

РАЗРАБОТВАНЕ И ВАЛИДИРАНЕ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОСТОСRYLENE В СЛЪНЦЕЗАЩИТНИ КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ ПРИ САМОСТОЯТЕЛНО И ПРИ СЪВМЕСТНО ПРИСЪСТВИЕ С ФИЗИЧНИ УЛТРАВИОЛЕТОВИ (UV) ФИЛТРИ ZINC OXIDE И TITANIUM DIOXIDE

Антон Колев Тачев¹, Надя Дамянова Василева¹, Анна Димитрова Димитрова²

¹Национален център по обществено здраве и анализи към МЗ, София, България

²Технически университет, Машинно-технологичен факултет, София, България

Резюме: За UV филтър Octocrylene, като съставка в козметичните продукти има посочена максимално допустима концентрация в законодателството до 10%. 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 Octocrylene 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 Octocrylene 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 Octocrylene в етилов алкохол да поглъщат ултравиолетови лъчи с дължина на вълната 303 nm. Стойността на светлинната абсорбция, измерена при тази дължина на вълната, е пропорционална на концентрацията на Octocrylene.

Проведени са общо 278 изпитвания, на базата на които са изведени параметрите на метода: селективност – специфична абсорбция при 303 nm; линейност - от 2,50 до 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (от 1,25% до 40,0%); устойчивост за 24 h престой на концентрация на Octocrylene 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ –RSD=0,38%; повторяемост - при 4% на Octocrylene-SD – 0,0356%; възпроизводимост - при 4% на Octocrylene - RSD в условия на повторяемост – 0,94%; аналитичен добив при концентрация на Octocrylene в козметичния продукт 2-96,56% (94,00-99,25%), при 4-95,71% (94,13-98,38%).

За различните видове козметични продукти са установени: работен обхват - от 0,75% до 40%, граница на откриване (LOD) - от 0,60% до 2,50%, граница на определяне (LOQ) - от 0,75% до 2,67%.

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

Ключови думи: Ултравиолетови (UV) филтри, слънцезащитни козметични продукти, валидиране, Octocrylene.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD TO DETERMINE THE CONTENT OF OCTOCRYLENE IN SUNSCREEN COSMETIC PRODUCTS SINGULARLY AND IN COMBINATION WITH PHYSICAL ULTRAVIOLET (UV) FILTERS OF ZINC OXIDE AND TITANIUM DIOXIDE

A. Tachev¹, N. Vassileva¹, A. Dimitrova²

¹National Center of Public Health Protection and Analyses, Ministry of Health, Sofia, Bulgaria

²Technical University, Faculty of Machine Technology, Sofia, Bulgaria

Summary: For UV filter of Octocrylene, as a component of cosmetic products, there exists a maximum applicable concentration indicated in legislation up to 10%. 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 Octocrylene 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 Octocrylene 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 Octocrylene 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 Octocrylene.

A total of 278 studies were performed, on the basis of which, the parameters derived of the method are: selection – specific absorption at 303 nm; linearity from 2,5 to 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (from 1,25% to 40,0%); stability for 24-hour duration at concentration of Octocrylene 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ – RSD=0,38%; repeatability - by 4% of Octocrylene - SD – 0,0356%; reproducibility - by 4% of Octocrylene - RSD under conditions of repeatability – 0,94%; yield at concentration of Octocrylene in cosmetic product by 2-96,56% (94,00-99,25%), by 4-95,71% (94,13-98,38%).

For the different types of cosmetic products there have been established: working range - from 0,75% to 40%, limit of detection (LOD) – from 0,60% to 2,50%, limits of quantification (LOQ) - from 0,75% to 2,67%.

The spectrophotometric method developed and validated for determination of UV filter of Octocrylene in sunscreen products is fast, sensitive, of good accuracy and reproducibility does not require sophisticated and expensive apparatuses. It can be applied easily for the control of sunscreen cosmetic products.

Key words: Ultraviolet (UV) filters, sunscreen cosmetic products, validation, Octocrylene.

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 Octocrylene в козметичните продукти е регламентирано до 10%, както в европейското законодателство (DIR.76/768/ЕЕС 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 Octocrylene намира широка употреба в разнообразни слънцезащитни козметични продукти – кремове, лосиони, млека и др. за ефективна защита от UVB и UVA лъчи. В публикуваните като референтни методи за про-

верка на състава (приложение № 10 на Наредба № 36) не фигурират методи за определяне на UV филтри в козметични продукти, в това число и за Octocrylene. Това налага разработването и валидирането на метод за нуждите на контрола.

