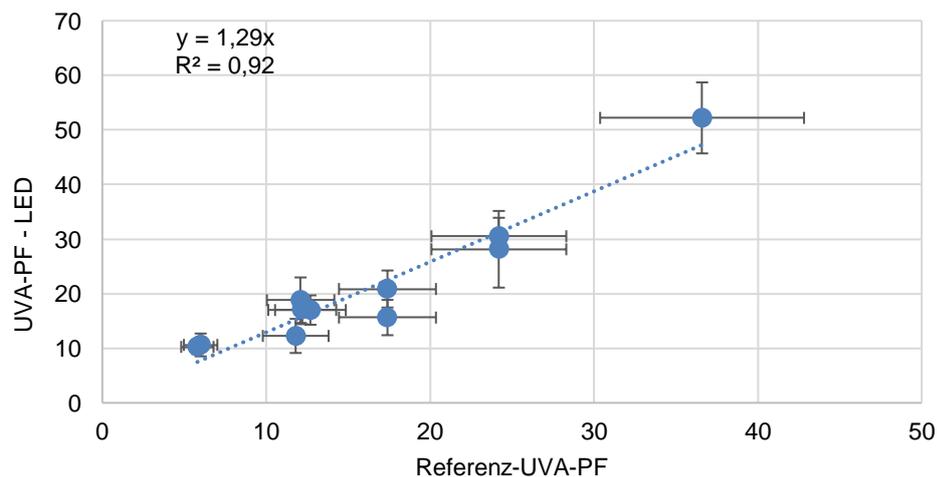


Abbildung 5: Korrelation der UVA-PF-Werte, die mithilfe des multi-lambda-LED-Geräts bestimmt worden sind, und den UVA-PF-Referenzwerten, die von Testinstituten nach ISO 24443 [65] bestimmt worden sind. Die Fehlerbalken der Referenzwerte entsprechen einem maximalen Standardfehler von 17%. Die Fehlerbalken der UVA-PF-LED-Werte entsprechen der Standardabweichung (n = 10).

Abbildung und Text übersetzt aus Thom, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „*In vivo sun protection factor and UVA protection factor*

determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source“; Journal of Biophotonics, 2020 [75].

In Tabelle 1 sind alle Testprodukte mit ihren Referenzwerten und den UVA-PF-LED- und LSF_{HDRS}-LED-Werten zusammengefasst.

Tabelle 1: Die getesteten Sonnenschutzmittel mit ihren LSF_{HDRS}-LED und UVA-PF-LED, wie auch den Referenzwerten. Übersetzt aus Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source“; Journal of Biophotonics, 2020 [75].

Sonnenschutzmittel Nr.	Type of formulation rezeptur	UV-Filter	Referenz-LSF des Testinstituts (n, Zahl der Testpersonen)	LSF +/-SD* gemessen mit dem multi-lambda-LED-Gerät, korrigiert auf Photodegradation	Referenz-UVA-PF des Testinstituts	UVA-PF +/-SD* gemessen mit dem multi-lambda-LED-Gerät, korrigiert auf Photodegradation
1	O/W Lotion	Organisch	12 (n = 10)	24,6+/-3,8	5,8	10,3 +/-1,3
2	O/W Lotion	Organisch	12 (n = 10)	26,2+/-6,7	6	10,6+/-2,1
3	O/W Spray	Organisch	21 (n = 11)	41,6+/-7,2	12,2	17,0+/-2,6
4	O/W Lotion	Organisch	26 (n = 10)	46,4+/-13,8	12,1	18,8+/-4,2
5	Öl-Spray	Organisch	30,4 (n ≥ 10)	34,0+/-6,4	17,4	15,6+/-3,2
6	O/W Lotion	Titandioxid (nano) und Zinkoxid	31,4 (n = 11)	30,8+/-7,8	11,8	12,3+/-3,1
7	O/W Lotion	Organisch	39 (n = 10)	54,9+/-14,0	12,7	17,0+/-2,7
8	O/W Spray	Organisch	39 (n = 10)	68,1+/-15,4	17,4	20,9+/-3,4
9	O/W Lotion	Organisch	64 (n = 10)	102,9+/-16,2	24,2	30,5+/-3,4
10	O/W Spray	Organisch	64 (n = 10)	86,7 +/-26,9	24,2	28,1+/-7,0
11	O/W Lotion	Organisch	73 (n = 10)	93,0+/-15,7	36,6	52,2+/-6,5

*Standardabweichung

Neben den LSF_{HDRS}-LED-Werten wurden auch die reinen in-vivo LSF-LED-Werte mit den Ergebnissen der Testinstitute verglichen. Die lineare Einfachregression ohne Interzept von den LSF-Referenzwerten auf die LSF-LED-Werte hat eine Steigung von 1,41 und $R^2 = 0,78$ für Sonnenschutzmittel mit einem LSF ≤ 26, wie in Abbildung 6 zu sehen ist. Werden nur Proband*innen (n = 2 - 4) mit Hauttyp I berücksichtigt, ist $R^2 = 0,9$.

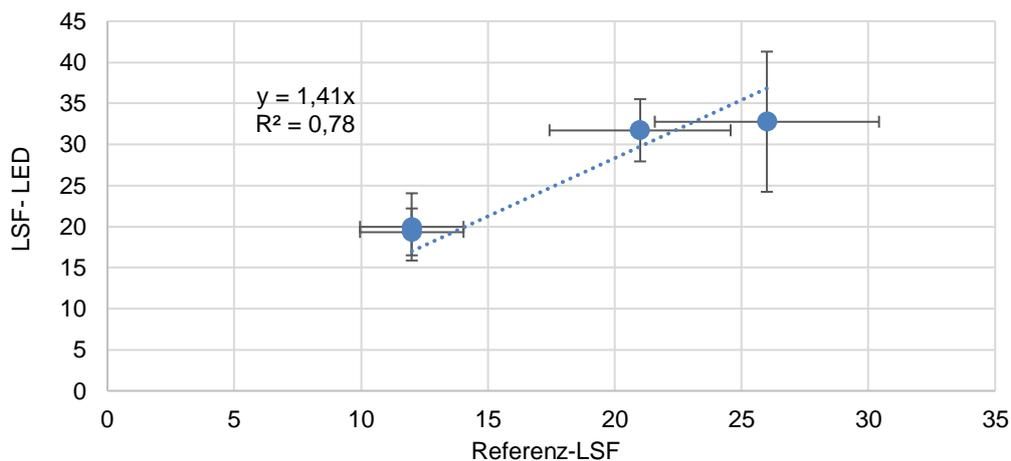


Abbildung 6: Korrelation der in-vivo LSF-Werte, die mithilfe des multi-lambda-LED-Geräts bestimmt worden sind, und den LSF-Referenzwerten der Testinstitute für die Testprodukte mit $LSF \leq 26$. Die Fehlerbalken der Referenzwerte entsprechen einem maximalen Standardfehler von 17%. Die Fehlerbalken der LSF-LED-Werte entsprechen der Standardabweichung ($n = 10$).

Abbildung und Text übersetzt aus Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „*In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source*“; *Journal of Biophotonics*, 2020 [75].

4. Diskussion

4.1. Berechnungsmethoden für das HDRS-Verfahren

Wie in 2.3. erwähnt, wurden im Rahmen der Datenauswertung verschiedene Berechnungsmethoden für das HDRS-Verfahren verglichen. Das Hybridspektrum wurde aus dem in-vivo Spektrum und alternativ dem in-vitro Spektrum der photogalterten oder der nicht photogalterten Creme zusammengesetzt. Die Adaptierung erfolgte in den Wellenlängenbereichen von 320 - 330 nm oder von 340 - 350 nm. Es wurden auch verschiedene Ansätze für die Alterungskorrektur untersucht: In einer ersten Variante wurde die Photodegradation nicht berücksichtigt, in einer zweiten wurde der Ratio of Photodegradation (RPD) nach *Rohr et al.* [71], also ein Alterungsfaktor aus dem Verhältnis zwischen den in-vitro Spektren der photogalterten und der nicht photogalterten Creme, berechnet. Eine dritte Variante stellte die Bestimmung eines Wellenlängen-abhängigen Skalierungsfaktors (C), siehe 2.3., dar. Dieser wurde sowohl für die Absorption als auch für

die Transmission berechnet. Bestimmtheitsmaße für alle diese HDRS-Varianten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Wird die individuelle Photodegradation eines Sonnenschutzmittel nicht bei der Bestimmung seines LSFs berücksichtigt, kann es dazu kommen, dass seine Schutzwirkung überschätzt wird. Daher ist eine Alterungskorrektur im HDRS-Verfahren notwendig. Die validesten Ergebnisse mit guter Übereinstimmung der LSF-Werte zur Referenzmethode wurden mit dem in 2.3. erläuterten Ansatz erzielt. Anders als in anderen Varianten blieb das Bestimmtheitsmaß hier recht stabil, wenn einzelne Testprodukte in die Berechnung der Korrelation eingefügt oder aus der Berechnung herausgenommen wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das multi-lambda-LED-Gerät für die Bestimmung des LSF_{HDRS} und des UVA-PFs geeignet ist. Ein externes Gerät, um die Photoalterung zu bestimmen, ist jedoch notwendig.

Tabelle 2: Bestimmtheitsmaße für verschiedene HDRS-Varianten gegenüber den Referenzwerten. Der fett gedruckte Wert gehört zu dem von uns gewählten Ansatz.

