

Фотозащитные свойства экстрактов из пяти видов лишайников

О.М. ХРАМЧЕНКОВА

Изучали фотозащитные свойства ацетонового, этанольного, гексанового, бензольного, метанольного, этилацетатного и хлорформного экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina* и *Cladonia arbuscula*. Экстракты из *H. physodes* имели высокие SPF; *E. prunastri* и *R. pollinaria* – очень высокие; *X. parietina* – низкие; *C. arbuscula* – низкие, средние и высокие. По результатам определения величины SPF, критической длины волны и отношения УФ-А/УФ-Б для спиртовых растворов экстрактов из лишайников, фотозащитной субстанцией с максимальной эффективностью может быть признан метанольный экстракт из *Cladonia arbuscula*.

Ключевые слова: экстракты из лишайников, солнцезащитный фактор (SPF), критическая длина волны ($\lambda_{\text{крит}}$), спиртовые растворы экстрактов, спектры поглощения, отношение УФ-А/УФ-Б.

Photoprotective properties of acetone, ethanol, hexane, benzene, methanol, ethyl acetate and chloroform extracts from lichens *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina* and *Cladonia arbuscula* were studied. Extracts from *H. physodes* had high SPF; *E. prunastri* and *R. pollinaria* were very high; *X. parietina* – low; *C. arbuscula* – low, medium and high. Based on the results of determination of SPF, critical wavelength and UV-A / UV-B ratio for alcohol solutions of lichen extracts, the methanol extract from *Cladonia arbuscula* can be recognized as the photoprotective substance with maximum efficiency.

Keywords: lichen extracts, sunscreen factor (SPF), critical wavelength (λ_{crit}), alcohol solutions of extracts, absorption spectra, UV-A / UV-B ratio.

Введение. Под действием солнечных лучей с длиной волны 280–400 нм в коже человека активируется продукция пигмента меланина, что является причиной появления загара. Упомянутый диапазон солнечного излучения, целиком относящийся к ультрафиолету, может быть разделен на длинноволновую – УФ-А (320–400 нм) и средневолновую – УФ-В (280–320 нм) части. Длительное пребывание на солнце зачастую вызывает ряд негативных эффектов: аллергические реакции, фотостарение кожи, ожоги, канцерогенез и множество других, в основе которых лежит развитие окислительного стресса с образованием активных форм кислорода и азота, а также продуктов окисления липидов [1]–[3]. Применение фотозащитных средств системного или местного действия является основной стратегией защиты кожи от негативных последствий воздействия солнца. Критерием эффективности защитного средства является солнцезащитный фактор, обозначаемый как SPF (Sun Protection Factor), представляющий собой отношение минимальных эритемных доз облучения с использованием фотопротектора и без него [4]. Солнцезащитные средства местного применения представляют собой косметические композиции вида «масло-в-воде», реже «вода-в-масле», и делятся на два типа: физические и химические. В состав физических солнцезащитных средств входят оксиды цинка, титана, магния и других металлов, в силу чего они рассеивают и отражают излучение, практически не вызывая аллергических реакций [5]. Недостатком таких средств является их непрозрачность, «видимость» на коже, таяние при высоких температурах, общая эстетическая непривлекательность при нанесении. Химические солнцезащитные средства представляют собой вещества синтетической или натуральной природы, которые способны поглощать и отражать ультрафиолет. Химические агенты зачастую комбинируются с физическими солнцезащитными средствами, что повышает защитную эффективность композиций. Одним из фундаментальных недостатков химических солнцезащитных средств является их аллергенность, что в сочетании с химической нестабильностью входящих в их состав соединений обосновывает актуальность поиска новых природных субстанций, обладающих фотозащитными свойствами [6].

В этом смысле заслуживают рассмотрения вторичные метаболиты лишайников, которым издавна приписываются фотопротекторные свойства [7]–[9]. Лишайники распространены по всему миру, они обитают в местах, где существование высших растений крайне ограничено или вообще невозможно: в Арктике и Антарктике, высоко в горах, в каменистых пустынях и т. д. В таких условиях лишайники вынуждены продуцировать вещества, защищающие ключевые макромолекулы от деградации под действием ультрафиолета. Следует отметить, что лишайники обитают также в регионах с благоприятным для человека климатом, и здесь также продуцируют вторичные метаболиты, назначение которых заключается не только в фотозащите. Лишайниковые вещества представляют собой обширную, химически крайне неоднородную группу сравнительно низкомолекулярных соединений, обладающих высокой биологической активностью: от противовирусной до иммуномодулирующей [10]–[12]. Все эти вещества образуются только в симбиозе фотобионта и микобионта, слагающих талломы лишайников. Использование метаболитов лишайников в косметической промышленности в качестве фотозащитных средств ограничивается целым рядом факторов:

- лишайники крайне медленно растут, и их массовый сбор на определенной территории фактически означает уничтожение лишайнобиоты на долгое время;
- качественный и количественный состав вторичных метаболитов даже самых распространенных видов далек от изученности;
- весьма слабо разработана и практически никак не унифицирована методология извлечения веществ;
- неизвестно с чем лучше иметь дело: с экстрактами из лишайников или выделенными индивидуальными соединениями;
- практически отсутствует база данных об аллергических и иных реакциях людей на лишайниковые метаболиты.

Настоящее исследование посвящено скринингу фотозащитных свойств экстрактов из пяти видов широко распространенных лишайников юго-востока Беларуси.

Методы исследований. Сбор натурального материала. Для исследования были выбраны виды лишайников с описанным составом вторичных метаболитов, три из которых являются стандартными при аналитическом определении лишайниковых веществ [13]–[16] – *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. и *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. Биомассу лишайников отбирали на территории ГЛХУ «Гомельский лесхоз» на типичных для каждого вида субстратах. Словесца эпифитных видов (*Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*) отбирали вместе с фрагментом субстрата (корки сосны обыкновенной, березы повислой, дуба черешчатого и тополя черного, соответственно); эпигейный вид *Cladonia arbuscula* собирали на почве в сухом средневозрастном сосняке. Талломы лишайников отделяли от субстрата, у *Cladonia arbuscula* – отбрасывали нижнюю часть подцеиев – около 5 мм, сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали.

Получение экстрактов из лишайников. Навески измельченной биомассы лишайников экстрагировали в аппарате Сокслета ацетоном, этанолом, гексаном, бензолом, метанолом, этилацетатом и хлороформом, полноту экстракции контролировали стандартным способом [17]. Растворитель удаляли, сухие экстракты использовали для дальнейших исследований.

Определение величины солнцезащитного фактора (SPF) полученных экстрактов выполняли методом скрининга *in vitro* [18], [19]. Навеску экстракта из лишайников массой 1,0 г растворяли в 100 мл этанола, фильтровали. Аликвоту 5 мл переносили в колбу на 25 мл, доводили этанолом до метки. Определяли оптическую плотность растворов в диапазоне длин волн от 290 нм до 320 нм с шагом в 5 нм, используя этанол в качестве раствора сравнения. Средством измерения служил УФ-спектрофотометр Solar PB 2201, измерительные кюветы – кварцевые. Величину SPF оценивали по формуле Мансура [18]:

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE_{\lambda} \times I_{\lambda} \times Abs_{\lambda} ,$$

где: CF – поправочный коэффициент (равен 10); $EE(\lambda)$ – спектр эритемного эффекта; $I(\lambda)$ – спектр солнечной интенсивности; $Abs(\lambda)$ – оптическая плотность образца. Величина $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ является константой [18].

Одновременно для каждого образца снимали спектр поглощения в диапазоне $\lambda = 290 \div 400$ нм.

Соотношение $УФ-А/УФ-В$ рассчитывали по [19], [20]:

$$\frac{УФ-А}{УФ-В} = \frac{\int_{320 \text{ нм}}^{400 \text{ нм}} Abs \lambda d\lambda}{\int_{290 \text{ нм}}^{320 \text{ нм}} Abs \lambda d\lambda}.$$

Критическую длину волны определяли по формуле [19], [20]:

$$\int_{290 \text{ нм}}^{\lambda_{\text{крит}}} Abs \lambda d\lambda = 0,9 \times \int_{290 \text{ нм}}^{400 \text{ нм}} Abs \lambda d\lambda,$$

где: $Abs(\lambda)$ – оптическая плотность образца.

Площадь под кривой спектра поглощения в диапазоне $\lambda = 290 \div 400$ нм принимали за 100 %; $\lambda_{\text{крит}}$ рассчитывали как длину волны, при которой данная площадь достигает 90 % [19], [20].

Анализ результатов исследования производили с помощью программного продукта Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Выход экстрактов из лишайников существенно отличался – таблица 1.

