МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ

СЛАВЕЙКА СТОИМЕНОВА ПАНЕВА

БИОАКТИВНИ СЪЕДИНЕНИЯ В КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ – АНАЛИЗ И КОНТРОЛ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”

Област на висше образование: 7. „Здравеопазване и спорт“
Професионално направление: 7.4. „Обществено здраве“Докторска програма „Хигиена (трудова, комунална, училищна, радиационна и др.)“

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
ПРОФ. Д-Р КАРОЛИНА ЛЮБОМИРОВА, ДМ
ДОЦ. СИЛВИЯ ЦАНОВА-САВОВА, ДМ

София, 2020 г.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедра „Трудова медицина“, при Факултета по Обществено Здраве, при Медицинския Университет – София.

Дисертационният труд съдържа 141 страници и е онагледен с 39 таблици, 39 фигури и 4 приложения.
Библиографската справка включва 134 заглавия, от които 36 на кирилица и 98 на латиница.

Научно жури:
Проф. д-р Невена Костова Цачева-Христова, дмн
Доц. Николай Атанасов Ризов, дх
Доц. Милена Георгиева Янчева-Стойчева, дм
Доц. Теодор Иванов Панев, дм
Доц. Антон Колев Тачев, дм

Резервни членове:
Проф. д-р Веселин Борисов Василев, дмн
Доц. Ружа Иванова Николова, дм

Публичната защита ще се състои на **22 април 2020 година от 10 часа** в заседателната зала на ФОЗ, МУ София, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ, ул. „Бяло море“ №8, гр. София.
Материалите по защитата са на разположение в отдел наука на ФОЗ, МУ София, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ, ул. „Бяло море“ №8, София и са публикувани на интернет страницата на МУ София .
.

СЪДЪРЖАНИЕ

		стр.
	Заглавна страница	1
	Съдържание	3
	Въведение	5
	Термини, определения и съкращения	7
1.	**ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**	9
1.1.	Законодателна рамка в козметиката.	9
1.1.1.	Исторически преглед и съвременни изисквания.	9
1.1.2.	Регистрация на козметичните съставки – REACH	11
1.1.3.	Cosmetovigilance и общественото здраве	12
1.1.4.	Регламент (ЕО) № 1223	13
1.1.5.	Стандартизационни документи	15
1.1.6.	Приложими изисквания при избор на аналитичен метод	16
1.2.	Здравни аспекти на биологично активните съединения.	18
1.2.1.	Витамини	18
1.2.1.1	Витамин А	19
1.2.1.2	Витамин Е	22
1.2.1.3.	Бета-каротен	24
1.2.2.	Мазнини	26
1.2.3.	Минерали	28
1.3.	Биологично активни съединения. Представители - роля в козметиката и методи за анализ.	29
1.3.1.	Витамини	
1.3.1.1.	Витамин А	30
1.3.1.2.	Витамин Е	32
1.3.1.3.	Бета-каротен	34
1.3.2.	Мастни киселини	38
1.3.3.	Флуор	40
1.4.	Изисквания към методите за анализ и контрол.	45
1.5.	Заключения от литературния обзор	48
	ЦЕЛ, ЗАДАЧИ, РАБОТНА ХИПОТЕЗА И ПРЕДМЕТ	**49**

2.	**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**	50
2. 1.	Документален метод	50
2.2.	Аналитични методи и материали	50
2.3	Социологически и статистически методи	52
3.	**РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**	**54**
3.1.	Проучване и анализ на законовата рамка за козметичните продукти.	54
3.1.1.	Методи за анализ и контрол	58
3.1.2.	Анализ на стандартизацията в козметиката	60
3.2.	Биологично активни съединения в козметични продукти. Методи за анализ и контрол. Резултати.	63
3.2.1.	UHPLC-HRMS метод за анализ на ретинол, токоферол и бета-каротен в козметични продукти	63
3.2.1.1.	Витамин А	66
3.2.1.2.	Витамин Е	68
3.2.1.3.	Бета-каротен	70
3.2.2.	GC-FID метод за анализ на мастно-киселинен състав на козметични продукти	72
3.2.3.	GC-FID-HS метод за анализ на флуор в продукти за дентална хигиена	84
3.3.	Анкетно проучване	87
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	**121**
	ИЗВОДИ	**122**
	ПРИНОСИ	**123**
	ЛИТЕРАТУРА	**124**
	ПРИЛОЖЕНИЯ	**134**
	Приложение 1 – Анкетна карта	134
	Приложение 2 - Списък на фигурите	137
	Приложение 3 - Списък на таблиците	139
	Приложение 4 – Информационна брошура	141

ВЪВЕДЕНИЕ

Стремежът на човека за постигане на дълголетие, познат още от дълбока древност, е свързан с многобройни и разнообразни подходи за реализацията му. В този аспект определено място, наред със здравето, заема и желанието за поддържане на по-млад и красив външен вид. Един от отговорите на този стремеж днес е мащабното производство на богато разнообразие от козметични продукти, чиито асортимент се разраства системно през последните десетилетия, съпътстван едновременно от увеличаващата се потребителска активност на населението.

Днес понятието козметика се възприема от обществото като способ да изглеждаме по-красиви и да се чувстваме по-добре. Напредък в познанията ни по биохимия и физиология на кожата и развитието на технологии като биотехнологиите, доведе до синтеза на молекули, които вече съществуваха в природата, но намериха приложение в козметиката за постигане на по-добри и възпроизводими ефекти. В резултат на всичко това се появиха множество активни вещества с различен произход и ефект, които предлагат при правилно комбиниране почти безкрайни възможности за козметичния формулатор. Тази иновация е придружена от все по-сложно и строго законодателство, чиято цел е да защити и информира потребителя за продукта, който ще се използва, като отразява както формулирането, така и разработването на нови активни съставки. Благодарение както на новите научни постижения, така и на по-задълбочените познания за причините, предизвикващи значими процеси като стареене на кожата, акне, целулит и нестабилност на тялото, много нови активни съставки са проектирани за решаване на тези проблеми.

Навлизането на химията в козметичното производство предостави богато разнообразие от активни съединения, определящи биологичната значимост на съответния козметичен продукт, но е и предпоставка за засилване на контрола върху безопасността. През последните години зачестиха и съобщения, описващи случаи на непоносимост и вредно действие при ежедневното използване на определена козметика. Тези факти са една от многото причини за търсене на силата на природата, изразена в многообразието от биологично-

активни съединения, чиято роля допринася за позитивен ефект върху здравето на потребителя.

Многобройни са примерите за ползата от приложението на козметични продукти, съдържащи нутриенти и биологично активни съединения, но много сериозен остава и въпроса за тяхната безопасност. За микро-нутриентите (витамини и минерали) вече са определени нивата на безопасен хранителен максимален прием, но за биоактивните все още са в процес на проучване. В този аспект е необходим контрол, провеждан с прецизни и възпроизводими аналитични методи, отговарящи на законодателната рамка по проблема. Задължителен контрол е необходим върху отразените претенции на етикета, които не винаги съответстват на експертните препоръките и съответната нормативна база. Необходимо е също и обстойно проучване на съвременните научни достижения в областта на козметиката, предоставяне на съвременна методология за анализ и контрол на козметични продукти, оценка и тълкуване на развитието на нормативните документи, както и задълбочено проучване на информираността по веригата - производители, контролиращи звена, потребители.

Настоящият дисертационен труд има амбицията да даде отговор на поставените по-горе въпроси, акцентирайки на контрола и ролята на информираността в постигането на здравословни и безопасни за човека козметични продукти. Информираността е гарант за постигане на максимален здравен ефект, потвърден далеч във времето, с думите на Гьоте :

„Човек вижда толкова, колкото знае”

ТЕРМИНИ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СЪКРАЩЕНИЯ

Козметичен продукт - означава всяко вещество или смес от вещества, предназначени за контакт с която и да е външна част на човешкото тяло (епидермис, коса и окосмени части, нокти, устни и външни полови органи) или със зъбите и лигавицата (мукозната мембрана) на устната кухина, изключително или преди всичко с цел тяхното почистване, парфюмиране, промяна във външния им вид, тяхната защита, поддържането им в добро състояние или коригиране на телесната миризма [27];

Биологична активност - активността, която се установява в живите организми. Във фармакологията под биологична активност се разбира фармакологична активност, която означава позитивен или негативен ефект на лекарство върху организма. Активността е в зависимост от дозата;

БАС – Биологично активни (биоактивни) съединения, които чрез участието си в биохимичните механизми и физиологични процеси оказват позитивен здравен ефект върху организма. От медицинска гледна точка терминът „биоактивни съединения" се дефинира като вещества, които предизвикват реакция или отговор в живите тъкани;

TLC (Thin-layer liquid chromatography) - Тънкослойна течна хроматография;

HPLC (High-performance liquid chromatography) - Високо-ефективна течна хроматография [44];

UHPLC (Ultra High-performance liquid chromatography) - Ултра високоефективна течна хроматография;

HRMS (High resolution mass spectrometry) – Масова спектрометрия с висока разделителна способност;

UVD (Ultraviolet detection) **-** Ултравиолетова детекция/откриване;

GC (Gas-chromatography) – Газ-хроматография;

LOD (Limit of detection) - Граница на откриване;

LOQ (Limit of quantitation) - Граница на количествено определяне;

GLP (Good laboratory practices) –Добра лабораторни практики (ДЛП);

GMP (Good management practices) – Добри производствени практики (ДПП);

СУК – Система за управление на качеството;

Акредитация - Процедура, при която независима трета страна определя дали даден орган отговаря на установените изисквания и е компетентен да

извършва дейностите по оценка на съответствие с изискванията на даден стандарт [23].

Сертификация - Атестация, извършена от трета страна, отнасяща се за продукти, процеси, системи или лица [5];

CosIng е база данни на Европейската комисия за информация за козметични вещества и съставки [72];

CPNP (Cosmetic Products Notification Portal) - Портал за нотифициране на козметични продукти;

INCI (International Nomenclature Cosmetic Ingredient) – мегдународна номенклатура на козметичните съставки;

FAME (Fatty acid methyl esters) – Метилови естери на мастни киселини;

RM (reference material) – референтет материал/сравнително вещество/свидетел;

TETCS (triethyl trichlorosilane) – триетилтрихлоросилан;

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

В този раздел е направено проучване по темата на дисертационния труд от гледна точка на развитието на законодателството в козметиката, здравните аспекти от позицията на опазване на общественото здраве и запазване на добрия външен вид и е направен преглед на научните данни за избрани представители на биоактивните съединения. Специално внимание е отделено на методите за анализ и контрол и на изискванията за тяхната валидност, които са проучени и обсъдени за целевите биоактивни съединения.

1.1. Законодателна рамка в козметиката.

1.1.1. Исторически преглед и съвременни изисквания.

Козметични средства са използвани от хилядолетия в бита на хората, но бурното развитие на козметичната индустрия започва едва в края на XIX век. Козметиката е неразделна част от здравето и хигиената и като такава е наложително да има норми и правила към производството и компонентите, които се влагат в козметичните продукти. Проучванията за **развитието на нормативната база** са направени за периода от 1976 година до 2016 година, когато бе честван 40-та годишнина на Европейското законодателство в областта на козметичните продукти.

През седемдесетте години на миналия век държавите членки на Европейската Икономическа Общност (сега ЕС) предприемат първи стъпки за хармонизиране на националните си законодателства в област козметика [9]. Тези стъпки целят да се гарантира преди всичко високо ниво на защита на потребителите, както и да се даде възможност за свободно движение на козметичните продукти в рамките на Общността. През 1976 година е приета **Директивата за козметичните продукти** 76/768 ЕИО [12], която хармонизира националните законодателства и има за своя главна цел защитата на общественото здраве. Втората важна стъпка е предприета през 1979 година, когато се създава **Научния комитет по козметология** (сега съкращението е SCCS - Scientific Committee on Consumer Safety) [107]. Този

комитет съставен експерти, с научна компетентност и независимост има като основна задача да дава становища относно безопасността на козметичните съставки по прозрачен и научно-обоснован начин, както и да бъде основно звено за регулаторни решения в ЕС. През 1980 година с подкрепата на SCCS е създаден списък на веществата, които могат да бъдат използвани като **консерванти в козметиката** и параметрите, на които трябва да отговорят (например концентрации). Съставен е позитивен списък на консервантите в ЕС, а десет години по-късно през 1990 година отново с подкрепата на SCCS е съставен Позитивен списък на **UV филтрите в козметиката** – т.е. веществата, които могат да бъдат използвани като такива [20, 111].

През 1993 година са направени изменения на Директива 76, които поставят изисквания като основа при регулацията да бъде прилагана **идентификацията и оценката на риска**. Определени са също и изискванията относно компетентността и квалификацията на оценителите. Достъпът до информация и нейния контрол е другата значима постановка, която от своя страна изисква от производителите отговорност за състава на козметичния продукт. За изпълнение на тези изисквания през 1996 година, с Решение на комисията, относно съставяне на списък и обща номенклатура на съставките, използвани в козметичните продукти е създадена **Международна номенклатура на козметичните съставки INCI** (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients). Тази обща номенклатура позволява чрез уникално наименование да се идентифицират веществата, вследствие на което потребителите ще могат лесно да разпознават веществата, които им е препоръчано да избягват (напр. поради алергии), независимо къде в Европейския съюз те ще купуват козметични продукт [29].

1997 година в резултат на кризата с храните, Комисията на ЕС решава да отдели ясно функциите на оценка на риска и управление на риска, за да се гарантира тяхната независимост. *Оценка на риска* е процес, състоящ се от четири етапа: определяне на опасност, охарактеризиране на опасността, оценка на въздействието при излагане на опасност и охарактеризиране на риска. *Управление на риска* е процесът на прилагане на политики в консултация със заинтересованите страни, чрез обсъждане на оценката на риска и други значими фактори, както и избор на подходящи способи за превенция и контрол [21]. Оценката на риска на равнището на Съюза се извършва от независима Научния комитет по безопасност на потребителите

(НКБП или SCCS), отделно от задачата за управление на риска, на институциите на ЕС, и най-вече на Комисията. Основната функция на Органа е да предоставя научни становища по искане на Комисията, държавите членки, Европейския парламент и по собствена инициатива (SCCS/1564/15 Revised version of 25 April 2016) [111]. През 1999г. Офисът за Официални Публикации на Европейската Общност публикува серия томове със заглавие „Правилата за козметичните продукти в ЕС" от Дирекции Лекарства и козметика на Европейската Комисия. „Оценка на риска" се определя като научно обоснован процес, състоящ се от четири етапа: определяне на опасност, охарактеризиране на опасността, оценка на въздействието при излагане на опасност и охарактеризиране на риска [21].

През 2000-та година е прието да бъдат **заменени опитите с животни при клиничните тествания** с други алтернативни методи – кожни тестове. Приет е първи Алтернативен метод за тестване на козметичните продукти върху кожата, който заменя опитите с животни [46]. На 3 май 2018 г. Европейският парламент одобри резолюция, с която призовава до 2023 г. да бъде наложена световна забрана на тестовете на козметични продукти върху животни, както и на продажбата на съставки, тествани върху животни [134]. Козметичните продукти не могат да бъдат пуснати на пазара, ако крайният продукт или неговите съставки са преминали тестове върху животни, освен ако изпитването е извършено за изпълнение на задълженията на друго законодателство, като например Регламент REACH

1.1.2. Регистрация на козметичните съставки – REACH

В 2001 година, в резултат на новият подход към законодателството за химикалите в ЕС, въведен с REACH [28] се въвежда задължителна регистрация на козметичните съставки. Козметични съставки са обхванати от това задължение за регистрация, като пакетът с информация на подавани за регистрация продукти задължително вече съдържа оценка за безопасност за хората и околната среда. 2003 година е направено 7-то изменение на Директивата за козметичните продукти, което освен изискванията за информиране на потребителите за трайност и наличие на определени **алергени**, внася и забрана за **тестване върху животни** на козметичните съставки, които до този момент са били зависими от наличието на алтернативни методи.

1.1.3. Cosmetovigilance и общественото здраве

Cosmetovigilance (**козметичната бдителност за нежелани ефекти**) е сравнително нова концепция за наблюдение с цел опазване на общественото здраве. Cosmetovigilance се различава от контрола на производителите, чиято цел е безопасност на продукта с търговска цел. Европейският регламент изисква нежеланите ефекти, съобщени на компетентния орган, да бъдат предадени на компетентните органи на държави-членки и на лицето, отговорно за козметичния продукт. Cosmetovigilance е средство за получаване на информация за безопасността на козметичните продукти и техните съставки [126]. Контролните органи на страните-членки на ЕС през 2006 година приемат Резолюция за система за наблюдение на нежелани ефекти от козметични продукти (“cosmetovigilance”) в Европа с оглед защита на общественото здраве [10]. Предназначението на тази платформа е сътрудничество, обмен на информация (Ръководство за обмен на данни) [31] и експерти, и прилагане на добри практики в контрола на козметичния пазар. Прилагат се практически подходи за наблюдение, чиято цел е защита здравето на потребителите за намаляването на вероятността от повторно появяване на нежелани ефекти (UE) [110]. Тези подходи включват оценка на нежеланите ефекти и разпространение на информацията. В отделните страни от ЕО се набира и обработва информация от упълномощени органи и частни инициативи за защита на потребителите и общественото здравел [106]. Cosmetovigilance помага на индустрията да определи по-добри стандарти и да направи козметиката по-безопасна за потребителите.

Член 23 от Регламент 1223/2009 определя обхвата на съобщението за нежелани ефекти, за които отговорното лице трябва да уведоми компетентните органи на съответната държава-членка и да предостави:

- Всички известни за тях сериозни нежелани реакции;
- Наименованието на козметичния продукт (идентифициране);
- Предприети коригиращите мерки;
- Съществуващите данни да се предоставят по подходящ начин на обществеността.

1.1.4. Регламент (ЕО) № 1223/2009 [27] на Европейския парламент и на Съвета от 30 ноември 2009 г. е основен документ, определящ нормативната рамка в настоящия момент и е задължителен за всички оператори в сектора. Структурно Регламентът е представен в глави, засягащи понятия и регулация по отношение на безопасността и оценката, ограничения по отношение на някои вещества, изпитване върху животни, етикетиране и информиране на потребителите, надзор на пазара. В **структурата на регламента** са включени приложения по отношение на доклад за безопасност, забранени и ограничени вещества, оцветители и консерванти, както и методи приложими за оценка на козметични продукти – списък на алтернативните методи [82]. Най-важен акцент в регламента е **безопасността** на козметичните продукти. Регламентът заменя многократно ревизираната Директива 76/768 / ЕО, като са въведени следните значими промени, които са записани в глави 2 и 3 – безопасност и нейната оценка. Производителите трябва да спазват специфичните изисквания, като уведомления (чл. 10) при изготвянето на доклад за безопасност на продукта преди пускането на продукта на пазара. Регламентът въвежда понятието **„отговорно лице“,** което е юридическо или физическо лице, точно идентифицирано и с ясно определени задължения, визирани в чл. 4 и 5, което гарантира спазването му [27].

Централизираното уведомяване за пускане на пазара е също нов елемент и се извършва само веднъж през нотификационен портал на ЕС за козметични продукти (CPNP). Изискванията за нотификация са посочени в чл. 13 и 16 [27]. Изискване за съобщаване и докладване на сериозни нежелани ефекти е посочено в чл. 23 и е задължение на националните органи и отговорното лице, които от своя страна събират информация от потребители, здравни специалисти и други и споделят с останалите. Други специфични изисквания, които касаят претенциите и критериите в доклада са посочени в серия от документи, които дават насоки относно **докладването на безопасността.** Решение за изпълнение 2013/674 / ЕС на Комисията от 25 ноември 2013 г. в насоки относно доклада за безопасност на козметичните продукти, Регламент (ЕС) № 655/2013 на Комисията от 10 юли 2013 година за определяне на общи критерии за обосновка на претенциите, използвани във връзка с козметични продукти, Технически документ за козметични претенции (версия от 03 юли 2017 г.) и Доклад от Комисията до Европейския парламент и до Съвета относно претенциите за продукти, основани на общи критерии в

областта на козметиката [13]. Всеки продукт, който се продава в Европейския съюз, трябва да съответства на Регламент 1223 и да носи **маркировката CE (European Conformity).** С поставянето на този знак производителят декларира, че продуктът му отговаря на европейските изисквания и всички процедури за оценка са изпълнени.

По отношение на изпитването на козметични продукти, научния комитет по безопасност на потребителите през 2018 година приема редица указания, които публикува в Ръководство, с „Бележки с насоки“, които предоставят помощ в по отношение на изпитване и оценка на безопасността на козметичните съставки в ЕС [119].

Изменения в регламента за козметиката

Поредица от промени претърпява Регламент 1223 през десетте години от приемането му. През 2014 година Европейската комисия приема изменения относно **парабените** в Регламент 1004, с Регламент 866 добавя изисквания към три нови консерванта и ограничава пределните концентрации на някои консерванти с Регламент 1003.

За да се гарантира безопасността на **продуктите за боядисване на коса** се ограничават максималните концентрации на 21 вещества с Регламент 1197/2013 и се измененят приложенията, относно промяна на максимално разрешените концентрации и относно багрила за коса и мигли с Регламент 658/2013.

Интерес буди Регламент № 344/2013, с който се изменя Приложение III към Регламент 1223, като **ограничава съдържанието на флуор в диапазона от 0,1 % до 0,15 % в продукти за устната кухина** и задължава производителя и дистрибутора да вписва върху опаковката текст „***При деца до 6-годишна възраст, включително: да се използва количество колкото грахово зърно за миене на зъбите под надзора на възрастен за ограничаване до минимум на поглъщането на продукта. При прием на флуорид от други източници, консултирайте се със зъболекар или лекар.***“

Последното изменение е прието с Регламент (ЕС) № 2019/831 от 22 май 2019 година, с което са изменени приложения II, III и V към Регламент 1223 във връзка със създаването на хармонизирана класификация на вещества които са **канцерогенни, мутагенни или токсични за репродукцията** и с цел да се гарантира защита на здравето на човека, всички тези вещества следва да

бъдат включени в списъка на забранените. Забранени са имидазоловите съединения с Регламент (ЕС) № 2019/698, а с Регламент (ЕС) 2019/680.
Регламент (ЕО) № 1223 влиза в сила в България от 11 юли 2013 г., като от тази дата неговите изисквания се прилагат вместо съществуващите до тогава разпоредби в Закона за здравето (Глава втора, раздел III „Здравни изисквания към козметичните продукти") [14], както и отменя Наредба 36 [17]. Със Закона за изменение и допълнение на Закона за здравето се осигурява прилагането на Регламента, като актуализацията влиза в сила от 3.01.2014г. Определенията за козметичен продукт; производител, дистрибутор и вносител на козметични продукти; отговорно лице, са в сила от 3.01.2014 г. в България.
В допълнение на регламента и във връзка с негово изискване - чл.19, пар.4 в националното ни законодателство е приета **Наредба 14 на МЗ от** 28 юли 2014 г. на МЗ за определяне на подробни правила за представяне на информацията относно козметичните продукти, изисквания за ефикасност на слънцезащитните козметични продукти и химичните методи за проверка състава на козметичните продукти [17]. Съществени моменти от структурата на тази наредба са правилата за представяне на информацията (Раздел II, чл. 3), ефикасността на слънцезащитните козметични продукти и предявяваните претенции към тях (Раздел III, чл. 4, 5 и приложение 1) и химичните методи за проверка състава(Раздел IV, чл. 6 и приложение 2).

1.1.5. Стандартизационни документи

Освен задължителните за приложение регулативни документи, като регламенти и наредби в областта на козметиката приложение намират и стандартите [60] Стандартите са документи основани на доброволен принцип, определящи изисквания или даващи указания, които са създадени въз основа на консенсус. В областта на козметиката те ни дават информация за методи [*46*].
Стандартизация се извършва на международно (ISO), регионално/европейско (CEN) и национално ниво (БИС). [34]. На национално ниво в областта оторизиран за приемане на стандартите е **Технически Комитет 19 „Козметични и ароматични продукти. Повърхностноактивни вещества"** (разгледани в раздел резултати и обсъждане). На европейско ниво такъв е **CEN/TC 392 – 24 броя стандарти, на международно е ISO/TC 217**

„Козметични продукти“ – 42 броя публикувани стандарти [69, 70]. В Европейският комитет по стандартизация CEN/TC 392 Козметични продукти са създадени три работни групи: CEN / TC 392 / WG 1, Аналитични методи, CEN / TC 392 / WG 2 Микробиологични методи и CEN / TC 392 / WG 4 Ефективност, включително продукти за защита от слънцето. На международно ниво стандартизационните документи се създават от технически комитет ISO/TC 217, към който има четири работни групи ISO / TC 217 / WG 01 "Микробиологични стандарти и ограничения", ISO / TC 217 / WG 03 "Аналитични методи", ISO / TC 217 / WG 04 "Терминология" и ISO / TC 217 / WG 07 "Методи за изпитване за защита от слънцето". Стандартите не налагат задължения, които трябва да бъдат спазвани, но позоваването им в нормативни актове може да бъде направено по такъв начин, че съответствието с тях да стане задължително [4]. Стандартите са мост за разпространение на знание, технологии и добри практики: основен елемент на световната икономическа и индустриална инфраструктура. Те подпомагат икономическите дейности и социалните аспекти – с други думи те са инструмент на устойчивото развитие [35].

1.1.6. Приложими изисквания при избор на аналитичен метод

При избор на аналитичен метод приоритетни критерии на първо място са наличие на международни, регионални или национални стандарти, включително тези чието прилагане е задължително според националното законодателство, на второ място национални норми, напр. регламенти, директиви, решения на ЕС. При липса на такива се прилагат методи, разработени за специфична област от водещи научни центрове, престижни организации и институции, предложени от производителите на оборудване, както и статии и съобщения от научни списания.

Предпоставка резултатите от анализ да бъдат достоверни е наличието на внедрена и адекватна система за управление на качеството (СУК) на лабораторни анализи в съответствие с регламентираните в БДС EN ISO/IEC 17025:2018 „Общи изисквания за компетентността на лаборатории за изпитване и калибриране“ [6]. Основа на СУК е Добрата Лабораторна Практика (ДЛП), която изпитвателната лаборатория прилага в своята работа и която е гарант за професионализма при анализ [64, 65, 67]. В „Насоки за приложение I на Регламент 1223/2009 (ЕО), относно доклада за безопасност

на козметичните продукти, е дадено указание за извършване на изпитването им, което да съответства на изискванията на стандартите за добра лабораторна практика [11]. Утвърждаването в лабораторията на добри практики от друга страна е основата върху която се изгражда адекватна и работеща система за управление. Изискванията на системите за управление на качеството и тези на добрата лабораторна практика са определени в нормативни документи, а именно:

- БДС EN ISO/IEC 17025/AC:2018 „Общи изисквания относно компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране“, публикуван на 15.01.2018г. от Български Институт по Стандартизация, чиято последно изменение от 2018 година го унифицира с тези на групата управленски стандарти по БДС EN ISO 9000:2015 „Системи за управление на качеството. Основни принципи и речник” и добави като изискване управлението на риска при изпитване. БДС IEC 31010:2019 „Управление на риска. Методи за оценяване на риска” [5, 6, *73*].
- Наредба за принципите, инспекцията и удостоверяването на добрата лабораторна практика (GLP), обн. ДВ. Бр. 74 от 24.08.2004г., в сила от 01.07.2005г., приета с постановление на МС №207/06.08.2004г. с която се регламентират редът и начинът за провеждане на инспекция, на мониторинг и удостоверяване съответствието на лабораториите с принципите на GLP [7, 17].

За осигуряване на резултатите от лабораторните анализи GLP и ISO/IEC 17025 налагат изисквания за **наличие на писмени процедури за избор, валидиране и контрол на методите за анализ, а именно: подбор и въвеждане на подходящи и изпълними методи; осигуряване на качеството на резултатите; верифициране и валидиране на методи за изпитване; управление и контрол на компютърните данни и защита на електронните записи.** Информационните системи и автоматизираното оборудване, с които се обработват данните трябва да са подходящи за предназначението им. Обслужването и актуализирането им да бъдат планирани; да функционират при условия специфицирани от производителите им. Те не са обект на валидиране тъй като се счита, че търговският софтуер, електронните калкулатори и персоналните компютри са валидирани преди да излязат на пазара.