Tabelle und Text übersetzt aus Thom, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „*In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source*“; Journal of Biophotonics, 2020 [75].

In-vitro Spektrum, das für das HDRS-Spektrum verwendet wird	Ohne Alterung		Alterung mit RPD		Wellenlängen-abhängige Alterung (C)			
	Prä-UV in-vitro Daten	Post-UV in-vitro Daten	Prä-UV in-vitro Daten	Post-UV in-vitro Daten	Prä-UV in-vitro Daten		Post-UV in-vitro Daten	
Spektrum, das für das HDRS-Spektrum und die Alterung verwendet wird					Basierend auf Absorptionswerten	Basierend auf Transmissionswerten	Basierend auf Absorptionswerten	Basierend auf Transmissionswerten
320 - 330 nm	0,81	0,76	0,76	0,81	0,88	0,86	0,85	0,83
340 - 350 nm	0,8	0,78	0,55	0,79	0,78	0,79	0,84	0,84

4.2. Vergleich des $LSF_{HDRS-LED}$ -Verfahrens mit der MED-basierten Referenzmethode

In erster Linie liegt der Vorteil des $LSF_{HDRS-LED}$ -Verfahrens gegenüber der MED-basierten Referenzmethode darin, dass dadurch nicht-invasive Messungen direkt auf der menschlichen Haut möglich sind. So kann die Interaktion zwischen Sonnenschutzmittel und Haut zumindest

im UV-A-Bereich unverfälscht beurteilt werden, ohne eine Erythembildung bei den Testpersonen zu provozieren. Das macht auch die Beurteilung der MEDs hinfällig. Das „MED reading“ ist ein Soft Skill, der einerseits aufwändig trainiert werden muss und andererseits als mögliche Ursache dafür diskutiert wird, dass Testprodukte je nach Untersucher mit unterschiedlichen SPF-Werten beziffert werden [76, 77]. Einige kommerzielle Sonnenschutzmittel enthalten UV-Filter mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, sodass die Hautrötungsschwelle erhöht wird. Dies kann bei der MED-basierten Bestimmung des LSF zu einer Überschätzung der Schutzwirkung des Testprodukts führen. [78] Biologische Reaktionen der Haut haben keinen Einfluss auf DRS-Messungen; daher besteht diese Möglichkeit im Rahmen des LSF_{HDRS}-LED-Verfahrens nicht. Auch unter praktischen Gesichtspunkten bietet das LSF_{HDRS}-LED-Verfahren einen großen Vorteil: Nach dem Auftragen und dem Einwirken des Testprodukts dauern die in-vivo Messungen für ein Sonnenschutzmittel, unabhängig von dessen Formulierung, nur etwa 15 min. Vier Testprodukte können insgesamt in etwa 1h 40 min untersucht werden. Dagegen muss bei der MED-basierten Methode allein für die Erythemantwort 16 bis 24h lange abgewartet werden [54].

Mit einer relativen Dosis von 0,2 MED bei Hauttyp I bietet die LSF_{HDRS}-LED-Methode folglich ein nicht-invasives, schnelles Verfahren zur Bestimmung des LSF, das eine gute Korrelation ($R^2 = 0,86$) mit der Referenzmethode zeigt.

4.3. Vergleich des LSF_{HDRS}-LED-Verfahrens (Throm et al.) mit anderen HDRS-Verfahren

In Tabelle 3 werden die Charakteristika der verschiedenen HDRS-Verfahren von *Ruvolo et al.* [70], *Rohr et al.* [71], *Cole et al.* [72] und *Throm et al.* [75] gegenübergestellt. Ein wesentlicher Unterschied ergibt sich aus dem gewählten Testsystem: *Ruvolo et al.* und *Rohr et al.* verwenden zwei (Doppel-)Monochromatoren. Daraus ergibt sich ein teurer, komplexer Aufbau. Das Messspektrum wird sequentiell aufgenommen. Das kostet mehr Zeit, als wenn das gesamte Spektrum, wie bei *Cole et al.* und *Throm et al.*, auf einmal aufgezeichnet wird. Um Streulicht zu unterdrücken, wird ein hohes Maß an Filtration angewandt. Dies kann zu einem Signalverlust beitragen [72]. Das multi-lambda-LED-Gerät bietet eine hohe spektrale und zeitliche Flexibilität. Die Belichtungsintensität und -dauer kann je nach Zielsetzung angepasst werden. Auch die einzelnen LEDs können adjustiert oder herausgenommen werden, um Wellenlängenbereiche auszuklammern oder zu tunen. Dies könnte z.B. hilfreich sein, um bestimmte Wellenlängen-abhängige Eigenschaften von Sonnenschutzmitteln zu

untersuchen. Bei *Cole et al.* werden keine in-vivo Messdaten im UV-B-Bereich gesammelt. Bei den anderen HDRS-Ansätzen wird das in ISO 24444 [54] vorgeschriebene Spektrum von 290 bis 400 nm abgedeckt.

Alle Ansätze zeigen eine hohe Korrelation mit der Referenzmethode. Dies könnte erwarten lassen, dass LSF-Testungen in Zukunft nicht mehr MED-, sondern HDRS-basiert durchgeführt werden könnten.

Tabelle 3: Die HDRS-Verfahren im Vergleich.

		Ruvolo et al. [70] (2014)	Rohr et al. [71] (2018)	Cole et al. [72] (2019)	Throm et al. [75] (2020)
in-vivo Aufbau	<i>Lichtquelle</i>	450 Watt Xenonbogenlampe	450 Watt Xenonbogenlampe	UV-A Sonnensimulator	multi-lambda-LED-Lichtquelle
	<i>Geräteaufbau</i>	- Doppel-Monochromator zur Emission - Doppel-Monochromator zur Extinktion - Photomultiplier - Lichtleitersonde	- Monochromator zur Emission - Monochromator zur Extinktion - Photomultiplier (-20°C gekühlt) - Lichtleitersonde	- Photomultiplier - Lichtleitersonde	- Spektrograph (84-Kanäle) - Glasfasersonde
	<i>Messspektrum</i>	290 - 400 nm; in Schritten von 2 nm; Integrationszeit: 100 ms	290 - 405 nm; in Schritten von 1 nm; Integrationszeit: 100 ms	320 - 400 nm	290 - 400 nm
	<i>Messungen pro Testgebiet</i>	3	3	4	20
in-vitro Verfahren		nach COLIPA Richtlinien [66]; ohne Photoalterung	nach ISO 24443 [65]	nach ISO 24443 [65]	in-vitro Daten bezogen vom Hersteller (dort gemessen nach ISO 24443 [65])
Testpersonen pro Testprodukt		10 (Hauttyp I, II, III)	8-15 (Hauttyp I, II, III)	8-10 (Hauttyp I, II, III)	10 (Hauttyp I, II, III)
Testprodukte		17 (LSF 15,4 - 58,7)	80 (LSF 5 - 120)	10 (LSF 4 - 85; UVA-PF 1,25 - 22)	11 (LSF 12 - 73; UVA-PF 5,8 - 36,6)
Verknüpfung der in-vivo und in-vitro Spektren		340 - 350 nm	340 - 350 nm	330 - 340 nm	320 - 330 nm
HDRS-Verfahren und Photodegradation		Mithilfe eines Skalierungsfaktors wird das in-vivo Spektrum mit dem in-vitro der nicht photogealterten Creme Spektrum verknüpft. Eine Alterskorrektur wird nicht vorgenommen.	Mithilfe eines Skalierungsfaktors wird das in-vivo Spektrum mit dem in-vitro Spektrum der photogealterten Creme verknüpft. Aus den UVA-PFs und SPFs, die sich prä- und post-UV ergeben, wird ein Ratio of Photodegradation (RPD) bestimmt. Mit diesem wird das HDRS-Spektrum multipliziert.	Das in-vitro Spektrum der nicht photogealterten Creme wird auf das Niveau des in-vivo Spektrums skaliert (320-400 nm). Aus der Differenz der UVA-PFs prä- und post-UV wird ein Photostability Factor (PSF) bestimmt, mit dem das skalierte in-vitro Spektrum Wellenlänge für Wellenlänge auf Photodegradation korrigiert wird. Daraufhin wird es mit dem in-vitro Spektrum der photogealterten	Mithilfe eines Skalierungsfaktors wird das in-vivo Spektrum mit dem in-vitro Spektrum nicht der photogealterten Creme verknüpft. Die Alterskorrektur erfolgt mithilfe eines Wellenlängen-abhängigen Faktors (C), der aus den in-vitro Spektren der photogealterten und der nicht photogealterten Creme berechnet wird.