Таблица 1 – Химический выход экстрактов из лишайников

В процентах

Вид лишайника	Используемый экстрагент						
	ацетон	этанол	гексан	бензол	метанол	этилацетат	хлороформ
<i>H. physodes</i>	11,5 ± 1,65	14,7 ± 1,88	1,8 ± 0,22	5,4 ± 0,46	15,7 ± 1,18	12,6 ± 1,22	10,8 ± 1,34
<i>E. prunastri</i>	8,8 ± 1,12	10,1 ± 1,29	1,9 ± 0,17	5,8 ± 0,51	16,4 ± 1,29	8,9 ± 1,18	9,8 ± 1,49
<i>R. pollinaria</i>	10,2 ± 1,43	7,6 ± 0,98	1,6 ± 0,37	5,4 ± 0,49	17,9 ± 1,38	10,2 ± 1,22	7,4 ± 0,87
<i>X. parietina</i>	4,5 ± 0,65	13,8 ± 1,56	2,0 ± 0,42	2,5 ± 0,32	11,6 ± 1,54	3,3 ± 0,66	3,9 ± 0,37
<i>C. arbuscula</i>	2,3 ± 0,29	4,9 ± 0,38	1,6 ± 0,29	1,3 ± 0,29	8,6 ± 1,33	3,2 ± 0,53	3,1 ± 0,47

Очевидно, что химический состав полученных экстрактов отличался так же сильно, как и величины химического выхода. Используемый при экстракции растворитель извлекает из биомассы лишайников не только растворимые в нем вторичные метаболиты, но также, попутно, все другие вещества. Составы экстрактов, полученных из одного и того же вида лишайников, но с использованием различных органических растворителей, отличаются. Соответственно, отличаются и величины выхода экстрактов. Химический выход экстрактов был наименьшим в случае использования гексана в качестве экстрагента, наибольший – при использовании метанола.

Эффективность солнцезащитных средств характеризуется величиной SPF: уровень фотозащиты считается низким при SPF = 2–6; средним – при SPF = 8–12; высоким – при SPF = 15–25; очень высоким – при SPF = 30–50; сверхвысоким – при SPF > 50 [20]. Все полученные нами экстракты из лишайников обладали свойством фотозащиты – рисунок 1.