1.2. Здравни аспекти на биологично активните съединения

Мощното разрастване на козметичната индустрия през последните десетилетия разшири спектъра на използваните биологично-активни съединения под формата на химически синтезирани съставки и природни екстракти. Биологичната сила на тези съединения определя претенциите на готовия козметичен продукт, които трябва да бъдат подкрепени със съответни доказателства и да бъдат обект на контрол. Класификацията на съединенията като биологично-активни и нутриенти е на базата на тяхната есенциалност [19, 35]. И двете групи (биоактивни и нутриентни) съединения притежават биологична активност, но дефицитът или липсата на нутриентите води до патологични състояния, определящи проявата на различни заболявания, докато дефицитът на биологично-активните съединения не води до подобни състояния. Тяхното присъствие подпомага протичането на различните биохимични процеси и функции на органите и системите, без да има есенциалния характер на нутриента. По-широкото приложение на биологично-активните компоненти с позитивен ефект започна с производството на хранителни добавки, а през последните декади навлезе и с голяма скорост в козметичната индустрия [96].

Всяко вещество, притежаващо биологична активност, независимо дали е нутриент или биологично-активно с позитивен ефект или токсично съединение, трябва да бъде охарактеризирано в три аспекта: химически, биологичен и здравен. В настоящия обзор ще предоставим оценка в този аспект на микронутриенти (витамини и минерали) и биологично-активни съединения, намиращи най-широко приложение в козметиката [25].

1.2.1. Витамини

Много са доказателствата, които научно обосновават значението на витамините за здравето на човека [125]. Сред тях определено място заемат и тези, които включени в козметиката, допринасят за здравето и добрия външен вид на кожата, косата, ноктите [84, 89]. Освен участието им в биохимичните процеси на клетъчно и органно ниво те участват и като адитиви в козметичните продукти, запазвайки качествата им и осигурявайки тяхната

безопасност. Най-масово приложение в козметиката имат витамините А, Е и С [84, 133].

1.2.1.1. Витамин А (Ретинол*)* е есенциален, мастноразтворим микронутриент. Терминът витамин А включва група от съединения на ретинола: *естери* (ретинил ацетат, ретинил палмитат, ретинил пропионат), които ензимно се хидролизират в кожата. Ретиналът е алдехидната форма, която се получава след оксидиране на ретинола. Последващата оксидация на ретинала води до образуване на ретиноева киселина Витамин А-активността се измерва в ретинол еквиваленти (RE). Биологичната му роля за здравето на човека се свързва с очното здраве, с есенциалността му за растежа и развитието на организма, както и за укрепване на имунната защита. Спецификата по отношение на действието на витамин А върху кожата се свързва най-много със способността му да нормализира процеса на кератинизация. Ретинолът и неговите деривати (естери, ретинал, ретинолова киселина) проявяват позитивен козметичен ефект най-вече чрез способността им да регулират растежа и диференциацията на епителните клетки [86, 135]. Тези съединения, често наричани под общото име *ретиноиди*, намаляват сухотата на кожата и забавят образуването на бръчки по рецепторно-специфични механизми [98].

Модулиране на функцията на кожата е доказано, че може да бъде ефективно постигнато чрез най-активния ретиноид – *третиноин,* който се получава само чрез лекарско предписание. Добре познат и отдавна използван е ретиниловия палмитат, който независимо от голямата си молекула и стабилността си в козметичния продукт се приема като най-ефективния ретиноид при топикално приложение. Този резултат се обяснява с ензимното превръщане на ретиниловия палмитат в кожата до ретинол, с последваща оксидация в активен третиноин. Допуска се, че нарушаването на ензимната реакция и оксидацията в кожата са факторите, лимитиращи ефекта от приложението на ретинола и ретиниловия палмитат в сравнение с ретиноевата киселина. В експериментални проучвания е доказан позитивен ефект върху окосмяването на плъхове, с установяване на по-високи нива на колагена и ДНК и по-висока степен на епидермална плътност при топикално приложение на ретинил палмитат [93].

Данни на комитета по безопасност на Норвегия сочат за неблагоприятни ефекти, особенно при надвишаване на общото допустимо ниво на прием на витамин А от 3000μg RE/ден. Този показател, обаче е сума от всички приеми – хранителни, чрез добавки и козметични. Не се посочват данни за неблагоприятни ефекти при продължителна употреба, освен появата на еритем (зачервяване на кожата) [106].

Сравнителни проучвания върху ефекта от приложението на ретинолови естери и ретинолова киселина са в полза на киселината. Алдехидната форма на витамин А – ретинала също така показва по ниско ниво на ефект върху кожата, но е много стабилен в различните козметични продукти. Различни изследвания показват, че приложението на ретинола е около 20 пъти по-слабо в сравнение с действието на ретиноевата киселина. Други изследвания показват, че ретинолът има по-добра усвоимост в кожата и при опити ин виво, в концентрация от 0.25% предизвиква промени и на клетъчно и на молекулно ниво. Независимо от многообразието на изследванията, показващи в различна степен биоактивността на различните съединения на ретинола, първото място по ефективност на приложението остава за *all-trans-ретиноевата киселина или третиноин*. За първи път ретиноид е използван срещу акне и Kligman AM. съобщава за неговата роля срещу фотостареенето на кожата през 1984г, след което следват редица проучвания с еднопосочни резултати [89]. Много години ретиноевата киселина е била забранена за приложение в козметиката, предназначена за кожата. Днес ретиноидите се използват за третиране на хиперкератози и белези от рани; за стимулиране на клетъчния растеж и колагеновия синтез в епителната тъкан; срещу стареенето на кожата (обикновено в комбинация с витамините Е и С), срещу акне и груба кожа. При предозиране или по продължително третиране може да се предизвикат странични ефекти като например еритема. Доказано е, че броят на витамин А-рецепторите се увеличава с продължителността на третирането, поради което е препоръчително да се започне с ниски дози и постепенно да се увеличава концентрацията. Независимо, че чрез локалното приложение по-трудно биха се получили странични ефекти, каквито има установени при орален прием. BfR (Federal Institute for Risk Assessment) препоръчва лимитирано приложение на витамин А в продукти за лице и ръце [106].

Кожата може да бъде снабдена с витамин А чрез локално приложение на козметика и лекарства. Проучвания сочат, че когато приложението върху

кожата е комбинация от някои витамини, като например витамин А, с витамин С, това води до подобряване състоянието на епидермиса [113]. Локални ретиноиди са били използвани за клинично лечение на псориазис, хиперкератоза, акне, ранно стареене и фотоувреждане. Ретиноидите играят роля в процеса на стареене на кожата като инхибират процесите по разграждане на колагена, които се свързват с образуването на бръчки [87, 103]. Използват се широко в козметиката, като се влагат в кремове против бръчки, кремове за ръце, лосиони за тяло и слънцезащитни продукти с цел противодействие на стареенето и фотостареенето на кожата и предотвратяването на оксидативния стрес [87, 131, 133]. Въпреки посочените положителни прояви от приложението на витамин А има данни и за неблагоприятни ефекти, особенно при надвишаване на общотодопустимо ниво на прием от 3000μg RE/ден. Този показател, обаче е сума от всички приеми – хранителни, чрез добавки и козметични. Не се посочват данни за неблагоприятни ефекти при продължителна употреба, освен появата на еритем (зачервяване на кожата) [106].

Според други проучвания ретиниловия естер не проявява добра анти-стареещa активност. Например в Европа и САЩ не е позволено влагането на ретинил палмитат в продуктите за слънцезащитна козметика, като UV филтър. Доказано е, че ретинолът проявява висока ефективност при забавяне на процесите на стареене и фотостареене [87]. Недостатък обаче е, че ретинолът е нестабилен и лесно се разгражда до биологично неактивни форми, когато е изложен на светлина и въздух [97].

Работната група от FDA [71] твърди в свой анализ, че 41% от слънцезащитните продукти на пазара съдържат ретинил палмитат (RP), естерна форма на витамин А. В своя годише слънцезащитен доклад работна група към Националната токсикологична програма на САЩ е издала предупреждение относно фотоканцерогенния потенциал на слънцезащитните продукти, съдържащи ретинолпалмитат [95].

По данни на проучване, финансирано от Procter & Gamble е установено, че витамин А от козметични продукти, отнесен към общия принос на ретиноиди от храни и добавки към тях е в границите само на 2 до 5 % от общата изчислена експозиция [123]. Този дял е много по-нисък от максималните граничните нива, които са посочени в публикация на Германското общество за хранене (Deutsche Gesellschaft für Ernährung-DGE), в която се посочва, че

приносът на витамин А от козметика може да достигне стойности до 25% от общия прием и дава препоръки за ограничения при влагането му в козметика за кожа [127].

1.2.1.2. Витамин Е (токоферол) принадлежи към мастноразтворимите витамини, с генерично наименование, обхващащо 8 съединения, от които 4 са токофероли (алфа-, бета-, гама-, и делта-токоферол) и 4 – токотриеноли (алфа-, бета-, гама-, делта-токотриеноли). С най-висока биологична активност се откроява алфа-токоферолът [105]. Другите токофероли проявяват макар и в по-ниска степен, биологична активност, с подчертана специфика в активността, например за гама-токоферола. През последните години се съобщават и данни за специфична роля и на някои токотриеноли [132]. Токотриенолните форми на витамин Е показват също способност за намаляване на вредния ефект от радиация с UVB-лъчи. Този ефект се постига чрез регулация на генните сигнали, в резултат на комулирането им в клетъчните мембрани на кожната тъкан. Токотриенолите предпазват фибробластите, участващи в съединителната тъкан и активират генните сигнали към повишен синтез на колаген и по този механизъм предпазват кожата от образуване на бръчки [129].
Най-типичните форми на витамин Е са: D-алфа-токоферол, D-алфа-токоферол ацетат; DL-алфа-токоферол и DL-алфа-токоферол ацетат. Префикс "D" означава, че продуктът е получен от природни източници, като растителни масла или пшеничен зародиш, а "DL" префикс показва, че този витамин със синтетичен произход. Изследванията показват, че естествените форми на витамин Е са по-мощни и имат по-висок процент на задържане в кожата, отколкото техните синтетични аналози, но и двете форми определено имат антиоксидантно действие. Витамин Е е общ термин за тези съединения: токофероли и токотриеноли [128].
Витамин Е е основен антиоксидант сред витамините в козметиката. Защитава кожата от свободните радикали и слънцето, намалява бръчките, хидратира и действа противовъзпалително. Подобрява състоянието на епидермиса и заличава белезите на увреждане и стареене, неутрализира свободните радикали, защитава колагеновите влакна и липидите на епидермиса от деградация, предотвратява преждевременното стареене на кожата, овлажнява и придава еластичност на епидермиса [122]. Витамин Е е сред най-ценните

козметични компоненти, които освен антиоксидантната си способност притежава и свойството да предпазва липидите и колагеновите влакна от окисляване и разрушаване, като по този начин съхранява еластичността на кожата [122]. Витамин Е притежава превантивен ефект за предотвратяване на оксидативния стрес, подпомага меланогенезата и синтеза на колаген [71].

При проучванията, които бяха направени се установи, че въпреки над 50 годишната употреба на витамин Е в клиничната и в експерименталната дерматология и големия брой публикувани клинични случаи, все още не са налице проучвания, които предоставят обосновка за неговата дозировка. Експериментални данни показват, че локално и орално витамин Е има противоканцероген и фотозащитен ефект за кожата. Важна функция на витамин Е е способността му да задържа във външните слоеве на кожата всички други мастноразтворими витамини и най-вече витамин А и витамин D [120]. Има данни в научната литература за защитната роля на витамин Е срещу инициирането и развитието на редица болести, както и изследванията за самостоятелната роля на витамин Е и в комбинация с други антиоксиданти в предпазването и намаляването на оксидативното увреждане [38, 94].

През 2018 година международна експертната група за преглед на козметичните съставки е оценила безопасността на токофероли и токотриеноли и излиза със заключение, че те са безопасни за използване в козметиката. Най-често срещаната форма в природата, обаче и с най-голяма биологична активност е α–токоферолът. Освен доказателствата за тяхната безопасност е потвърдено и действието им за подобряване на кожата, като антиоксиданти и като фотостабилизатор [58].

От дълги години витамин Е се използва в козметиката и се приема като основния мастноразтворим антиоксидант, необходим за поддържане на интегритета и функционалността на клетъчните мембрани [99]. Мембранната функция на витамин Е се изразява в защита на полиненаситените мастни киселини от оксидация, процес в който самия витамин Е се оксидира и е необходимо неговото „рециклиране”, което се постига чрез участието в процеса на витамин С. Есенциална е ролята на витамин Е във всички процеси, свързани с оксидативен стрес в организма. Освен ролята му на антиоксидант, витамин Е участва в процесите на сигнална трансдукция, генна експресия и в регулацията на други клетъчни функции.

Редица научни изследвания доказват значимата роля на витамин Е срещу вредното действие на УВ-радиацията върху кожата, както и за забавеното образуване на кожни бръчки и превенцията на туморни образувания [39]. В научната литература са предоставени данни за сравнителната оценка на биологичната активност на различните форми на витамин Е [30]. Доказателствата за алфа-токоферола като най-активна форма, с висока антиоксидантна активност са съпроводени и от данни за най-ефективно проникване в кожата на неговите ацетил-естерни деривати. Доказано е, че при топикално приложение естерните форми проникват по-лесно в епидермиса [91]. Тъй като в естерификацията участва хидроксилната група от фенолното ядро, което обяснява липсата на антиоксидантна активност. Така самите продукти нямат антиоксидативна функция, но са стабилни съединения, които след преминаване на кожната бариера се хидролизират от естеразите и се възстановяват отново антиоксидантните им свойства. По-често използваните в козметиката деривати на витамин Е са: токоферил-ацетат, токоферил палмитат, токоферил линолеат, токоферил никотинат. Обобщавайки разнообразието от действия на витамин Е чрез козметичните продукти би могло да бъдат резюмирани в следните позиции:

- антиоксидантна и радикал-захващаща активност;
- редуциране на оксидативния стрес, свързан с УВ радиацията;
- стимулиране на епитализацията ;
- запазване нивото на хидратация на кожата;
- протекция на витамин А и дериватите му заедно с участието на витамин С.

Еднопосочни са резултатите на редица изследвания, доказващи безопасността от приема на витамин Е, позволяващи да бъде класифициран, независимо от липидната му разтворимост, заедно с витамин С, като витамините с най-висока степен на безопасност [105].

1.2.1.3. Бета-каротен

Бета-каротенът е биологично-активно съединение от групата на каротеноидите, широко разпространен като пигмент в плодовете и зеленчуците. Биологичната му роля се свързва основно с антиоксидантната му активност. Приет с храната, той се превръща във витамин А, което определя и наименованието му - провитамин А, и съответната физиологична значимост за организма . Както вече отбелязахме витамин А е есенциален за

нормалния растеж и развитие, за функцията на имунната система, за очното здраве и здравето на кожата и костите. Степента на превръщане на бета-каротена във витамин А, се регулира от статуса на самия витамин А, което е защитен механизъм срещу предозирането му в организма (хипервитаминоза А) [102].

Кожата е изложена на постоянно въздействие на различни екзогенни и ендогенни фактори, които предизвикват промени в състоянието и фукционирането и. В резултат се активират процесите на фото-стареене, възпалителни процеси, имунна дисфункция, нарушен баланс на епидермална хомеостаза, или други кожни смущения [90]. Най-ясно откроряващо е стареенето на кожата под въздействие на слънчевата УВ-радиация [20]. Клиничната изява е в оформяне на бръчки, пигментация, загуба на свежест, сухота и хиперкератозис на епидермиса, загуба на кожна еластичност [74, 75]. Основни хистологични промени настъпват в дермалната съединителна тъкан , които се разпределят в две групи в зависимост от мястото на протичане - епидермис и дермис. Промените в епидермиса се проявяват чрез промяна на формата, размера и броя на кератиноцитите, меланоцитите и Лангерхансовите клетки. В дермиса се установяват промени в колагена, еластин, глюкозамингликаните [83, 92]. Бета-каротенът има доказани слънце-защитни свойства със значително по-висока ефективност при топикалното му приложение. Едновременното орално и топикално приложение на бета-каротена има най-висока степен на ефективност срещу вредното слънчево въздействие [114]. Механизмите, по които бета-каротенът оказва своето протективно действие включват – неутрализация на вредното действие на синглетния кислород (O2), както и на негативния ефект на другите свободни кислородни радикали.

Свойства на каротеноиди са многобройни, но най-значимо е свойството им свързано с функция им като прекурсор на витамин А. Една от най-важните характеристики на бета-каротена е високата му антиоксидантна активност, а биологичното му значение се свързва най-вече със здравето на очите. Мощните антиоксидантни и биоактивни свойства на бета-каротена са причина за широкото му приложение не само като съставка във много фармацевтични препарати, в храни като оцветител, в хранителни добавки, но и в широка гама козметични продукти. Когато чрез храната в организма постъпват каротеноиди са необходими няколко седмици за поява на защитни

ефекти, но когато това се случва чрез локално приложение на бета-каротен, тогава значително се увеличава дермалната защита и като продължителност и като здравен ефект [114]. Каротеноидите не са единствените съединения, които осигуряват защита на кожата от вредното въздействие на слънчева светлина [131]. Други фитохимичните съединения, които притежават тези свойства са токофероли, токотриеноли, аскорбат, полифеноли (флавоноиди), полиненаситени мастни киселини и други [50, 132]. Слънчевите ултравиолетови лъчения са три категории: UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) и UV-A (320-400 nm). UVC се филтрира от озоновия слой и е биологично най-вредното лъчение. Известно е, че отговорни за възникването на кожни проблеми са UVB и в по-малка степен UVA лъчите [20, 43]. Широко известна е фото-защитната функция на каротеноидите срещу вредните UVB и UVA лъчи [36, 132, 133].

1.2.2. Мазнини

Мазнините са незаменима, но в зависимост от вида и количеството им , би могла да стане проблематична съставна част на храната ни, която за много хора се е превърнала в синоним на нездравословно хранене [105]. При правилен избор обаче на мазнините, здравословните предимства преобладават. За козметиката мазнините са едни от първите нутриенти, намерили мястото си в състава на различни козметични продукти. Така например още преди два века палмовата мазнина се използва за производство например на сапуни, което продължава и днес. Какаовото, кокосовото, розовото и много други растителни и животински мазнини намират широко приложение в богатото разнообразие от козметични продукти.

Основните биологични функции на липидите, чиято подгрупа са мазнините е съхранение на енергията и изграждането на клетъчната мембрана [55]. Растителните се включвани в храни, козметика и фармацевтични продукти, като носят множество ползи за здравето на човека, една от които е - грижата за кожата. Освен това растителните масла привличат голям интерес разработване на естествена и екологична козметика [90, 109]. В организма мазнините изпълняват функцията на изолиращ слой срещу студа и на предпазни обвивки на вътрешните органи. Жизнено важни са съставките на мазнините – мастните киселини, като градивни елементи на клетъчната

мембрана, отговорна за обмяната на веществата и клетъчното функциониране [105].

Класификацията на мазнините се базира на вида на изграждащите ги мастни киселини. Въз основа на броя на двойните връзки мастните киселини биват наситени, мононенаситени и полиненаситени. В научната литература се откроява голям интерес към биологичната активност на полиненаситените мастни киселини, с определен фокус към омега-3 и омега-6 мастните киселини, намиращи приложение в съвременните козметични продукти. Омега-мастните киселини спадат към голямата група на ненаситените мастни киселини с 18 и повече въглеродни атома. Обозначението Омега идва от последната буква на гръцката азбука и е поставено заради последния С-атом във веригата на мастната киселина, така наречения метилов край (CH_3). От този край се локализира първата двойна връзка, която при една омега-3-мастна киселина се намира при третия въглероден атом.

От средата на осемдесетте години на миналия век е известно, че омега-3-мастните киселини действат благоприятно и при хронични кожни възпаления, особено при псориазис. Тъй като псориазисът е хронично заболяване, приемането на омега-3-мастните киселини обикновенно е дългосрочно. Според клинични опити и фармакологични изследвания омега-3-мастните киселини са подходящи и при лечение на невродерматити. Все още няма обаче контролирани изследвания в този аспект. Приемането на омега-3-мастните киселини за лечение на възпалителни заболявания изисква по-високо дозиране и трябва да става след консултация с лекар в зависимост от болестта [88].

В козметиката мастните киселини се използват като емулгатори, фактори поддържащи текстурата, и като почистващи агенти при смесването им с глицерин. Много растителни и животински мазнини се включват директно в производството на продукти, с различно медицинско и козметично предназначение. Така например рициновото масло се използва в производството на червила; какаовото масло – в продуктите за тен на кожата; ланолин – в различни козметични и медицински продукти за кожата; лой и нейни деривати – в продукти за кожата, за клепачите – очна линия, вежди и за червила; лецитин – в червила, течни пудри, кремове за ръце, лосиони, сапуни, шампоани и много други.

Известно с положителните ефекти за намаляване на кожните възпаления е ***лененото масло*.** Намалява сърбежа и предотвратява възпаленията. Съдържа голямо количество антиоксиданти, витамин А, В, D и Е, Омега 3 и 6 мастни киселини и минерали, които заедно успокояват и заздравяват кожата. При студено време предпазва лицето, устните и ръцете. Лененото масло укрепва слаби и увредени коса и нокти. Ефективно е при раздразнения на скалпа, причинени от екзема. При редовна употреба повишава устойчивостта на кожата към външни дразнители.

В някои по-скъпи козметични продукти се влагат и други масла като бадемово, масло от кайсиеви ядки, от авокадо, от сусам, масло от костенурка и от редица други екзотични растения и животни. Спецификата на действие на различните мазнини зависи основно от мастно-киселинния им спектър.

1.2.3. Минерали

Биологичната активност на минералите се свързва основно с ролята им на ко-фактори в множество ензимни реакции, протичащи на клетъчно ниво, което определя и биологичната им значимост за здравето на човека [25]. По отношение на козметиката, директното участие на минералите се свързва най-много с продуктите за орална хигиена.

Все повече в козметиката намират приложение различни нутриенти, известни с биологичната си активност и принос за нормалното функциониране на кожата. Използването на съставки с доказана нутритивна стойност в козметичните продукти даде основание за развитие на новия клон в козметиката – нутрикозметика, която предоставя възможност за постигане на по-ефективни резултати чрез използване на двата пътя на въздействие – екзогенен и ендогенен [22].

Минералите постъпват в организма основно с храната и водата, като участват в минерализацията на зъбите, стабилизират pH на слюнката и участват в профилактиката на зъбния кариес. Многобройни са проучванията, доказващи позитивната роля на флуора в превенцията на зъбния кариес, който основно постъпва в организма чрез съответните козметични продукти. Тъй като все още продължава дискусията за позитивния ефект на флуора върху здравето на човека, с акцент върху подрастващите, е необходим мониторинг на контрола за съдържанието му в козметиката [24].

1.3. Биологично активни съединения. Представители - роля в козметиката и методи за анализ.

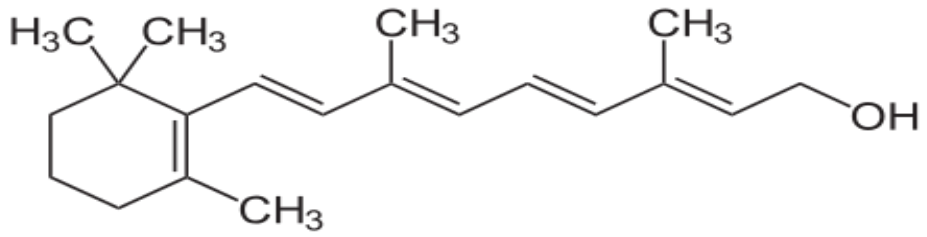
Терминът "биоактивен" се състои от две думи: био-и-активна. В етимологията: био-от гръцката (βίο-) "биос" се отнася до живот, а-активен от латински "activus", означава: динамичен, пълен с енергия [101]. В науката все още се води дискусия по отношение на термина „биоактивното съединение“ и дефиницията на „биоактивното съединение“ е в динамика, тъй като научните изследвания на потенциала за биоактивност днес процъфтяват. Когато говорим за биоактивни съединения от гледна точка на влиянието им върху организма трябва започнем със значението им за поддържане на здравето и достигнем до възможните негативни прояви, като вземем в предвид влиянието на доза, както и на бионаличността след употреба [38].

Огромният брой биоактивни вещества в природата налага тяхното групиране, което може да бъде направено по 2 начина: *според химичния им състав и структура и според тяхната биоактивност*. По отношение на първия аспект, хилядите представители на биоактивните съединения биха могли най-общо да бъдат групирани в три основни групи: терпеноиди (каротеноиди и фитостероли); полифенолни съединения (флавоноиди, фенолови киселени) и Сяра-съдържащи съединения (аллиум, гликозинолати). По отношение на втория аспект – активност, те могат да бъдат разпределени като: имуностимулатори; антиоксиданти; противовъзпалителни; медиатори и други.

1.3.1. Витамини

1.1.1.1. Витамин А

Три са формите на витамин А - алкохолна (ретинол), алдехидна (ретинал) и киселинна (ретиноева киселина). Сред тях ретинолът (***фигура 3***) е биоактивната форма, която притежава най-висока антиоксидантна активност [94]. Намира се в рибеното масло, черния дроб, яйцата и млякото. А под формата на провитамин (каротин) се съдържа в морковите,спанака, кайсиите, пипера, доматите и тиквата.



Наименование по UPAC: (2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol

Фигура 2 *Структурна формула и наименование на ретинол*

През 2016 г. Европейска комисия по Здраве и безопасност на храните, Дирекция С: Обществено здраве, знания за страните и управление на кризи получи оценката на риска за употребата на витамин А (ретинол и ретинилови естери) в козметични продукти [56]. Определени са **максимални концентрации** на използване на витамин А: 0.05% RE в лосиони за тяло и 0.3% RE в кремовете за ръце и лице

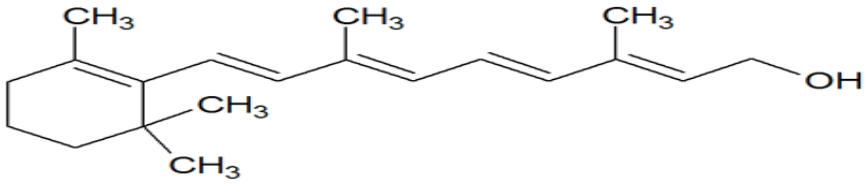
Количеството на витамините в даден продукт може да бъде записано и обявено и в международните единици за активност (I.U.). Тази димензия отчита действието и ефекта от активното веществото в организма, а не само неговото количество в продукта. Преобразуването на IU в милиграми и микрограми ва витамин А формите е представено в ***Таблица 2***.

Таблица 2 *Превръщане на производните на витамин А в международни единици (IU)*

Производни на витамин А	***1 IU отговаря на***
Retinol	*0,300 µg*
Retinyl acetate	*0,345 µg*
Retinil propionate	*0,359 µg*
Retinil palmitate	*0,550 µg*

Данни за витамин А *от „CosIng, списъка на категориите козметични продукти" Cosmetics - CosIng* [45, 72], като ретинол са представени на **таблица 3**.

Таблица 3 *Информация за Витамин А от Cosmetics -CosIng*

INCI Name	***Retinol***
	
INN Name	Retinol [INN:BAN]
Ph. Eur. Name	Vitaminum A
Chemical/IUPAC Name	Retinol; vitamin A
Functions	Skin coditioning

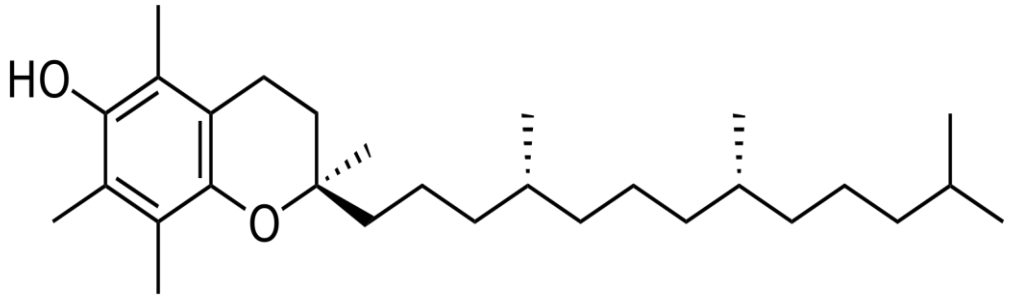
Необходимостта от информация за съдържанието на витамин А в продукти за кожа, коса и такива за лична хигиена налага да има съвременни методи за анализ и контрол, които да предоставят на потребителите и на специалистите достоверни данни.