			Creme (290-340 nm) verknüpft.	
Korrelation mit Referenzmethoden	LSF: $R^2= 0,98$	LSF: $R^2= 0,97$ UVA-PF: $R^2= 0,98$	LSF: $R^2= 0,97$ UVA-PF: $R^2= 0,98$	LSF: $R^2= 0,86$ UVA-PF: $R^2= 0,92$

4.4. Einordnung der LSF-LED-Ergebnisse

Neben den LSF_{HDRS}-LED-Ergebnissen wurden auch die reinen in-vivo LSF-LED-Daten auf Photodegradation korrigiert und mit der Referenzmethode verglichen. Dabei wurden für Sonnenschutzmittel mit $LSF \leq 26$, insbesondere bei Probanden mit Hauttyp I, gute Ergebnisse erzielt, wobei die kleine Stichprobe an Testprodukten ($n = 4$) zu berücksichtigen ist. Dessen ungeachtet stehen diese Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit früheren Studien: So zeigten DRS-Messungen mit einer Xenonbogenlampe auf Schweineohrenhaut, die eine hohe Reflexion aufweist, überwiegend eine gute Korrelation mit LSF-Referenzwerten [79]. Auch mit einer einzelnen UV-B-LED wurden reine in-vivo Messungen zunächst auf Schweineohrenhaut [80], dann bei Testpersonen ($R^2 = 0,57$) [81] durchgeführt. Mit dem multi-lambda-LED-Gerät, das das volle UV-A- und UV-B-Spektrum abdeckt, sind nun viel präzisere Messungen möglich. Es eignet sich für Versuche, bei denen nicht die absoluten LSF-Werte untersucht werden, sondern deren Reproduzierbarkeit unter realen Umweltbedingungen, so z.B. durch den Kontakt mit Wasser, Schmutz und Schweiß, aber auch Reibung durch Kleidung [82]. Es kann auch bestimmt werden, ob Sonnenschutzmittel gleichmäßig verteilt sind [52], und welche Schutzeffekte sich durch eine Reapplikation ergeben [83]. Die Laborbedingungen, unter denen die Bestimmung des LSF stattfindet, unterscheiden sich in der Regel deutlich von der Anwendung der Verbraucher. So wird statt der vorgesehenen 2 mg/cm^2 im Schnitt nur $0,39 - 1,0 \text{ mg/cm}^2$ des Produkts verwendet und die Effektivität der UV-Filter ist häufig durch eine inhomogene, lückenhafte Verteilung zusätzlich eingeschränkt [84]. Daher wären Untersuchungen dieser Art besonders hilfreich, um zu bestimmen, in welchem Maße die Schutzwirkung der Produkte überschätzt wird. Für die Entwicklung von neuen Sonnenschutzmitteln könnte es von Vorteil sein, dass sich anhand der in-vivo Spektren die Interaktion zwischen Haut und Sonnenschutzmittel sowohl im UV-A- als auch im UV-B-Bereich abbilden lässt. Auch Unterschiede in der nativen Reflexion von lichtexponierten und nicht exponierten Körperregionen wären ein interessanter Untersuchungsgegenstand, um den Effekt von Eigenschutzmechanismen der Haut weiter zu erforschen [85].

Aus den LSF-LED-Ergebnissen kann geschlossen werden, dass ein nicht-invasives, reines in-vivo Verfahren zur Bestimmung des LSF von Sonnenschutzmitteln grundsätzlich möglich ist. Es sollte auch angestrebt werden, Produkte möglichst entsprechend ihrer späteren Anwendung zu testen, im Fall von Sonnenschutzmitteln also auf der menschlichen Haut. Nur über ein reines in-vivo Verfahren lassen sich die tatsächlichen Schutzeffekte über das gesamte Wirkspektrum der Testprodukte aufzeichnen. Für Sonnenschutzmittel mit $LSF > 26$ ist die Menge an reflektiertem Licht jedoch zu gering, um LSF-Werte zuverlässig zu bestimmen. Daher wird aktuell an einem multi-lambda-LED-Gerät gearbeitet, das über eine Kühlung verfügt, um noch kleinere Mengen an reflektiertem Licht detektieren zu können.

5. Schlussfolgerung

Bei dem HDRS-Verfahren handelt es sich um eine schnelle, nicht-invasive Methode zur Beurteilung des LSF von Sonnenschutzmitteln auf der menschlichen Haut. Das multi-lambda-LED-Gerät bietet ein kompaktes und anpassungsfähiges Testsystem, um LSF_{HDRS} - und UVA-PF-Werte zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen eine gute Korrelation mit der MED-basierten Referenzmethode. Zusätzlich sind auch reine in-vivo Messungen im UV-A- und im UV-B-Bereich möglich. Diese lassen sich zu Forschungszwecken verwenden.

6. Eigenleistung

Georg Wiora, Carina Reble, Martina Meinke, Jürgen Lademann und Carolin Throm waren an der Konzeptualisierung beteiligt. Carina Reble, Georg Wiora und Georg Khazaka haben das multi-lambda-LED-Gerät konstruiert und gebaut. Carolin Throm hat nach einer Einweisung durch Sabine Schanzer die in-vivo Messungen durchgeführt. Carolin Throm hat die von Georg Wiora aufbereiteten Daten mithilfe eines Codes, den Johannes Schleusener programmiert hat, analysiert und statistisch ausgewertet. Carolin Throm hat den ersten Entwurf für die Publikation der Arbeit geschrieben. Diesen haben Carina Reble, Johannes Schleusener, Martina Meinke und Jürgen Lademann überarbeitet. Jürgen Lademann, Martina Meinke, Georg Khazaka und Georg Wiora halten die Projektleitung inne.

7. Referenzen

1. Urbach, F., *Potential health effects of climatic change: effects of increased ultraviolet radiation on man*. Environ Health Perspect, 1991. **96**: p. 175-6.

2. Holick, M.F., J.A. MacLaughlin, M.B. Clark, S.A. Holick, J.T. Potts, Jr., R.R. Anderson, I.H. Blank, J.A. Parrish, and P. Elias, *Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences*. Science, 1980. **210**(4466): p. 203-5.
3. Havinga, E., *Vitamin D, example and challenge*. Experientia, 1973. **29**(10): p. 1181-93.
4. Li, Y.C., M. Amling, A.E. Pirro, M. Priemel, J. Meuse, R. Baron, G. Dellling, and M.B. Demay, *Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4391-6.
5. Panda, D.K., D. Miao, I. Bolivar, J. Li, R. Huo, G.N. Hendy, and D. Goltzman, *Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16754-66.
6. Huldshinsky, K., *Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1919: p. 90-91.
7. Hess, A.F. and L.J. Unger, *Use of the carbon arc light in the prevention and cure of rickets*. JAMA 1922. **78**(21): p. 1596-1598.
8. Michael F. Holick, N.C.B., Heike A. Bischoff-Ferrari, Catherine M. Gordon, David A. Hanley, Robert P. Heaney, M. Hassan Murad, Connie M. Weaver, *Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline*. JCEM, 2011. **96**(7).
9. Kilkinen, A., P. Knekt, A. Aro, H. Rissanen, J. Marniemi, M. Heliövaara, O. Impivaara, and A. Reunanen, *Vitamin D status and the risk of cardiovascular disease death*. Am J Epidemiol, 2009. **170**(8): p. 1032-9.
10. Dobnig, H., S. Pilz, H. Scharnagl, W. Renner, U. Seelhorst, B. Wellnitz, J. Kinkeldei, B.O. Boehm, G. Weihrauch, and W. Maerz, *Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality*. Arch Intern Med, 2008. **168**(12): p. 1340-9.
11. Ginde, A.A., R. Scragg, R.S. Schwartz, and C.A. Camargo, Jr., *Prospective study of serum 25-hydroxyvitamin D level, cardiovascular disease mortality, and all-cause mortality in older U.S. adults*. J Am Geriatr Soc, 2009. **57**(9): p. 1595-603.
12. Knight, J.A., M. Lesosky, H. Barnett, J.M. Raboud, and R. Vieth, *Vitamin D and reduced risk of breast cancer: a population-based case-control study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(3): p. 422-9.
13. Giovannucci, E., Y. Liu, E.B. Rimm, B.W. Hollis, C.S. Fuchs, M.J. Stampfer, and W.C. Willett, *Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(7): p. 451-9.
14. Garland, C.F., G.W. Comstock, F.C. Garland, K.J. Helsing, E.K. Shaw, and E.D. Gorham, *Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study*. Lancet, 1989. **2**(8673): p. 1176-8.
15. Hyppönen, E., E. Läärä, A. Reunanen, M.R. Järvelin, and S.M. Virtanen, *Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study*. Lancet, 2001. **358**(9292): p. 1500-3.
16. Munger, K.L., L.I. Levin, B.W. Hollis, N.S. Howard, and A. Ascherio, *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis*. Jama, 2006. **296**(23): p. 2832-8.
17. Kurtzke, J.F., *Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region*. Acta Neurol Scand, 1980. **62**(2): p. 65-80.
18. Elamin, M.B., N.O. Abu Elnour, K.B. Elamin, M.M. Fatourechi, A.A. Alkatib, J.P. Almandoz, H. Liu, M.A. Lane, R.J. Mullan, A. Hazem, P.J. Erwin, D.D. Hensrud, M.H. Murad, and V.M. Montori, *Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. 1931-42.
19. Medicine), I.I.o., *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. The National Academies Press (US). 2011, Washington D.C.
20. Papoutsaki, M. and A. Costanzo, *Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis*. BioDrugs, 2013. **27 Suppl 1**: p. 3-12.
21. Rodenbeck, D.L., J.I. Silverberg, and N.B. Silverberg, *Phototherapy for atopic dermatitis*. Clin Dermatol, 2016. **34**(5): p. 607-13.