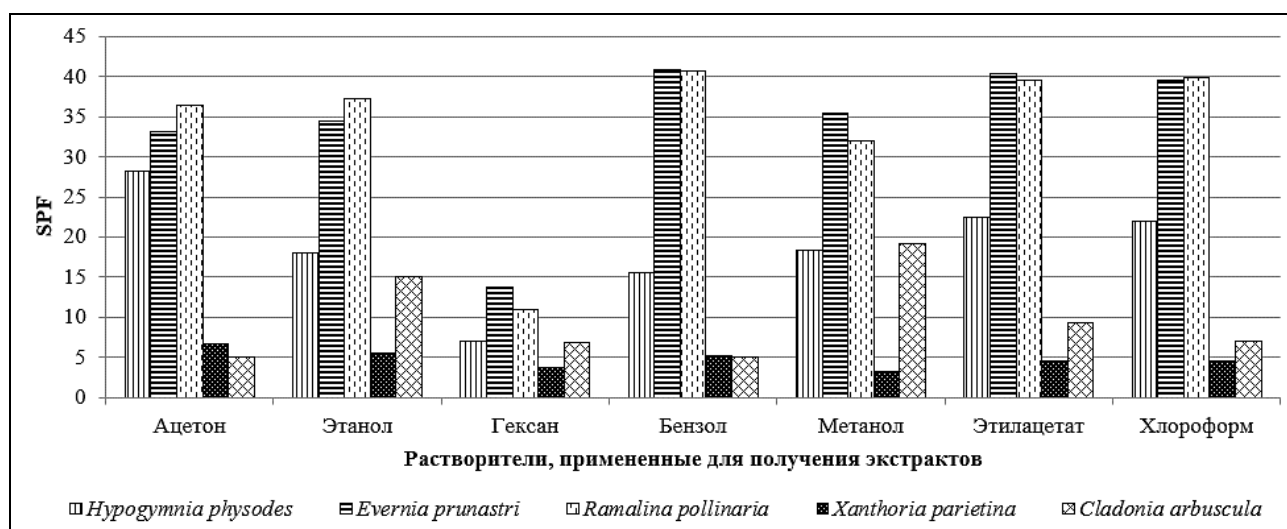
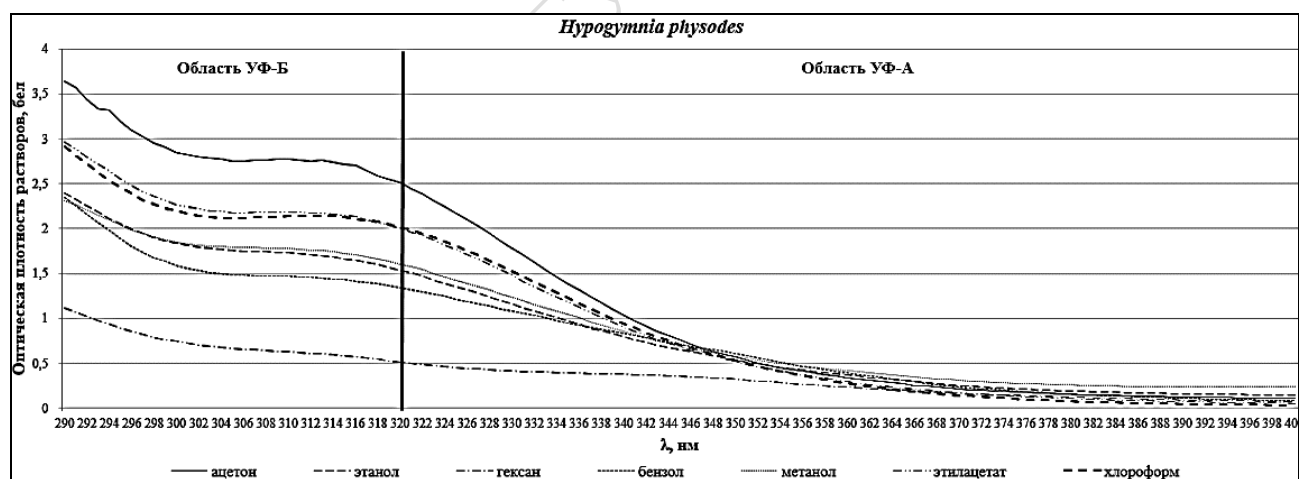


Рисунок 1 – SPF экстрактов из лишайников

Низким уровнем фотозащиты характеризовались все экстракты из *Xanthoria parietina*; ацетоновый, гексановый, бензольный и хлороформный экстракты из *Cladonia arbuscula*, а также гексановый экстракт из *Hypogymnia physodes*. Средний уровень SPF установлен для гексановых экстрактов из *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria*, а также для метанольного экстракта из *Cladonia arbuscula*. Высокой фотозащитной активностью отличались все (кроме гексанового) экстракты из *Hypogymnia physodes*, а также этанольный и метанольный экстракты из *Cladonia arbuscula*. Очень высокий уровень фотозащиты был присущ всем экстрактам (кроме гексановых) из *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria*.

Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из лишайников существенно отличались – рисунки 2–7. Для растворов экстрактов из *Hypogymnia physodes* можно выделить несколько групп спектров поглощения – рисунок 2.

Рисунок 2 – Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Hypogymnia physodes*

В области УФ-Б поглощение было наибольшим у раствора ацетонового экстракта; спектры этилацетатного и хлороформного экстрактов практически совпадали и слабее поглощали ультрафиолет; довольно близки были спектры этанольного и бензольного экстрактов; слабее всего поглощал гексановый экстракт. В области УФ-А в диапазоне 346–366 нм поглощение практически прекращалось.

Растворы экстрактов из *Evernia prunastri* отличались активным поглощением в области УФ-Б и довольно слабым – в области УФ-А – рисунок 3.