В литературата са описани различни **методи за количествено определяне на мастно-разтворими витамини.** За анализиране съдържанието на витамин А и витамин Е най-често се използва HPLC система с UV-Vis или флуоресцентна детекция [3]. Витамините са компонент на липидната

фракция, която се извлича след осапунването на пробата. Възможно е както индивидуално, така и съвместно определяне на двата витамина [32].
Методите за анализ и контрол на съдържанието на витамин А в козметични продукти могат да бъдат разгледани според принципа на детекция на спектрофотометрични, флуориметрични и колориметрични [40, 41, 51].
Според техниката на разделяне хроматографските методи са течно- и газово-хроматографски. Ретиноидите са термо лабилни, затова газовохроматографските техники за анализ не са предпочитани [54]. Описаният течно-хроматографски метод е с ултравиолетовата детекция при 330 nm и разделяне на обратнофазова C18 колона, с параметри на количествено определяне за all-trans-retinol LOQ - 0.54 μg. Екстракцията се извършва със смес от органични разтворители - 1/3 (v/v) hexane, 1/3 (v/v) isopropanol, 1/3 (v/v) ethyl acetate и 0.1% BHT). Колонното разделяне е с градиенден режим, при стартиране с подвижна фаза съставена от 25% от 0,4 М амониев ацетат/1% ацетатен буфер, с pH 5,3 към 75% метанол до 80% към 20% дихлорметан.
Бърз метод за количествено определяне, с UV детекция и разделяне на обратно фазова колона е представен от Hubinger, 2009 [75]. Екстракцията е извършено със система от разтворители, съставена от равни количества хексан, изопропанол и етилацетат, и екстрактът се инжектира директно в HPLC хроматограф със C18 колона и UV детектор, настроен на 330 nm. Елуирането се постига чрез градиенд на подвижната фаза, като се започва със смес от ацетатен буфер/метанол, който постепенно се променя до метанол/дихлорометан [76].

1.3.1.2. Витамин Е

Химичното наименование на витамин Е е α -токоферол, а структурната му формула е представена на ***фигура 3.***



Наименование по UPAC: (2*R*)-*2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4*R,*8*R*)-*(4,8,12-trimethyltridecyl)]-6-chromanol*

Фигура 3 *Структурна формула и наименование на Алфа-Токоферол*

Научното познание за витамин Е датира от 1922 година, когато Evans и Bishop установяват, че липсата на активното вещество, което те наричат „фактор Х" води до нарушени репродуктивни функции при плъхове [30]. По-късно през 1924 година Sure нарича този „фактор Х" витамин Е по азбучен ред, тъй като по това време е в процес на откриване витамин D [30].

Витамин Е е мастно разтворим витамин - антиоксидант, който се отнася към групата на токоферолите (tocopherols). Терминът токоферол в превод от гръцки език означава произвеждам потомство. Този витамин представлява смес от четири токофероли и четири токотриеноли. През 1938 година Витамин Е бил синтезиран по химически път [30, 57].

Различните форми на токоферолите, заедно с токотриенолите се наричат общо витамин Е (липидоразтворим витамин с антиоксидантно действие в няколко етапа на пероксидация на липиди in vivo) и всеки от тях притежава различна степен на медицинско, биологично и физиохимично значение. Сред четирите токофероли (α-, β-, γ- и δ-токоферол) се съобщава, че α - токоферолът притежава най-висока биологична активност [100]. В съответствие с броя и мястото на добавяне на метилови групи се разграничават следните активни форми на витамин Е: α-токоферол, β-токоферол, γ-токоферол и δ-токоферол [99].

Биологичната роля на витамин Е се определя най-вече от свойството му да бъде антиоксидант, прекъсващ верижните свободнорадикалови реакции. Механизмът на прекъсване се осъществява чрез отдаване на фенолносвързан водороден атом от молекулата на α–tocopherol, който се свързва с

липопероксилен радикал (LOO•). В резултат се получава по-слабо реактивоспособен α–токофероксилов радикал (α–TO•) [38]:

α–TO**H** + LOO• → α–TO• + LOO**H**

Публикуван е HPLC метод от Biljana Nastova и колектив за определяне на α - токоферол в козметика. Хроматографското разделяне е на колона Purospher Star RP 18, с подвижната фаза от метанол - n-хексан и детекция при 220 nm. Методът е валидиран по отношение на точност, прецизност, линейност, граница на откриване и количествено определяне и обхват. Методът е чувствителен и позволява откриване на активни компоненти в концентрации от 0,007 μg и 0,011 μg за α-токоферол и съответно за α-токоферолов ацетат, докато най-ниските концентрации, които могат да бъдат определени, са 0,023 μg и 0,033 μg [100].

Друга публикация в Macedonian Pharmaceutical Bulletin съобщава за бърз HPLC метод за определяне на алфа-токоферол и неговата естерна форма в козметиката. Хроматографското разделяне се извършва върху колона Purospher Star RP 18 (150 x 4.0 mm id, 5μm), като подвижната фаза се състои от метанол - n-хексан (90:10, V / V). ml min-1. Откриването на всички рацемични α-токоферол и естерната форма на целия рацемичен α-токоферилацетат се извършва при 220 nm. Методът е валидиран и позволява откриване на концентрации от 0,007 μg и 0,011 μg за α-токоферол и съответно за α-токоферолов ацетат [100].

1.3.1.3. Бета-каротен

Каротеноидите са група съединения, представена от над 600 каротеноида, най-разпространени от които са: бета-каротен, алфа-каротен, ликопен, лутеин, зеаксантин и бета-криптоксантин. Групата на каротеноидите произлиза от една основна химична структура, тази на ликопена, която е формирана чрез линейно свързване на 8 изопренови единици, асоциирани в две групи по 4 единици: геранил-геранил. Според химичния си състав каротеноидите се разделят на две главни групи:

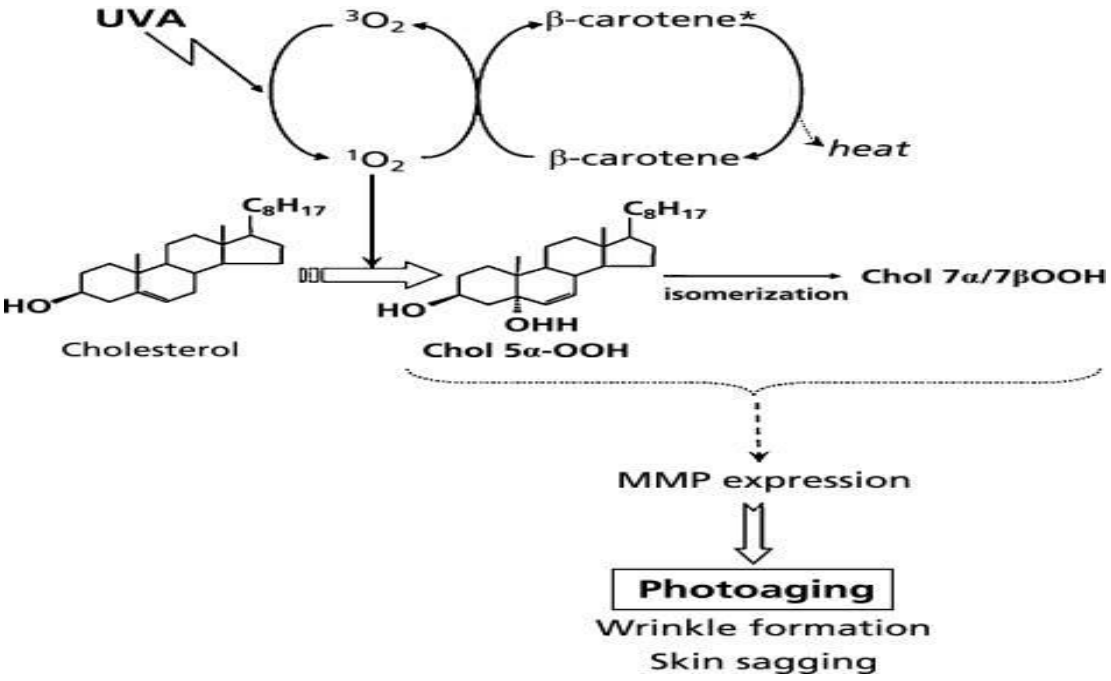
- Каротени, съставени само от въглеродни и водородни атоми: α-каротен, β-каротен, и ликопен и

➢ Ксантофили, притежаващи поне една крайна кислород съдържаща функционална група: β-криптоксантин, лутеин и зеаксантин;

Каротеноидите могат да бъдат класифицирани и въз основа на цвета на пигментите като: жълто-оранжеви (α-каротен, β-каротен, β-криптоксантин, лутеин и зеаксантин) и червени (ликопен). Според биологичното превръщане в организма се делят на провитамин А, каротеноиди (α-каротен, β-каротен и β-криптоксантин) и каротеноиди не притежаващи витамин А активност (ликопен, лутеин и зеаксантин).

Известно е, че каротеноидите играят важна роля в предотвратяването на **процесите на фотостареене на кожата** [92]. Бета-каротен и астаксантин са двата представителя на каротеноидите, които най-често се използват като фотозащитни компоненти, тъй като притежават висока защитна способност срещу вредните УВ лъчи, както и способност да елиминират синглетния кислород [39, 68]. Фотозащита чрез β-каротин, когато тя е приложена локално чрез слънцезащитни продукти е значително по-висока от приема му с храна или добавки. Въпреки това, оптималното снабдяване с антиоксидантни микроелементи в кожата увеличава базалната защита на кожата срещу ултравиолетово облъчване, поддържа дългосрочна защита и допринася за поддържане на здравето и външния вид на кожата [39, 116].

На *фигура 1* е представен механизма на гасене от бета-каротена на синглетния молекулен кислород и превръщането му в по-ниско енергетичната триплетна форма, което предпазва кожата от фотостареене [74].



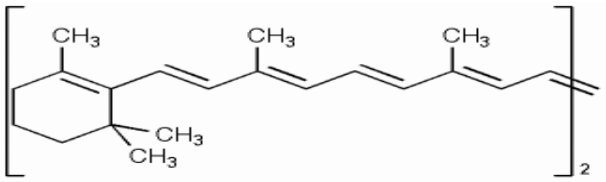
Фигура: 1 *Механизъм на гасене от бета-каротена на синглетния молекулен кислород и превръщането му в триплетна форма*

Структурата на бета-каротен е изградена от два незаместени бета-йононови пръстена, разделени от 4 изопренови единици, които имат 9 спрегнати, двойни връзки (***Таблица 1*** *Данни за бета-каротен в Cosmetics – CosIng).* Активността като прекурсор на витамин А в човешкия организъм се дължи на наличието в молекулата му на бета-йононовите пръстени. Следователно бета-каротена е най-важният източник на витамин А и стехиометрично той е еквивалентен на две молекули ретинол. Ключов момент за образуването на витамин А е окислителното разцепване чрез ензима β-каротин 15,15 – диоксигеназа [48].

Методите за идентифициране и количественото определяне на бета-каротена се основават на неговите свойства да поглъщат светлината във UV-VIS спектъра, както и да имат специфична детекция при сигнал, получен в мас-спектрометричниата детекция, в резултат от отношението маса-заряд на молукулния йон. Друг известен способ за анализ е електрохимичния [42].

Прегледът на научни публикации и стандарти за методите за идентифициране и за количествено определяне на бета-каротен можем да ги опишем в следните групи:

Таблица 1 *Данни за бета-каротен в Cosmetics - CosIng [45]*

Име на INCI	***Beta-Carotene***
Структура	
NN Name	Beta-carotene
Ph. Eur. Name	Beta carotenum
CAS #/ EC #	7235-40-7 /230-636-6
Chemical/IUPAC Name	Beta -carotene
Functions	Skin conditioning

➢ **Спектроскопски**. Тук попадат абсорбционната и флуоресцентната спектроскопия. Абсорбционната спектроскопия [2] дава възможност за определяне на индивидуални концентрации, чрез припокриване на абсорбционни линии, докато при флуориметричната има селективно възбуждане ма молекулите, но това не е от полза за количественото определянето на каротеноиди, тъй като те имат незначителна флуоресценция [132];

➢ **Хроматографски**, като способ основно за разделяне можем да отличим **колонната и тънкослойната хроматографии**. Официалният AOAC метод за определяне на каротени и ксантофили все още включва колонно-хроматографски метод [37, 44]. Недостатък на тези методи е ниската скорост на анализ, както и че по същество те са полуколичествени, поради което се използват основно за разделяне и пречистване на смеси.;

➢ **Високо-ефективната течна хроматография** е съвременна техника за анализ на бета-каротен, която позволява висока чувствителност и селективност при анализа. Предимствата на използването на тази техника са скоростта, чувствителността и точността за определяне на съединенията в допълнение към икономичността на необходимите разтворители и простото свързване с други техники [56, 124]. Wilhelm и Helmut предлагат течно-

хроматографски метод за разделяне на каротеноиди, с ултра-виолетова детекция [132]. Igielska-Kalwat от колежа по образование за здраве и красота „Бжежински”, Полша публикува в свое изследване за подходящ метод за определяне на β-каротен в търговски кремове с HPLC, в което посочва като подходяща мобилна фаза за определянето му метанол, вода и етелацетат в определено съотношение. Намира концентрация на β-каротенът в анализирани козметични кремове в границите от 3,10 до 10,45 mg/100 g [78].
В AOAC е публикуван хроматографски метод за анализ на бета-каротен, който предназначен за храни и хранителни добавки. Разделянето се извършва на обратно-фазова хроматографска колона C18, линейността е от 0.1 до 50 µg /ml и RSD от 1.2 до 4.4 % [112]. Съвременен и ефективен метод за анализ на каротеноиди в растителните тъкани чрез 1.3.1 течно хроматографско разделяне и хибридна квадруполна масспектрометрия (MS) е валидиран и позволява количественият анализ в значително по-ниски концентрации: от 2,5 pg / mg до 10 ng / mg сухо тегло [83].

1.3.2. Мастни киселини

Мазнините са естери на висшите мастни киселини и глицерола и влизат в състава на липидите [55]. Мастните киселини са карбоксилни киселини, чиято молекула се състои от дълга, неразклонена алифатна опашка с 4 до 30 въглеродни атома, която може да бъде наситена или ненаситена, с метилова група от едната страна на веригата и карбоксилна група от другата страна [49]. Според дължината на веригата мастните киселини се делят на три групи [49]:

- късоверижни (до 4 въглеродни атома);
- средноверижни (6-10 въглеродни атома);
- дълговерижни (над 10 въглеродни атома).

Според степента на наситеност те могат да бъдат:

- наситени (без двойни връзки) - палмитинова (C_{16}), стеаринова (C18) и арахинова (C20); с обща формула (CnH_{2n})O_2 ;
- мононенаситени (с една двойна връзка) – палмитоолеинова (C16:1), олеинова (C18:1);
- полиненаситени (с две и повече двойни връзки), които съдържат две или повече двойни връзки, разделени от метиленова група [49].

Освен по брой двойни връзки, те се отличават по положението на двойната връзка относно последния атом и се делят на полиненаситени масти киселини ω9, ω6 и ω3-мастни киселини [49]. **ω6-мастните киселини** се обединяват като витамин F и се съдържат в растителните масла. омега-6 подобряват състоянието на кожата, ноктите, косата и подпомога емоционалния и хормонален баланс [88]. За разлика от омега - 3 и омега - 6 мастните киселини, **омега - 9** не се счита за незаменима, тъй като се произвежда в тялото от ненаситени мазнини. Подобно на омега-3 и омега-6 точният баланс за омега-9 е важен, тъй като при отсъствие на омега-3 и омега-6, организмът ще компенсира, чрез производството на омега-9, която не е толкова ефективна в хранителен план. **Олеиновата киселина е омега-9 мастна киселина** и има способността да намалява риска от атеросклероза (втвърдяване на артериите) [49].

Животинските и растителните масла са най-ранно прилаганите компоненти в козметиката, с цел успокояване и изглаждане на кожата и подхранване на косата и брадата, но в миналото проблем е била стабилността и наличието понякога на нежелана миризма. Днес тези проблеми са решени чрез химична модификация, хидрогениране за ненаситените, с цел получаването на стабилни масла, както и естерификацията [99]. Най-често мастните киселини се използват в козметиката като емолиент или емулгатор. В козметологията по дефиниция емолиент означава „вещество, което омекотява кожата“. Има латински произход и се превежда от „mollire“ – „омегчавам“. Предназначението им е да успокояват и да придават усещане за гладкост и плътност на кожата [96]. Като успокояващо средство, мастните киселини спомагат за подобряване на хидратацията чрез запазване на влагата в кожата. Емулгиращите свойства на мастните киселини служат като уплътняващо средство в козметика с грижа за кожата. Мастните киселини са много полезни в продуктите за лична хигиена, като средство за осигуряване на по-добра способност за разпръскване, както и за облекчаване на сухотата на кожата. В козметиката се използват основно стеариновата, лауриновата, миристиновата, олеиновата и палмитиновата киселини обикновено като смеси от тях, които се влагат в кремове и сапуни. Ето някои функции на тези киселини:

- Миристиновата и палмитиновата киселини имат успокояващо и изглаждащо кожата въздействие.

- Стеариновата, лауриновата, миристиновата, олеиновата и палмитиновата киселини имат почистващо и повърхностно активно действие.
- Емулгиращ агент са стеариновата и палмитиновата киселини.

Наличен е и приложим в лабораторната практика **стандартизиран метод за анализ** на мастно-киселинен състав в животински и растителни мазнини и масла. Газова хроматография на метилови естери на мастните киселини [81], но не е открит такъв приложим в козметиката. При преглед на публикуваните методи в научната литература бе открит съвременен метод за анализ на мастно-киселинен състав, като дериватизацията за получаване на метилови естери на мастни киселини (FAME) е чрез метилиране с борен трифлуорид (BF3) в метанол [77]. Съставът се определя чрез газова хроматография (GC), съчетано с пламъчна йонизация детектор (FID). Мастните киселини са идентифицирани чрез сравняване времето на задържане, при използване на вътрешен стандарт - метил трикозаноат (C23: 0). Метиловите естери на мастните киселини са разделени върху капилярна колона DB-5 (30 m 0.25 mm I.D. 0.25 m2). Използва се азот като газ-носител при 0.6 mL / min. Хроматографският условия са нжектор 250 ° C, разделяне 1:50, инжекционен обем 1 mL; фурна: 100 ° C за 0.5 min, последвано от увеличаване от 3 ° C / мин до 260 ° C; FID се поддържа при 280 ° C [95].

Нов, точен и надежден метод, приложен за определяне на количествения и качествен състав на свободните мастни киселини в пробите от тоалетен сапун чрез газова хроматография-масспектрометрия е предложен от Bernecke, S., Maruska, A [39]. Използван е силилиращ агент хексаметилдисилазан (HMDS) и хлороформ като разтворител. Детекцията и количественото определяне се извършва с газова хроматография-масспектрометричен анализ, като се използва DB-5 капилярна колона. При валидирането на метода е установено, че има приемлива линейност с коефициент на определяне> 0,999 в границите на концентрация 0,005-2 mg / ml. Границите на откриване и количествено определяне са получени от регресивния анализ и са съответно 2,5 и 8 μg / ml [39].

1.3.3. Флуор

Флуорната профилактика започва през 40-те години на миналия век, като за първи път е приложена в град Гранд Рапид САЩ, подкрепена от научни изследвания, доказващи висока ефективност по отношение на превенцията на

зъбен кариес. Подходящо провеждане на флуорна профилактика е периодът преди поникване на зъбите, периодът от раждането до първата година за осигуряване на здраво млечно съзъбие. По време на бременност трябва да се внимава да не се постигне предозиране, тъй като има опасност за плода, ако не е завършена минерализацията на млечните зъби.

Флуорът не е есенциален за развитието и функционирането на организма на човека, но е необходим в превенцията на зъбното здраве и в известна степен подкрепящт борбата срещу остеопорозата.

Една от специфичните за настоящия 21-и век активности на СЗО е включването на оралните болести към групата на значимите неинфекциозни заболявания, представляващи сериозен здравно-социален проблем. В научните, експертни доклади на организацията се акцентира върху значимото разпространение на зъбния кариес, предопределящо разработване на активни превантивни програми за осигуряване на оралното здраве на населението. Многобройни са проучванията, доказващи позитивната роля на флуора в превенцията на зъбния кариес, но в последните години се получиха и различни съобщения, установяващи странични и вредни за здравето ефекти. Дискусията по този въпрос продължава и днес [84].

Познанието за флуора, като неорганичен микро-елемент, необходим за здравето на зъбите и костната система на човека, датира от повече от 100 години. В природата не се открива в свободно състояние, а като много активен йон. Обмяна на флуора в организма – източници на флуор за организма са питейната вода, минерални води, води за жабурене съдържащи флуор от 2.2 – 0,3 μg/ml, във въздуха, в храни като чай, боб, морски продукти, зеленчуци, плодове, някой медикаменти и др. **[**60**].** Съдържа се в почвата, скалите, вулканичната прах и костите на рибите.

Роля на флуора в продуктите за дентална хигиена.

Флуорът, приет в организма чрез водата, храната и въздуха се резорбира от лигавицата на стомаха и храносмилателния тракт и като флуорен йон преминава в кръвта, лимфата и слюнката. Той влиза в емайловите кристали, превръщайки по-малко стабилния хидроксиапатит в флуорапатит, с повишена киселинна устойчивост. Третирането с флуор има максимален ефект до 3 годишна възраст, след което действието му намалява с възрастта до 12-15 години. При локални апликации на флуор се образува CaF_2 по повърхноста на

зъба и преминава в зъбния емайл. Флуорапатита и калциевият флурид са по-киселинно устойчиви. Флуорът, калция и фосфора укрепват структурата на зъбния емайл и водят до редукция на кариесите [8].

Друг начин на действие на флуора е чрез намаляване на микрофлората в устната кухина, редукцията и в зъбната плака и намаляване на киселинността. Всичко това променя строежа, състава и свойствата на зъбната плака, водещо до редукция на кариеса [1]. Флуорната профилактика срещу развитието на кариеси показва висока степен на ефективност. Предоставените през последните години данни за странични и вредни ефекти от предозирането на флуорния прием налагат по-строго спазване на препоръчителните нива за екзогенен и ендогенен прием, както и контрол на съдържанието на елемента в питейните води и медицински контрол на продуктите с вътрешно и локално приложение [19]. Предозирането с флуор не трябва да се допуска при деца и възрастни [88]. Необходимо е повишаване нивото на информираност на населението относно ползите от приема на флуор и евентуалните вредни последствия при предозирането му [59].

Установен е пътя на флуора, приет чрез вода, храна или зъбни пасти, който постъпвайки в устната кухина чрез слюнката установява контакт със зъбната повърхност. Зъбният емаил е изграден от хидроксиапатит ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$), съставен от калции и фосфор и в присъствието на флуор се превръща във флуорапатит ($Ca_5 (PO_4)_3 F$), който от своя страна прави повърхността на зъба по-здрава и е преграда за бактериите. При недостиг на флуор, флуорапатитът се превръща обратно в хидроксиапатит и възможността за разграждане на емайла и образуване на кариес от микрофлората нараства. Процесът протича в кисела среда, но при pH под 4.3 (още по-кисела среда) се постига и разграждане на самия флуорапатит [15]. Преминалият през храносмилателната система флуор се отделя чрез бъбреците, слюнката, потта и млечните жлези (при кърмене) [1].

В научната литература, както и в регулационните документи (стандарти, регламенти, директиви и други) са публикувани не малко методи за анализ на флуор в пасти за зъби. Най-често прилаганите и описани в научни статии са тези, които го определят като флуориден йон, чрез йон селективни електроди и йонна хроматография. Флуоридните йон селективни електроди са удобни за употреба и чувствителни. Необходимо условие тук, обаче е подържане на

киселинност в интервала от 5,2 до 5,5 pH единици, за да бъде избегнато образуването на утайка от флуорид.

Използваните техники за анализна флуор [107] са:

- Потенциометричен анализ;
- Анализ с йон-селективен електрод;
- Спектрофотометрично определяне;
- Газово-хроматографски анализ

В научната литература е описан потенциометричен метод за определяне на флуориди в продукти за дентална хигиена - пасти за зъби и води за уста. Методът е валидиран при следните параметри на приложимост: граница на откриване 1×10^{-3} mg / L, на количествено определяне 2.8×10^{-3} mg / L и възпроизводимост 93-103% като флуорид [117].

Йон-селективено определяне на флуоридни йони е приложен от Abdel-Hakim и колектив, като използван е методът на стандартната права при изчисляването на концентрацията на пробите, построена с работни разтвори с концентрация в диапазона от 1 до 10 mg/L. Възпроизводимостта на този метод е определена на 99,2%. Достигната е границата на количествено определяне от 5 mg/L. Методът е сравним със спектрофотометричното определяне [37].

Спектрофотометричен метод за определяне на флуориди е публикуван през 2018 година от Сухарева и колектив. Методът се основава на намаляване интензитета на цветни, комплексни съединения на метални йонни асоциати като Fe (III) и Al (III) вследствие конкуренцията на флуоридни йони. Този подход е прост и ефективен за определяне на флуориди. Достигнати са параметри на метода от (LOD) – 3,6 mg/dm^3, (LOQ) – 11,8 mg/dm^3. Приложимостта, обаче тук е за природни води [33].

При хроматографските методи за анализ, най често флуоридният йон се дериватизира с триетилхлоросилан до триетилфлуоросилан в присъствието на солна киселина. Дериватизация на флуоридният йон цели превръщането му в летливо съединение, каквото е триетилфлуоросилана, което може да се анализира със способите на газ-хроматографската техника. Химизма на превръщане на триетилхлорсилана до неговия летлив дериват – триетилфлуорсилан е представена в следните реакции:

$(C_2H_5)_3SiCl + H_2O + H^+ \longrightarrow (C_2H_5)_3Si(OH) + HCl$

(*Triethylchlorosilane*)

$(C_2H_5)_3Si(OH) + F^- \longrightarrow (C_2H_5)_3SiF + OH^-$

(Triethylfluorosilane)

Този способ е приложен и от Sarathchandraprakash и колектив, които след дериватизацията екстрахират триетилфлуоросилана с ксилен. Хроматографират на ZB-624 капилярна колона, при добавен циклохексан като вътрешен стандарт. *(Фигура 12)*. Постигната е добра повторяемост, точност, линейност и стабилни резултати [108].

Методът показва линейна концентрация в диапазона от 250μg/g до 2000μg/g. Точността е определена чрез добавяне на флуорид в три концентрационни нива - 50%, 100% и 200% от целевата концентрация на аналита. Точността е определена чрез възпроизводимост, която е изчислена в границити от 96 до 107 % за различните концентрации.

1.4. Изисквания към методите за анализ и контрол.

Приложими изисквания

В „Насоки за приложение I на Регламент 1223/2009 (ЕО) са указани изискванията за извършване на анализи, които трябва да съответстват на стандартите за добра лабораторна практика, т.е. да бъдат "валидни". Посочените изисквания препращат към Регламент (ЕО) № 440/2008, установяващ методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), където за признати се считат международни ръководства или стандарти, които да са в съответствие с принципите за добра лабораторна практика [26, 27, 28].