В литературата са публикувани методи с високо ефективна течна хроматография (HPLC) за разделяне и количествено определяне на Octocrylene в присъствие на други химични UV филтри (A. Chisvert et al., 2001, A. Chisvert, A.Salvador, 2002, E.A.Dutra et al, 2002, S.Bouzid, 2005, D. De Orsi et al., 2006, Kedor-Hackman et al, 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 Octocrylene 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 Octocrylene 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 козметичен 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 Octocrylene. 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 Octocrylene дължина на вълната, при която се осъществява максимална абсорбция на UV лъчите, са сканирани серия от работни стандартни разтвори в етилов алкохол: 10, 15, 20, 25, 30 и 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 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 Octocrylene, с чистота 99,9%, е приготвен изходен стандартен разтвор, с концентрация 10 mg/cm^3 (10000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). От така получен изходен стандартен разтвор на Охуbenzone са приготвени работни стандартни разтвори с концентрации: 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 60,0; 70,0; 80,0; 100,0 и 120,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, които са спектрофотометрирани. Въз основа на получените данни е построена графика на зависимостта абсорбция/концентрация в $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Определена е линейната област, която се използва за последващите стъпки при валидирането на метода.

- **Устойчивост** - За определяне устойчивостта на стандартни разтвори, със съдържание 5,0; 10,0 и 15,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ Octocrylene е измерена абсорбцията в различни часови интервали в рамките на 24 часа.

- **Граница на откриване (LOD)** и граница 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 разработва-

ни проби с трите базисни козметични продукти, 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 повторемостта и аналитичния добив е проведено с използването на първи базисен козметичен продукт, чиято консистенция и тип на емулсията са най-близки до тези на основните слънцезащитни продукти.

- Повторемост и възпроизводимост - За определяне на повторемостта, изразена чрез стандартното отклонение (SD), са изпитани проби от първи базисен козметичен продукт, с добавка на 4% UV филтър Octocrylene, 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 Octocrylene към първи базисен козметичен продукт. От приготвените проби са претеглени 0,01g и са разтворени при нагриване с етилов алкохол. След охлаждане и темперирание са прехвърлени в мерителна колба от 50 cm³ и е долят 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/cm³. Успоредно е пускана и празна проба от първи базисен козметичен продукт, без съдържание на UV филтър.

Концентрацията на UV филтъра Octocrylene в пробата се получава в µg/cm³ по уравнението на калибрационната крива, след което се изчислява в % по формулата:

$$x (\%) = \frac{C \times V}{m \times 10000},$$

където: *C* е концентрацията на Octocrylene, отчетена по калибрационната крива, в µg/cm³;

V е обемът, до който е доведена пробата, в cm³;

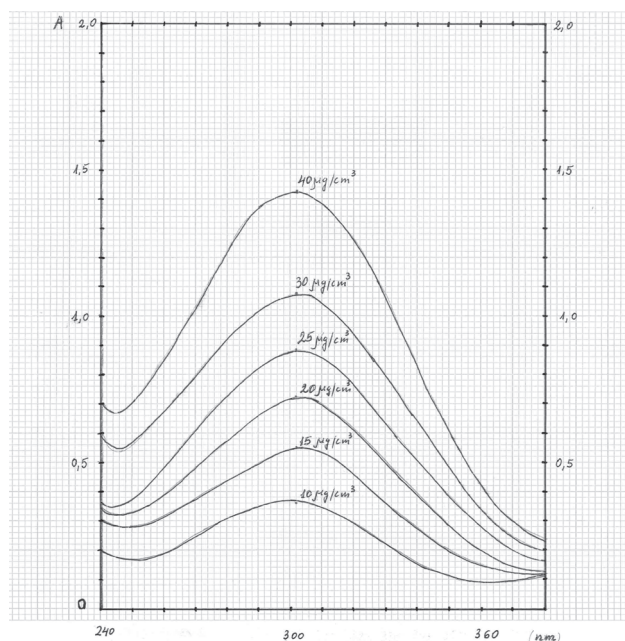
m е масата на взетата за анализ проба, в g;

10000 е коефициент за превръщане на крайния резултат в проценти.