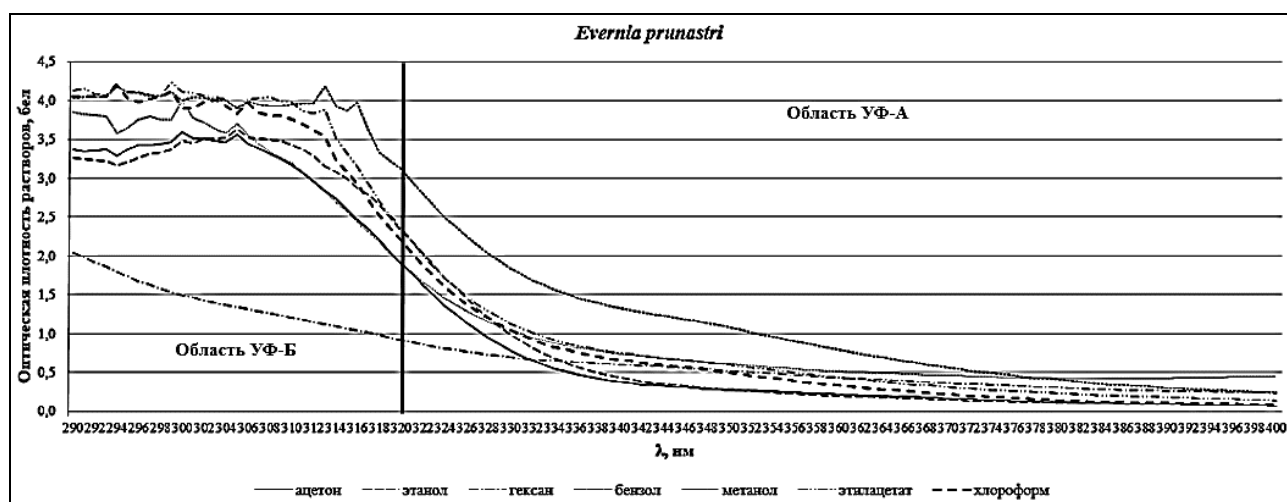


Рисунок 3 – Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Evernia prunastri*

Спектры поглощения растворов большинства экстрактов были близки, за исключением бензольного, который поглощал ультрафиолет наиболее активно, и наименее активного – гексанового. В области УФ-А в диапазоне 336–373 нм поглощение практически прекращалось.

Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Ramalina pollinaria* в значительной степени схожи с таковыми для *Evernia prunastri* – рисунок 4.

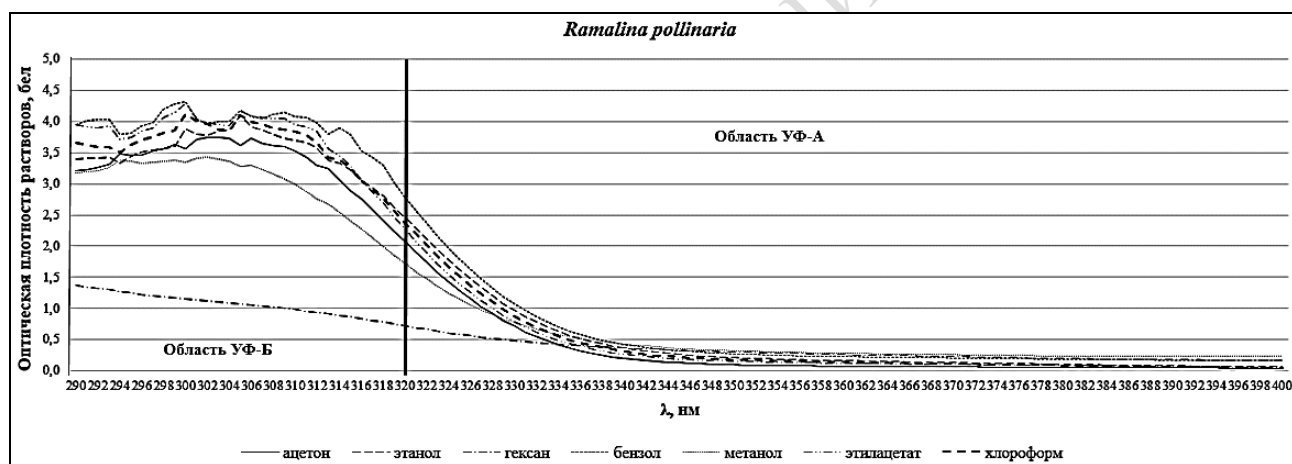


Рисунок 4 – Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Ramalina pollinaria*

Только раствор гексанового экстракта отличался низкой активностью поглощения в диапазоне УФ-Б. Остальные экстракты хорошо поглощали средневолновой ультрафиолет, и значительно слабее – длинноволновой.

Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Xanthoria parietina* резко отличались от описанных выше: довольно слабое поглощение было практически одинаковым в областях УФ-Б и УФ-А – рисунок 5.