Проследявайки изискванията на законодателя в проекта са представени необходимите документи и записи от системата за управление в лаборатория за изпитване, които са в съответствие с изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025. Този подход е предприет с цел гарантиране достоверността на резултатите от анализ на избраните биоактивни съединения [6]. Познаване на стандартите за управление на лабораторните дейности и добрите практики са гаранция за предоставяне на достоверни данни от анализи. Въвеждането на система за управление на качеството (СУК) [70], каквато е тази съответстваща на изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025 оказва съществено влияние върху организацията и правилното функциониране на лабораторните дейности. Утвърждаването в лабораторията на добри практики (ДЛП) от друга страна е основата върху която се изгражда адекватна и работеща система за управление. Изискванията на СУК по БДС EN ISO/IEC 17025 и тези на ДЛП са определени в нормативни документи, а именно:

- БДС EN ISO/IEC 17025:2018 Общи изисквания относно компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране, публикуван на 14.11.2006г. от Български Институт по Стандартизация.
- Наредба за принципите, инспекцията и удостоверяването на добрата лабораторна практика, обн. ДВ. Бр. 74 от 24.08.2004г., в сила от 01.07.2005г., приета с постановление на МС №207/06.08.2004г. [18].

Осигуряване достоверност на резултатите от анализ. Предпоставки и система за управление на качеството при лабораторни анализи.

Как се гарантира и доказва достоверността на резултата от измерването?

- Закон за акредитацията – Изпълнителна Агенция Българска служба за Акредитация ИА БСА в сила от 14.01.2006 г. Акредитация по смисъла на този закон е признаването от ИА БСА на компетентността на физически или юридически лица да извършват дейностите по чл. 1, ал. 1. на закона. [7, 36]
- В БДС EN ISO/EC 17025:2018 „Общи изисквания към лабораториите за изпитване и калибриране.” [*6*] са определени изискванията към управленските процеси в лабораторията за изпитване и калибриране. Това са изисквания към управление на качеството, които ако са изпълнени гарантират правилно управление на всички други процеси в лабораторната дейност. Такива са процесите по отговорност на ръководството, осигуряване на независимост на лабораторията, създаване на подходяща политика и цели по качеството, създаване и внедряване на СУК, адекватна на изискванията, правила за изменения, оценка на доставчици на материали и услуги, удовлетворяване на изискванията на клиенти и други заинтересовани лица, правила за откриване и анализ на несъответствия, прилагане на подходящи коригиращи действия към тях, както и предприемане на превантивни такива, провеждане на одити и прегледи на СУК [67]. В раздел Техническите изисквания са представени процедури и правила, които осигуряват дейностите по компетентност на персонал, инфраструктура и работна среда, методи за изпитване и калибриране, технически средства – метрологична осигуреност, проследимост на измерванията, вземане на извадки/проби, манипулиране на пробите – подготовка за изпитване, изпитване и съхранение, осигуряване качеството на резултатите-контрол, достоверност, валидност и удовлетворяване на изискванията на заинтересованите страни [79].

Валидиране на методите за анализ

Процедурите за валидиране са задължителен елемент при разработването на метод. Валидиране е потвърждение чрез изследване и представяне на обективни доказателства, че конкретните изисквания за дадено специфично предназначение са изпълнени. Валидирането на метод представлява процес на потвърждаване, с помощта на обективни доказателства, за удовлетворяване на определени и предварително заложени изисквания. Изчисляването на

параметрите на метода и като крайна цел неопределеността на резултата се базира на познаването на характеристиките на метода и на проведените измервания [81]. Отчитат се експерименталните данни, получени по време на валидирането на метода (неопределеност тип А) [7]. При оценка на неопределеността се идентифицира целият набор от фактори, които оказват влияние върху измерването, като за изчислителната процедура се подбира разумен брой значими фактори (неопределеност от тип В) [79]. Представянето на крайният резултат от един анализ винаги е придружен с изчислената неопределеност. От значение за достоверността на един резултат, получен при изпълнението на определен метод са параметри на метода [118] като:

- *Работен диапазон (обхват) (Range)* – концентрационен обхват, в който получените резултати са с приемлива точност и прецизност. Работният обхват се определя чрез анализиране на проби с различна концентрация на определяемия компонент.
- *Граница на откриване – LOD (Limit of Detection)* – най-малкото количество аналит в пробата, което се открива, без да е необходимо да се определи количествено при посочените условия на изпитване (или може да се измери с достатъчна статистическа сигурност). Изразява се чрез формулата: $LD = \overline{X}_o + 3S_o$
- *Граница на количествено определяне – LOQ (Limit of Quantitation/ Quantification Limit или Limit of Reporting – граница на отчитане)* – най-ниската концентрация на аналита, която може да бъде определена с приемлива прецизност (повторяемост) и точност. Обикновено се приема, че границата на количественото определяне е най-ниското концентрационно ниво на калибрационната крива.

Изразява се чрез формулата: $LQ = \overline{X}o + 10So$, където:

$\overline{X}o$ е средната стойност на резултатите от измерването на празна проба;

So е стандартно (средно квадратично) отклонение на резултатите от празна проба.

Стандартно отклонение при възпроизводимост (Reproducibility Standard Deviation) – Стандартно отклонение на резултатите от измерване, получени при условия на възпроизводимост (мярка за дисперсията от разпределението на резултатите при условията на възпроизводимост).

1.5. Заключение от литературния обзор

1) След прегледът на научната информация по отношение на биологичното значение, законодателната рамка и аналитичните подходи може да бъде направено заключението, че биоактивните съединения в козметичните продукти са предмет на многоспектърни, обстойни проучвания. Големият брой научни публикации са доказателство за повишен интерес към биоактивните съединения, присъстващи в козметичните продукти, които имат все по-голямо значение не само за запазване на добрия външен вид, за забавяне процесите на стареене на кожата [47], но и за здравето. Фокусът в науката е насочен към антиоксидантното действие на тези биоактивни съединения, което е логично предвид превантивната им роля по отношение на забавяне процесите на стареене на кожата и запазване за по-дълго време на добрия вид на най-големия орган в човешкото тяло – кожата.

2) Развитието на аналитичната техника позволява прилагането на съвременни, високотехнологични *методи за анализ и контрол*, с които да се постига по-висока степен на сигурност на получените данни за състава на козметичните продукти. Проучваните методи са групирани по естество на изследваните съединения:

- **Течно-хроматографски методи** за анализ на витамин А, витамин Е и β-caroten, които са подходящи анализа на сложни проби с нелетливи съединения, особено биологично активни вещества.;
- **Газово-хроматографски методи** за анализ на Мастни киселини и Флуор, които са подходящи за разделяне, идентифициране и количествено определяне на летливи органични съединения.;

3) Въз основа на направения обзор става ясно, че е необходимо да бъде направен обстоен анализ на законовата рамка в областта на козметичните продукти, като проследим нейното развитие на национално и европейско ниво, като сравним ключови показатели, касаещи общественото здраве, а именно: *регистрация, отговорност и контрол*, както и да сравним приложимите *методи за анализ и контрол*, публикувани в европейски и национални методични документи.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на дисертационния труд е да се проучат и разработят методи за анализ и контрол на биоактивните съединения в козметични продукти, да се оцени и анализира информираността на потребителите относно ролята на биоактивните съединения.

За постигане на посочената цел е необходимо изпълнението на следните конкретни **задачи**:

1) Да се направи аналитичен преглед на нормативната база относно качеството и безопасността на козметичните продукти;
2) Да се предостави актуална информация за ролята, методите за анализ и контрол на избрани биоактивни съединения;
3) Да се разработят и валидират методи за анализ на избраните съединения - витамините А и Е, бета-каротен, мастно-киселинен състав и флуор;
4) Да се проучи информираността на групи анкетирани – потребители и специалисти, във връзка с ролята и безопасността на козметичните продукти.
5) Да се създадат информационни материали, с цел повишаване здравните познания на обществото по отношение безопасността и ролята на биоактивните съставки в козметичните продукти.

РАБОТНА ХИПОТЕЗА

Предоставяне на актуална информация за биоактивните съединения по отношение на значението им за общественото здраве, чрез проучване на законодателната рамка, информираността на потребителите и специалистите в областта на анализа и контрола, както и предоставяне на съвременни, валидирани методи за техния анализ и контрол.

ПРЕДМЕТ

Изследване на всички достъпни източници на информация – научна литература по предмета на изследване, анкетно проучване, нормативни и

стандартизационни документи – на национално и европейско ниво. Създаване на материали, с цел повишаване информираността на потребители и специалисти за биоактивните съединения, влагани в козметични продукти. Предоставяне на съвременни методи за анализ на избрани съединения и апробирането им, с цел доказване на тяхната приложимост.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Документален метод

Документалният метод е приложен при **проучването и анализа на законовата рамка**, чрез историческо проследяване на регулативните изисквания към козметичните продукти и влаганите в тях субстанции в ЕС и в България. Методът е приложен чрез сравнение на изисквания за времеви период от влизането в сила на директива 76/768/ЕИО, към промените приети с Регламент (ЕО) № 1223/2009 на Европейския парламент и Съвета на Европейския съюз от 2009 г. относно козметичните продукти, валидни и до сега.

Документалният метод е приложен и при **анализа на информация за ролята на биоактивните компоненти в козметичните продукти,** чрез преглед на данни публикувани в признати научни платформи, съдържащи бази данни с публикации, като Scopus, Pub Med, Research Gate, Elsevier и Science direct.

Документален е и метода за анализ и оценка на приложимите **изисквания, които осигуряват достоверност на резултатите от анализ.** Предпоставки за достоверност са изискванията, заложени в регламенти и стандарти, отнасящи се до процесите за управление в лабораторната дейност. По този начин са избрани, валидирани и приложени в настоящия проект методи за анализ на биоактивни съединения.

2.2. Аналитични методи и материали

За анализите на биоактивните съединения са използвани инструментални методи, с приложени **хроматографски техники**. Хроматографските методи за разделяне на веществата почиват на селективното изменение на скоростта на тяхната миграция при контакт между подвижна и неподвижна фаза. В

настоящата работа за определяне на изследваните съединения е използвана **газова (GC) и високоефективна течна хроматография (HPLC)**. При газовата хроматография, разделянето на веществата се извършва върху неподвижна твърда фаза, нанесена на тънък филм върху вътрешната стена на капилярна колона, а подвижната фаза е газ, докато при течната хроматография разделянето се осъществява също върху неподвижна твърда фаза, с която е запълнена колоната, като подвижната фаза тук е течна.

На основата на разгледаните в литературния обзор предпоставки за избор на методи за анализ на целевите биоактивни съединения, бяха подбрани и приложени:

- **UHPLC-HRMS метод за анализ на транс-ретинол, алфа-токоферол и бета-каротен.** Мас спектрометрията (MS) идентифицира съединенията като съотношение на атомната маса към заряда на молекулата на аналита. UHPLC, в комбинация с масова спектрометрия с висока разделителна способност (HRMS) [63]. UHPLC – MS е високотехнологичен хроматографски метод, който е подходящ за нашата цел. Благодарение на HRMS се постига висока селективност на силно разредения разтвор на пробата, което позволява да се снижат максимално матричните пречения и да бъде избегната сложната процедура по пречистване и евентуалните загуби от нея, неизбежна при използване на други методи на анализ. Разделянето на съединенията е извършено на обратно-фазова колона C_{18} EVO 100 x 3 mm 0.26µm, с градиентен режим на работа, който стартира при съотношение 1:1 на метанол и ацетонитрил до 1:1 на тетрахидрофуран и ацетонитрил със скорост на потока 0,5ml/min, за 10 min. Идентифицирането е по време на задържане и масспектрална детекция с висока разделителна способност в режим „сканиране“ в диапазона 100-500 m/z.

- **GC/FID метод за анализ на мастно киселинен състав и флуор.** Газовата хроматография е метод за разделяне на летливите съединенията основно на базата на точката на кипене и молекулното тегло. Качественото и количествено определяне извършихме на пламъчно-йонизационен детектор (FID). Анализът на флуор и мастни киселини с GC/FID е след предварително дериватизиране с подходящи реактиви до летливи съединения.

При анализът на флуора приложихме техника на инжектиране от парова фаза (head-space - HS). Техниката на инжектиране от парова фаза се прилага

след постигнато равновесие в затворената система между пари и течност в контейнера с пробата, които са термостатирани при 70°C Предимствата на този способ на инжекция в хроматографската колона са безспорни тъй като спестяват от предварителната подготовка на пробата при изолиране на целевата субстанция и значително снижават на загубите.

Валидирането на методите е осъществено съгласно изискванията на БДС EN ISO 17025:2018, принципите за акредитация и тези на GLP.

Съставен е план за описание на методите, който съдържа следните основни позиции:

- Принцип на метода
- Материали и реактиви
- Подготовка на пробата
- Хроматографски анализ и резултати

За доказване валидност на методите по избраните показатели са изчислени следните индикаторни за приложимостта и адекватността параметри, като:

- Граница на откриване (откриваем минимум) LOD;
- Граница на определяне (чувствителност) LOQ;
- Повтаряемост, изразена с относителното стандартно отклонение (RSD %);

Като материал за проведеждане на собствените изследвания, с цел да се демонстрират внедрените методи за анализ на биоактивните съединения са закупени избрани продукти от търговската мрежа. Подборът на пробите за анализ е направен на случаен принцип. Някои от пробите са с обявено в наименованието си или на етикета съдържание на конкретни биологично активни съединения.

2.3. Социологически и статистически методи

Социологическият метод на проучване е чрез анкетна форма, насочена към две целеви групи, имащи отношение към проблематиката разгледана в дисертацията. Първата целева група са ползватели (потребители) на козметичните продукти, а втората са специалисти и отговорни лица, работещи в регулативни органи и лаборатории, в които се извършва контрол и анализ на козметични продукти.

Анкетата съдържа 33 въпроса. Въвеждащите въпроси в анкетата дават информация към коя целева група е анкетирания, пол, възраст и образование.

Втората група въпроси се отнася за отношението и информираността на попълващия към козметичните продукти и присъстващите в тях биологично активни съединения.

Проведеното проучване на информираността на потребители и участници във веригата на производството и контрола на козметични продукти е чрез общи и специфични техники в т.ч.: пряка анкета с представителна извадка от потребители на козметични продукти и специалисти от контролни органи, лаборатории и производители.

Анкетното проучване е направено като са използвани възможностите, както на съвременните **софтуерни платформи (**https://docs.google.com/forms/u/0/), електронна поща и социални мрежи като *facebook* и *linkedin* на които са предоставяни онлайн формуляри за попълване - google forms, така и на **традиционната техника** – събиране на отговорите на хартиен носител.

Данните от анкетата са обработени с помощта на специализиран статистически пакет за персонален компютър – **SPSS for Windows, ver. 25.0.**

Статистическите методи, които са приложени са описателна статистика - анализ на честотни количествени и категорийни разпределения и непараметричен анализ - статистическа обработка на взаимовръзката между някои от въпросите с **Fisher's Exact test**.

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Проучване и анализ на законовата рамка за козметичните продукти.

В съответствие с европейското законодателство регламентът е нормативен акт от най-висок ранг, неговите изисквания са пряко приложими за всички държави-членки на ЕС, имат задължителен характер за прилагане от правните субекти и приоритет пред националните правни документи. В областта на козметичното законодателство такъв е Регламент 1223/2009 (Регламента), с чието приемане за първи път в България не се налага въвеждане на национални нормативни документи, които да бъдат хармонизирани с тези на общността. До 2009 година, преди влизане в сила на Регламента в България е в сила регулацията по Наредба 36 за изискванията към козметичните продукти [16], чиято основа е изградена върху постулатите на Директива 76/768/ЕИО. Регламент 1223 на Европейския парламент и Съвета на Европейския съюз влиза в сила на 11 юли 2013г., като с текста си записан в чл. 38 той отменя Директива 76/768/ЕИО, считано от датата на влизане в сила с изключение на член 4б, който е отменен още на 1 декември 2010 г. и въвежда ограничения, условия за употреба и приложение на определени вещества. С въвеждането на Регламента се постигна хармонизиране на правилата на Общността, в член 1 на който е определено приложното поле, чрез установяване на правила с които трябва да бъде съобразен всеки козметичен продукт предоставен на пазара. Целта е да се гарантира функционирането на вътрешния за Общността пазар и защита на човешкото здраве. Осигуряването на висока степен на защита на човешкото здраве е предвидено да се постигне чрез **засилване ролята на контрола на пазара**.

В **Раздел III, чл. 49 на Закона за здравето**, от 1 до 12 точка са посочени здравните изисквания на които трябва да отговарят козметичните продукти, за да бъдат безопасни за човешкото здраве, при уточненението да се използват в нормални и разумно предвидими условия. Здравните изисквания на законодателя препращат напълно към постулатите на хармонизираното законодателство, а именно Регламент 1223. Затова в дисертационния труд

направеният анализ на законовата рамка е сведен до двата значими нормативни документа: Регламент 1223 и Наредба № 14 (Наредбата). Наредбата отменя и заменя Наредба 36, в чиито изменения от 2007 и от 2008 г. са въведени изискванията на Директива 76/768/ЕИО, обвързани с приемането на България в ЕС и необходимостта от хармонизиране на нормативната уредба в област козметика. Анализът е направен по ключови показатели като:

- **Регистрацията на продукта** – компетентни органи, досие, отговорности;
- **Здравен контрол** и надзор на пазара и
- **Методи на анализ** и контрол на козметичните продукти.

Преди влизане в сила на Регламента и на Наредбата по отношение на регистрацията на козметичните продукти бе определено, че разрешение се издава от главния държавен здравен инспектор съгласно чл. 50 от Закона за здравето, а самата регистрацията се извършва в съответната районна здравна инспекция (РЗИ), като режимът на регистрация до този момент е уведомителен и отговорностите са възложени на лицата, произвеждащи или пускащи за първи път (когато е от внос) козметичния продукт на пазара, което кореспондира с понятието „отговорно лице“, посочено в Регламента. Важен недостатък бе, че не е конкретизирано лицето, което пуска на пазара козметични продукти дали е дистрибутор или вносител, както това е съвсем ясно определено при отговорностите по Регламент 1223.

Изводът от това сравнение е, че в Регламента са въведени единни за Общността правила за регистрация, в които са предвидени всички възможни обстоятелства, касаещи здравната безопасност.

Уведомителният режим при пускане на пазара на нов козметичен продукт определен в Директива 76 изискваше от страните-членки да осигурят сътрудчество на компетентните си власти, когато това е необходимо. Като резултат бе изградена Платформа за наблюдение на козметика на европейския пазар [104], чиято цел бе улесняване на сътрудничеството чрез обмяна на информация, развитие и въвеждане на общи проекти, обмяна на експертиза и добри практики.

Преди влизане в сила Регламент 1223, който въвежда понятието "отговорно лице“ по отношение на безопасността, оценката се извършваше от квалифицирано лице, а контрола на органите на държавния здравен контрол по реда на Закона за здравето. В настоящата ситуация само козметични

продукти, за които е определено в рамките на ЕС "отговорно лице" могат да бъдат пуснати на пазара. Регламентът изисква точно идентифициране на отговорното лице, с ясно определени задължения. В Член 4 и 5 на Регламента са посочени изискванията за отговорно лице и неговите задължения, защото: «На пазара се пускат единствено козметичните продукти, за които в рамките на Общността дадено юридическо или физическо лице е определено като отговорно лице.” Определени са и отговорностите, тогава когато продуктите са доставени от трети страни и по интернет (чл. 4).

Отговорните лица най-общо могат да бъдат разделени на три групи: производители, вносители и дистрибутори. За всеки козметичен продукт отговорното лице гарантира спазването на Регламента. За продукти, произведени в Общността, които са изнесени и отново внесени, отговорно лице е производителят. Когато козметичен продукт е от внос, то съответния вносител е отговорно лице за всеки конкретен продукт, пуснат на пазара. Дистрибуторът е отговорно лице, когато пуска на пазара козметичен продукт със собствена търговска марка, или променя продукт, вече пуснат на пазара, по начин, който може да засегне спазването на приложимите изисквания. Когато козметичен продукт, не е в съответствие с Регламента, то съответните отговорни лица имат задължение да приложат коригиращи действия за привеждането му в съответствие, за изтегляне или изземане, незабавно да информират и да сътрудничат на компетентните национални органи. Следователно ***съществената разлика в законовата рамка е преминаване от национален здравен контрол към надзор на пазара в общността, с категорично и ясно дефиниран механизъм за контрол*** (чл. 4 от Регламент 1223).

Друга разлика се явява при отговорностите, възложени на лицата: квалифицирано лице, което по предшестващата уредба е лицето извършило оценката за безопасност на козметичния продукт, а отговорно лице по Регламент 1223 това е лицето което е нотифицирало продукта в CPNP.

За целите на ефикасния надзор на пазара на **един единствен адрес** на територията на Общността трябва да е налице **досие** с информация за продукта, което се предоставя на разположение на компетентния орган на държавата-членка, в която досието се съхранява. **Cosmetic Product Notification Portal** (CPNP) е онлайн нотификационна система, която е създадена за прилагане на Регламента. Потребители на CPNP са отговорните

лица, дистрибуторите, компетентните органи и центровете по токсикология. CPNP предоставя част от информацията по електронен път на компетентните органи, с цел надзор на пазара, пазарен анализ, оценки и информация за потребителите, на токсикологичните центрове или други подобни заведения за целите на медицинското лечение. Досието с информация за продукта съдържа следната информация: описание на козметичния продукт; доклад за безопасността на козметичния продукт, посочен в член 7, параграф 1; описание на технологията на производство и удостоверение за съответствието с добрата производствена практика, посочена в член 5. Отговорното лице съхранява и предоставя досието с информация за продукта в електронен или друг формат, на компетентните органи.

С приемането на Регламент 1223 са постигнати следните **подобрения** в единното козметично законодателство на ЕС и **могат да се направят следните изводи:**

- ***Премахнати са законовите неясноти и несъответствия. Несъответствията могат да бъдат обяснени с големия брой изменения (55 към днешна дата) на Директива 76/768/ЕИО и пълната липса на набор от определения.;***
- ***Премахнати са разминаванията, получени в резултат на транспонирането в националните законодателства, които увеличават нормативната тежест и административните разходи, без обаче да допринасят за безопасността на продуктите. С приемането си Регламентът става задължителен и не е необходимо да бъде транспониран в конкретно национално законодателство, което спестява разходи и дава сигурност по отношение на здравната безопасност.;***
- ***Осигурена е безопасност на козметичните продукти, пуснати на пазара на ЕС, като се имат предвид иновациите в сектора. Постигането на баланс между „отговорността на производителя“ и „подробно нормативно регулиране на отделните съставки“ е ключов елемент тъй като Директивата е разработена преди повече от 30 години за регулиране на всички съставки, използвани в козметичните продукти, „съставка по съставка“. Този остарял подход се оказва не достатъчен, за да се осигури безопасността на пуснатите на пазара козметични продукти. Става ясно, че аспекти като отговорност на производителя и контрол на пазара, които са значими фактори за осигуряване***

безопасността на продуктите в този иновативен сектор да бъдат изведени като водещи в регулативните изисквания.

България, като член на Европейският Съюз е хармонизирала своето законодателство с Европейското. При направеният анализ на страницата на БИС е намерен публикуван един хармонизиран по Регламент (ЕО) № 1223/2009 български стандарт и това е **БДС EN ISO 22716:2008 Козметични продукти. Добра производствена практика (GMP).** Указания относно Добрата производствена практика. Този международен стандарт дава указания за производството, контрола, съхранението и експедирането на козметични продукти. Указанията обхващат аспекти, свързани с качеството на продукта. Стандартът дава ценни насоки за производство, контрол, съхранение и експедиране на козметични продукти и възможност на козметичните компании да отговорят на изискванията на Регламент 1223/2009 относно козметичните продукти.

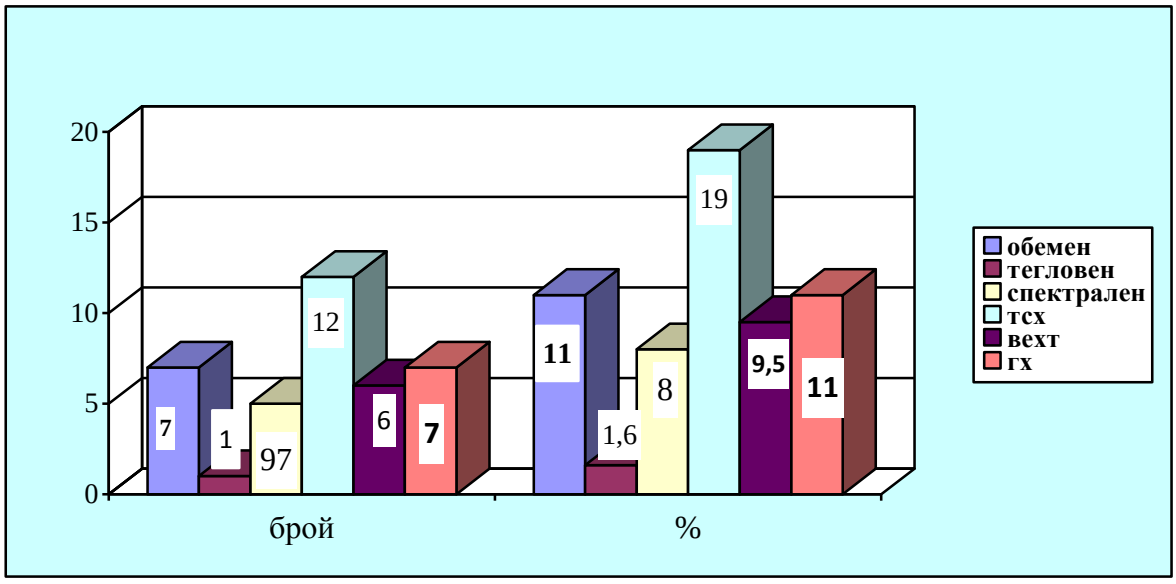
Във връзка с избраните биоактивни съединения, направихме **преглед на методите**, които се използват за **анализ и контрол**.

3.1.1.Методи за анализ и контрол

Проучени са методите за анализ, публикувани в хармонизираните стандарти - Наредба 14 и в Регламент 1223. Описани са 38 броя физико-химични методи за изпитване на козметични продукти, които са публикувани в Наредба 14/2014 на МЗ за определяне на подробни правила за представяне на информацията по чл. 19, параграф 4 на Регламент (ЕО) № 1223/2009 относно козметичните продукти, изисквания за ефикасност на слънцезащитните козметични продукти и химичните методи за проверка състава на козметичните продукти. На *Таблица 4* са представени **приложимите методи по техния принцип на изпитване**. В наредбите са представени седем метода за обемен анализ, един за тегловен анализ, пет метода за спектрално изпитване и двадесет и пет хроматографски метода. Хроматографските методи от своя страна са дванадесет с тънкослойно хроматографски (ТСХ), шест високоефективна течна хроматография (ВЕХТ) и седем газовохроматографски метода (ГХ).

Таблица 4 *Методи за анализ и контрол, групирани според принципа на изпитване*

Принцип на метода	***брой***	***%***
Обемен	7	11
Тегловен	1	1,6
Спектрален	5	8
Хроматографски - общо	25	40
ТСХ	12	19
ВЕХТ	6	9,5
ГХ	7	11
Общо методи	***63***	



Фигура 4 *Графично представяне на стандартите, групирани според принципа на измерване*

От данните, представени на таблицата става ясно, че хроматографските методи за анализ заемат най-голям дял. Прави впечатление големият брой ТСХ методи, които намират приложение при анализа на козметичните продукти. ТСХ се използва не само за изпитване, но и за разделяне на

съединенията, т.е. за получаване на чисти вещества и последващото им количествено определяне, поради което намира широко приложение в аналитичната практика.

При прегледът и анализът на детекция при хроматографските методи се установи, че качествения и количествения анализ на контролираните показатели се извършва основно с пламъчно-йонизационен, по-рядко с катарометър, електронулавящ и рефрактив индекс детектори. Посочените, обаче методи са създадени и публикувани най-вече за целите на здравния контрол и са предназначени за контрол и анализ на показатели, осигуряващи здравето и безопасността на потребителите.

Методите в двата документа са идентични и в тях ***не са намерени методи за анализ на интересуващите ни биоактивни съединения,*** което ни даде основание да направим проучване на публикуваните в научни списания и стандарти методи и да ги валидираме за целта на настоящия проект.