22. Zanello, S.B., D.M. Jackson, and M.F. Holick, *An immunocytochemical approach to the study of beta-endorphin production in human keratinocytes using confocal microscopy*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **885**: p. 85-99.
23. Jussila, A., R. Huotari-Orava, L. Ylianttila, T. Partonen, and E. Snellman, *Narrow-band ultraviolet B radiation induces the expression of β -endorphin in human skin in vivo*. *J Photochem Photobiol B*, 2016. **155**: p. 104-8.
24. Fell, G.L., K.C. Robinson, J. Mao, C.J. Woolf, and D.E. Fisher, *Skin β -endorphin mediates addiction to UV light*. *Cell*, 2014. **157**(7): p. 1527-34.
25. Kligman, A.M., *Comments on the stratum corneum*. *Biological Effects of Ultraviolet Radiation (With Emphasis on the Skin)*. Pergamon Press, 1969. **Edited by F. Urbach**: p. p. 165.
26. Lerner, A.B. and T.B. Fitzpatrick, *Biochemistry of melanin formation*. *Physiol Rev*, 1950. **30**(1): p. 91-126.
27. Olson, R.L., J. Gaylor, and M.A. Everett, *Skin color, melanin, and erythema*. *Arch Dermatol*, 1973. **108**(4): p. 541-4.
28. Liebler, D.C. and J.A. Burr, *Effects of UV light and tumor promoters on endogenous vitamin E status in mouse skin*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(2): p. 221-5.
29. Stahl, W. and H. Sies, *β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight*. *Am J Clin Nutr*, 2012. **96**(5): p. 1179s-84s.
30. Farr, P.M. and B.L. Diffey, *The erythematous response of human skin to ultraviolet radiation*. *Br J Dermatol*, 1985. **113**(1): p. 65-76.
31. Sklar, L.R., F. Almutawa, H.W. Lim, and I. Hamzavi, *Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review*. *Photochem Photobiol Sci*, 2013. **12**(1): p. 54-64.
32. Hönigsmann, H., *Erythema and pigmentation*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2002. **18**(2): p. 75-81.
33. Fitzpatrick, T.B., *The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI*. *Arch Dermatol*, 1988. **124**(6): p. 869-71.
34. Fisher, G.J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J.J. Voorhees, *Mechanisms of photoaging and chronological skin aging*. *Arch Dermatol*, 2002. **138**(11): p. 1462-70.
35. Boniol, M., P. Autier, P. Boyle, and S. Gandini, *Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis*. *Bmj*, 2012. **345**: p. e4757.
36. Gloster, H.M., Jr. and D.G. Brodland, *The epidemiology of skin cancer*. *Dermatol Surg*, 1996. **22**(3): p. 217-26.
37. Setlow, R.B. and W.L. Carrier, *Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's*. *J Mol Biol*, 1966. **17**(1): p. 237-54.
38. Mitchell, D.L. and R.S. Nairn, *The biology of the (6-4) photoproduct*. *Photochem Photobiol*, 1989. **49**(6): p. 805-19.
39. Brash, D.E., *Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas*. *Br J Dermatol*, 2006. **154 Suppl 1**: p. 8-10.
40. Hiraku, Y., K. Ito, K. Hirakawa, and S. Kawanishi, *Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism*. *Photochem Photobiol*, 2007. **83**(1): p. 205-12.
41. Kripke, M.L., P.A. Cox, L.G. Alas, and D.B. Yarosh, *Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(16): p. 7516-20.
42. Beissert, S. and T. Schwarz, *Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression*. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1999. **4**(1): p. 61-4.
43. Lomas, A., J. Leonardi-Bee, and F. Bath-Hextall, *A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer*. *Br J Dermatol*, 2012. **166**(5): p. 1069-80.
44. Godar, D.E., *Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma*. *J Skin Cancer*, 2011. **2011**: p. 858425.
45. Randle, H.W., *Suntanning: differences in perceptions throughout history*. *Mayo Clin Proc*, 1997. **72**(5): p. 461-6.

46. *Nicht-melanotischer Hautkrebs*.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nicht-melanotischer-Hautkrebs/nicht-melanotischer-hautkrebs_node.html [13.02.2020].
47. *Malignes Melanom der Haut*.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_node.html [13.02.2020].
48. Iannacone, M.R., M.C. Hughes, and A.C. Green, *Effects of sunscreen on skin cancer and photoaging*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2014. **30**(2-3): p. 55-61.
49. Ferrero, L., M. Pissavini, S. Marguerie, and L. Zastrow, *Efficiency of a continuous height distribution model of sunscreen film geometry to predict a realistic sun protection factor*. *J Cosmet Sci*, 2003. **54**(5): p. 463-81.
50. Sohn, M., A. Hêche, B. Herzog, and G. Imanidis, *Film thickness frequency distribution of different vehicles determines sunscreen efficacy*. *J Biomed Opt*, 2014. **19**(11): p. 115005.
51. Novick, R., G. Anderson, E. Miller, D. Allgeier, and K. Unice, *Factors that influence sunscreen application thickness and potential preservative exposure*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2015. **31**(4): p. 212-23.
52. Schleusener, J., S. Schanzer, C. Wille, V. Langen, H. Richter, J. Lademann, and M.C. Meinke, *Electrohydrodynamic spray applicator for homogenous application and reduced overspray of sunscreen*. *Skin Res Technol*, 2020.
53. Cole, C., *Sunscreens – what is the ideal testing model?* *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 2014. **30**(2-3): p. 81-87.
54. *ISO 24444, Cosmetics - Sun protection test methods - In vivo determination of the sun protection factor (SPF)*. 2010.
55. Miyamura, Y., S.G. Coelho, K. Schlenz, J. Batzer, C. Smuda, W. Choi, M. Brenner, T. Passeron, G. Zhang, L. Kolbe, R. Wolber, and V.J. Hearing, *The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011. **24**(1): p. 136-47.
56. *Europäische Verordnung über kosmetische Mittel EG Nr. 1223/2009*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A02009R1223-20201203&qid=1403001930973> [13.02.2020].
57. *Verordnung über kosmetische Mittel*. https://www.gesetze-im-internet.de/kosmetikv_2014/index.html [13.02.2020].
58. *European Commission, Standardisation Mandate assigned to Cen Concerning Methods for Testing Efficacy of Sunscreen Products*. M/389 EN, Brussels, 12 July 2006.
59. Stiefel, C. and W. Schwack, *Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects*. *Int J Cosmet Sci*, 2015. **37**(1): p. 2-30.
60. Raffa, R.B., J.V. Pergolizzi, Jr., R. Taylor, Jr., and J.M. Kitzen, *Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer*. *J Clin Pharm Ther*, 2019. **44**(1): p. 134-139.
61. Garoli, D., M.G. Pelizzo, P. Nicolosi, A. Peserico, E. Tonin, and M. Alaibac, *Effectiveness of different substrate materials for in vitro sunscreen tests*. *J Dermatol Sci*, 2009. **56**(2): p. 89-98.
62. Groves, G.A., P.P. Agin, and R.M. Sayre, *In vitro and in vivo methods to define sunscreen protection*. *Australas J Dermatol*, 1979. **20**(3): p. 112-9.
63. Rohr, M., E. Klette, S. Ruppert, R. Bimzcok, B. Klebon, U. Heinrich, H. Tronnier, W. Johncock, S. Peters, F. Pflücker, T. Rudolph, H. Flösser-Müller, K. Jenni, D. Kockott, J. Lademann, B. Herzog, S. Bielfeldt, C. Mendrok-Edinger, C. Hanay, and L. Zastrow, *In vitro sun protection factor: still a challenge with no final answer*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2010. **23**(4): p. 201-12.
64. Ferrero, L., M. Pissavini, and O. Doucet, *How a calculated model of sunscreen film geometry can explain in vitro and in vivo SPF variation*. *Photochem Photobiol Sci*, 2010. **9**(4): p. 540-51.
65. *ISO 24443, Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro*. 2012.
66. Matts, P.J., V. Alard, M.W. Brown, L. Ferrero, H. Gers-Barlag, N. Issachar, D. Moyal, and R. Wolber, *The COLIPA in vitro UVA method: a standard and reproducible measure of sunscreen UVA protection*. *Int J Cosmet Sci*, 2010. **32**(1): p. 35-46.