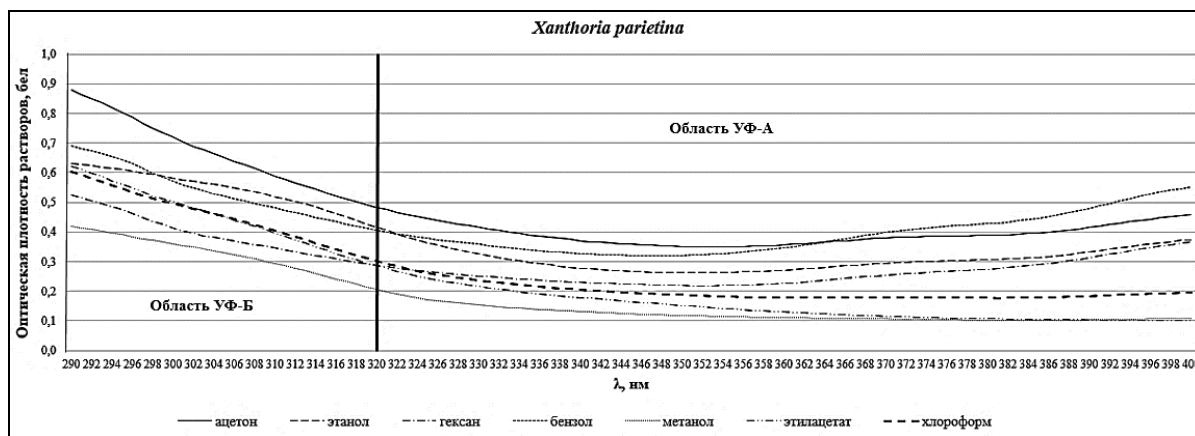


Рисунок 5 – Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Xanthoria parietina*

В области УФ-Б практически совпадали спектры поглощения этанольного и бензольного экстрактов, а также этилацетатного и хлороформного; в области УФ-А – ацетонового и бензольного, этанольного и гексанового, метанольного и этилацетатного.

Довольно широким был разброс спектров поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Cladonia arbuscula* – рисунок 6.

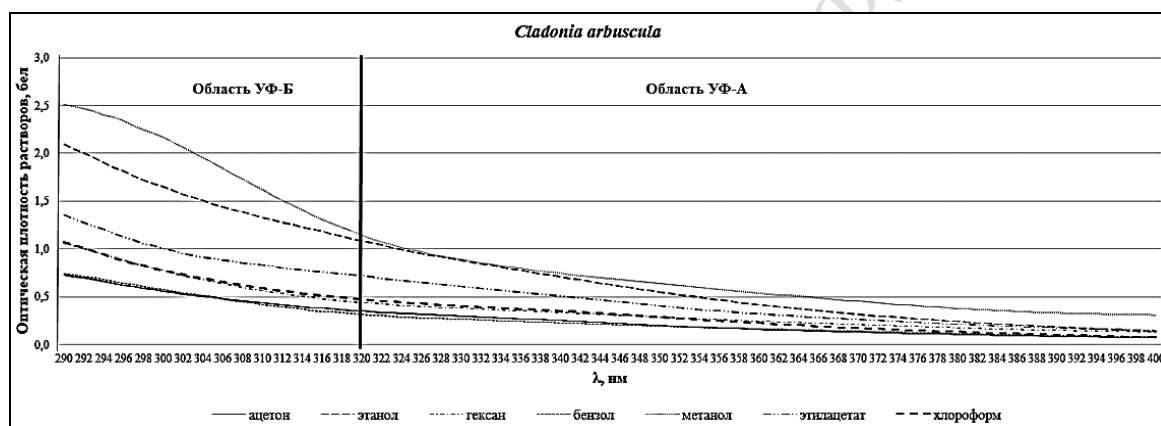


Рисунок 6 – Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *Cladonia arbuscula*

Наиболее низкой (и совпадающей) была активность бензольного и ацетонового экстрактов, несколько более высокой (и тоже совпадающей) – хлороформного и гексанового; наиболее высокой – метанольного и этанольного.

Одним из критериев эффективности солнцезащитного средства является величина критической длины волны – значения, при котором площадь по кривой спектра поглощения в диапазоне $\lambda = 290 \div 400$ нм достигает 90 % от максимального значения [20]. Для классификации предложена пятибалльная шкала эффективности: 0 ($\lambda_{\text{крит}} < 325$); 1 ($325 < \lambda_{\text{крит}} < 335$); 2 ($335 < \lambda_{\text{крит}} < 350$); 3 ($350 < \lambda_{\text{крит}} < 370$) и 4 ($370 < \lambda_{\text{крит}}$). Только средства с длиной $\lambda_{\text{крит}}$ более 370 нм и величиной SPF, превышающей 15,0 признаются солнцезащитными [20].