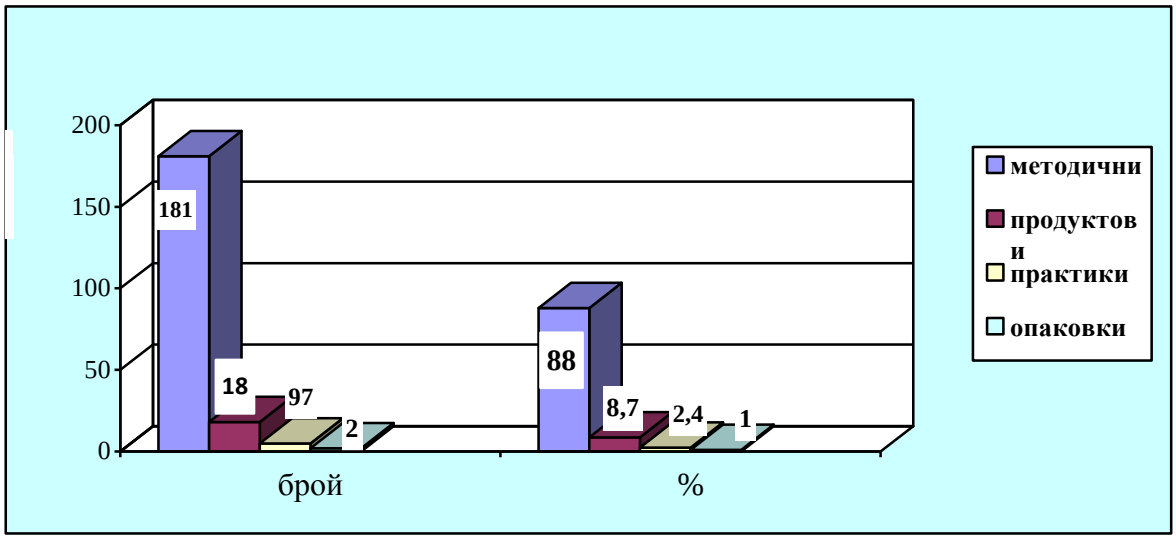
3.1.2. Анализ на стандартизацията в козметиката

Проучени са методите за контрол от хармонизираното ни национално законодателство, които са публикувани в Наредба 14/2014 на МЗ. Анализът показа наличието на 63 метода за анализ, за целите на контрола на козметичните продукти. Посочените методи, обаче касаят безопасността на продуктите и то във връзка с нейната оценка. ***Не са намерени методи за анализ и контрол на биологично активните съединения, предмет на нашето проучване.***

Направен е **преглед на публикуваните стандарти от страницата на Български Институт по Стандартизация, за Технически комитет 19** (ТК-19) „Козметични и ароматични продукти. Повърхностно-активни вещества.“. Намерените стандарти са представени на *Таблица 5* по тяхното **предназначение в четири обособени групи**: методични, продуктови, практики с указания за производство и за опаковки.

Таблица 5 *Стандарти в БИС, ТК 19, групирани по предназначение*

БИС стандарти в ТК 19 козметика		
	Брой	***%***
Методични	181	88
Продуктови	18	8,7
Практики	5	2.4
Опаковки	2	1
Общо	***206***	***100***



Фигура 5 *Графично представяне на стандартите, групирани по предназначение*

При прегледа бяха намерени общо двеста и шест стандартизационни документа в Технически комитет 19, от които 88% или сто осемдесет и един броя са методични стандарти, осемнадесет продуктови (9%), пет указващи добри практики (2%) и два отнасящи се за опаковки (1%) на козметични продукти. От графиката е видно, че най-голям е броят на методичните стандарти, но те се отнасят основно за оценка безопасността на козметичните продукти, във връзка с опазване здравето на потребителите. Сред проучените не са намерени стандартни методи за анализ и контрол на вложените в

козметичните продукти биологично активни съединения, с позитивно действие. Такива са публикувани в редица научни статии и обзори, представени в литературния обзор на дисертацията. Това е и една от причините да предприемем проучване, описание и внедряване на аналитични методи за биологично активните съединения, които са предмет на нашето проучване.

В ледващият раздел ***„Биологично активни съединения в козметични продукти. Методи за анализ и контрол - описание. Резултати от анализ на избрани съединения.“*** са описани методите и са представени резултати от анализа на козметични продукти, които ги съдържат.

3.2. Биологично-активни съединения в козметични продукти. Методи за анализ и контрол. Резултати.

3.2.1. UHPLC-HRMS метод за анализ на витамин А, витамин Е и бета-каротен в козметични продукти

Принцип на метода

Приложена е аналитична техника на ултра високоефективна течна хроматография (UHPLC), с мас-спектрометрична детекция и висока разделителна способност (HRMS). Количественото определяне е направено чрез сравнение големината на хроматографските пикове на разтвори на стандартните съединения с тези на анализираната проба с помоща на създадена програма в софтуера към апарата. Идентифицирането е по време на задържане в хроматографската колона и масспектрална детекция в режим „сканиране“. Основния йон, получен от масспектъра и времето на задържане при съответните концентрации на стандартните разтвори са съответно за:

- Витамин А (като all trans-retinol) - ***m/z*=**269.226 ***Da,*** при концентрация на стандартния разтвор 250 μg/g и време на задържане в колоната RT = 4.21min,
- Витамин Е ацетат (като DL-α-Tocopherol acetate) - ***m/z*=** 473.392 ***Da,*** при концентрация на стандартния разтвор 300 μg/g и време на задържане в колоната RT = 2.78 min,
- Бета-каротен (като β-Carotene) - ***m/z*=** *536.438.**Da,*** при концентрация на стандартния разтвор 250 μg/g и време на задържане в колоната RT = 4.55 min,

Материали и реактиви

- Стандартни/референтни вещества:
- Retinol synthetic, ≥95% (HPLC), crystalline , Sigma-Aldrich, cat. No R7632-25MG
- DL-α-Tocopherol acetate, Sigma-Aldrich, cat. No T 3376-5G;
- β-Carotene synthetic, ≥93% (UV), powder, , Sigma-Aldrich, cat. No C9750-5G;
- Ацетонитрил с квалификация „За LC/MS”
- Метанол с квалификация „За LC/MS”
- Тетрахидрофуран с квалификация „За LC/MS”
- N-Hexane за HPLC, ≥97.0% (GC)

- Мравчена киселина с квалификация „За LC/MS”
- Филтри с големина на порите 0,45µm
- Стандартно лабораторно оборудване: Везна с точност ±0,1мг, ултразвукова вана чаши, колби и др.;

Апарат за улта високоефективна течна хроматография UHPLC, състоящ се от кватернерна помпа „Exela”, аутосамплер “Exela” и масспектрометичен детететектор с висока разделителна способност .

Приготвяне на стандартен разтвор

В мерителна колба от 50 ml се претегля с точност до ±0.1mg по около 15 mg от съответната сравнителна субстанция, като процедурата се ивършва при редуцирана светлина. Внесените стандартни/референтни вещества се разтварят с около 40 ml хексан, след което колбата се долива с хексан до марката. Разтворът се съхранява при -20^{o}C, за не по-дълго от 10 дни. Изчислените концентрации на разтворите на сравнителните субстанции са съответно 250 µg/g за транс-ретинола и за бета каротена и 300 µg/g за алфа-токоферола.

Подготовка на пробите

В бехерова чаша се претегля 1±1x10^$^{-3}$g от изследваната проба**,** като процедурата се извършва при редуцирана светлина. С 4-5 порции от по 15 ml хексан и използване на ултразвук претеглената проба се пренася количествено в мерителна колба от 100 ml и се допълва с хексан до марката. Хомогенизира се чрез разклащане и част от така получената суспенсия се филтрува през филтър с порьозност 0.45 µm. Филтратът се събира в шишенце за аутосамплер от 2 ml от амбър стъкло напълнено догоре, затваря се херметично и се съхранява до анализа при температура -20^{o}C.

Така подготвените проби и стандартни разтвори се постават в аутосемплера на апарата.

Хроматографски анализ и резултати

Разделянето се извършва в хроматографската колона C_{18} EVO 100 x 3 mm 0.26µm и достигане до MS детектора. Инжектира се 0,2 µl от стандартния разтвор и от пробата, при следните условия:

Подвижна фаза: градиент от 50% метанол в ацетонитрил до 50% тетрахидрофуран в ацетонитрил. Скорост на елуиране: 500 µl/min

Идентифицирането е по време на задържане (RT, min) в хроматографската колона и по съотношението маса/заряд (m/z) на положително заредения молекулен йон на бета-каротена.

Определянето на концентрацията на активната субстанция в пробата се пресмята по формулата:

$C, \mu g/ml = A_1 . c_{st} . n / A_{st}$, където:

C - Съдържанието на активната субстанция в пробата в µg/ml;

A_1 – Площ на пика на активната субстанция в пробата;

A_{st} - Площ на пика на сравнително/референтно вещество в стандартния разтвор;

n - Степента на разреждане (1/100)

c_{st} - Концентрация на стандартния разтвор, µg/ml;

Валидирането е извършено при стандартни лабораторни условия.

Граница на откриване: 1 µg/g

Граница на количествено определяне: 5 µg/g

Повтаряемост: RSD=3.5%

Резултати

Резултатите от нашият експеримент са представени под формата на хроматографски спектри за отделните биоактивни съединения, кратки описания и цифрови стойности от анализа на съединенията за които са получени резултати.

Разработеният метод, за да бъде внедрен в практиката е апробиран и върху реални козметични продукти. **Пробите на козметичните продукти, които бяха изследвани са:**

1) **Проба А** - Ревитализиращ крем за лице с витамини, който бе закупен от търговската мрежа. Представеният за анализ крем за лице е в оригинална опаковка, с етикет поставен като неизтриваем надпис върху нея. Върху етикета на крема е обявено, че съдържа витамин А и витамин Е. Посочената проба е анализирана за съдържание на витамин А, като trans-retinol и на витамин Е, като tocopherol acetate.

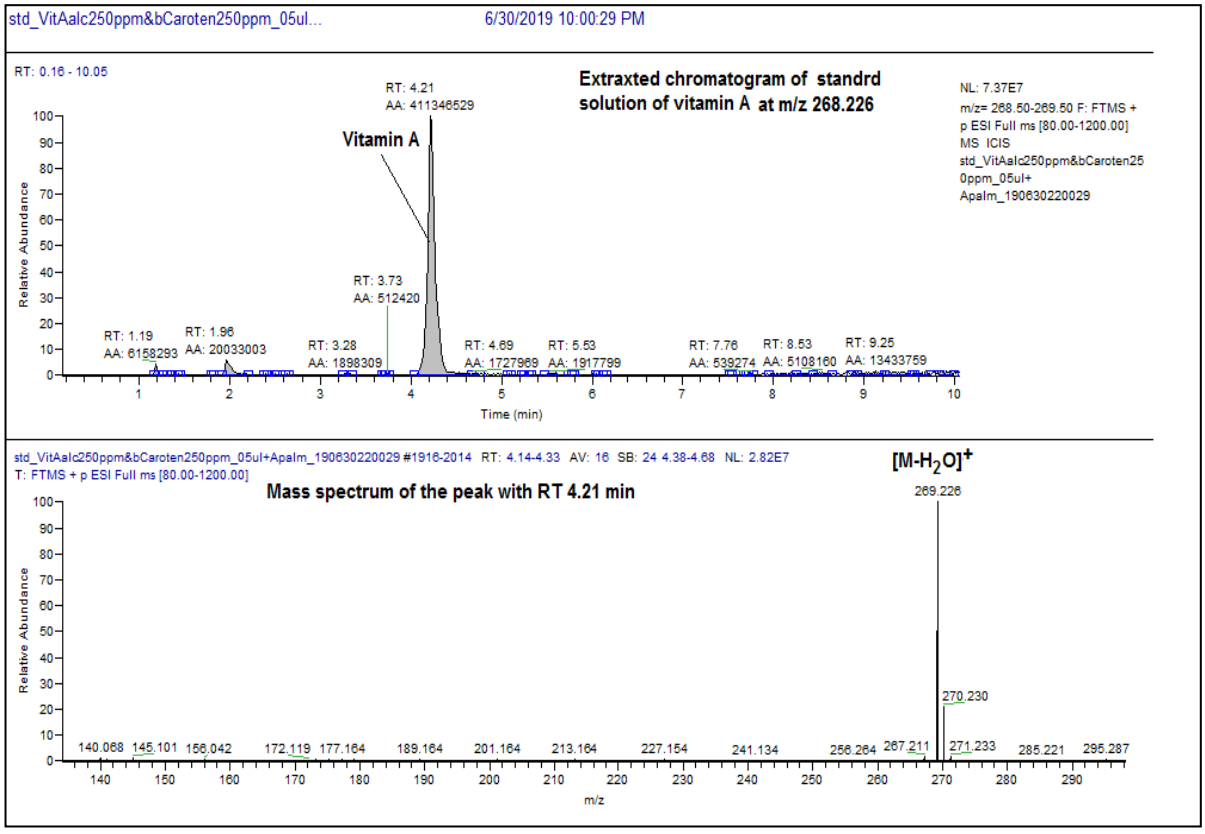
2) **Проба Б** - Козметичен крем, който е със запис върху етикета, че съдържа β-carotene и е закупен в магазин - дрогерия, в която се предлагат продукти с претенция за натурален произход. Посочената проба е анализирана за съдържание на β-carotene.

3.2.1.1. Витамин А

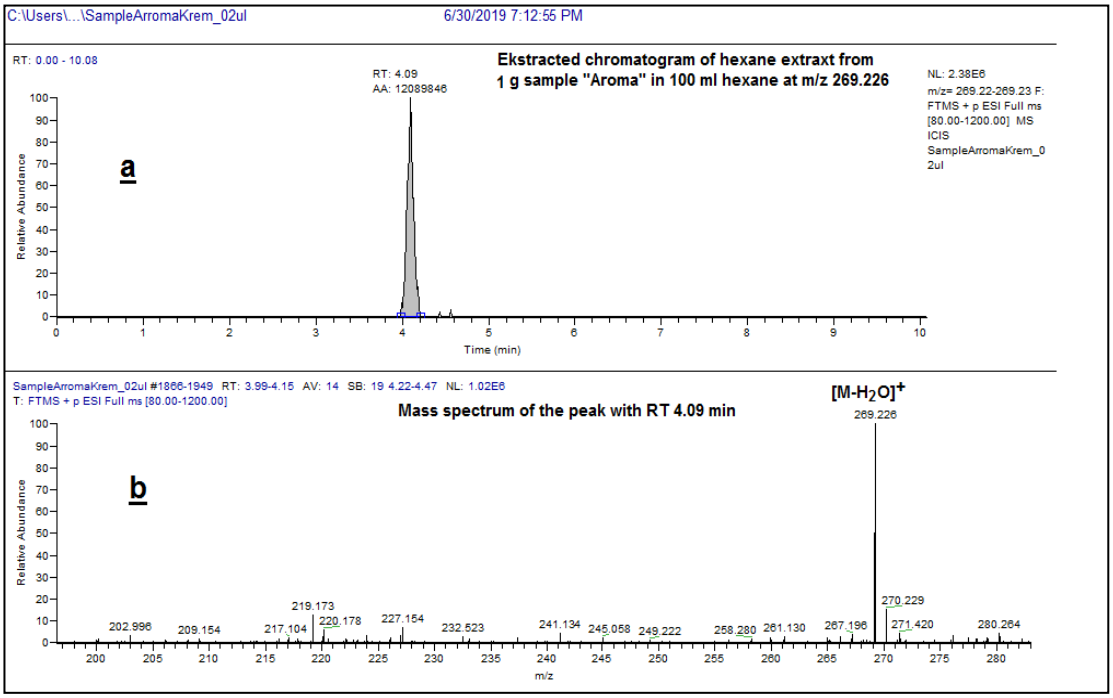
Съдържанието на витамин А е определено като trans-retinol.

Инжектираният в колоната обем е 0,5 µl. Идентифицирането е чрез мас-детекцията, по съотношение маса/заряд при m/z=269.226 на дехидратирания ретинол и времето му на задържане в хроматографската колона. Количественото определяне е по площ на хроматографския пик.

На **фигура 6** са представени хроматограма и мас-спектъра на стандартен разтвор на витамин А от който се вижда, че времето на задържане е RT=4,21 min.



Фигура 6 *Хроматограма на стандартен разтвор на ретинол.*



Фигура 7 *Хроматограма на проба „А“ за retinol*

Анализът на проба (А) за определяне съдържанието на retinol е извършен като са инжектирани 0,2 µl от подготвения хексанов екстракт.Установеното време на задържане в хроматографската колона е 4,09 min, а масата на дехидратирания йон на retinol на проба „а“ е при m/z 269,226. На етикета на пробата е обявено, че е обогатена допълнително с витамини А и Е.

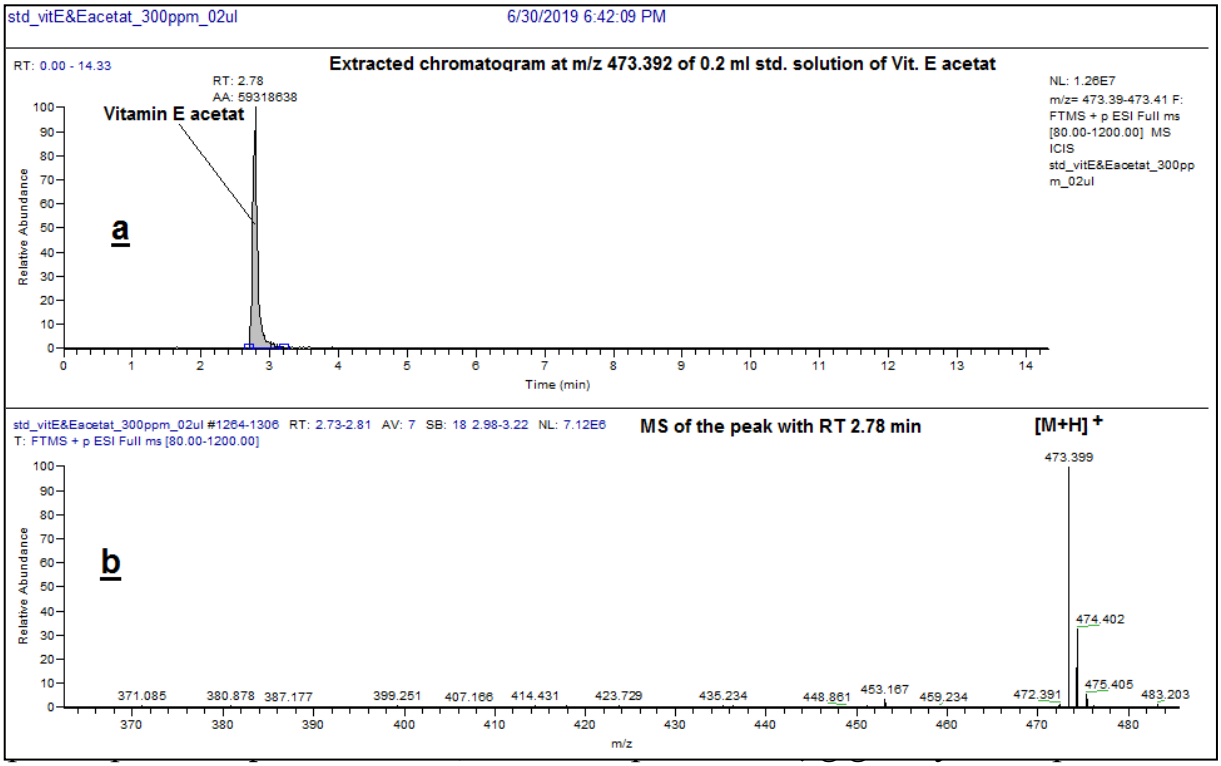
Намереното количество е 3,1±0,1 mg/g.

3.2.1.2 Витамин Е

Съдържанието на витамин Е е определено като витамин Е ацетатна форма (**tocopherol acetate**).

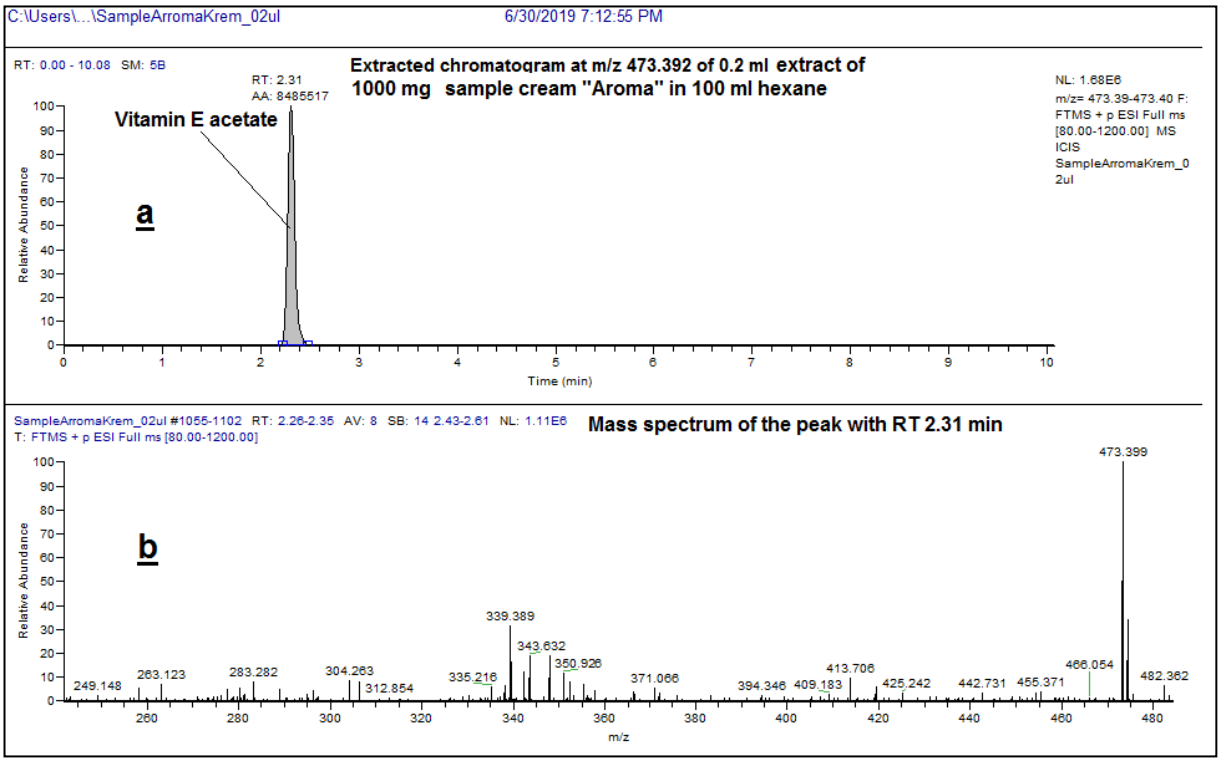
Инжектираният в колоната обем е 0,2 µl. Идентифицирането е чрез мас-детекцията, по съотношение маса/заряд при m/z=473,392 и времето му на задържане (RT) в хроматографската колона, което за tocopherol acetate е RT=2,78 min. Количественото определяне е по площ на хроматографския пик.

На **фигура 8** са представени хроматограма и мас-спектър на стандартен разтвор на tocopherol acetate.



Фигура 8 *Хроматограма на стандартен разтвор на tocopherol acetate*

UHPLC/ESI-HRMS при разделяне на колона C_{18} EVO 100 x 3 mm 0.26µm с градиент режим на работната програма, с дебит на елуента 500 µl/min и масспектрална детекция.



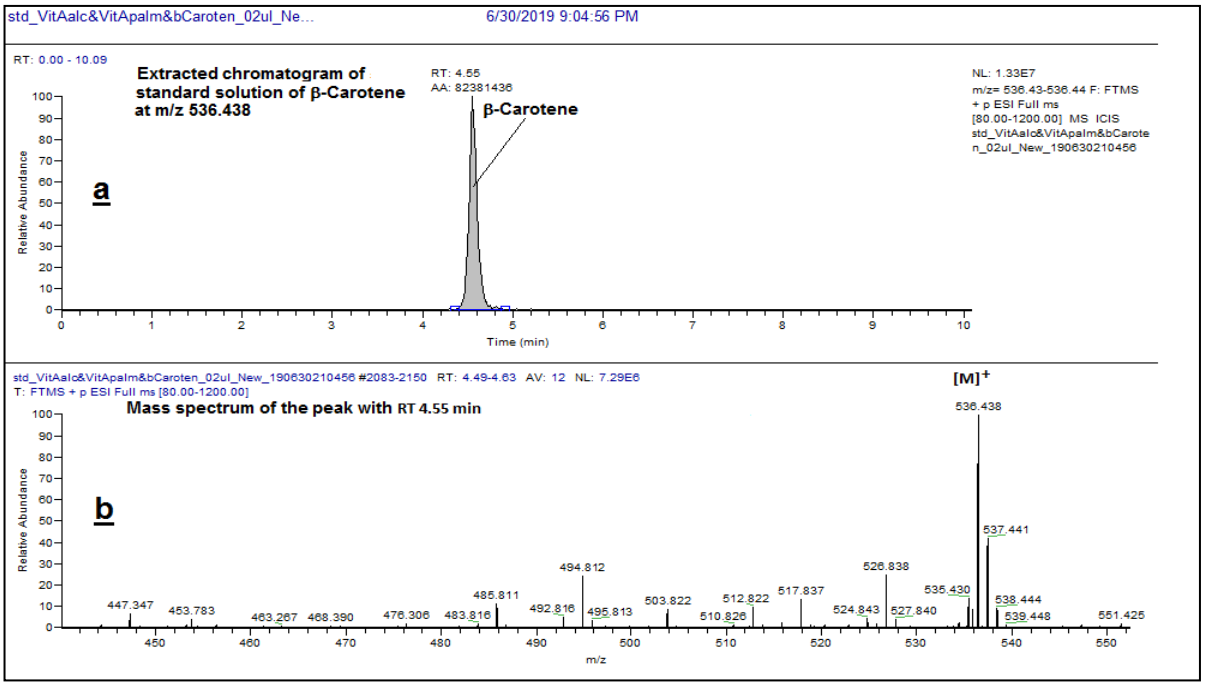
Фигура 9 *Хроматограма на проба „А” за tocopherol acetate*

Резултатите от анализираните проби (**фигура 9)** са изчислени чрез пряко сравнение на площите на пробата с тези на стандартния разтвор, като е взето в предвид количеството проба и степента на разреждане.

Изчисленото съдържание на tocopherol acetate в пробата е 4.2±0,2 mg/g.

3.2.1.3. Бета-каротен

Съдържанието на *бета-каротен* определено като е инжектиран стандартен разтвор в колоната, в обем 0,2 µl. Идентифицирането отново е чрез масспектрална-детекцията, при m/z= 536.438 и времето му на задържане (RT) в хроматографската колона RT=4,55 min. Количественото определяне е по площ на хроматографския пик.



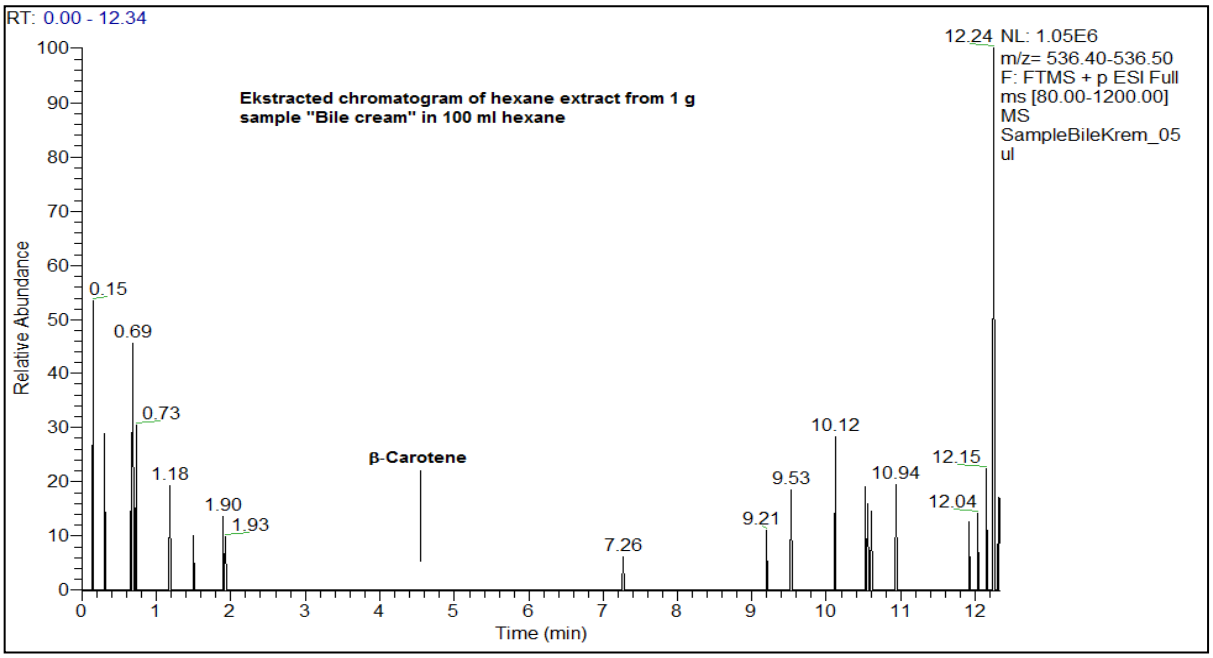
Фигура 10 *Мас-спектър и хроматограма на стандартен разтвор на β-carotene*

На хроматограмата е представен мас спектъра (b) на стандартен разтвор на β-carotene, с инжекционен обем 0,2 µl. Идентифициран е положително заредения молекулен йон с m/z= 536.438 (a) и време на задържане в хроматографската колона RT 4.55 min

При същите хроматографски условия е направен анализ на проба „Б“ – крем за лице.

