ФАРМАЦИЯ
PHARMACIA

Том/Volume LVII **2010** **Книжка/Number 1-4**

СПИСАНИЕ НА БЪЛГАРСКОТО НАУЧНО ДРУЖЕСТВО ПО ФАРМАЦИЯ

JOURNAL OF THE BULGARIAN PHARMACEUTICAL SCIENTIFIC SOCIETY

Адрес на редакицията
Фармацевтичен факултет
ул.. "Дунав" 2, София 1000
Факс (02) 987 987 4
Гл. редактор: ✆ (02) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

Address of Editorial Board
Faculty of Pharmacy
2, Dunav str., Sofia 1000
Fax (02) 987 987 4
Editor in Chief: ✆(+359 2) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Оригинални статии

Обзори

C O N T E N T S

Original articles

Reviews

ФАРМАЦИЯ 1-4/2010
ISSN 0428-0296 УДК 615

Организационен секретар *Св. Цветанова*
Стилова редакция *Св. Цветанова и д-р Б. Станчева (на англ. ез.)*
Корекция *Св. Цветанова*
Терминологичен и семантичен контрол *д-р Б. Станчева*
Форматиране *О. Маркова*

Подписана за печат на 11.02.2011 г.
Печатни коли 11.5, формат 60 x 90/8

Централна медицинска библиотека
1431 София, ул. „Св. Г. Софийски" № 1, тел. 952-16-45, Fax: 851 82 65
e-mail: svetlamu@mail.bg

ВАЛИДИРАНЕ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА OCTYL SALICYLATE В СЛЪНЦЕЗАЩИТНИ КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ ПРИ САМОСТОЯТЕЛНО И ПРИ СЪВМЕСТНО ПРИСЪСТВИЕ С ФИЗИЧНИ УЛТРАВИОЛЕТОВИ ФИЛТРИ ZINC OXIDE И TITANIUM DIOXIDE

А. Тачев, С. Узунова и Н. Василева

Национален център по опазване на общественото здраве към МЗ – София

Резюме. За ултравиолетовия (UV) филтър Octyl Salicylate като съставка в козметичните продукти има посочена максимално допустима концентрация в законодателството до 5%. Необходим е контрол за спазване на тази норма. От друга страна, установяването на по-ниско фактическо наличие на UV филтъра от обявеното в рецептурата на козметичния продукт е показателно за неосигуряване на обявената върху етикета защита срещу UV лъчи. Отсъства референтен метод за определяне на UV филтър Octyl Salicylate в слънцезащитни козметични продукти. Целта на проучването е разработване и валидиране на достъпен спектрофотометричен метод за неговото определяне. Разработен и валидиран е спектрофотометричен метод за определяне на UV филтъра Octyl Salicylate в слънцезащитни козметични продукти, който е приложим както при самостоятелно, така и при съвместно присъствие с физични UV филтри Zinc Oxide и Titanium Dioxide. Методът се основава на способността на разтвори на Octyl Salicylate в етилов алкохол да поглъщат ултравиолетови лъчи с дължина на вълната 305 nm. Стойността на светлинната абсорбция, измерена при тази дължина на вълната, е пропорционална на концентрацията на Octyl Salicylate. Проведени са общо 433 изпитвания, на базата на които са изведени параметрите на метода: селективност – специфична абсорбция при 305 nm; линейност – от 1,25 до 100 μg/cm^3 (от 0,625 до 50,0%); устойчивост за 24 h престой на концентрация на Octyl Salicylate 10 μg/cm^3 – RSD = 0,55%; повторяемост – при 4% на Octyl Salicylate – SD – 0,0479%; възпроизводимост – при 4% на Octyl Salicylate – RSD в условия на повторяемост – 1,21%; аналитичен добив при концентрация на Octyl Salicylate в козметичния продукт 2% – 97,62% (95,56-102,22%), при 4% – 98,26% (96,11-101,67%). За различните видове козметични продукти са установени: работен обхват – от 0,09 до 12,5%, граница на откриване (LOD) – от 0,07 до 0,75%, граница на определяне (LOQ) – от 0,09 до 0,82%. Разработеният и валидиран спектрофотометричен метод за определяне на UV филтър Octyl Salicylate в слънцезащитни козметични продукти е бърз, с добра чувствителност, точност и възпроизводимост и не изисква сложна и скъпа апаратура. Той може лесно да бъде използван при контрола на слънцезащитните козметични продукти.