Показатель УФ-А/УФ-Б является мерой широты защитных свойств. По величине УФ-А/УФ-Б солнцезащитные средства делятся на слабые ($0 \div 0,2$); средние ($0,2 \div 0,4$); хорошие ($0,4 \div 0,6$); превосходные ($0,6 \div 0,8$) и максимальные ($0,8 \geq$) [20], [21].

В таблице 2 приведены значения $\lambda_{\text{крит}}$ и УФ-А/УФ-Б для экстрактов из лишайников.

Таблица 2 – Фотозащитные свойства экстрактов из лишайников

Вид лишайника	Используемый экстрагент						
	ацетон	этанол	гексан	бензол	метанол	этилацетат	хлороформ
<i>H. physodes</i>	$\frac{346}{0,36}$	$\frac{358}{0,75}$	$\frac{366}{0,91}$	$\frac{358}{0,82}$	$\frac{364}{1,01}$	$\frac{347}{0,63}$	$\frac{346}{0,65}$

Окончание таблицы 2

<i>E. prunastri</i>	$\frac{337}{0,29}$	$\frac{336}{0,32}$	$\frac{373}{0,88}$	$\frac{358}{0,64}$	$\frac{367}{0,52}$	$\frac{350}{0,39}$	$\frac{344}{0,34}$
<i>R. pollinaria</i>	$\frac{327}{0,20}$	$\frac{333}{0,28}$	$\frac{366}{0,75}$	$\frac{337}{0,31}$	$\frac{354}{0,38}$	$\frac{328}{0,21}$	$\frac{330}{0,24}$
<i>X. parietina</i>	$\frac{389}{1,56}$	$\frac{389}{1,48}$	$\frac{392}{1,77}$	$\frac{392}{1,93}$	$\frac{382}{0,99}$	$\frac{376}{0,86}$	$\frac{385}{1,11}$
<i>C. arbuscula</i>	$\frac{371}{0,92}$	$\frac{366}{0,83}$	$\frac{375}{0,98}$	$\frac{373}{0,90}$	$\frac{373}{0,81}$	$\frac{372}{1,00}$	$\frac{368}{0,90}$

Примечание: в числителе – величины $\lambda_{\text{крит}}$, нм; в знаменателе – значения УФ-А/УФ-Б, абс.ед.

По показателям величин $\lambda_{\text{крит}}$ и SPF солнцезащитным является метанольный экстракт из *Cladonia arbuscula*. Гексановый экстракт из *Evernia prunastri*, а также этанольный из *Cladonia arbuscula* по своим свойствам приближаются к фотозащитным. Упомянутые экстракты из лишайников являются максимально эффективными по показателю УФ-А/УФ-Б. Экстракты из лишайников с высокими значениями SPF и бальностью $\lambda_{\text{крит}} = 0 \div 2$ могут быть рекомендованы в составы средств для загара в качестве агентов, защищающих от действия УФ-Б.

Заключение. Оценивали процентный выход экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina* и *Cladonia arbuscula* при использовании ацетона, этанола, гексана, бензола, метанола, этилацетата и хлороформа в качестве экстрагентов. Для *H. physodes*, *E. prunastri*, *R. pollinaria* и *C. arbuscula* максимальный выход экстракта получен при использовании метанола; для *X. parietina* – этанола; наименьший химический выход экстрактов был при использовании гексана. Определяли величину солнцезащитного фактора (SPF) семи экстрактов из пяти видов лишайников. Для экстрактов из *H. physodes* установлен высокий уровень фотозащиты; для экстрактов из *E. prunastri* и *R. pollinaria* – очень высокий; для *X. parietina* – низкий; для *C. arbuscula* – низкий, средний и высокий. Гексановые экстракты из лишайников отличались низкими и средними значениями SPF. Спектры поглощения спиртовых растворов экстрактов из *H. physodes*, *E. prunastri* и *R. pollinaria* отличаются высокой активностью в области УФ-Б и быстро снижающейся – в области УФ-А. Поглощение ультрафиолета спиртовыми растворами экстрактов из *X. parietina* не велико и практически одинаково в областях УФ-Б и УФ-А. Спиртовые растворы экстрактов из *C. arbuscula* поглощали ультрафиолет не одинаково: величины SPF составляли от 5,1 до 19,2; при этом $\lambda_{\text{крит}} = 366 \div 375$ нм; УФ-А/УФ-Б = 0,81 \div 1,00. На основании результатов определения величины SPF, критической длины волны и отношения УФ-А/УФ-Б для спиртовых растворов экстрактов из лишайников фотозащитной субстанцией с максимальной эффективностью может быть признан метанольный экстракт из *Cladonia arbuscula*. Гексановый экстракт из *Evernia prunastri*, а также этанольный экстракт *Cladonia arbuscula* по своим свойствам приближаются к фотозащитным.