Екстрахираната LC/MS хроматограма на хексанов екстракт от проба „Б“ при m/z 536.438 показва, че в нея не се открива β-каротен въпреки, че на етикета

на пробата е обявено, че го съдържа. Пробата е закупена от търговец – дрогерия, който заяви претенции за оригиналност на рецептата.



Фигура 11 *Хроматограма на хексанов екстракт от проба „Б“ за β-carotene*

Преимуществата на разработения метод се изразяват в едновременното определяне на три биологичноактивни съединения, което съкращава времето за анализ и необходимостта за прилагане на три отделни методики за определяне на витамин А, витамин Е и β-каротен. Елиминирането на етапа на пробоподготовка, повишава икономичаската рентабилност/ефективност на методиката, поради избягване на употреба на екстатенти и реактиви с висока чистота, които носят и висока цена. В допълнение на това, прилагането на мас-детекция определя и високата специфичност на метода, като елиминира възможността за неправилна идентификация, само по времето на задържане на пиковете, с други компоненти на пробата.

3.2.2. GC-FID метод за анализ на мастно-киселинен състав на козметични продукти

Принцип на метода

Методът по който е анализирано съдържанието на мастните киселини е газово-хроматографски, с пламъчно-йонизационна детекция (GC/FID) на метилираните мастни киселини (FAME), които са получени чрез дериватизация на екстрахираната мазнина. Методът дава възможност да бъдат изчислени количествено както индивидуалните мастни киселини, така и следните групи: наситени; мононенаситени; полиненаситени, както и групирането им в омега- 3, 6 и 9 и транс- мастни киселини.

Апарати, материали и реактиви

- Апаратура: Газов хроматограф TRACE 1300 GC; Column 30m x 0.25mm ID,0.25µm-полярна фаза, оптимизирана за FAME анализи; Пламъчно–Йонизационен Детектор FID; Инжектор за капилярни колони Instant Connect Split/Splitless; Хроматографски софтуер Chromeleon 7.1 и компютърна конфигурация към него; Аналитична везна с точност ±0,0001 g.;
- Общо лабораторно оборудване, като камина, стъклария и други материали;
- Газове – азот, водород и въздух с хроматографска чистота;
- Метанолов разтвор на калиева основа с приблизителна концентрация 2 mol/L;
- Реактивите за приготвяне разтворите са с аналитично качество - чист за анализ за Метилов алкохол абс., изооктан, натриев сулфат монохидрат, калиева основа, кисел натриев сулфат монохидрат, натриева основа и дихлорметан.
- Стандартен микс - CRM 37-Component FAME Mix;

Подготовка на пробата и анализ

Мазнините се извличат с петролев етер, след което колбата с екстракта се суши при температура 103±2^{0}C в продължение на 1 час. Охлажда се в ексикатор и се тегли с точност до 0,001g. Операциите на сушене, охлаждане и теглене се повтарят, докато резултатите от две последователни тегления не се различават с повече от 0,1 % от масата на взетата проба. Определянето се извършва чрез две успоредни проби. Проверката за пълна екстракция на мазнината се извършва като се изпаряват няколко капки от разтворителя,

стичащ се от екстрактора в часовниково стъкло. След изпаряване на разтворителя върху стъклото не трябва да има следи от мазнина. След като мазнината се извлече напълно, маслените извлеци се смесват, изчислява се общата мазнина и от нея се тегли 0,1-0,2g, за да бъде направена подготовката на метиловите естери на мастни киселини.

Съхраняване на пробите: Преди започване на процедурата по метилиране пробите на мастните киселини се съхраняват в хладилник при температура до 8^oC.

Дериватизация на мастните киселини и превръщането им в метилови естери на мастните киселини. Метилирането е процес на дериватизация, който се състои в „закачане“ на метилови групи в молекулата на мастната киселина. Целта е да се доведе молекулата до „летлива“ форма.

В епруветка се претеглят около 50 – 100 mg (около две-три капки) от аналитичната проба, т.е от мазнината, която е изолирана по подходящ метод с точност до 0,1 mg. След което чрез двукратно промиване на пробата в епруветката с изооктан/дихлорметан облодънна колба от 50-100 ml и се изпълнява процедурата по метилиране.

Използват се два аналитични способа за получаване на метилови естери на мастните киселини: **преестерификационен**, приложим за мастни киселини, съдържащи 4 и повече въглеродни атома и метод с **борен трифлуорид BF_3,** приложим за мастни киселини, съдържащи 6 и повече въглеродни атома.

Преестерификационен метод за метилиране

При разработване на пробата от ленено масло е приложен преестерификационния метод, който е подходящ за мазнини и масла от растителен и животински произход, съдържащи от 4 до 24 въглеродни атома в молекулата си. Методът е неприложим за проби с високо съдържание на свободни мастни киселини, тъй като свободните мастни киселини и сапуните не се естерифицират напълно с калиева основа. Етапите на процеса са следните:

- Към претеглената мазнина с пипета се добавят 4 mL изооктан и пробата се разтваря с внимателно нагряване, ако е необходимо;
- С пипета се добавят 200 μL (0,2 mL) метанолов разтвор на калиева основа, след което колбата се затваря плътно със запушалка;
- Сместа се разклаща енергично около 30 секунди. След първоначално помътняване, дължащо се на отделяне на глицерол, реакционната смес се

избистря. Необходимо е да се изчака до пълното избистряне на сместа;

- Към разтвора се добавя около 1 g кисел натриев сулфат монохидрат и се разклаща енергично, за да се неутрализира калиевата основа. След утаяване на солта, горният слой, съдържащ метиловите естери, се отдекантира с пастьорова пипета и се прехвърля във флакон от 2 mL и може да се инжектира директно в хроматографа.

Метилиране с борен трифлуорид

Към 0,1 до 0,25 g мазнина поставени в облодънна колба с вместимост 50-100 ml се добавят пемза и 4ml 0,5 mmol/l натриева основа в метанол, след което се поставя се на апарата на Соксле и се нагрява до кипене за 5 до 10 минути, след което се добавят се 5ml 20% Борен трифлуорид-метанолов разтвор. Кипенето продължава още 3 минути, след които се добавят се 1-3ml изооктан, отстранява се от нагревателя и се добавя 20 ml наситен разтвор на натриев хлорид. Колбата се затваря и разбърква енергично за 15 секунди. Прехвърля се в делителна фуния. Добавя се още наситен разтвор на натриев хлорид, така че нивото да е достатъчно видимо за разделяне на двете фази. Оставя се в покой, с цел разделяне на двете фази. Горният изооктанов слой се обезводнява с безводен натриев сулфат за отстраняване на всички следи от вода. Така подготвената проба се съхранява във фризер при -18÷-20^{0}C до инжектиране в хроматографа.

Хроматографски анализ

Разделянето на FAME в хроматографската колона е по отношение дължината на въглеводородната верига, степента на (не)насищане и позицията на двойните връзки. Разделянето в газ-хроматографската колона се извършва в поток от инертен газ – азот или хелий. Детекцията се извършва в пламъчно-йонизационния детектор, където метиловите естери изгарят в пламък. При изгарянето се регистрира сигнал, пропорционален на количеството на съответния метилов естер на мастна киселина. Идентифицирането на отделните метилови естери на мастни киселини се извършва по време на задържане в хроматографската колона и сравнението му с това на референтни (стандартни) мастни киселини.

FAME се разделят след инжектиране в газ-хроматографската колона при температурна програма от 50^{0}C, за 30 sec., стъпка - повишаване на

температурата с 4^0C за минута до 250^0C и задържане при тази температура за 10 минути.
Инжекционният обем е 1µl, при температура на инжектора 250^0C, Purge flow: 5,0 mL/min; Split flow: 50,0 mL/min.
Детекцията в FID е с работна температура 280^0C; Ignition threshold: 0,5pA.
Газовете, използвани за метода са:

- Carrier flow: Азот 1,000 mL/min;
- Carrier gas saver flow: 20,0 mL/min, Carrier gas saver time: 3,00 min;
- Air flow: 350,0 mL/min,
- Hydrogen flow: 35,0 mL/min,
- Makeup gas flow: 40,0 mL/min;

Откриване и идентифициране на отделните FAME се извършва автоматично, след предварително създаден метод, с въведените наименования и изчислени от софтуера площи на референтния микс от FAME. Отделните метилови естери в референтния микс и в пробата са представени като относително процентно съдържание към общата сума площи на всички съдържащи се метилови естери на мастните киселини в референтния микс и в пробата, която обща сума е 100%.
Идентифицирането на метиловите естери на мастни киселини е извършено със CRM 37-Component FAME Mix on the Equity-1, от които се подготвят работни разтвори.
Количественото определяне се извършва по метода на нормализацията, при който се приема че 100% от мастните киселини в пробата са елуирани (преминали през колоната) и детектирани. Резултатите от хроматографския анализ се регистрират с помоща на софтуера на апарата. Откриване и идентифициране на отделните метилови естери се извършва автоматично, след въведените наименования и изчислени от софтуера данни и регистрирани на хроматограмата.
За да определим съдържанието на метилови естери на мастните киселини е необходимо да знаем **съдържанието на общи мазнини в %,** които се изчисляват по формулата:

$M = \frac{m2 - m1}{m0} 100$ **%,** където:

M – количеството общи мазнини, %
m_1 - маса на приемната колбата, g

m_2 маса на приемната колба с екстрахирания материал, g

m_0 – масата на взетия за анализ материал, g

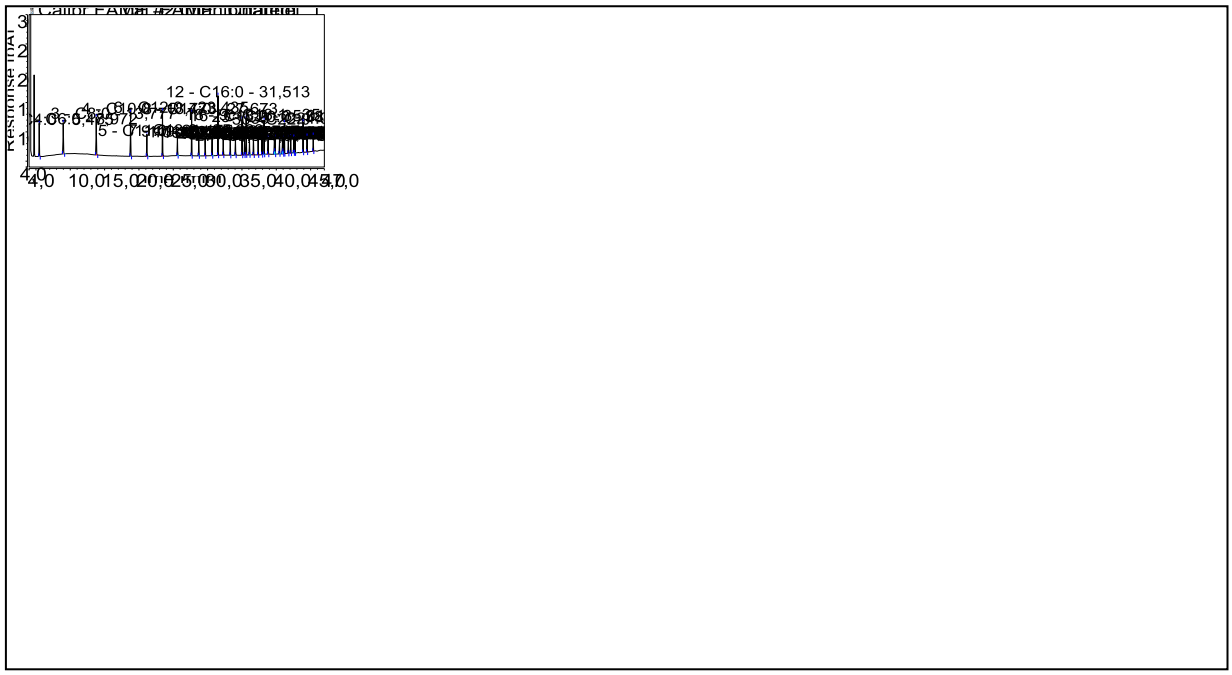
Изчисляване на съдържанието на **отделните метилови естери на мастните киселини**, C_i % в 100% мазнина е по площ за компонентите от анализираната смес (C_i):

$Ci = \frac{Gi.100}{\sum Gi}$ **,** където:

C_i - относителен процент по площ за i-тия компонент на пробата

G_i - площ на пика отговарящ на i-тия компонент на пробата (mm^2)

ΣG_i- сума от площите на пиковете на всички компоненти на пробата (mm^2).



Фигура 12 *Хроматограма на референтен микс FAME*

Изчисляване на съдържанието на **наситени мастните киселини** в % - (Saturated fatty acids of general formula CH3(CH2)nCOOH), %

$Fs = \frac{\sum (A1 + A2 + ...Ai)}{M} 100$ %, където

Fs – Количеството на наситени мастни киселини (Ci:0) в пробата, като относително процентно съдържание

ΣA1...Ai – сумата от площите на наситени мастни киселини (Ci:0) в пробата, като относително процентно съдържание

M - количеството общи мазнини, %

Изчисляване на съдържанието на **мононенаситени мастните киселини** - Monoenoic fatty acids of general formula $CH_3(CH_2)_mCH=CH(CH_2)_nCOOH$)

$Fms = \frac{\sum (A1 + A2 + ...Ai)}{M} 100$ %, където

Fms – Количеството на мононенаситени мастни киселини (Ci:1) в пробата, като относително процентно съдържание

ΣA1...Ai – сумата от площите на мононенаситени мастни киселини (Ci:1) в пробата, като относително процентно съдържание

M - количеството общи мазнини, %

Таблица 6 *Съдържание на мононенаситени мастните киселини в %*

No.	***Systematic name***	***Trivial name***	***Peak Name***	***Relative Area, %***
9	cis-9-tetradecenoic	myristoleic	9c-C14:1	2.16
11	cis-10-heptadecanoic	-	10c-C15:1	2.02
13	cis-9-hexadecenoic	palmitoleic	9c-C16:1	1.92
15	cis-10-heptadecanoic	-	10c-C17:1	1.97
18	cis-9-octadecenoic	oleic	9c-C18:1	4.18
24	cis-9-eicosenoic	gadileic	c11-C20:1	1.78
31	cis-13-docosenoic	erucic	c13-C22:1	1.69
36	cis-15-tetracosenoic	nervonic	c9-C24:1	1.58
			Total, %:	***17.30***

Изчисляване на съдържанието на **полиненаситени мастните киселини** в % (Polyunsaturated fatty acids of general formula $CH_3(CH_2)_m(CH=CHCH_2)_x(CH_2)_nCOOH$)

$Fps = \frac{\sum (A1 + A2 + ...Ai)}{M} 100$ %, където:

Fps – Количеството на полиненаситени мастни киселини (Ci:n) в пробата, като относително процентно съдържание

ΣA1...Ai – сумата от площите на полиненаситени мастни киселини (Ci:n) в пробата, като относително процентно съдържание

M - количеството общи мазнини, %

Таблица 7.*Съдържание на полиненаситени мастните киселини в %*

No.	***Systematic name***	***Trivial name***	***Peak Name***	***Relative Area, %***
20	cis-9,12-octadecadienoic	Linoleic (Ω-6-Fatty acid)	9c,12c-C18:2	2.03
21	cis-6,9-octadecatrienoic	Y-linolenic (Ω-6-Fatty acid)	6c,9c,12c-C18:3	1.91
22	cis-9,12,15octadecatrienoic	α-linolenic (Ω-3-Fatty acid)	9c,12c,15c-C18:3	1.95
26	c-11,14-eicosadienoic	-	c11,c14-C20:2	1.76
27	8,11,14-eicosatrienoic	homo-y-linolenic	c8,c11,c14-C20:3	1.59
28	5,8,11,14-eicosatetraenoic	Arachidonic (Ω-6-Fatty acid)	c5,c8,c11,c14-C20:4	1.78
29	C20:3n3(c-11,14,17-eicosatrienoic acid)		c11,c14,c17-C20:3	1.75
32	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA (Ω-3-Fatty acid)	c5,c8,c11,c14,c17-C20:5	1.83
34	c-13,16-docosadienoic	-	c13,c16-C22:2	1.80
37	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	DHA (Ω-3-Fatty acid)	c4,c7,c10,c13,c16,c19-C22:6	1.73
			Total, %:	***18.13***

Изчисляване на съдържанието на **Омега-3 и Омега-6 мастни киселини**

Методът дава възможност и за изчисляване на съдържанието на **транс мастни киселини, %.**

Сумата от C18:1 транс и C18:2 транс метилови естери на мастни киселини, като част от масата на всички метилови естери на мастни киселини.

trans-9-octadecenoic	(elaidic)	t9-C18:1
trans-9,12-octadecadienoic	(linolelaidic)	9t,12t-C18:2

Таблица 8.*Съдържание на Омега-3 и Омега-6 мастните киселини в %*

No.	***Systematic name***	***Trivial name***	***Peak Name***	***Relative Area, %***
20	cis-9,12-octadecadienoic	linoleic (Ω-6-Fatty acid)	9c,12c-C18:2	2.03
21	cis-6,9-octadecatrienoic	Y-linolenic (Ω-6-Fatty acid)	6c,9c,12c-C18:3	1.91
22	cis-9,12,15octadecatrienoic	α-linolenic (Ω-3-Fatty acid)	9c,12c,15c-C18:3	1.95
28	5,8,11,14-eicosatetraenoic	Arachidonic (Ω-6-Fatty acid)	c5,c8,c11,c14-C20:4	1.78
32	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA (Ω-3-Fatty acid)	c5,c8,c11,c14,c17-C20:5	1.83
37	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	DHA (Ω-3-Fatty acid)	c4,c7,c10,c13,c16,c19-C22:6	1.73
			Total, %:	***11.23***

Валидиране на метода

Валидирането на метода е извършено посредством работни разтвори на референтен микс, с проследими метрологични характеристики, съответстващи на измервания обхват. Валидираният метод дава възможнност за изчисляване съдържанието на: наситени-, ненаситени- (моно- и полиненаситени) омега-3 и 6- и транс-мастни киселини.

- Обхват на метода, 0.1÷99.5%
- Граница на откриване LOD >0,04%
- Граница на определяне LOQ >0,1%
- Възпроизводимост - при концентрация 1,075% RSD=0,09%

Неопределеност при концентрация 8,75 % е 0,19 %, което изразено в отн.% спрямо резултата е 2,17%;

Изразяване на резултата: 8,75±0,19 %

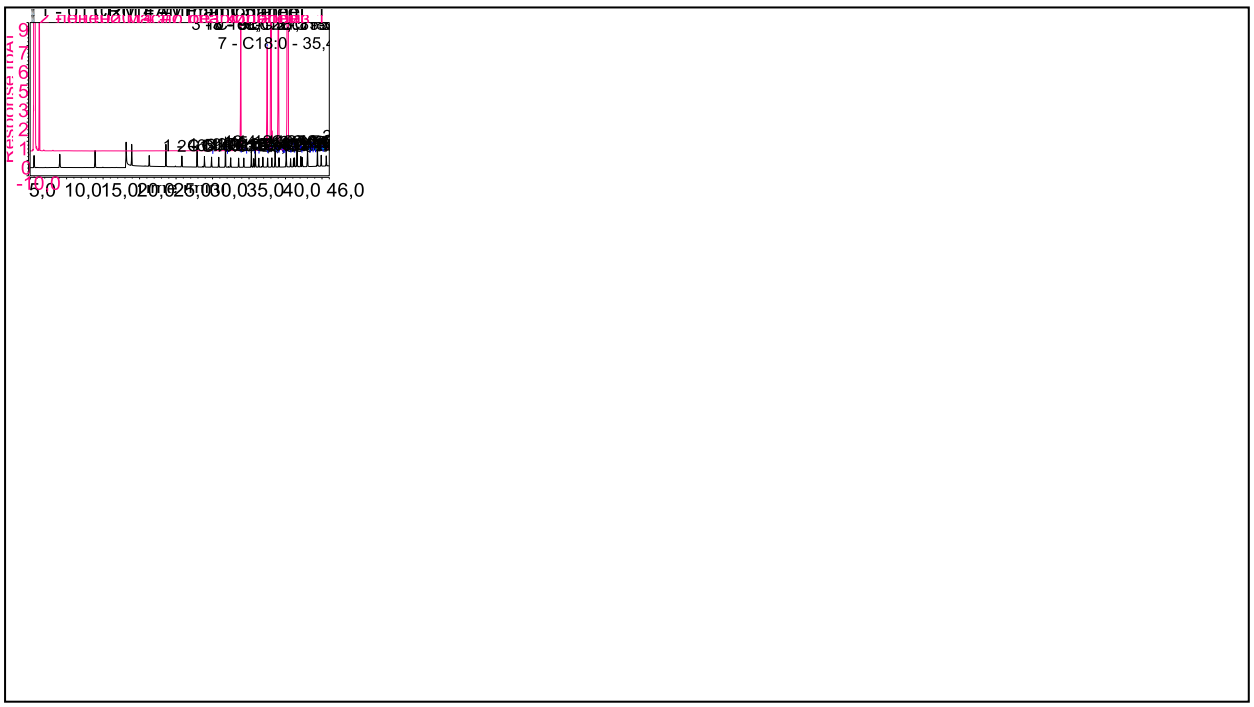
Таблица 9 *Изчисления при три концентрации на FAME в RM*

No	Systematic Name	Trivial Name	Peak Name	RT, Min	CRM, µg/ml	5xCRM, µg/ml	25xCRM, µg/ml	% in Mix
1	butanoic	butyric	C4:0	5.48	417.70	83.54	16.71	4.04
2	hexanoic	caproic	C6:0	8.96	418.00	83.60	16.72	4.05
3	octanoic	caprylic	C8:0	13.76	418.70	83.74	16.75	4.04
4	decanoic	capric	C10:0	18.76	418.50	83.70	16.74	2.04
5	undecanoic	-	C11:0	21.14	211.20	42.24	8.45	4.02
6	didecanoic	lauric	C12:0	23.42	415.90	83.18	16.64	2.03
7	tridecanoic	-	C13:0	25.59	209.60	41.92	8.38	4.00
8	tetradecanoic	myristic	C14:0	27.65	414.20	82.84	16.57	2.01
9	cis-9 -tetradecenoic	myristoleic	9c-C14:1	28.69	207.60	41.52	8.30	1.99
10	pentadecanoic	-	C15:0	29.62	205.90	41.18	8.24	1.99
11	cis-10 -pentadecanoic	-	10c-C15:1	30.64	205.40	41.08	8.22	5.96
12	hexadecanoic	palmitic	C16:0	31.49	616.70	123.34	24.67	1.96
13	cis-9 -hexadecenoic	palmitoleic	9c-C16:1	32.26	203.00	40.60	8.12	2.03
14	heptadecanoic	margaric	C17:0	33.28	209.90	41.98	8.40	2.03
15	cis-10 -heptadecanoic	-	10c-C17:1	34.03	210.50	42.10	8.42	4.02
16	octadecanoic	stearic	C18:0	34.99	416.00	83.20	16.64	1.98
17	trans-9 -octadecenoic	trans-elaidic	t9-C18:1	35.35	204.90	40.98	8.20	4.02
18	cis-9 -octadecenoic	oleic (omega-9)	9c-C18:1	35.59	416.00	83.20	16.64	1.97
19	trans-9,12 -octadecadienoic	linolelaidic	9t,12t-C18:2	36.08	203.50	40.70	8.14	2.00
20	cis-9,12 -octadecadienoic	linoleic (omega-6)	9c,12c-C18:2	36.65	207.00	41.40	8.28	2.00
21	cis-6,9 -octadecatrienoic	Y-linolenic (omega-6)	6c,9c,12c-C18:3	37.33	206.90	41.38	8.28	2.00
22	cis-9,12,15 -octadecatrienoic	α-linolenic (omega-3)	9c,12c,15c-C18:3	37.91	207.10	41.42	8.28	4.06
23	eicosanoic	arachidic	C20:0	38.19	420.30	84.06	16.81	2.01
24	cis-9 -eicosenoic	gadileic	c11-C20:1	38.78	207.50	41.50	8.30	2.00
25	heneicosanoic	-	C21:0	39.69	207.40	41.48	8.30	2.00
26	c-11,14 -eicosadienoic	-	c11,c14-C20:2	39.80	206.60	41.32	8.26	2.09
27	8,11,14 -eicosatrienoic	homo-y -linolenic	c8,c11,c14-C20:3	40.45	216.40	43.28	8.66	1.81

28	5,8,11,14 -eicosatetraenoic	arachidonic (omega-6)	c5,c8,c11,c14-C20:4	40.88	187.10	37.42	7.48	1.97
29	C20:3n3(c-11,14,17 -eicosatrienoic acid)		c11,c14,c17-C20:3	40.99	203.60	40.72	8.14	4.00
30	docosanoic	behenic	C22:0	41.14	413.70	82.74	16.55	2.01
31	cis-13 -docosenoic	erucic	c13-C22:1	41.73	207.90	41.58	8.32	2.01
32	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA(omega -3)	c5,c8,c11,c14,c17-C20:5	42.09	207.20	41.44	8.29	2.00
33	tricosanoic	-	C23:0	42.53	205.40	41.08	8.22	1.99
34	c-13,16 -docosadienoic	-	c13,c16-C22:2	42.70	205.50	41.10	8.22	1.99
35	tetracosanoic	lignoceric	C24:0	43.87	405.90	81.18	16.24	3.92
36	cis-15 -tetracosenoic	nervonic	c9-C24:1	42.24	208.10	41.62	8.32	2.01
37	4,7,10,13,16,19 -docosahexaenoic	DHA (omega-3)	c4,c7,c10,c13,c16,c19 -C22:6	43.08	200.00	40.00	8.00	1.93
					10346.80			97.97
	НМК, % (U)	8.75	0.19	µg/ml	6025.00	1205.00	241.00	
	моноННМК, , % (U)	3.73	0.11	µg/ml	1866.00	373.20	74.64	
	полиННМК, % (U)	4.09	0.25	µg/ml	1841.90	368.38	73.68	
	трансМК, % (U)	0.82	0.06	µg/ml	408.40	81.68	16.34	
	сума				10141.30	2028.26	405.65	
	НМК, % (U)				59.41	59.41	59.41	
	Моно ННМК, % (U)				18.40	18.40	18.40	
	Поли ННМК, % (U)				18.16	18.16	18.16	
	Транс МК, % (U)				4.03	4.03	4.03	
					100.00	100.00	100.00	
	Ω-6-Fatty acid				601.00	120.20	24.04	
	Ω-3-Fatty acid				614.30		122.86	

Резултати

На анализ за съдържание на мастни киселини избрахме **ленено масло**, защото е известно че то е една от най-влаганите съставки в козметиката за лице и коса, заради високато си съдържание на ненаситени мастни киселини и най-вече омега-3 мастни киселини.