Ключови думи: ултравиолетови филтри, слънцезащитни козметични продукти, валидиране, Octyl salicylate

VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD TO DETERMINE THE CONTENT OF OCTYL SALICYLATE IN SUNSCREEN COSMETIC PRODUCTS SINGULARLY AND IN COMBINATION WITH PHYSICAL ULTRAVIOLET FILTERS OF ZINC OXIDE AND TITANIUM DIOXIDE

A. Tachev, S. Uzunova and N. Vassileva

National Center of Public Health Protection – Sofia

Summary. For ultraviolet (UV) filter of Octyl salicylate, as a component of cosmetic products, there exists a maximum applicable concentration indicated in legislation up to 5%. The observation of the mandatory limits has to be strictly controlled. On the other hand, the establishment of real content of the UV filter lower than the declared in cosmetic formulation is an indication for lack of safety protection against UV filters declared on the label. There is no referent method for determination of UV filter of Octyl Salicylate in sunscreen products. The aim of this

study is to develop and validate a useful spectrophotometric method for its determination. There has been developed and validated a spectrophotometric method for determination of UV filter of Octyl salicylate in sunscreens, which is applied both singularly and in combination with physical filters of Zinc oxide and Titanium dioxide. The method is based on the capacity of solutions of Octyl salicylate in ethanol to absorb UV filters with wave length of 305 nm. The value of light absorption measured at this wave length is proportional to the concentration of Octyl salicylate. A total of 433 studies were performed, on the basis of which, the parameters derived of the method are: selection – specific absorption at 305 nm; linearity from 1,25 to 100 μg/cm^3 (from 0,625 to 50,0%); stability for 24-hour duration at concentration of Octyl Salicylate 10 μg/cm^3 – RSD = 0,55%; repeatability – by 4% of Octyl Salicylate – SD – 0,0479%; reproducibility – by 4% of Octyl salicylate – RSD under conditions of repeatability – 1,21%; yield at concentration of Octyl Salicylate in cosmetic product by 2% – 97,62% (95,56-102,22%), by 4% – 98,26% (96,11-101,67%). For the different types of cosmetic products, there have been established: working range – from 0,09 to 12,5%, limits of detection (LOD) – from 0,07 to 0,75%, limits of quantification (LOQ) – from 0,09 to 0,82%. The spectrophotometric method developed and validated for determination of UV filter of Octyl salicylate in sunscreen products is fast, sensitive, and reproducibile, of good accuracy and does not require sophisticated and expensive apparatuses. It can be applied easily for the control of sunscreen cosmetic products.

Key words: ultraviolet filters, sunscreen cosmetic products, validation, Octyl salicylate

С цел максимална защита на кожата в слънцезащитните козметични продукти, предлагани за продължително излагане на слънце, и в продуктите за ежедневна масова употреба се влагат UV филтри за ефективна защита от UVB и UVA лъчи – химични и физични. Съдържанието на UV филтър Octyl salicylate в козметичните продукти е регламентирано до 5% както в европейското законодателство (DIR.76/768/EEC и нейните изменения и допълнения), така и в българското, хармонизирано с европейското законодателство – Наредба № 36 на МЗ от 2005 г. "за изискванията към козметичните продукти" и нейните изменения и допълнения. Необходим е контрол за спазване на тази норма. От друга страна, установяването на по-ниско фактическо наличие на UV филтъра от обявеното в рецептурата на козметичния продукт е показателно за неосигуряване на обявената върху етикета защита срещу UV лъчи.

UV филтърът Octyl salicylate намира широка употреба в разнообразни слънцезащитни козметични продукти – кремове, лосиони, млека и други, за ефективна защита от UVB и UVA лъчи. В публикуваните като референтни методи за проверка на състава (Приложение № 10 на Наредба № 36) не фигурират методи за определяне на UV филтри в козметични продукти, в това число и за Octyl salicylate. Това налага разработването и валидирането на метод за нуждите на контрола.

В литературата са публикувани методи с високоефективна течна хроматография (HPLC) за разделяне и количествено определяне на Octyl salicylate в присъствие на други химични UV филтри (A. Chisvert и сътр., 2001, A. Chisvert, A. Salvador, 2002, E. A. Dutra и сътр., 2002, S. Bouzid, 2005, D. De Orsi и сътр., 2006, Kedor-Hackman и сътр, 2006, A. Chisvert, A. Salvador, 2007). Не са намерени спектрофотометрични методи, които са достъпни, бързи и лесни за приложение, каквито са необходими за нуждите на осъществявания от РИОКОЗ контрол над козметичните продукти.