Литература

1. Gallagher, R.P. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review / R.P. Gallagher, T.K. Lee // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 92 (1). – P. 119–131.
2. Matsumura, Y. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin / Y. Matsumura, N. Ananthaswamy // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2004. – Vol. 195 (3). – P. 298–308.
3. De Grujil, F.R. Skin cancer and solar UV radiation / F.R. de Grujil // European Journal of Cancer. – 1999. – Vol. 35 (14). – P. 2003–2009.
4. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry / E.A. Dutra [et al.] // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2004. – Vol. 40 (3). – P. 381–385.
5. González, S. The latest on skin photoprotection / S. González, M. Fernández-Lorente, Y. Gilaberte-Calzada // Clinics in Dermatology. – 2008. – Vol. 26 (6). – P. 614–626.

6. Mukherjee, P.K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging / P.K. Mukherjee, N.M. Neelesh, K.N. Birendra, K. Sarkar // *Phytomedicine*. – 2011. – Vol. 19 (1). – P. 64–73.
7. Shukla, V. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review / V. Shukla, G.P. Joshi, M.S. Rawat // *Netherlands: Springer: Phytochemistry Reviews*. – 2010. – Vol. 9, № 2. – P. 303–314.
8. Boustie, J. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites / J. Boustie, M. Grube // *Plant Genetic Resources*. – 2005. – Vol. 3, № 2. – P. 273–287.
9. Shrestha, G. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs / G. Shrestha, L.L.S. Clair // *Phytochemistry reviews*. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 229–244.
10. Ranković, B. Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential / B. Ranković. – Cham : Springer International Publishing, 2015. – V, 202 p.
11. Recent Advances in Lichenology: in 2 vol. / ed. : D.K. Upreti [et al]. – New Delhi : Springer, 2015. – Vol. 2. – XV, 265 p.
12. The multiple properties of some of the lichenized ascomycetes: biological activity and active metabolites / V. Shukla [et al] // *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*. – 2017. – Ch. 8. – P. 201–234.
13. Цуриков, А.Г. Лишайники юго-востока Беларуси (опыт лишеномониторинга) / А.Г. Цуриков. – Гомель : ГГУ им. Ф. Скорины, 2013. – 276 с.
14. Elix, J.A. A catalogue of standardized thin layer chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances / J.A. Elix. – Canberra : Australian National University, 2014. – 330 p.
15. Huneck, S. Identification of lichen substances / S. Huneck, I. Yoshimura. – Berlin : Springer, 1996. – 493 p.
16. The lichens of Great Britain and Ireland: 2nd ed. / Eds. : C.W. Smith [et al.]. – London : British Lichen Society, 2009. – 700 p.
17. Воскресенский, П.И. Техника лабораторных работ / П.И. Воскресенский. – М. : Химия, 1973. – 717 с.
18. Mansur, J.S. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria / J.S. Mansur, M.V.R. Breder, M.C.A. Mansur, R.D. Azulay // *An. Bras. Dermatol.* – 1986. – Vol. 61. – P. 121–124.
19. Sayre, R.M. Comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas / R.M. Sayre, P.P. Agin, G.J. Levee, E. Marlowe // *Photochem Photobiol.* – 1979. – Vol. 29. – P. 559–566.
20. Rojas, J.L. Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Usnea roccellina* Motyka, a lichen from Colombian Andes / J.L. Rojas, M. Díaz-Santos, N.A. Valencia-Islas // *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*. – 2015. – Vol. 3 (4). – P. 18–26.
21. Springsteen, A. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance / A. Springsteen, R. Yurek, M. Frazier, K.F. Carr // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – Vol. 380 (2–3). – P. 155–164.