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

Резултати:

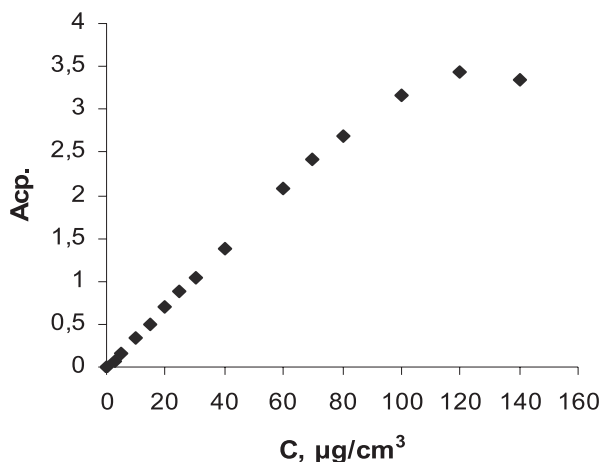
При изпитване на селективността, абсорбционният максимум се отчете при 303 nm, което потвърждава абсорбционния максимум по оригиналния сертификат на фирмата производител. Спектрограмата е представена на фиг. 1.



Фиг. 1 Спектрограма за абсорбцията на UV лъчи от работни стандартни разтвори със съдържание на 10; 15; 20; 25; 30 и 40 µg/cm³ от сертифицираното стандартно вещество UV филтър Octocrylene

За определяне на линейния диапазон (фиг. 2) са проведени 98 изпитвания с работните стандартни разтвори (по 7 изпитвания на всяка от четирнадесетте концентрации) и с осреднените стойности е построена калибрационна крива на зависимостта абсорбция / концентрация в µg/cm³ (фиг. 3).

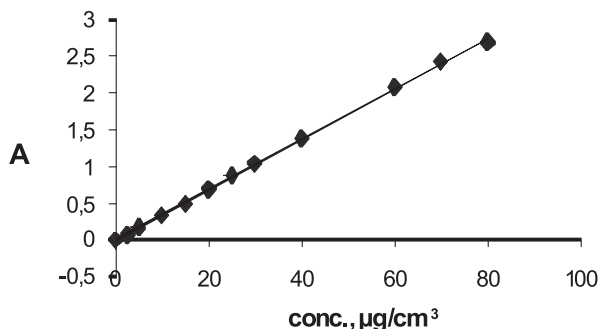
Резултатите от изпитването за устойчивост на разтворите на Octocrylene в етилов алкохол са дадени на табл. 1.



Фиг. 2 Линеиност на зависимостта абсорбция (A)/ концентрация (C µg/cm³) на UV филтър Octocrylene

$$y = 0,034x - 0,002$$

$$R^2 = 0,999$$



Фиг. 3 Калибрационна крива на зависимостта (A)/ концентрация (C µg/cm³) на UV филтър Octocrylene

За определяне на LOD и LOQ са разработени 90 броя празни проби с трите базисни козметични продукти, без съдържание на UV филтри. Резултатите за LOD и LOQ на Octocrylene са представени на таблица 2. При втори 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 303 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 0,75% (1,50 µg/cm³) до 40% (80 µg/cm³);
- за козметични продукти с млекоподобна консистенция, с тип на емулсията - вода в масло - от 2,67% (5,34 µg/cm³) до 4 % (80 µg/cm³);
- за козметични продукти с кремообразна консистенция, с тип на емулсията - масло във вода - от 0,82% (1,64 µg/cm³) до 40% (80 µg/cm³).

Таблица 1. Устойчивост на стандартни разтвори на Octocrylene в етанол

Концентрация (C), µg/cm³	Абсорбция (A)			
	n	\bar{X}	SD	RSD, %
5	4	0,174	0,0013	0,74
10	4	0,336	0,0013	0,38
15	4	0,502	0,0008	0,16

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

n	Абсорбция (A)		Концентрация (C)		LOD		LOQ	
	\bar{X}	SD	\bar{X} , µg/cm³	SD	µg/cm³	%	µg/cm³	%
Първи базисен козметичен продукт								
30	0,028	0,0022	0,878	0,107	1,20	0,60	1,50	0,75
Втори базисен козметичен продукт								
30	0,157	0,0018	4,641	0,117	4,99	2,50	5,34	2,67
Трети базисен козметичен продукт								
30	0,032	0,0015	0,994	0,107	1,31	0,66	1,64	0,82