Целта на проучването е разработване и валидиране на достъпен спектрофотометричен метод за определяне на Octyl Salicylate в слънцезащитни козметични продукти при самостоятелно и при съвместно присъствие с физични UV филтри Zinc Oxide и Titanium Dioxide.

Материал и методи

Разработен и валидиран е спектрофотометричен метод, който се основава на разтваряне на козметичния продукт в етилов алкохол (чза) и спектрофотометрично определяне на концентрацията на UV филтъра Octyl salicylate при селективната му дължина на вълната. Изпитването е проведено на спектрофотометър UV–VIS Lamda 5 на фирмата Perkin-Elmer. Използвани са три базисни козметични продукта без съдържание на UV филтри:

Първи базисен козметичен продукт: козметичен продукт с хомогенна кремообразна консистенция, с тип на емулсията – вода в масло, втори базисен козметичен продукт: козметичен продукт с млекоподобна консистенция, с тип на емулсията – вода в масло, и трети базисен коз-

метичен продукт: козметичен продукт с кремообразна консистенция, с тип на емулсията – масло във вода.

За стандартните и работните разтвори е използвано сертифицирано сравнително вещество UV филтър Octyl salicylate. Пробите са приготвяни в лабораторни условия чрез смесване на базисните козметични продукти с UV филтъра и последващо хомогенизиране.

Валидирането на метода е осъществено съгласно БДС EN ISO/IEC 17025:2006 по параметрите: селективност; линейност; устойчивост; граница на откриване; граница на определяне; работен обхват; повторяемост; възпроизводимост; аналитичен добив.

• **Селективност.** За проверка на обявената в сертификата на сертифицираното сравнително вещество Octyl salicylate дължина на вълната, при която се осъществява максимална абсорбция на UV лъчите, е сканирана серия от работни стандартни разтвори в етилов алкохол: 5, 10, 15, 20, 25 и 30 μg/cm^3 на UV филтъра, при дължина на вълната от 280 до 340 nm. По получената спектрограма е отчетена фактическата максимална абсорбция на UV лъчите в nm.

• **Линейност.** От сертифицираното сравнително вещество Octyl salicylate, с чистота 99,9%, е приготвен изходен стандартен разтвор с концентрация 10 mg/cm^3 (10 000 μg/cm^3). От така получения изходен стандартен разтвор на Oxybenzone са приготвени работни стандартни разтвори с концентрации: 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0; 50,0; 60,0; 80,0; 100,0; 120,0; 150,0; 180,0 и 200,0 μg/cm^3, които са спектрофотометрирани. Въз основа на получените данни е построена графика на зависимостта абсорбция/концентрация в μg/cm^3. Определена е линейната област, която се използва за последващите стъпки при валидирането на метода.

• **Устойчивост.** За определяне устойчивостта на стандартни разтвори със съдържание 1,25, 10 и 30 μg/cm^3 Octyl Salicylate е измерена абсорбцията в различни часови интервали в рамките на 24 часа.

• **Границата на откриване (LOD) и границата на определяне (LOQ)** са дефинирани, както следва:

LOD = C празна проба ± 3 SD празна проба,

където:

C празна проба е концентрацията на празната проба, SD празна проба е стандартното отклонение на празната проба;

LOQ = C празна проба ± 6 SD празна проба,

където:

C празна проба е концентрацията на празната проба, SD празна проба е стандартното отклонение на празната проба.

За определянето на LOD и LOQ са разработвани проби с трите базисни козметични продукта, без съдържание на UV филтри в тях.

• **Работен обхват.** За долна граница на работния обхват е приета установената граница на определяне (LOQ) при всички базисни козметични продукти (празна проба). Горната граница на работния обхват е определена въз основа на линейността на калибрационната крива на UV филтъра.

Доказването на повторяемостта и аналитичния добив е проведено с използването на първия базисен козметичен продукт, чиито консистенция и тип на емулсията са най-близки до тези на основните слънцепредпазни продукти.

• **Повторяемост и възпроизводимост.** За определяне на повторяемостта, изразена чрез стандартното отклонение (SD), са изпитани проби от първия базисен козметичен продукт, с добавка на 4% UV филтър Octyl salicylate, в три последователни дни. Възпроизводимостта е изразявана чрез относителното стандартно отклонение (RSD).