67. Gillies, R., D. Moyal, S. Forestier, and N. Kollias, *Non-invasive in vivo determination of UVA efficacy of sunscreens using diffuse reflectance spectroscopy*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2003. **19**(4): p. 190-4.
68. Ruvolo, E., Jr., M. Chu, F. Grossman, C. Cole, and N. Kollias, *Diffuse reflectance spectroscopy for ultraviolet A protection factor measurement: correlation studies between in vitro and in vivo measurements*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2009. **25**(6): p. 298-304.
69. Kölmel, K.F., B. Sennhenn, and K. Giese, *Investigation of skin by ultraviolet remittance spectroscopy*. *Br J Dermatol*, 1990. **122**(2): p. 209-16.
70. Ruvolo Junior, E., N. Kollias, and C. Cole, *New noninvasive approach assessing in vivo sun protection factor (SPF) using diffuse reflectance spectroscopy (DRS) and in vitro transmission*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2014. **30**(4): p. 202-11.
71. Rohr, M., N. Ernst, and A. Schrader, *Hybrid Diffuse Reflectance Spectroscopy: Non-Erythematous in vivo Testing of Sun Protection Factor*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2018. **31**(4): p. 220-228.
72. Cole, C., J. Silverman, and M. Bonitatibus, *Evaluating sunscreen ultraviolet protection using a polychromatic diffuse reflectance device*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2019. **35**(6): p. 436-441.
73. Pathak, M.A. and D.L. Fanelow, *Photobiology of melanin pigmentation: dose/response of skin to sunlight and its contents*. *J Am Acad Dermatol*, 1983. **9**(5): p. 724-33.
74. Wiora, G.R., Carina; Lademann, Jürgen; Schanzer, Sabine; Kobylinski, Susanna; Throm, Carolin; Karrer, Hans; Khazaka, Georg; Meinke, Martina C, *Development of a fast non-invasive in vivo measurement of UVA-PF and SPF with new Diffuse Reflectance Spectroscopy device*. IFSCC.
75. Throm, C.M., G. Wiora, C. Reble, J. Schleusener, S. Schanzer, H. Karrer, L. Kolbe, G. Khazaka, M.C. Meinke, and J. Lademann, *In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source*. *J Biophotonics*, 2020: p. e202000348.
76. Gniadecka, M., J. Lock-Andersen, F. de Fine Olivarius, and H.C. Wulf, *Skin temperature and phototest evaluation*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1996. **12**(5): p. 189-93.
77. Bertin, C., V. Nollent, A. Nkengne, E. Oun, S. Tokgoz-Engrand, and A. Mojon, *Standardisation of minimal erythematous dose reading and assessment: a new system*. *Skin Res Technol*, 2016. **22**(4): p. 423-429.
78. Couteau, C., C. Chauvet, E. Papis, and L.J. Coiffard, *Influence of certain ingredients on the SPF determined in vivo*. *Arch Dermatol Res*, 2012. **304**(10): p. 817-21.
79. Reble, C., I. Gersonde, S. Schanzer, M.C. Meinke, J. Helfmann, and J. Lademann, *Evaluation of detection distance-dependent reflectance spectroscopy for the determination of the sun protection factor using pig ear skin*. *J Biophotonics*, 2018. **11**(1).
80. Reble, C., M. Meinke, and J. Rass, *No More Sunburn*. *Optik&Photonik*, 2018. **01/2018**.
81. Susanna Kobylinski, C.R., Sabine Schanzer, Ingo Gersonde, Georg Wiora, Naysha Lobo Ploch, Hans Karrer, Ludger Kolbe, Georg Khazaka, Jürgen Lademann, Martina Meinke, *Non-invasive measurement of the sun protection factor based on one UVB-LED, accepted by Journal of Biophotonics*.
82. Shahneh A., U.C., Meinke M., Nippel G. , *Neue Methode zur Prüfung von geeigneten Sonnenschutzmitteln für Hautkrebs-gefährdete Berufsgruppen*, in *FOBI2020*.
83. Ruvolo, E., L. Aeschliman, and C. Cole, *Evaluation of sunscreen efficacy over time and re-application using hybrid diffuse reflectance spectroscopy*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2020. **36**(3): p. 192-199.
84. Petersen, B. and H.C. Wulf, *Application of sunscreen--theory and reality*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2014. **30**(2-3): p. 96-101.
85. Nielsen, K.P., Z. Lu, P. Juzenas, J.J. Stamnes, K. Stamnes, and J. Moan, *Reflectance spectra of pigmented and nonpigmented skin in the UV spectral region*. *Photochem Photobiol*, 2004. **80**(3): p. 450-5.

III. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Carolin Maria Throm, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nicht-invasive Bestimmung des Lichtschutzfaktors von Sonnenschutzmitteln auf der menschlichen Haut mithilfe eines spektroskopischen Untersuchungsgeräts im gesamten UV-Bereich/Non-invasive determination of the sun protection factor on the human skin with a spectroscopic device in the whole UV range“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

IV. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Carolin Maria Throm hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source“; Journal of Biophotonics, 2020

Carolin Throm war an der Konzeptualisierung beteiligt. Carolin Throm hat nach einer Einweisung durch Sabine Schanzer die in-vivo Messungen durchgeführt. Carolin Throm hat die von Georg Wiora aufbereiteten Daten mithilfe eines Codes, den Johannes Schleusener programmiert hat, analysiert und statistisch ausgewertet (alle Grafiken der Publikation). Carolin Throm hat den ersten Entwurf der Publikation geschrieben.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

V. Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE, SSCI
 Selected Categories: **"BIOPHYSICS"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 71 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Physics of Life Reviews	1,627	14.789	0.003150
2	NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY	27,178	11.980	0.056800
3	Annual Review of Biophysics	3,014	11.685	0.007430
4	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS	62,284	10.257	0.085930
5	CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY	10,968	9.689	0.017770
6	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	5,650	7.365	0.007800
7	QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS	2,066	5.545	0.002530
8	Acta Crystallographica Section D-Structural Biology	21,750	5.266	0.018220
9	STRUCTURE	15,145	4.862	0.026940
10	BIOELECTROCHEMISTRY	4,944	4.722	0.004950
11	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS	10,266	4.519	0.016350
12	COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES	31,573	4.389	0.031370
13	JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY	12,794	4.383	0.013640
14	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE	15,965	4.352	0.024200
15	BIOPHYSICAL JOURNAL	51,232	3.854	0.050570
16	Current Topics in Membranes	768	3.744	0.002170
17	Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms	7,544	3.510	0.012190
18	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS	13,089	3.465	0.014710

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
19	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL SUBJECTS	15,011	3.422	0.019730
20	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES	18,219	3.411	0.020320
21	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS	21,796	3.391	0.013440
22	NMR IN BIOMEDICINE	7,537	3.221	0.011610
23	JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY	10,073	3.071	0.025320
24	FEBS LETTERS	48,353	3.057	0.030350
25	Journal of Biophotonics	3,799	3.032	0.007930
26	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	85,844	2.985	0.075090
27	ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA	3,743	2.836	0.004840
28	PHOTOCHEMICAL & PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES	6,997	2.831	0.005900
29	PROTEINS-STRUCTURE FUNCTION AND BIOINFORMATICS	15,177	2.828	0.011090
30	PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY	10,220	2.721	0.004880
31	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOMETEOROLOGY	6,418	2.680	0.007220
32	RADIATION RESEARCH	8,707	2.657	0.005340
33	JOURNAL OF COMPUTER-AIDED MOLECULAR DESIGN	4,602	2.546	0.004100
34	Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	3,209	2.527	0.006000
35	JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES	2,561	2.524	0.001700
36	Biomicrofluidics	4,073	2.500	0.006300
37	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS	7,900	2.371	0.008600
38	JOURNAL OF BIOMECHANICS	29,158	2.320	0.024890

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
39	PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT	6,066	2.309	0.006240
40	BIOELECTROMAGNETICS	2,549	2.278	0.001530
41	JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION	2,206	2.214	0.001680
42	BMC Biophysics	195	2.188	0.000360
43	PROGRESS IN BIOPHYSICS & MOLECULAR BIOLOGY	3,744	2.175	0.004160
44	CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS	4,475	2.094	0.004610
44	EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS	2,813	2.094	0.002450
46	CELL BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS	3,673	2.073	0.004490
47	Biointerphases	1,849	2.043	0.002670
48	Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials	553	2.000	0.000980
48	PHYSICAL BIOLOGY	1,898	2.000	0.003310
50	BIOPHYSICAL CHEMISTRY	4,376	1.995	0.002560
51	JOURNAL OF BIOMECHANICAL ENGINEERING-TRANSACTIONS OF THE ASME	7,469	1.947	0.006650
52	Peptide Science	168	1.865	0.000320
53	BIOPOLYMERS	9,185	1.854	0.003840
54	ELECTROMAGNETIC BIOLOGY AND MEDICINE	683	1.820	0.000670
55	Cellular and Molecular Bioengineering	922	1.720	0.002020
56	Multisensory Research	402	1.553	0.001370
57	HIGH ALTITUDE MEDICINE & BIOLOGY	1,178	1.430	0.001310
58	JOURNAL OF MOLECULAR MODELING	5,881	1.346	0.005350

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
59	RADIATION AND ENVIRONMENTAL BIOPHYSICS	1,332	1.321	0.001330
60	JOURNAL OF BIOLOGICAL PHYSICS	790	1.135	0.000580
61	GENERAL PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS	958	1.070	0.000890
62	Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications	1,913	0.968	0.003750
62	Acta of Bioengineering and Biomechanics	700	0.968	0.000850
64	Aerospace Medicine and Human Performance	565	0.954	0.002100
65	BIORHEOLOGY	1,411	0.889	0.000350
66	Journal of Mechanics in Medicine and Biology	914	0.859	0.001340
67	Biomolecular NMR Assignments	323	0.677	0.000840
68	Doklady Biochemistry and Biophysics	524	0.672	0.000740
69	INDIAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & BIOPHYSICS	1,073	0.537	0.000270
70	PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS	371	0.463	0.000600
71	PTERIDINES	86	0.366	0.000120

Copyright © 2020 Clarivate Analytics

VI. Publikation: Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source“; Journal of Biophotonics, 2020

Received: 1 September 2020 | Revised: 29 September 2020 | Accepted: 29 September 2020
DOI: 10.1002/jbio.202000348



FULL ARTICLE

JOURNAL OF
BIOPHOTONICS

In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source

Carolin Maria Throm¹ | Georg Wiora² | Carina Reble² | Johannes Schleusener¹ | Sabine Schanzer¹ | Hans Karrer³ | Ludger Kolbe⁴ | Georg Khazaka² | Martina C. Meinke¹ | Jürgen Lademann^{1*} 