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

Добавено количество UV филтър, %	Намерена концентрация (C), %			
	n	\bar{X} , %	SD, %	RSD, %
4	30	3,81	0,0356	0,94

Таблица 4. Аналитичен добив при определяне на UV филтър Octocrylene, добавен 2% и 4% в първи базисен козметичен продукт

Добавено количество UV филтър, %	n	Намерено количество, %			Аналитичен добив, %			SD, %	RSD, %
		min	max	\bar{X}	min	max	\bar{X}		
2	21	1,88	1,99	1,93	94,00	99,25	96,56	1,4703	1,52
4	21	3,77	3,94	3,83	94,13	98,38	95,71	1,2507	1,31

- Повторяемост – Резултатите от 30-те проби са представени на таблица 3. Стандартното отклонение (SD) в условия на повторяемост е 0,0356%.

Изчислената възпроизводимост като RSD, при условия на повторяемост е 0,94%.

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

Заклучение:

Разработен и валидиран е спектрофотометричен метод за определяне на UV филтър Octocrylene 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 Octocrylene в етилов алкохол да поглъщат ултравиолетови лъчи с дължина на вълната 303 nm. Стойността на светлинната абсорбция, измерена при тази дължина на вълната, е пропорционална на концентрацията на Octocrylene.

Проведени са общо 433 изпитвания, на базата на които са изведени параметрите на метода: селективност – специфична абсорбция при 303 nm; линейност - от 2,50 до 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (от 1,25% до 40,0%); устойчивост за 24 h престой на концентрация на Octocrylene 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ - RSD=0,38%; повторяемост - при 4% на Octocrylene - SD – 0,0356%; възпроизводимост - при 4% Octocrylene

- RSD в условия на повторяемост – 0,94%; аналитичен добив при концентрация на Octocrylene в козметичния продукт 2-96,56% (94,00-99,25%), при 4-95,71% (94,13-98,38%).

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 - 0,75-40,0% (1,50 -80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$); LOD – 0,60%; LOQ – 0,75%.

За козметичен продукт с млекоподобна консистенция, с тип на емулсията - вода в масло: работен обхват на метода – 2,67-40,0 % (5,34-80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$); LOD – 2,50%; LOQ – 2,67%.

За козметичен продукт с кремообразна консистенция, с тип на емулсията - масло във вода : работен обхват на метода – 0,82-40 % (1,64-80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$); LOD – 0,66%; LOQ – 0,82%.

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

Литература

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., изм. и доп., бр.62 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, A. Salvador. Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC. Fresenius J.Anal.Chem.2001Apr.; 369(7-8): 638-641.
 5. Chisvert, A., A. Salvador. Determination of water soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 2002, Vol. 977, 2, 277-280.
 6. Chisvert, A., 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., G. Giannini, L. Gagliardi, R. Porrà, S. Berri, A. D. Bolasco, I. Carpani, D. Tonelli. Simple Extraction and HPLC Determination of UV-A and UV-B Filters in Sunscreen Products. Chromatographia Vol. 64, Numbers 9-10, 2006, 509-515.
 8. Dutra, E.A., E.R.M. Kedor-Hackman, M.I.R.M. Santoro. Validation of a high performance liquid chromatography method for sunscreen determination in cosmetics. Internacional Journal of Cosmetic Science, Vol. 24, February 2002, p.97.
 9. Kedor-Hackman, E.R.M., M.L. De Lourdes Perez Gonzalez, A.K. Singh, M.I.R.M. Santoro. Validation of a high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of five sunscreen in lotion preparation. Internacional Journal of Cosmetic Science, Vol. 28, June 2006, p.219.

 **Адрес за кореспонденция:**

Антон Колев Тачев
Национален център по общественото здраве и
анализи към МЗ, София
бул. Иван Евст. Гешов 15,
София 1431, България
e-mail: a.tachev@ncpha.government.bg

 **Address for correspondence:**

Rositca Dimova
National Center of Public Health Protection and
Analises, Ministry of Health, Sofia
e-mail: a.tachev@ncpha.government.bg