• **Аналитичен добив.** За определяне на аналитичния добив са приготвени проби с две концентрационни добавки 2% и 4% на UV филтъра Octyl salicylate към първия базисен козметичен продукт. От приготвените проби са претеглени 0,01 g и са разтворени при нагряване с етилов алкохол. След охлаждане и темперираане са прехвърлени в мерителна колба от 50 cm^3 и е долято с етилов алкохол до марката. Така приготвените разтвори са спектрофотометрирани при дължина на вълната 305 nm срещу етилов алкохол и е отчетена абсорбцията. След това по калибрационната крива е изчислено съдържанието на UV филтъра в μg/cm^3. Успоредно е пускана и празна проба от първия базисен козметичен продукт без съдържание на UV филтър.

Концентрацията на UV филтъра Octyl salicylate в пробата се получава в μg/cm^3 по уравнението на калибрационната крива, след което се изчислява в % по формулата:

$$x\ (\%) = \frac{C \times V}{m \times 10\,000},$$

където:

C е концентрацията на Octyl salicylate, отчетена по калибрационната крива, в μg/cm^3;

V е обемът, до който е доведена пробата, в cm^3;

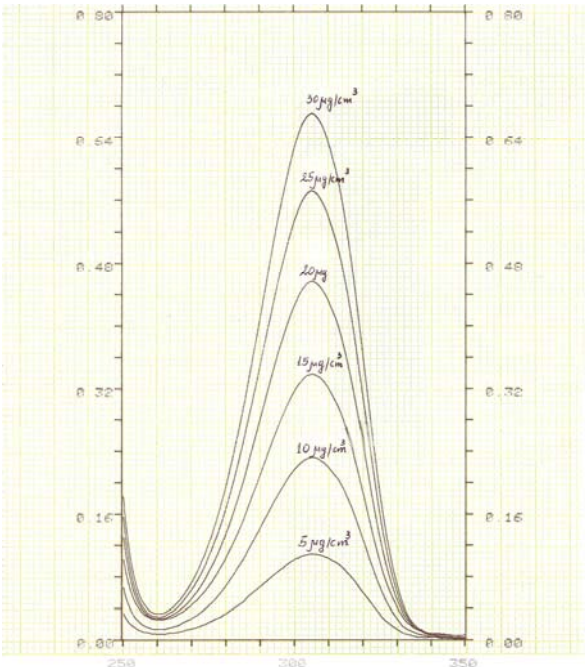
m е масата на взетата за анализ проба, в g;

10 000 е коефициент за превръщане на крайния резултат в проценти.

Резултатите са обработвани статистически посредством статистически програмен пакет SPSS 10,0.

Резултати

При изпитване на селективността абсорбционният максимум се отчете при 305 nm, което потвърждава абсорбционния максимум по оригиналния сертификат на фирмата производител. Спектрограмата е представена на фиг. 1.

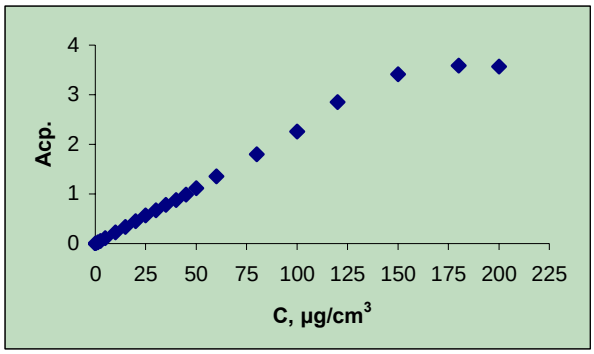


Фиг. 1. *Спектрограма за абсорбцията на UV лъчи от работни стандартни разтвори със съдържание на 5; 10; 15; 20; 25 и 30 μg/cm^3 от сертифицираното стандартно вещество UV филтър Octyl salicylate*

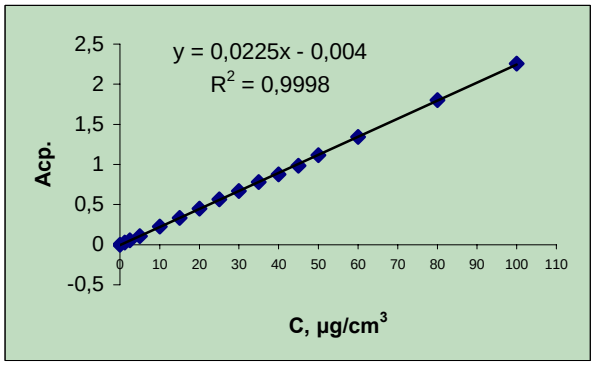
За определяне на линейния диапазон (фиг. 2) са проведени 133 изпитвания с работните стандартни разтвори (по 7 изпитвания на всяка от деветнадесетте концентрации) и с осреднените стойности е построена калибрационна крива на зависимостта абсорбция/концентрация в μg/cm^3 (фиг. 3).