¹Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Berlin, Germany

²Courage+Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany

³Hans Karrer GmbH, Augsburg, Germany

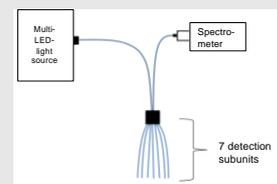
⁴Beiersdorf AG, Research and Development, Hamburg, Germany

*Correspondence
Prof. Dr. Jürgen Lademann, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany.
Email: juergen.lademann@charite.de

Funding information
Bundesministerium für Bildung und Forschung, Grant/Award Number: FKZ 03ZZ0131D; Courage + Khazaka electronic GmbH

Abstract

The sun protection factor (SPF) values are currently determined using an invasive procedure, in which the volunteers are irradiated with ultraviolet (UV) light. Non-invasive approaches based on hybrid diffuse reflectance spectroscopy (HDRS) have shown a good correlation with conventional SPF testing. Here, we present a novel compact and adjustable DRS test system. The in vivo measurements were performed using a multi-lambda-LED light source and an 84-channel imaging spectrograph with a fiber optic probe for detection. A transmission spectrum was calculated based on the reflectance measured with sunscreen and the reflectance measured without sunscreen. The preexposure in vitro spectrum was fitted to the in vivo spectrum. Each of the 11 test products was investigated on 10 volunteers. The SPF and UVA-PF values obtained by this new approach were compared with in vivo SPF results determined by certified test institutes. A correlation coefficient $R^2 = 0.86$ for SPF, and $R^2 = 0.92$ for UVA-PF were calculated. Having examined various approaches to apply the HDRS principle, the method we present was found to produce valid and reproducible results, suggesting that the multi-lambda-LED device is suitable for in-vivo SPF testing based on the HDRS principle as well as for in-vivo UVA-PF measurements.



KEYWORDS

fiber probe, non-erythral testing, non-invasive, SPF determination by HDRS, sunscreen

Abbreviations: DRS, diffuse reflectance spectroscopy; HDRS, hybrid diffuse reflectance spectroscopy; SPF, sun protection factor; UVAPF, UVA protection factor.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2020 The Authors. Journal of Biophotonics published by Wiley-VCH GmbH.

J. Biophotonics. 2020;e202000348.
<https://doi.org/10.1002/jbio.202000348>

www.biophotonics-journal.org | 1 of 8

1 | INTRODUCTION

Skin cancer is the most common cancer worldwide and incidences have been increasing steadily over the last decades [1, 2]. Beside seeking shade and wearing protective clothing, applying sunscreen products is an important strategy of photoprotection [3]. The efficacy of a sunscreen product is dependent on the type and amount of UV-filters [4], the vehicle of the product [5, 6], as well as its quality to create a continuous film over the surface of the skin [7]. Commercial sunscreen formulations are constantly being adapted to the state of research and customized to target susceptible groups like children or dermatological patients.

The sun protection factor (SPF) value quantifies the degree of protection of an individual sun protection product. It is a relative measure of how much longer a person can stay in the sun before developing an erythema response to the solar ultraviolet (UV) rays. For each new sunscreen product, the SPF value must be tested. Guidelines, such as those from the International Organization for Standardization (ISO) define an *in vivo* procedure, in which the ratio between the UV dose leading to a minimal erythema response (MED) on protected skin and on unprotected skin, is calculated with a minimum of 10 voluntary test subjects [8].

Consequently, the current procedure requires that the tested volunteers are being intentionally exposed to UV irradiation, raising ethical concerns. Sufficient evidence shows that UV radiation is the main environmental cause of non-melanoma skin cancer [9]. It is considered to be the main environmental cause of cutaneous melanoma, too [10]. Therefore, the European Commission for safety of non-food products has advised the development of a non-invasive method for the determination of SPFs [11].

In the past decades, efforts have been made to develop an *in vitro* procedure: However, no approach measuring the transmission of the sunscreen on roughened polymethylmethacrylate (PMMA) plates has been broadly accepted, yet [12, 13]. While the shape of the absorption curve represents the effectiveness of the sunscreen filters reliably, the magnitude of the absorbance is often either over- or underestimated, because artificial substrates cannot imitate the interaction between sunscreen formulations and skin [5, 14, 15].

Therefore, a method is required, which allows measurements directly on the human skin without inducing damage due to irradiation.

SPF determination via hybrid diffuse reflectance spectroscopy (HDRS) fulfills these criteria.

By comparing the skin's remitted light before and after the application of a sunscreen, the absolute UVA absorption spectrum can be evaluated. Due to high light

extinction in the UVB range, the shape of the UVB absorbance spectrum can be measured using an *in vitro* transmission spectrum and then adjusted to the *in vivo* diffuse reflectance spectroscopy (DRS) measurements. Different approaches using two monochromators or a polychromatic light source showed a good correlation with conventional SPF testing [16–18].

In the following, a new DRS device for SPF and UVA-PF measurements is presented that uses an LED-based light source, thus providing an adjustable and compact test system, since LEDs can be pulsed, and the UVA and the UVB range can be individually adapted.

2 | MATERIALS AND METHOD

2.1 | Diffuse reflectance spectroscopy setup

The *in vivo* measurements were performed with a DRS device, using a customized multi-lambda-LED light source with 8 LEDs at wavelengths from 290 to 400 nm. A customized 84-channel imaging spectrograph was used for detection. A customized fiber optic probe captured 7 measuring positions and two detection distances simultaneously (= 14 channels). At every probe position, the optimal exposure time (max. 4 seconds) was evaluated by a sample measurement with short exposure time. Thereby, overexposure at positions with high reflectance was avoided, while the total erythema effective dose was limited to below 30 J/m². This corresponds to about 20% of the MED of skin type I and a lower fraction for skin types II and III (e.g. ≈10% for skin type II) [19, 20]. The LED settings (and thus the overall UV illumination spectrum) chosen ensured an optimal signal to noise ratio of the skin reflectance.

Reflectance values for each of the 84 detection fibers were derived from the reflectance image. On this level, a square root was applied in order to achieve a “transmission-like” weighting of values before robust averaging was used for calculation of values on the level of individual channels, measurement position, and probe position, respectively. Reflectance values without sunscreen were averaged over all measurement positions. The transmission was obtained dividing the reflectance measured with sunscreen by the reflectance measured without sunscreen. The result of the measurement was a robust average transmission spectrum for each volunteer and each sunscreen.

2.2 | *In vivo* measurement

The test subjects met the criteria defined in ISO 24444 [8], having skin phototypes I, II and III and no

disqualifying skin conditions, such as, sun damage or pigmentation marks. A positive vote for the study design had been obtained from the ethics committee of the Charité-Universitätsmedizin Berlin, and all test subjects had provided their written informed consent. 10 subjects were tested for each test sample. Before starting a new measurement series, the device was calibrated for the specific volunteer to check the constancy of the light emittance. Five measurements per test area (10 × 10 cm) were performed before test product application. A total of 20 spectra of all 4-test areas was used for further calculation. An amount of 2.0 mg/cm² was applied to the back of the test subjects. 25 to 30 minutes after the application 20 measurements were carried out in the test area.

2.3 | Hybrid diffuse reflectance spectroscopy procedure

With the resulting DRS signals, the transmission can be calculated as according to Equation (1), where R_0 is the diffuse reflectance after product application and R the diffuse reflectance before product application.

$$T(\lambda) = \sqrt{\frac{R}{R_0}} \quad (1)$$

The in vitro data were provided by the sunscreen manufacturers. The transmission values of the in vivo

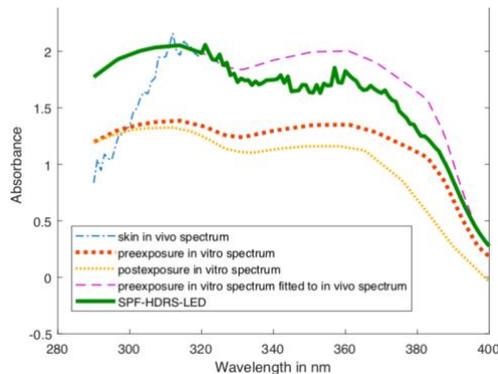


FIGURE 1 The preexposure in vitro spectrum (orange dotted thick line) is shifted to the level of the in vivo spectrum (blue dash-dotted line) at 320 to 330 nm, resulting in the dashed purple line. For the correction of photodegradation a wavelength-dependent scaling factor based on the ratio of pre- and postexposure (yellow dotted fine line) in vitro spectra is calculated. Now SPF_{HDRS-LED} (green continuous line) can be determined. This is shown here for a sunscreen lotion with SPF 30

DRS measurement $T_{\text{DRS}}(\lambda)$ are divided by the preexposure in vitro value at each wavelength between 320 and 330 nm, to determine the scaling factor $C_{\text{HDRS}'\lambda}$ at each wavelength. The scaling value $C_{\text{HDRS}'_0}$ is the arithmetic mean of these 11 $C_{\text{HDRS}'\lambda}$ values. The values of $T_{\text{PMMA}}(\lambda)$ from 290 to 320 nm are multiplied by the scaling value $C_{\text{HDRS}'_0}$ and combined with $T_{\text{DRS}}(\lambda)$ values from 321 to 400 nm to form the transmission spectrum $T_{\text{HDRS}}(\lambda)$ from 290 to 400 nm ($T_{\text{HDRS}}(\lambda)_{290-400\text{nm}}$). Figure 1 shows representative spectra of different stages of the HDRS procedure.