Фигура 13 *Хроматограма на FAME в ленено масло, сравнена с FAME в RM*

Изчислените резултати са сравнени с такива от други изследвания, представени на ***таблица 10.*** Процентно съдържание е на база сумата от всички мастни киселини. Резултатите от анализа са сравними с тези публикувани в признати литературни източници: Lipid library и plant derived fatty acid oil as used in cosmetics (*Beauty-review, final report march 4, 2011*).

Таблица 10 *Резултати на FAME в проба - ленено масло*

No.	Peak Name	RT, min	Area, pA*min	Height, pA	Relative Area%	Relative Height%	FAME name
1	C14:0	27.89	0.04	0.73	0.04	0.06	myristic
2	C15:0	29.88	0.02	0.34	0.02	0.03	pentadecanoic
3	C16:0	31.81	5.70	93.63	5.18	7.90	palmitic
4	9c-C16:1	32.50	0.08	1.33	0.07	0.11	palmitoleic
5	C17:0	33.59	0.06	0.99	0.06	0.08	margaric
6	10c-C17:1	34.22	0.04	0.62	0.04	0.05	cis-10-heptadecanoic
7	C18:0	35.44	5.25	66.99	4.77	5.65	stearic
8	9c-C18:1	35.99	20.83	231.38	18.94	19.52	oleic (omega-9)

10	9c,12c-C18:2	36.99	15.08	205.04	13.71	17.29	linoleic (omega-6)
12	6c,9c,12c-C18:3	37.74	0.25	2.93	0.23	0.25	Y-linolenic (omega-6)
13	c9,c12,c15-C18:3	38.31	61.44	563.75	55.86	47.55	α-linolenic (omega-3)
14	C20:0	38.60	0.16	2.60	0.14	0.22	arachidic
15	c11-C20:1	39.13	0.11	2.04	0.10	0.17	gadileic
16	C21:0	40.11	0.03	0.42	0.02	0.04	heneicosanoic

Таблица 11 *Сравнителна таблица с данни за FAME*

Ленено масло	***Saturated***					***Unsaturated***			***Unsaturated/ Saturated***
						Mono	***Poly***		
По данни на	*Capric Acid C10:0*	*Lauric Acid C12:0*	*Myristic Acid C14:0*	*Palmitic Acid C16:0*	*Stearic Acid C18:0*	*Oleic Acid C18:1*	*Linoleic Acid (Ω6) 18:2*	*α-Linolenic Acid (Ω3)C18:3*	
Lipid library	-	-	-	3.00	7.00	21.00	16.00	53.00	9.00
Beauty review				5.50	3.50	19.10	15.30	57.00	10.10
J. of alimentary	-	-	-	6.60	4.40	18.50	17.20	53.20	8.10
Търговеца	-	-	-	-	-	-	14.00	58.00	-
Анализа	-	-	0.04	5.20	4.80	18.90	13.70	55.90	8.80

Преимущество на предложеният метод е комплексния подход, изразен в подробно описание, от предоставяне на изчислени данни за общите мазнини до индивидуални или представени като групи мастни киселини – омега з, 6 и 9. Аналитичният подход е икономически ефективен, като снижава разходите за времетраене на анализ и разхода на консумативи.

3.2.3. GC-FID-HS метод за анализ на флуор в продукти за дентална хигиена

Принцип на метода

Определянето се извършва чрез газова хроматография. Методикта се основава на дериватизация на флуорните йони с хлортриетил силан (TETCS) в кисела среда. Обарзувалият се триетилфлуорсилан се определя чрез инжектиране на газова фаза посредством автоматично парофазово пробоподаване „хедспейс“. Благодарение на „хедспейса“ се избягва използването на органични разтворители, а за разтворител се използва дейонизирана вода, което прави метода по-безопасен и екологично чист.

Материали и реактиви

- Натриев флуорид
- Дериватизиращ агент триетилхлорсилан (triethylchlorosilane – TETCS)
- Изходен стандартен разтвор на NaF, с концентрация на NaF 1000 μg/g (или концентрация на F^- 452,47 μg/g)
- 50%-ен разтвор на сярна киселина
- Дейонизирана вода

Приготвяне на стандартни разтвори на флуор – от сухата субстанция NaF се приготвя се основен стандартен разтвор на F, с концентрация около 1000 μg/g. От него се приготвят работните стандартни разтвори във флакони за HS по следната схема:

- 0,1 ml основен разтвор, 0,9 ml вода, 1 ml 50% сярна киселина, 100 μl TECS;
- 0,3 ml основен разтвор, 0,7 ml вода, 1 ml 50% сярна киселина, 100 μl TECS;
- 0.5 ml основен разтвор, 0.5 ml вода, 1 ml 50% сярна киселина, 100 μl TECC;
- 1 ml основен разтвор, 1 ml 50% сярна киселина, 100 μl TECS.

Подготовка на пробите в мерителна колба с обем 100 ml се претеглят около $0,5 \pm 1.10^{-3}$g от анализираната паста за зъби и към нея се добавят към 50 ml дестилирана вода. Сместа се хомогенизира в продължение на 30 минути в ултразвукова вана. Получената смес се хомогенизира в продължение на 30 минути в ултразвукова вана и се допълват до марката.

Дериватизиране/силанизиране на пробата - взема се 1 ml от подготвеният разтвор на пробата и се поставя в HS флакон. Добавят се 1 ml 50% сярна киселина и 100 μl триетилхлорсилан (TECS).

След добавяне на TECS флаконите с пробата и със стандартите се затварят възможно най-бързо и се разбъркват в продължение на 60 минути в шейкър при 30 °C, след което се поставят в гнездата на HS уреда. Всеки флакон може да се инжектира само веднъж.

Хроматографски анализ – извършва се на газов хроматограф Clarus 580, Perkin Elmer, снабден с пламъчно-йонизационен детектор и автоматична проба за парна фаза "headspace" (HS) Turbomatrix HS16, аналитична колона Elite CLP 30 m, 25 mm, 0.25 μm, флакони за HS - 20 ml.

Газохроматографски условия:

- Температура на инжектора: 220 ^{o}C
- Температура на детектора: 250 ^{o}C
- Температура на колоната: 70 ^{o}C за 5 минути, следва покачване с 10 ^{o}C/min до 150 ^{o}C и задържане 2 минути.
- Газ-носител: хелиий, 20 mL/min
- Условия на хедспейс при инжектирана проба: Oven 70 ^{o}C; Transfer 110 ^{o}C; Needle 75^{o}C; Carrier 28,0 psi; Termostat 10 min; Pressurize time 1,5 min; Injection time 0.04 min

Валидиране

Концентрационният интервал на калибриране на пастата за зъби е от 100 до 2000 μg/g, а за продуктите за уста от 50 до 1000 μg/g. Повторяемостта, изразена като относително стандартно отклонение при оптимизирани условия на реакция и определяне на GC, е ± 5% за паста за зъби и ± 3.5% за продукти за вода за уста.

Аналитичните параметри на методиката са определени чрез хроматографиране на стандартни разтвори с точно определени концентрации, като за целта се изработват в шишенца от хедспейс по 4 идентични разтвора на всяка концентрация.

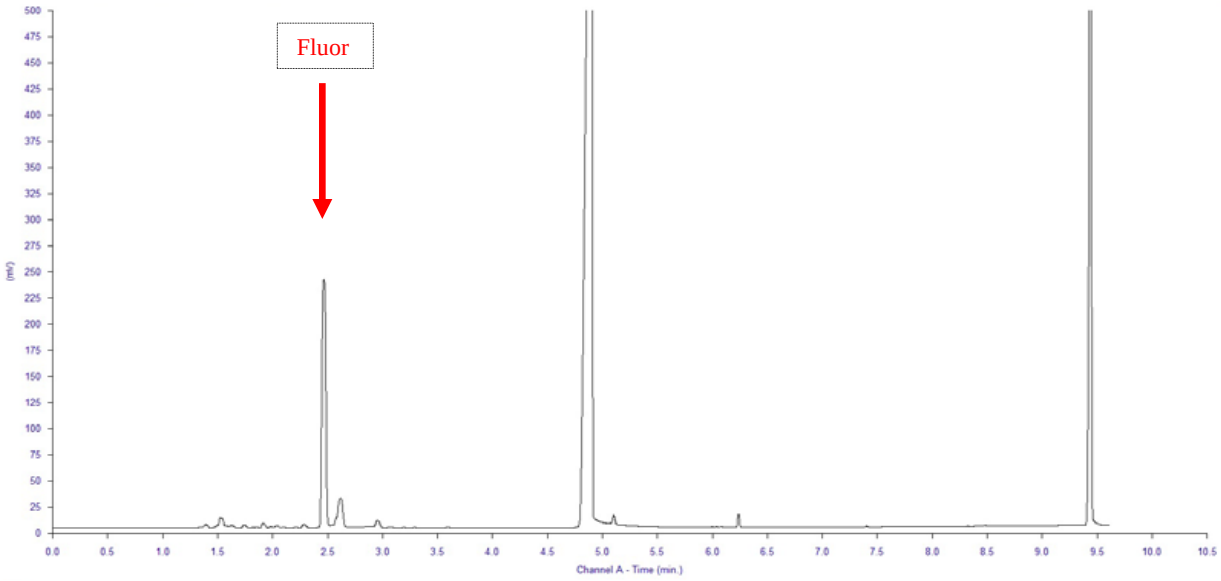
- Линеен диапазон: *концентрации на F- 0,45* μg/g – *45,25* μg/g
- Граница на откриване: *концентрации на F^{-} 0,45* μg/g
- *Относително стандартно отклонение* при условията на повтаряемост:
  - 1,92 % при концентрации на F^{-} 45,25 μg/g

- 0,76 % при концентрации на F^- 22,62 μg/g
- 1,62 % при концентрации на F^- 4,52 μg/g
- 6,15 % при концентрации на F^- 0,452 μg/g

Резултати

На Фигура 14 е представена хроматограма на проба за паста за зъби с добавен флуор. Графиката ясно очертава добрата резолюция, гарантираща постигането на добри аналитични параметри на представения метод. Времето на задържане е rt = 2.45 min, а **средната концентрация на F^- , отчетена в четирите инжектирани проби е 1480,52 μg/g, а съдържанието на F^- посочено на етикета е 1450 μg/g.**

Фигура 14 *Хроматограма на проба за флуор в паста за зъби*



Преимуществата на представената методика се изразяват в постигната висока селективност чрез прилагане на дериватизационна реакция. Същевременно, инжектиране на пробата в парова фаза, спомага за елиминане на пречещите влияния на други компоненти в пробата и за създаване на хроматографски условия, щадящи капилярната колона, което удължава нейния експлоатационен живот и повишава икономическата ефективност на метода.

3.3. АНКЕТНО ПРОУЧВАНЕ

Анкетата е с насоченост към две целеви групи, имащи отношение към проблематиката на дисертацията. Първата целева група са потребители на козметичните продукти, втората са специалисти, предлагащи козметични процедури и отговорни лица, контролиращите качеството в здравни органи, производители и аналитици в лаборатории, които са компетентни да извършват оценка на съответствието на козметичните продукти.

Анкетата съдържа 33 въпроса. Въвеждащите въпроси в анкетата дават информация към коя целева група е анкетирания, пол, възраст и образование. Втората група въпроси се отнася за отношението и информираността на попълващия към козметичните продукти. Проведеното проучване на информираността на потребители и участници във веригата на производството, прилагането и контрола на козметични продукти е чрез общи и специфични техники в т.ч.: пряка анкета с представителна извадка от потребители на козметични продукти и специалисти от контролни органи, лаборатории и производители. Анкетното проучване е направено като са използвани възможностите, както на съвременните **софтуерни платформи (***https://docs.google.com/forms/u/0/***), така и на традиционната техника – събиране на отговори на хартиен носител.**

Статистически анализ

За обработка на получените резултати, както е отбелязано по-горе, са използвани два статистически подхода: описателна статиската(анализ на честотни количествени и категорийни разпределения)

и непараметричен статистически анализ (**Fisher's Exact Test)**

Описателната статистика дава „снимка" на моментната информираност на анкетираните, докато с непараметричния анализ се установяват взаимосвързани въпроси, което може да помогне съществено при предлагане на промени в нормативната база и особенно при изготвяне на обучителни и информационнимтериали.

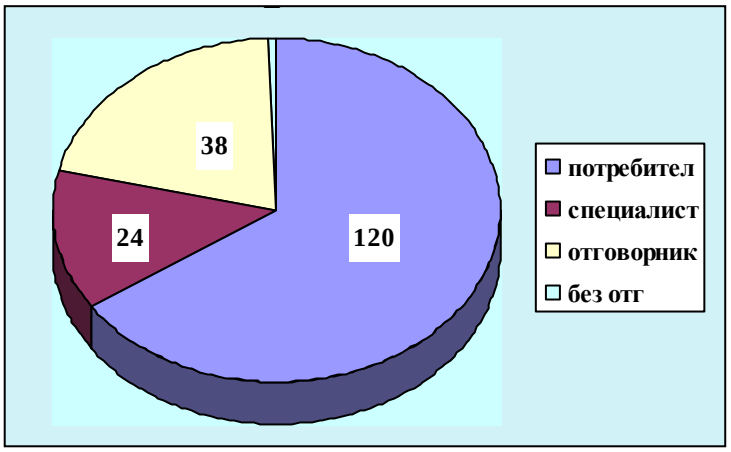
Описателна статистика

В описателната статистика данните са представени във вид на таблици с честотно разпределение по съответните въпроси от анкетата, включващи брой респонденти, процент и валиден процент (само от отговорилите). Повечето таблици са съпътствани от съответна фигура за нагледност и улеснение на ползвателя (читателя).

В ***таблица 12*** и на фигура 15 е представено разпределението на участниците по групи, в зависимост от тяхната лична преценка за компетентност. Установихме, че най–висок е процентът на потребителите на козметични продукти – 65,6 %, съответно 13% специалисти и 21% отговорни лица.

Таблица 12 *Разпределение по групи*

Група	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Потребител	120	65.6	65.9
Специалисти	24	13.1	13.2
Отговорни лица	38	20,7	20,8
Без отговор	1	0.6	100.0
Общо	***183/182***	***100***	

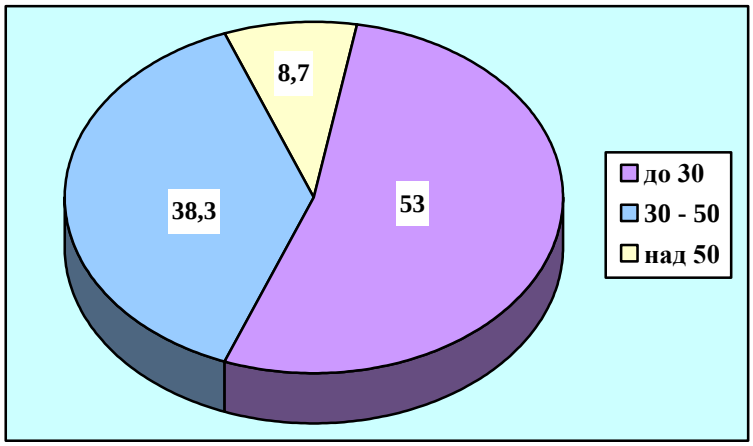


Фигура 15
Разпределение по групи

Представени са общо 183 попълнени, анонимни анкетни карти, от които на 120 от респондентите са се отбелязали като потребители, 24 като специалисти, а 38 като отговорни лица. Логично най-голям е процентът на определилите себе си участници като потребители. Като специалисти са тези работещи в областта на услугите, предоставящи разкрасяващи и подмладяващи процедури, които са 13% от участниците. Отговорни лица са специалисти, с компетентност да контролират качеството на козметичните продукти в здравни организации, в производствени и дистрибуторски организации и в лаборатории, които извършват анализ на козметика. Техният дял 21% от всички участници.

Таблица 13 *Разпределение по възраст*

Група	***Брой***	***%***
До 30 год.	97	53
От 30 до 50	70	38,3
Над 50	16	8,7
Общо	***183***	***100***

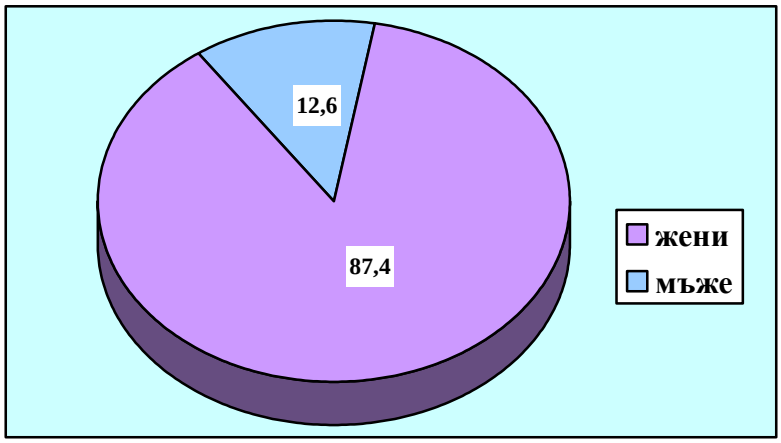


Фигура 16
Разпределение по възраст

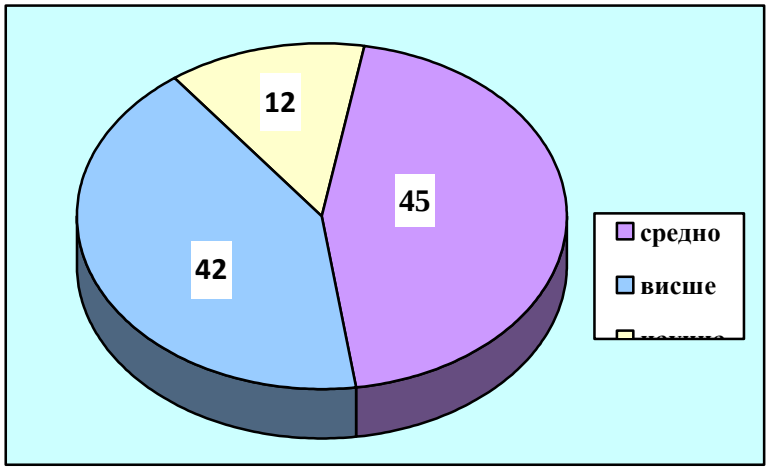
В таблица 13 и на ***Фигура 16*** е представено разпределението на участниците по възраст (въпрос 2). Установихме, че най–голям интерес предизвика нашето проучване сред по-младите участници – тези до 30 годишна възраст – 53% (95бр.). Значителен е интереса и на възрастовата група до 50 годишна възраст

– 38% (70бр.). Обясним е високият интерес на младите, както и заинтересоваността на групата респонденти на средна възраст.

На ***Фигура 17*** е представено разпределението на участниците по пол **(въпрос 3)**. По-висок е процентът на участвалите жени – 87,4 (160) и съответно 12,6 (23) на мъжете, което е логично във връзка с интереса на дамите към по-добра визия и по-дълго задържане на младежкия външен вид



Фигура 17
Разпределение по пол



Фигура 18
Разпределение по степен на образование

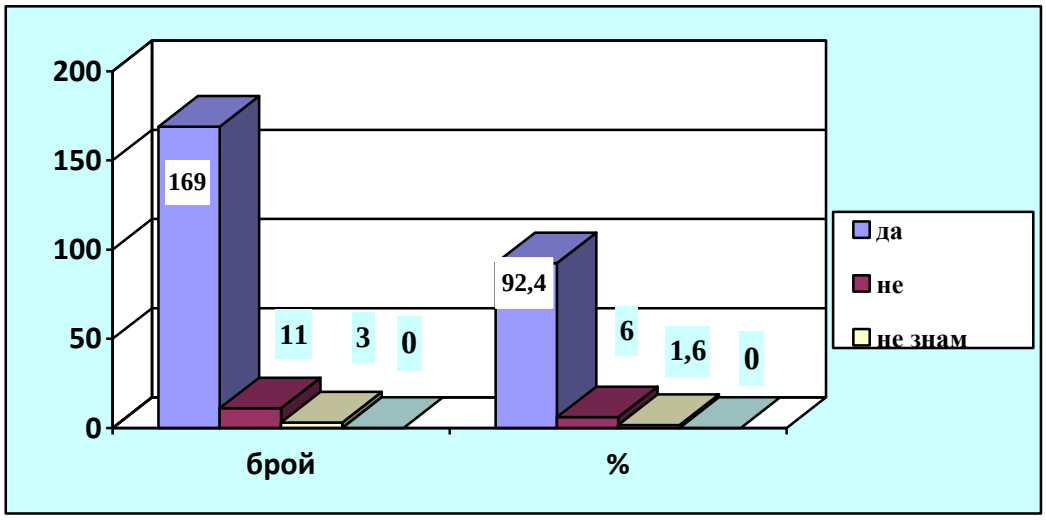
На въпросът „Моля, посочете Вашата степен на образование“ **(въпрос 4)**, 45% от участниците в анкетното проучване са посочили - средно образование, 42% висше (степен бакалавър или магистър), а 13% от респондентите са с присъдена научна степен – доктор и по-висока.

От представените анкетни карти на въпрос**„Знаете ли що е козметичен продукт**?” **(въпрос 5)** всички участници са отговорили утвърдително.

Таблица 14 *Връзка между козметичните продукти и здравето на човека. (въпрос 6)*

Група	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	169	92.4	92.4
Не	11	6.0	6.0
Не знам	3	1.6	1.6
Общо	***183***	***100***	***100***

Интерес предизвикват резултатите от отговори на **въпрос 6** „Има ли връзка козметичният продукт със здравето на човека?”. Видно е, че най-голям брой 169 участника от общо 183 са отговорили утвърдително, което ни навежда на мисълта за добрата информираност на участниците за връзката на козметиката със здравето на човека и добрия външен вид



Фигура 19 *Връзка между козметичните продукти и здравето на човека*

Резултатите от отговори на **въпрос 7** „Използвате ли козметични продукти?” са представени в ***Таблица 15***. Много ясно се откроява тенденцията, че почти всички респонденти използват козметични продукти. ***Този отговор ни дава основание да смятаме, че всички следващи въпроси, касаещи козметичните продукти ще намерят своя отговор и че групата на анкетираните лица, макар и на рандомизиран принцип е добре подбрана.***

Таблица 15 *Използвате ли козметични продукти? (въпрос 7)*

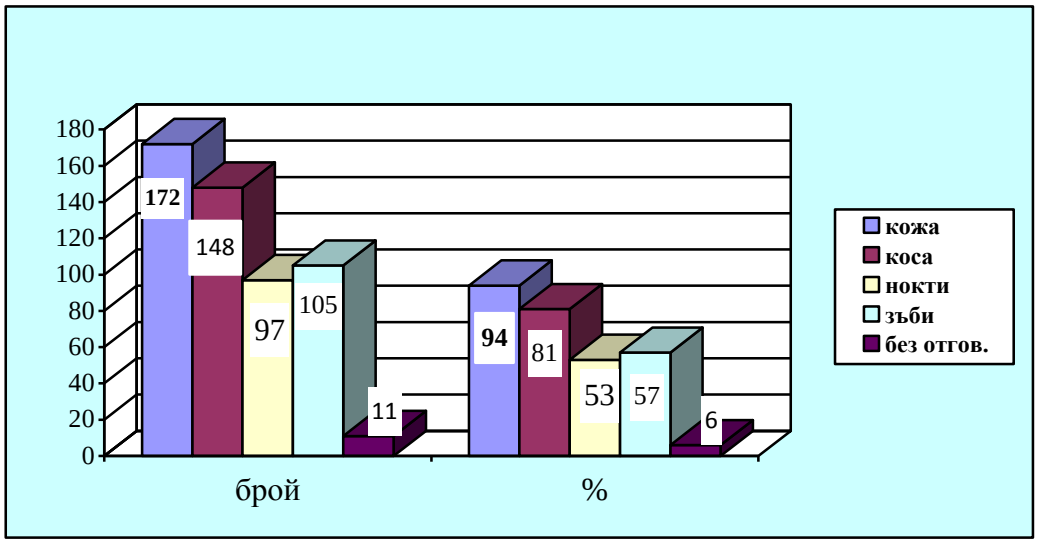
Група	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	180	98.4	100.0
Не	0	0.0	0.0
Без отговор	3	1.6	
Общо	183/180	100	100.0

Резултатите от отговори на **въпрос 8** „Ако използвате козметични продукти, моля отговорете с какво предназначение?" са представени в ***Таблица 16*** и онагледени на ***Фигура 20.***

Таблица 16 *С какво предназначение? (въпрос 8)*

Отговор	***Брой***	***%***
Кожа	172	94.0
Коса	148	81.0
Нокти	97	53.0
Зъби	105	57.0
без отговор	11	6.0
Брой отговори	553	
Респонденти	183	

Сборът от процентите е по-голям от 100, тъй като анкетираните са давали повече от един отговор.



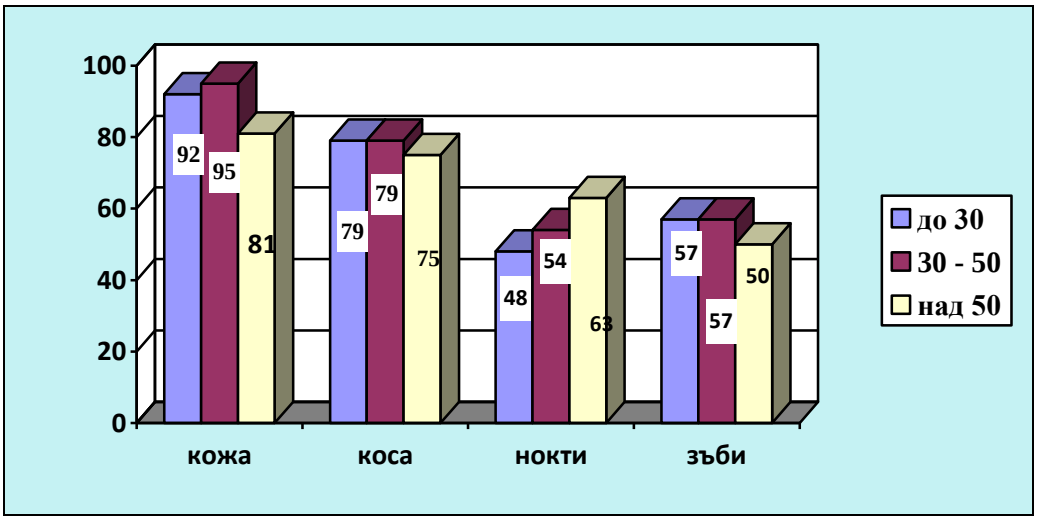
Фигура 20 *С какво предназначение?*

Разпределението на отговорите е следното: набраните отговори са общо 553, от които само 6 са без посочен отговор. Най-голям е броят на отговорите, касаещи използването на продукти за кожа, следван от продуктите за коса. Най-малък е броят на отговорите за продукти за нокти. Смятаме, че разпределението е логично, тъй като най-дълъг е периода от жизнения цикъл на човека в който се използват продукти за кожа (кремове, лосиони, за лице, за ръце и за тяло). Необходимостта от подържане цвета, подхранването и стилизирането на косата обхваща също така дълъг период, по-характерен за жените. Разбираем е по-ниския брой на продукти за нокти, тъй като те се използват основно в юношеска, млада и по-малко средна възраст. Получените резултати предоставят логична картина на използването на разнообразните козметични продукти, в съответствие с възрастта.