Резултатите от изпитването за устойчивост на разтворите на Octyl salicylate в етилов алкохол са дадени на табл. 1.

За определяне на LOD и LOQ са разработени 90 броя празни проби с трите базисни козметични



Фиг. 2. *Линейност на зависимостта абсорбция (A)/концентрация (C μg/cm^3) на UV филтър Octyl salicylate*



Фиг. 3. *Калибрационна крива на зависимостта абсорбция (A)/концентрация (C μg/cm^3) на UV филтър Octyl salicylate*

Таблица 1. *Устойчивост на стандартни разтвори на Octyl Salicylate в етанол*

Концентрация (C), μg/cm^3	**Абсорбция (A)**			
	n	$\overline{X}$	SD	RSD, %
1,25	4	0,028	0,0006	2,10
10	4	0,227	0,0013	0,55
30	4	0,666	0,0010	0,14

продукта, без съдържание на UV филтри. Резултатите за LOD и LOQ на Octyl Salicylate са представени на табл. 2. При втория базисен козметичен продукт по-високите стойности за LOD и LOQ се дължат на неговата специфичност (емулсия тип вода в масло) и специфичното му поглъщане при дължина на вълната 305 nm, което трябва да се отчита при изпитването на реални проби от козметични продукти.

- За козметични продукти с хомогенна кремообразна консистенция, с тип на емулсията вода в масло – от 0,72% (1,44 μg/cm^3) до 50% (100 μg/cm^3);
- За козметични продукти с млекоподобна консистенция, с тип на емулсията вода в масло – от 4,16% (8,32 μg/cm^3) до 50% (100 μg/cm^3);

• За козметични продукти с кремообразна консистенция, с тип на емулсията масло във вода – от 0,99% (1,98 μg/cm^3) до 50% (100 μg/cm^3).

Повторяемост. Резултатите от 30-те проби са представени на табл. 3. Стандартното отклонение (SD) в условия на повторяемост е 0,0479%.

Изчислената възпроизводимост като RSD при условия на повторяемост е 1,21%.

Общо за концентрациите 2% и 4% са изпитани 42 броя проби за аналитичен добив. На табл. 4 са посочени данните, получени за аналитичния добив на Octyl salicylate.

Таблица 2. *Граница на откриване (LOD) и граница на определяне (LOQ) на UV филтър Octyl salicylate в трите базисни козметични продукта*

n	Абсорбция (A)		Концентрация (C)		LOD		LOQ	
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$, μg/cm^3	SD	μg/cm^3	%	μg/cm^3	%
Първи базисен козметичен продукт								
30	0,020	0,0013	1,074	0,0596	1,253	0,63	1,432	0,72
Втори базисен козметичен продукт								
30	0,156	0,0045	7,128	0,200	7,728	3,86	8,328	4,16
Трети базисен козметичен продукт								
30	0,027	0,0022	1,385	0,0984	1,680	0,84	1,976	0,99

Таблица 3. *Повторяемост на резултатите от определяне на концентрацията (C в %) при добавени 4% UV филтър Octyl salicylate в първи базисен козметичен продукт*

Добавено количество UV филтър, %	Намерена концентрация (C), %			
	n	$\overline{X}$, %	SD, %	RSD, %
4	30	3,96	0,0479	1,21

Таблица 4. *Аналитичен добив при определяне на UV филтъра Octyl salicylate, добавен 2% и 4% в първи базисен козметичен продукт*

Добавено количество UV филтър, %	n	Намерено количество, %			Аналитичен добив, %			SD, %	RSD, %
		min.	max.	$\overline{X}$	min.	max.	$\overline{X}$		
2	21	1,91	2,04	1,95	95,56	102,22	97,62	1,7651	1,81
4	21	3,84	4,07	3,93	96,11	101,67	98,26	1,2584	1,28

Заключение

Разработен и валидиран е спектрофотометричен метод за определяне на UV филтър Octyl Salicylate в слънцезащитни козметични продукти, който е приложим както при самостоятелно, така и при съвместно присъствие с физични UV филтри Zinc oxide и Titanium dioxide. Методът се основава на способността на разтвори Octyl salicylate в етилов алкохол да поглъщат ултравиолетови лъчи с дължина на вълната 305 nm. Стойността на светлинната абсорбция, измерена при тази дължина на вълната, е пропорционална на концентрацията на Octyl salicylate.