In order to take the photostability of the test product into account (photodegradation), the transmission values of the postexposure in vitro measurements $T'_{\text{PMMA}}(\lambda)$ are divided by the preexposure in vitro values $T_{\text{PMMA}}(\lambda)$ at each wavelength between 290 and 400 nm. This results in the wavelength-dependent scaling factor of photodegradation $C_{\text{PD}}'(\lambda)$.

$$\text{SPF} = \frac{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda)I(\lambda)d\lambda}{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E(\lambda)I(\lambda)T'(\lambda)d\lambda} \quad (2)$$

$T_{\text{HDRS}}(\lambda)_{290-400\text{nm}}$ is multiplied by $C_{\text{PD}}'(\lambda)$ before calculating SPF_{HDRS} according to Equation (2), where $E(\lambda)$ = erythemal action spectrum, $I(\lambda)$ = spectral irradiance, $T'(\lambda)$ = postexposure transmission $T_{\text{HDRS}}(\lambda)_{290-400\text{nm}}$, and $d(\lambda)$ = wavelength interval.

We decided to apply the HDRS principle to the in vivo and the preexposure in vitro spectra. Alternatively, one could first correct the in vivo spectra for photodegradation and then use the postexposure in vitro spectra to obtain the HDRS spectra, see Table 2.

2.4 | Test products

Eleven commercially available test products with an SPF ranging from 12 to 73 and a UVA-PF ranging from 5.8 to 36.6 were investigated. Included were lotions and sprays, products without any physical filters as well as one product with titanium dioxide (nano) and zinc oxide. The samples also differed in their photostability. The test products and test protocols from certified test institutes were provided by the manufacturer.

3 | RESULTS

The SPF and UVA protection factor (UVA-PF) values obtained by this new approach were compared with

in vivo SPF results determined by certified test institutes, as illustrated in Figures 2 and 3. A linear regression through zero with a slope of 1.43 and a correlation coefficient $R^2 = 0.86$ for SPF and a slope of 1.29 and $R^2 = 0.92$ for UVA-PF was obtained. The error bars of the reference values correspond to the 17% maximum standard error, which is allowed according to ISO 24444 [8].

The sunscreens included in the evaluation with their reference, $SPF_{HDRS-LED}$ and $UVA-PF_{HDRS-LED}$ values are shown in Table 1.

In addition to the SPF_{HDRS} values, in vivo DRS data obtained by the multi-lambda device were compared with results determined by test institutes. Taking the photostability into account, an $R^2 = 0.78$ was calculated for

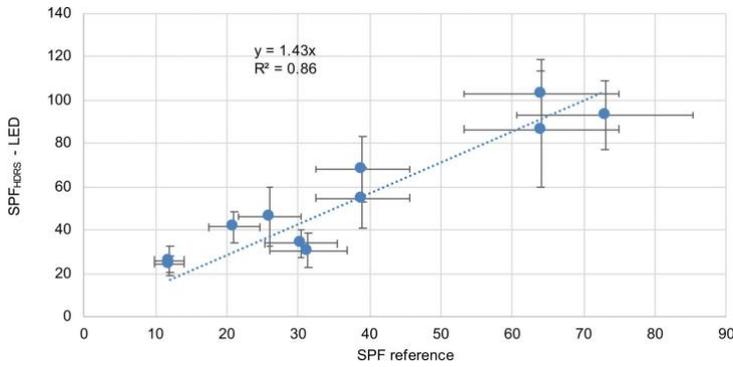


FIGURE 2 Correlation of the SPF_{HDRS} values determined by the multi-lambda-LED device versus the SPF reference method based on MED. The error bars of the reference values correspond to a 17% standard error. The error bars of the SPF_{HDRS} values correspond to the standard deviation (SD n = 10)

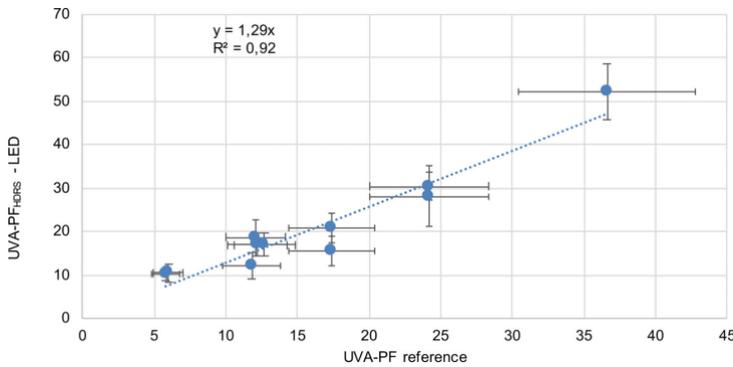


FIGURE 3 Correlation of the UVA-PF values determined by the multi-lambda-LED device versus the UVA-PF reference method based on ISO 24443 [21]. The error bars of the reference values correspond to a 17% standard error. The error bars of the $UVA-PF_{HDRS}$ values correspond to the standard deviation (SD n = 10)

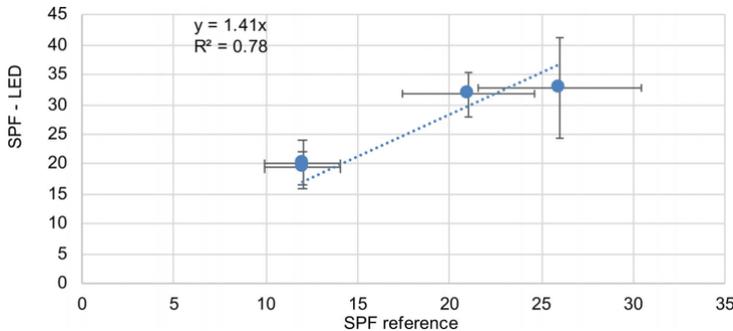


FIGURE 4 Comparison of the in vivo data determined by the multi-lambda-LED device taking photodegradation into account versus conventional SPF testing based on MED for creams with SPF 26 and lower. The error bars of the reference values correspond to a 17% standard error. The error bars of the SPF_{HDRS} values correspond to the standard deviation (SD n = 4)

TABLE 1 Sunscreens included in the evaluation with their reference, SPF_{HDRS}-LED and UVA-PF_{HDRS}-LED values

Sunscreen nr.	Type of formulation	UV filter	Reference SPF of manufacturer measured by test institute (n, number of volunteers)	SPF +/-SD ^a measured by multi-lambda-LED device, corrected for photodegradation	Reference UVA-PF of manufacturer measured by test institute	UVA-PF +/-SD ^a measured by multi-lambda-LED device, corrected for photodegradation
1	O/W lotion	Organic UV filters	12 (n = 10)	24.6+/-3.8	5.8	10.3 +/-1.3
2	O/W lotion	Organic UV filters	12 (n = 10)	26.2+/-6.7	6	10.6+/-2.1
3	O/W spray	Organic UV filters	21 (n = 11)	41.6+/-7.2	12.2	17.0+/-2.6
4	O/W lotion	Organic UV filters	26 (n = 10)	46.4+/-13.8	12.1	18.8+/-4.2
5	Oil spray	Organic UV filters	30.4 (n ≥ 10)	34.0+/-6.4	17.4	15.6+/-3.2
6	O/W lotion	titanium dioxide (nano) and zinc oxide	31.4 (n = 11)	30.8+/-7.8	11.8	12.3+/-3.1
7	O/W lotion	Organic UV filters	39 (n = 10)	54.9+/-14.0	12.7	17.0+/-2.7
8	O/W spray	Organic UV filters	39 (n = 10)	68.1+/-15.4	17.4	20.9+/-3.4
9	O/W lotion	Organic UV filter	64 (n = 10)	102.9+/-16.2	24.2	30.5+/-3.4
10	O/W spray	Organic UV filter	64 (n = 10)	86.7 +/-26.9	24.2	28.1+/-7.0
11	O/W lotion	Organic UV filter	73 (n = 10)	93.0+/-15.7	36.6	52.2+/-6.5

^aStandard deviation.

TABLE 2 Correlation coefficients calculated for different approaches of the HDRS principle. The bold value is the result of the chosen approach

Type of in vitro spectra used for HDRS spectrum	No aging		Aging with RPD		Aging with a wavelength dependent factor					
	Pre-exposure in vitro data		Post-exposure in vitro data		Pre-exposure in vitro data		Postexposure in vitro data			
	Based on absorption values	Based on transmission values	Based on absorption values	Based on transmission values	Based on absorption values	Based on transmission values	Based on absorption values	Based on transmission values		
Type of spectra used for calculation of HDRS spectra and aging										
320–330 nm	0.81	0.76	0.76	0.81	0.88	0.86	0.85	0.83		
340–350 nm	0.8	0.78	0.55	0.79	0.78	0.79	0.84	0.84		

sunscreen products up to SPF 26 ($n = 4$), as shown in Figure 4. When considering only test subjects with skin photo type I ($n = 2-4$), an $R^2 = 0.9$ was calculated for sunscreen products with SPF 26 and lower.