Проведени са общо 433 изпитвания, на базата на които са изведени параметрите на метода: селективност – специфична абсорбция при 305 nm; линейност – от 1,25 до 100 μg/cm^3 (от 0,625 до 50,0%); устойчивост за 24 h престой на концентрация на Octyl salicylate 10 μg/cm^3 – RSD = 0,55%; повторяемост – при 4% на Octyl salicylate – SD – 0,0479%; възпроизводимост – при 4% Octyl salicylate – RSD в условия на повторяемост – 1,21%; аналитичен добив при концентрация на Octyl salicylate в козметичния продукт 2% – 97,62% (95,56-102,22%), при 4% – 98,26% (96,11-101,67%).

За различните видове козметични продукти са установени работен обхват на метода, LOD и LOQ.

За козметичен продукт с хомогенна кремообразна консистенция, с тип на емулсията вода в масло: работен обхват на метода – 0,72-50,0% (1,44 μg/cm^3-100 μg/cm^3); LOD – 0,63 %; LOQ – 0,72%.

За козметичен продукт с млекоподобна консистенция, с тип на емулсията вода в масло: ра-

ботен обхват на метода – 4,16-50,0% (8,32 μg/cm^3-100 μg/cm^3); LOD – 3,86%; LOQ – 4,16%.

За козметичен продукт с кремообразна консистенция, с тип на емулсията масло във вода: работен обхват на метода – 0,99-50,0 % (1.98 μg/cm^3-100 μg/cm^3); LOD – 0,84%; LOQ – 0,99%.

Разработеният и валидиран спектрофотометричен метод за определяне на UV филтър Octyl salicylate в слънцезащитни козметични продукти е бърз, с добра чувствителност, точност и възпроизводимост, не изисква сложна и скъпа апаратура и може лесно да бъде използван при контрола на слънцезащитните козметични продукти.

Библиография

1. Наредба № 36 от 30 ноември 2005 г. за изискванията към козметичните продукти (обн., ДВ, бр. 101 от 2005 г., изм. и доп., бр. 44 от 2006 г., изм., бр. 75 от 2006 г., изм. и доп., бр. 39 от 2007 г., изм. и доп., бр. 106 от 2007г., изм. и доп.бр. 80 от 2008 г., изм. и доп., бр. 35 от 2009 г., изм. и доп., бр. 2 от 2010 г.).
2. БДС EN ISO/IEC 17025/2006. Общи изисквания относно компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране.
3. Bouzid, S. HPLC/formulation stabilization. Optisol UV Absorber improves the retention of organic UV absorbers during solar exposure. Oxonica Commercial Solutions from Nanotechnology (2005).
4. Chisvert, A., M. C. Pascual-Marti et A. Salvador. Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC. – Fresenius J. Anal. Chem., **369**, 2001, № 7-8, 638-641.
5. Chisvert, A. et A. Salvador. Determination of water soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography. – Journal of Chromatography A, **977**, 2002, № 2, 277-280.
6. Chisvert, A. et A. Salvador. UV filters in sunscreens and other cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. – Analysis of cosmetic products, 2007, 83-120.
7. De Orsi, D. et al. Simple Extraction and HPLC determination of UV-A and UV-B filters in sunscreen products. – Chromatographia, **64**, 2006, № 9-10, 509-515.
8. Dutra, E. A., E. R. M. Kedor-Hackman et M. I. R. M. Santoro. Validation of a high performance liquid chromatography method for sunscreen determination in cosmetics. – International Journal of Cosmetic Science, **24**, 2002, 97.
9. Kedor-Hackman, E. R. M. et al. Validation of a high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of five sunscreen in lotion preparation. – Internacional Journal of Cosmetic Science, **28**, 2006, 219.

✉ **Адрес за кореспонденция:**
Антон Колев Тачев
Национален център по опазване на общественото здраве
бул. „Иван Евст. Гешов" № 15
1431 София
България
e-mail: A.Tachev@ncphp.government.bg

✉ **Address for correspondence:**
A. Tachev
National Center of Public Health Protection
15 Ivan Evst. Geshov bulv.
1431 Sofia
Bulgaria
e-mail: A.Tachev@ncphp.government.bg