In addition to the SPF_{HDRS} values, in vivo DRS data obtained by the multi-lambda device were compared with results determined by test institutes. Taking the photostability into account, an $R^2 = 0.78$ was calculated for sunscreen products up to SPF 26 ($n = 4$), as shown in Figure 4. When considering only test subjects with skin photo type I ($n = 2-4$), an $R^2 = 0.9$ was calculated for sunscreen products with SPF 26 and lower.

4 | DISCUSSION

During the project implementation, various approaches to apply the HDRS principle have been examined. Each of these approaches used a scaling factor C'_λ of each wavelength either between 320 and 330 nm or between 340 and 350 nm to adjust the in vitro spectrum to the in vivo DRS measurements. Different approaches for aging (correction for photodegradation) were investigated. They included no aging at all, calculating the ratio of photodegradation (RPD) based on Rohr et al. [17] and determining a wavelength dependent scaling factor. The correction for photodegradation was done after application of the HDRS principle and alternatively before calculating a HRDS spectrum. In addition, both versions were carried out using either transmission or absorption values for all the calculation steps. The correlation coefficients for all of these options are shown in Table 2.

The method presented above was found to produce the most valid and best reproducible results, which indicates that the multi-lambda device is suitable for SPF testing based on the HDRS principle as well as for UVA-PF measurements. An external device for testing photostability is required, yet.

Compared to waiting 24 hours for erythema formation using conventional SPF determination, this approach is much faster: Measuring one SPF takes about 15 minutes per volunteer plus the time of application and incubation (independent of the formulation).

With an effective dose of less than 20% of the MED of skin type I the technology is non-invasive. No erythema response is being induced. This makes MED reading, a soft skill often discussed as an inter-grader variable factor of SPF testing, obsolete [22, 23].

The spectroscopic measurements are independent of a biological response and thus not influenced by anti-inflammatory components of certain commercial sunscreen formulations, which can otherwise lead to an overestimation of SPF values [24].

The compact LED-based setup offers a high flexibility in terms of spectrum, light intensity and time. The duration of illumination can be adapted to measurement purposes. Each LED can be individually adjusted in order to tune and to omit specific wavelength ranges. This could be beneficial, for example, to investigate particular wavelength-dependent properties of sunscreen products.

Apart from SPF values based on the HDRS principle, the multi-lambda-LED device produced DRS in vivo values that showed a good accuracy in sunscreen products with SPF 26 and lower, especially when testing subjects with skin type I. This is in accordance with previous experiments using an older Xenon lamp-based spectroscopic DRS setup, where the comparably high reflectance of pig ear skin was mostly in good agreement with SPF values [25]. Pure in vivo measurements were also shown for a setup using one UVB LED and a photodiode for detection [26]. Now the multi-lambda-LED light source with 8 LEDs covering the whole UV range allows more spectrally resolved and thus accurate measurements. These could be beneficial for testing the reproducibility of SPF values, for example, to determine the sweat-resistance or homogeneity of a sunscreen product [7, 27]. Furthermore, the in vivo spectra may be useful for research purposes, since skin filter interactions are measured in the UVA and in the UVB range. For sunscreen products with SPF values higher than 26 the remitted light signal becomes insufficient for the determination of SPFs. In order to pursue a non-invasive, pure in vivo method to determine high SPF values, too, a modified, more powerful multi-lambda-LED device with a cooling system will be developed.

5 | CONCLUSION

Overall, we present a compact and adjustable measurement system using a multi-lambda-LED light source that is suitable for non-invasive and fast SPF testing based on the HDRS principle. In addition, DRS in vivo measurements can be performed and used for research purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jürgen Helfmann for his contribution in the early phase of the program. We are thankful to Mathias Rohr for providing photostability measurements. Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

G.W., C.R., and G.K. are employed by Courage + Khazaka electronic GmbH, which is the industrial partner of the joint research project with an interest in commercialization.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Georg Wiora, Carina Reble, Carolin Maria Throm, Martina C. Meinke and Jürgen Lademann were involved in conceptualization. Carina Reble, Georg Wiora and Georg Khazaka, construction and building up the system. Georg Wiora, Carolin Maria Throm and Johannes Schleusener were involved analyzing the data. Carolin Maria Throm, Sabine Schanzer, Georg Wiora, Carina Reble, Johannes Schleusener, Ludger Kolbe and Hans Karrer were involved in investigation. Carolin Maria Throm writing-original draft; Carina Reble, Johannes Schleusener, Martina C. Meinke and Jürgen Lademann writing-review and editing. Jürgen Lademann, Martina C. Meinke, Georg Khazaka and Georg Wiora, project management.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Jürgen Lademann  <https://orcid.org/0000-0003-1828-7460>

REFERENCES

- [1] A. Lomas, J. Leonardi-Bee, F. Bath-Hextall, *Br. J. Dermatol.* **2012**, *166*(5), 1069.
- [2] D. E. Godar, *J. Skin Cancer* **2011**, *2011*, 858425.
- [3] M. R. Iannaccone, M. C. Hughes, A. C. Green, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2014**, *30*(2–3), 55.
- [4] L. Ferrero, M. Pissavini, S. Marguerie, L. Zastrow, *J. Cosmet. Sci.* **2003**, *54*(5), 463.
- [5] M. Sohn, A. Héche, B. Herzog, G. Imanidis, *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*(11), 115005.
- [6] R. Novick, G. Anderson, E. Miller, D. Allgeier, K. Unice, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2015**, *31*(4), 212.
- [7] J. Schleusener, S. Schanzer, C. Wille, V. Langen, H. Richter, J. Lademann, M. C. Meinke, *Skin Res. Technol.* **2020**.
- [8] ISO 24444, Cosmetics—Sun protection test methods—In vivo determination of the sun protection factor (SPF), 2010
- [9] IARC (International Agency for Research on Cancer), *Mono-graphs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 55, Solar and ultraviolet radiation, Lyon **1992**.
- [10] IARC, *Radiation: Volume 100 D—a review of human carcinogens*, World Health Organization (WHO), Lyon, **2012**.
- [11] European Commission, Standardisation Mandate assigned to Cen Concerning Methods for Testing Efficiency of Sunscreen Products. M/389 EN, Brussels, July 12, 2006
- [12] C. Cole, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2014**, *30* (2–3), 81.
- [13] M. Rohr, E. Klette, S. Ruppert, R. Bimzcok, B. Klebon, U. Heinrich, H. Tronnier, W. Johncock, S. Peters, F. Pflücker, T. Rudolph, H. Flösser-Müller, K. Jenni, D. Kockott, J. Lademann, B. Herzog, S. Bielfeldt, C. Mendrok-

- Edinger, C. Hanay, L. Zastrow, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2010**, 23(4), 201.
- [14] L. Ferrero, M. Pissavini, O. Doucet, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9(4), 540.
- [15] J. A. Osterwalder Uli, S. Alex, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2018**, 1–2, 20.
- [16] E. Ruvolo Junior, N. Kollias, C. Cole, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2014**, 30(4), 202.
- [17] M. Rohr, N. Ernst, A. Schrader, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2018**, 31(4), 220.
- [18] C. Cole, J. Silverman, M. Bonitatibus, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2019**, 35(6), 436.
- [19] T. B. Fitzpatrick, *Arch. Dermatol.* **1988**, 124(6), 869.
- [20] M. A. Pathak, D. L. Fanzelov, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1983**, 9(5), 724.
- [21] ISO 24443, Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro, 2012
- [22] J. Lock-Andersen, H. C. Wulf, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **1996**, 12(4), 154.
- [23] C. Bertin, V. Nollent, A. Nkengne, E. Oun, S. Tokgoz-Engrand, A. Mojon, *Skin Res. Technol.* **2016**, 22(4), 423.
- [24] C. Couteau, C. Chauvet, E. Papis, L. J. M. Coiffard, *Arch. Dermatol. Res.* **2012**, 304(10), 817.
- [25] C. Reble, I. Gersonde, S. Schanzer, M. C. Meinke, J. Helfmann, J. Lademann, *J. Biophotonics* **2018**, 11(1), e201600257. Doi: 10.1002/jbio.201600257
- [26] S. Kobylinski et al., *submitted*, **2020**.
- [27] Shahneh A., U.C., Meinke M., Nippel G., Neue Methode zur Prüfung von geeigneten Sonnenschutzmitteln für Hautkrebsgefährdete Berufsgruppen, in FOBI2020

How to cite this article: Throm CM, Wiora G, Reble C, et al. In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source. *J. Biophotonics*. 2020;e202000348. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000348>

VII. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VIII. Publikationsliste:

Publikation 1:

Throm, C. M.; Wiora, G.; Reble, C.; Schleusener, J.; Schanzer, S.; Karrer, H.; Kolbe, L.; Khazaka, G.; Meinke, M. C.; Lademann, J. „In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source“; Journal of Biophotonics, 2020
Impact Factor: 3,032

IX. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Vollendung der Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Lademann und Frau Prof. Dr. Meinke danke ich für die Themenstellung und die sehr gute Betreuung.

Für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen und auch das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Frau Dr. Carina Reble.

Frau Sabine Schanzer danke ich für ihre Einweisung am DRS-Gerät und im Labor.

Ich danke Herrn Dr. Georg Wiora für die Aufbereitung der DRS-Daten und Herrn Dr. Johannes Schleusener für die Programmierung eines Codes, der mir bei der Datenauswertung geholfen hat.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und das angenehme Arbeitsklima.