Таблица 17 *Разпределение по възраст при използване на КП с различно предназначение*

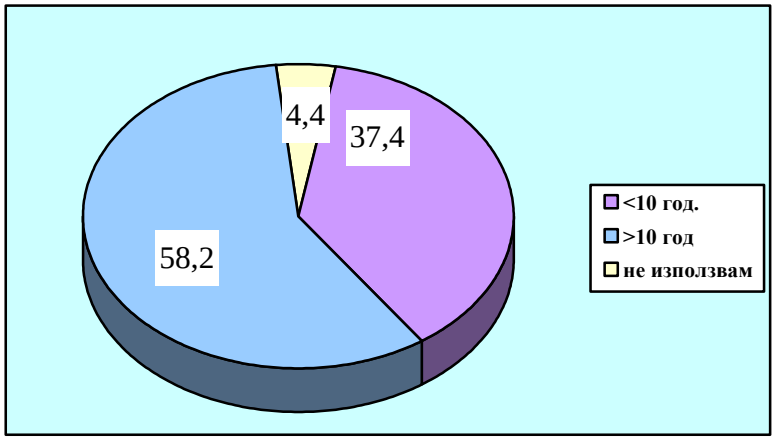
Възраст	***Кожа*** %	***Коса*** %	***Нокти*** %	***Зъби*** %
<30 г.	92	79	48	57
30-50	95	79	54	57
>50	81	75	63	50

От 97 респонденти до 30г., 89 броя от (92%) ползват продукти за кожа, 77 (79%)-за коса, 47 (48%)-за нокти и 55 (57%)-за зъби.
От 70 респонденти от 30 до 50г., 66 ползват продукти за кожа (95%), 55 (79%)-за коса, 38 (54%)-за нокти и 40 (57%)-за зъби.
От 16 респонденти над 50г., 13 (81%) ползват продукти за кожа, 12 (75%)-за коса, 10 (63%)-за нокти и 8 (50%)-за зъби.



Фигура 21 *Разпределение по възраст при използване на КП с различно предназначение*

На въпроса „От колко време използвате продукти за кожа (лице и тяло)?“ ***(въпрос 9)*** 58% от респондентите отговарят „над 10 години“, 37% „по-малко от 10 години“ и само 4% „не ползвам продукти за лице и тяло“. (***Таблица 18*** *и* ***Фигура 22*****)**



Фигура 22
Време на използване на КП за кожа

Таблица 18 *От колко време използвате козметични продукти за кожа (лице и тяло) (въпрос 9)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
< 10 години	68	37.2	37.4
> 10 години	106	57.9	58.2
Не използвам	8	4.4	4.4
Без отговор	1	0.5	
Общо	183/182	100	100.0

На въпроса за ефектът от използването на козметични продукти за кожа (лице и тяло) 98% от анкетираните заявяват, че ефекта е добър.

Таблица 20 *Ефект от използването на козметични продукти за кожа (въпрос 10)*

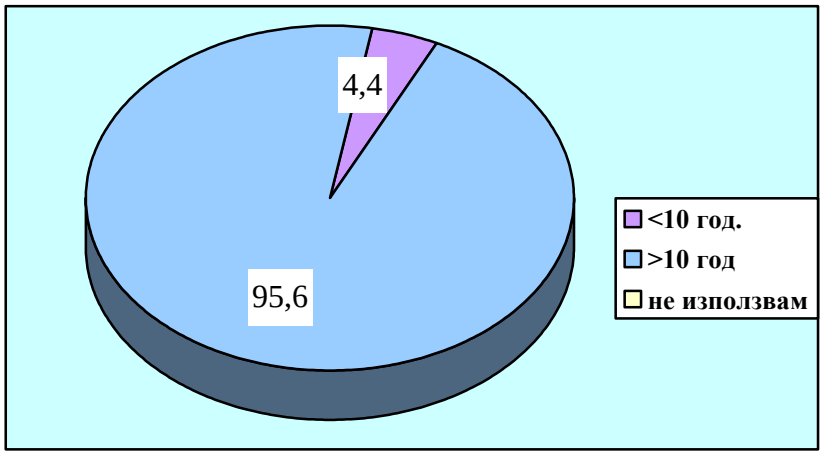
Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Добър	179	97.8	98.4
Лош	2	1.1	1.1
Няма ефект	1	0.6	0.5
Без отговор	1	0.5	
Общо	***183/182***	***100***	100.0

Пренебрежително малък е процентът на участниците (1%), определящи използването на тези продуктите като не ефективно. Оценката дадена от приблизително всички участници (179 от 183) в анкетата подчертава необходимостта от производство на подобна козметика, което е позитивна характеристика не само за производството, но и за пазара (маркетинга) на тези продукти. Установеният добър ефект оправдава претенциите на тези продукти, изписани на съответните етикети и приложените листовки.

Оценката на отговорите на въпрос **„От колко време използвате продукти за коса (шампоани, балсами, маски за коса и др.)?“** показва следното разпределение: 95% от респондентите отговарят „повече от 10 години“, 4% „по-малко от 10 години“ и 1% „не отговорили“(таблица .

Таблица 21 *От колко време използвате козметични продукти за коса (шампоани, балсами, маски за коса и др.) (въпрос 11)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
< 10 години	8	4.4	4.4
> 10 години	174	95.1	95.6
Не използвам	0	0.0	0.0
Без отговор	1	0.5	
Общо	***183/182***	***100***	100.0



Фигура 23
Време на използване на КП за коса

Ниският процент елементи в групата под 5 години и под 10 години от предварителния анализ ни позволи да трансформираме множеството в 2 групи – под 10 и над 10 години, т.е. **прилагаме методът на нормализацията - привеждане към общ порядък**. Но дори и след тази трансформация, виждаме че процента на отговорилите над 10 години превишава близо 20 пъти този на отговорилите под 10 (95/5).

Отговорът може да бъде свързан и с възрастта на респондентите, а именно тъй като след определена възраст започва активно използване на боя за коса, за маскиране на белите коси. Разбира се, че има и случаи на боядисване на косата в различни цветове и нюанси, без те да са побелели, но те касаят в повечето случаи групата на юноши и по-млади индивиди, които в настоящето проучването не се визират.

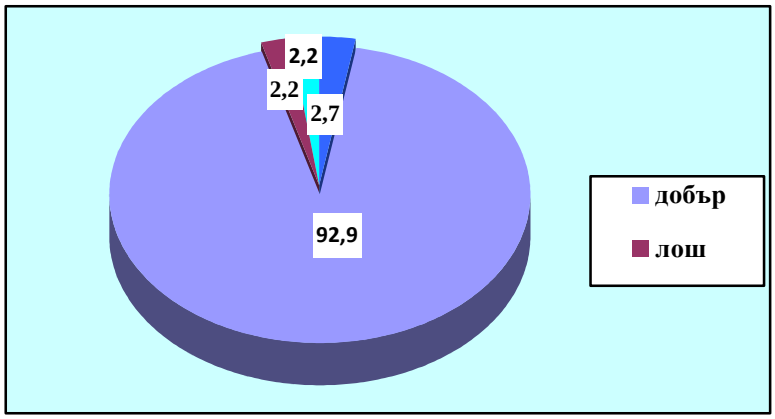
Към същият въпрос могат да бъдат отнесени и продукти свързани, не само с промяната цвета на косата но и такива, свързани с нейната здравина и външен вид. При последните периодът на използване е значително по-широк,

обхващащ съответно и по-голям брой и спектър на участниците в тестовото проучване.

На въпрос 12 „Какъв е ефекта от използването на козметика за коса?” 93% от запитаните в нашата анкета отговарят „добър“, 2% казват, че е лош, 2% - няма ефект и 3% от анкетираните не са отговорили.(таблица 22, фигура 24)

Таблица 22 *Какъв е ефекта от използването на козметика за коса? (въпрос 12)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Добър	170	92.9	98.4
Лош	4	2.2	1.1
Няма ефект	4	2.2	0.5
Без отговор	5	2.7	
Общо	***183/178***	***100***	100.0



Фигура 24
Ефект от използване козметика за коса

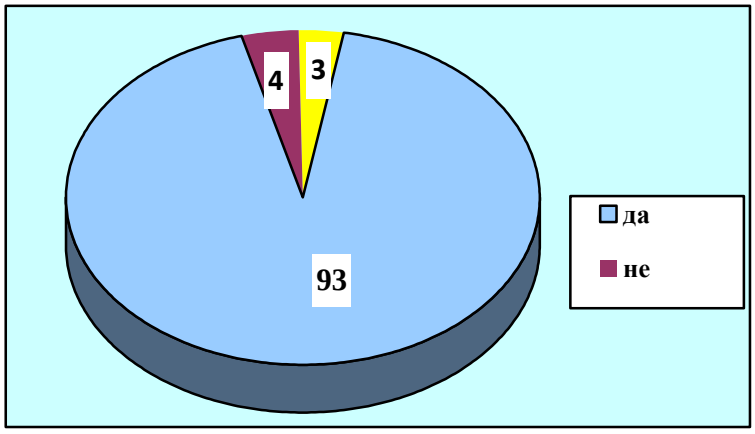
Много висок е процентът на лицата, оценяващи ефекта от използването на козметика за коса като добър, в сравнение тези оценяващи го като лош или липса на такъв. Вероятно отговорът касае не само ефекта от боядисването на косата, но и използването на продуктите за нейното подхранване, за постигане на по-здрав и не чуплив косъм, както и подържане на фризура. Логично в зависимост от индивидуалните характеристики на косата могат да се очакват и различни ефекти от прилагането на съответната козметика.

Обобщавайки всички отговори на този въпрос може да бъде потвърдено качественото производство на продуктите, задоволяващо претенциите на потребителите в тази категория продукти.

Отговорите на въпрос №13 (таблица 23, фигура 25***)*** показват висока степен на недоверие по отношение безопасното приложение на козметиката. Този резултат приемаме като много смущаващ факт. Той ни дава основание да тълкуваме изразеното критично отношение повече като непознаване на проблема и ниско ниво на информираност, относно процедурите за разрешение на производство и пазарен статут, както и подходите за контрол на продуктите свързани със здравето на човека.

Таблица 22 *Има ли риск при използване на козметиката?*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	170	93	95
Не	7	4	5
Без отговор	6	3	
Общо	***183/179***	***100***	100.0



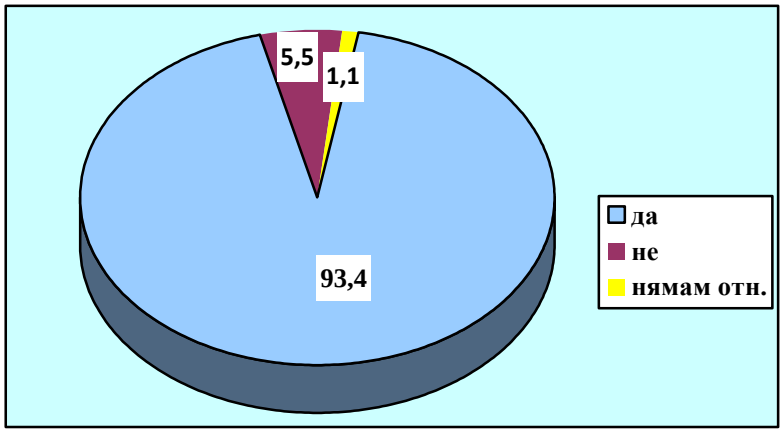
Фигура 25
Риск при използване на козметика

Очертава се необходимост от повишаване информираността на потребителя, тъй като в съвременния пазар на козметичните продукти се допускат само такива, които не предизвикват вредни и странични ефекти.

Изхождайки от отговорите на предишния въпрос бихме могли да обясним резултатите от въпрос №14,(таблица 24, фигура 26) че потребителите търсят информация на първо място, за да осигурят безопасност за организма си при използването на козметични продукти.

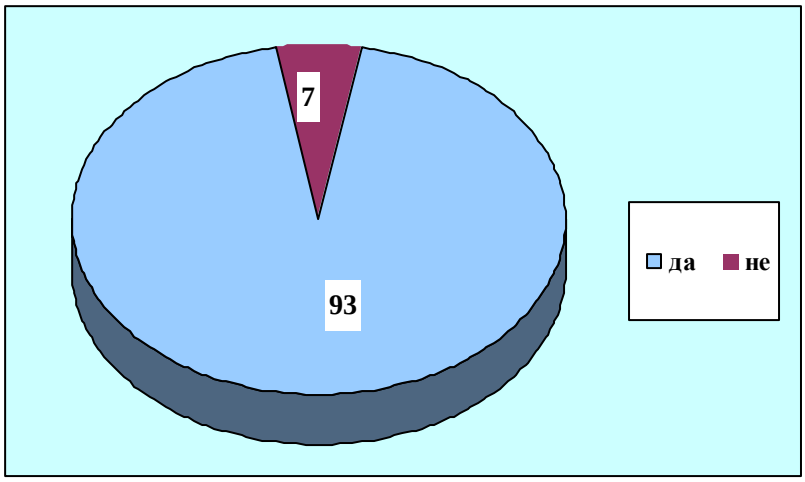
Таблица 24 *Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате? (въпрос 14)?*

Отговор	***Брой***	***%***
Да	171	93,4
Не	10	5,5
Нямм отношение	2	1,1
Общо	***183/179***	***100***



Фигура 26
Информация за козметиката преди закупуване

Можем да продължим обяснението и с интереса на потребителя към ефективността на съответния продукт. Познаването на механизмите на действие и евентуалният краен ефект ще повиши доверието на потребителя към съответните козметични продукти, използвани в ежедневието му. Отговорът „нямам отношение" и липсата на отговор обхващат много малък процент респонденти, който може да бъде пренебрегнат. Отговорът „не търся информация" дават само 5% от участниците в анкетата, което може да бъде свързано или с убеденост в качеството на продукт, използван от по-дълго време, или с достатъчната информация съпътстваща продукта.



Фигура 27
Четене на етикетите

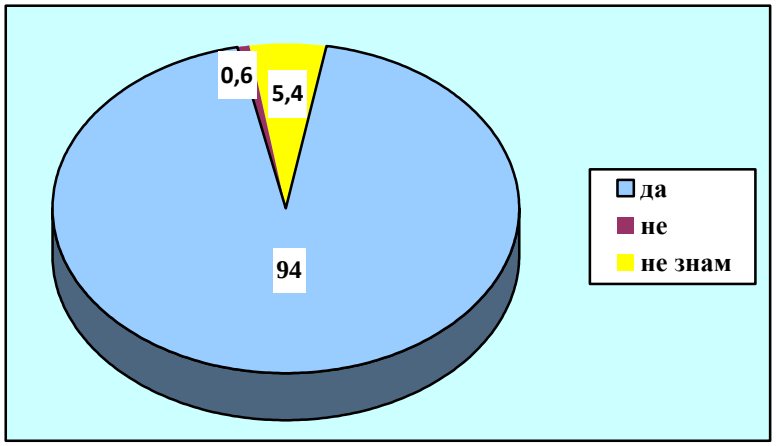
Впечатляващо висок е отговорът (93%) на лицата, които четат етикетите на закупените от тях продукти. Този факт показва явен интерес на респондентите към състава и съдържанието на козметичния продукт, както и към претенциите описани на неговия етикет.

Търсенето на консултация от специалисти е показател за стремежа на потребителите за повече познания, относно активността на използвания от тях козметичен продукт, както и за сигурността, че приложението няма да предизвика странични за здравето ефекти. Съмнението към безопасността на продукта е паралелно със стремежът за нови познания (повишаване на информираността), отразен в по-големия процент от респондентите – 69%. *Интерес представлява отговорът „не купувам продукти с биоактивни съставки", който може да бъде обяснен с липсата на познания върху смисъла на термина „биоактивна съставка" или в употребата само на обикновенна козметика, като сапуни, шампоани без активни добавки.* Тази оформила се група от 6% при настоящия въпрос, би могла да се отрази и върху отговорите на другите въпроси зададени в анкетата, свързани с биоактивните компоненти.

Като продължение на предишният въпрос ще разгледаме отговорите на въпрос №17, а именно „Смятате ли, че биоактивните съставки в козметичните продукти имат принос за здравето?" .(*таблица 25, фигура 28*) и въпрос 16 „Консултирате ли се със специалист преди за закупите козметика с биоактивни съставки?" .(*таблица 26, фигура 29*)

Таблица 25 *Смятате ли, че биоактивните съставки в козметичните продукти имат принос за здравето? (въпрос 17)*

Отговор	***Брой***	***%***
Да	172	94
Не	1	0.6
Не знам	10	5.4
Общо	183	100



Фигура 28
Биоактивни съставки в КП и здраве

Установихме, че най-голям процент (94%) е на позитивния отговор „да”. С „не” са отговорили само 1%, а с „не знам” - 5%. Трудно може да бъде изтълкуван позитивният отговор преди да сме намерили зависимост между отговорите в настоящия въпрос и тези на въпроси №10 и №12 - ефекта от използването на козметика, съответно за кожа и коса.

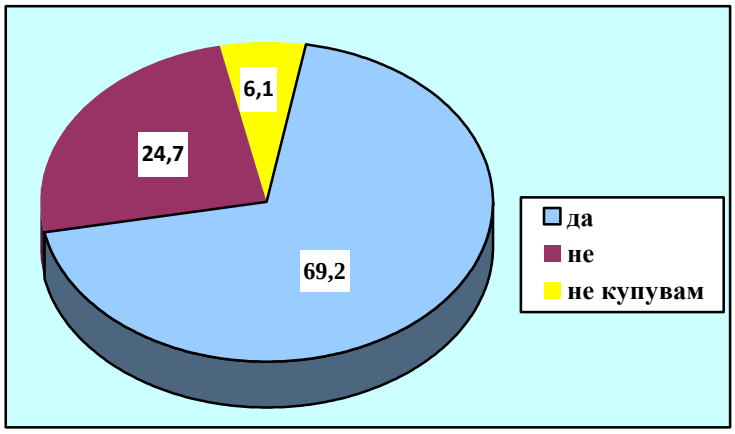
Предполагаме, че оценения ефект се свързва именно с наличието на биоактивни съединения в продуктите, чрез които се реализират претенциите на използваната козметика.

Прави впечатление броят на незнаещите лица (10), който директно можем да свържем с оценката на отговорите на въпроси № 6 „Има ли връзка козметичният продукт със здравето на човека?” и №13 „Има ли риск при използването на козметика?”, доказващи ниска информираност.

Таблица 26 *Консултирате ли се със специалист преди за закупите козметика с биоактивни съставки*?

въпрос 16)

Отговор	***Брой***	***%***
Да	127	69,2
Не	45	24,7
Не купувам	11	6,1
Общо	183	100

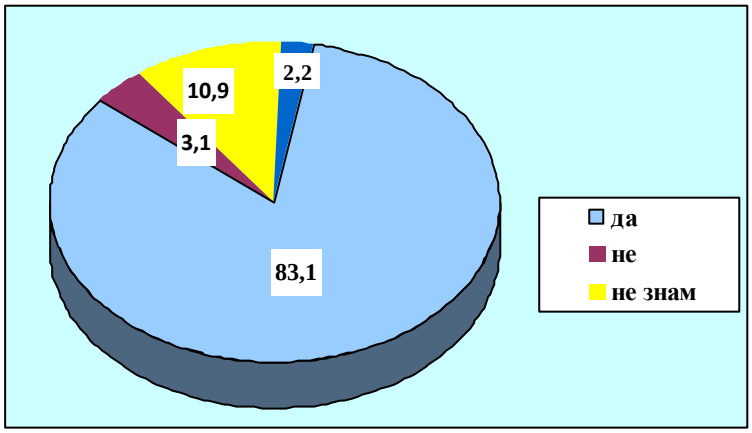


Фигура 29
Консултиране със специалист преди закупуване на козметика с биоактивни съставки

Въпросът за законовата регулация касае в по-голяма степен познанията на специалистите, които се очаква да знаят, че има законова регулация, както за производството на козметичен продукт, така и за неговото приложение. Въпросът, обаче представлява определена трудност за отделния потребител, но именно това беше нашата цел да проверим степента на познания върху контрола, осигуряващ безопасна употреба на козметиката, ръководейки се от отговорите на **въпрос №13 „Има ли риск при използването на козметика?“** в който категоричния отговор беше, че има риск при използване на козметичните продукти. Разглеждайки общо групата анкетирани се получава много висок – 83% (таблица 27, фигура 30) за лицата знаещи за съществуването на законови регламенти. Трудно може да бъде дискутирана зависимостта между показаната информираност чрез отговорите на този въпрос и мнението на респондентите, че съществува определен риск при използването на козметиката.

Таблица 27 *Подлежат ли на законова регулация козметичните продукти? (въпрос 18)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	152	83.1	84.9
Не	7	3.8	3.9
Не знам	20	10.9	11.2
Без отговор	4	2.2	
Общо	***183/179***	***100***	***100***



Фигура 30
Законова регулация на КП

Настоящият въпрос бе зададен с цел да установим степента на доверие на анкетираните към козметичните продуктите през призмата на законово аргументираната безопасност на пазара. Имайки предвид богатото присъствие на много международни и местни фирми на козметичния пазара на едни и същи продукти трудно потребителят би могъл да определи своите предпочитания. Познаването на унифицираните законови разпоредби на европейско или международно ниво ще увеличи доверието на потребителите към безопасността на продуктите и ще ги улесни при техния избор.

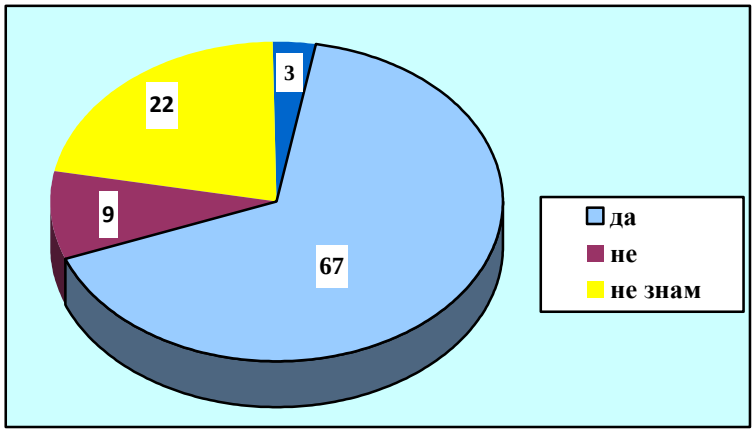
Разглеждайки в този аспект отговорите на въпрос №19 „Хармонизирано ли е националното ни законодателство в козметиката с европейското?” получаваме следните резултати: 67% от респондентите отговарят утвърдително, 9% отрицателно и 22% с „не знам”.(таблица 28,фигура 31)

Тъй като въпросът е в голяма степен специализиран и може да затрудни потребителите ще направим разпределението по съответните групи. Ясно се откроява по-високият процент на познание при групата на специалистите - 63% от тях отговарят с „да” и съответно при потребителите - само 29% дават

този положителен отговор. Отговорът „не знам” повече бихме могли да обясним с липсата на разбиране на този въпрос, а не толкова на незнание, тъй като той съществува и в двете групи, но се дължи основно на отговорите дадени от групата на потребителите.

Таблица 28 *Хармонизирано ли е националното ни законодателство в козметиката с европейското? (въпрос 19)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	122	67	68.5
Не	16	9	9
Не знам	40	22	22.5
Без отговор	5	3	
Общо	***183/178***	***100***	***100.0***

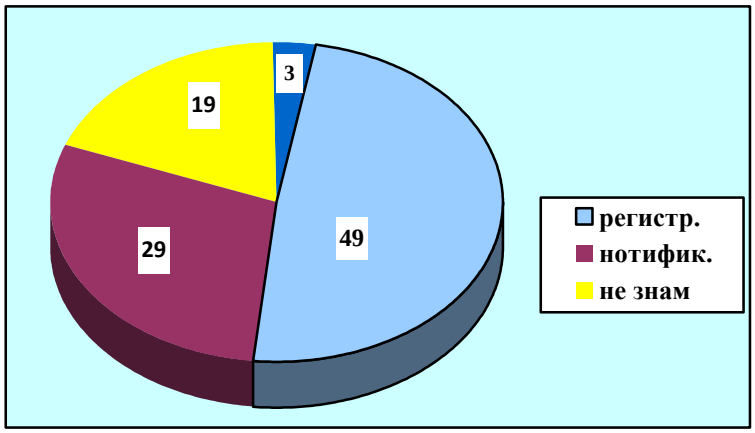


Фигура 31
Хармонизиране на законодателството

Настоящият въпрос № 20 касае специфична, професионална компетентност. Задаваме го за да оценим нивото на познания на специалистите, без да очакваме добра информираност от потребителите. Резултатите от отговорите на този въпрос не съответстват на нашите предвиждания, което показва необходимост от повишаване на информираността не само на потребителите, но и най-вече на специалистите. Най-висок процент се получава при регистрационния режим, което може да бъде обяснено с логичното мислене, но без да има сигурност за познаване на разликата в съдържанието на двата термина „регистрационен” и „нотификационен”.(таблица 29, фигура 32)

Таблица 29 *Какъв е режимът на контрол и отговорност при пускане на нов козметичен продукт? (въпрос 20)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Регистрационен	89	49	50.3
Нотификационен	53	29	29.9
Не знам	35	19	19.8
Без отговор	6	3	
Общо	***183/177***	***100***	***100.0***

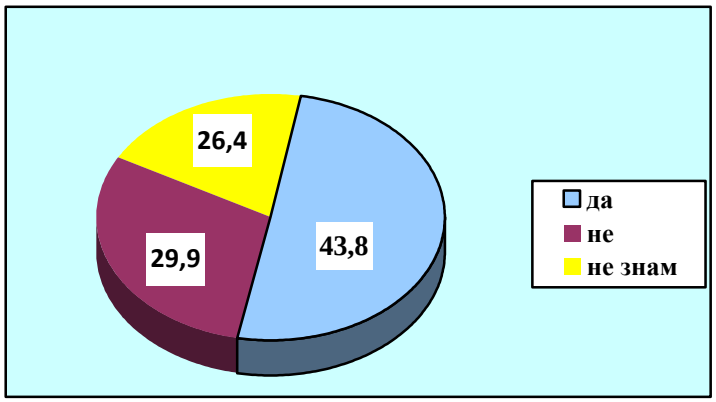


Фигура 32 *режим на контрол и отговорност при пускане на нов КП*

В Нотификационен портал за козметични продукти (CPNP), чл. 131 Ръководство за потребителя е определено, че на регистрация подлежат производствените и търговските/дистрибуторски организации, за да могат в следствие на регистрацията си да нотифицират козметичен продукт. Нотификацията на козметични продукти се извършва, съгласно две ръководства на Европейската комисия: „Нотификационен портал за козметични продукти (CPNP). Ръководство за потребителя.” и „Ръководство за потребителя за нотифициране на козметични продукти, съдържащи наноматериали”.

Тези резултати се подкрепят и от големия процент на отговорилите „не знам” – 19%, за които може да се предположи, че ако познаваха смисъла на понятията биха дали точен отговор. Обобщавайки получените резултати от отговорите на въпроса може да се констатира не достатъчна информираност на рамката на контрол на продуктите.

На фигура 32 са представени отговорите на въпрос 21” *Има ли национални стандарти за анализ на биоактивни съставки в козметични продукти?”*



Фигура 33
Национални стандарти за анализ на биоактивни съставки в козметични продукти

Анализът показва по-голям процент на незнание (26,4 %), което означава ниска информираност. Най-малкият процент, с отговор „не” показва пълна неинформираност (30 %). Бихме могли да обединим тези 2 отговора и тогава още по-ясно ще подчертае ниската информираност (>50 %).

Тъй като в действителност няма държавни стандарти, относно използнането на биоактивни съединения в козметиката, определяме тези отговори като предположения, а не като знания. Този факт се подкрепя от големия процент респонденти дали отговор „не знам”. Процентът на анкетираните отговорилите отрицателно (29%) не бихме го приели напълно като добра информираност, независимо че логично по-голямата част от специалистите са дали този отговор.

Склонни сме да приемем, че част от отговорите са дадени инертно без конкретно задълбочаване в отговора, тъй като се предполага че съществуват стандарти почти във всички икономически сфери. Отговорите и от този въпрос подкрепят становището ни за ***необходимост от намиране на конкретни подходи за повишаване информираността и сред потребителите и сред специалистите.***

Таблица 30 *Влагат ли се в козметиката витамини?(въпрос 22)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	153	84	85.5
Не	1	1	0.5
Не знам	25	14	14.0
Без отговор	4	2	
Общо	***183/179***	***100***	***100.0***

Ясно се откроява големият процент на анкетирани, знаещи че витамините се използват в козметиката – 84%, което е добра характеристика за познанията им и бихме могли да свържем този отговор с отговора на въпрос 6. Тази еднопосочност ни дава основание да дадем сигурна оценка на резултата, което можем да приемем като верификация на отговорите на въпрос № 6 („Има ли връзка козметичният продукт със здравето на човека?”). Ако направим анализ само на групата специалистите, установяваме, че над 90% от тях дават потвърдителен отговор на този въпрос.

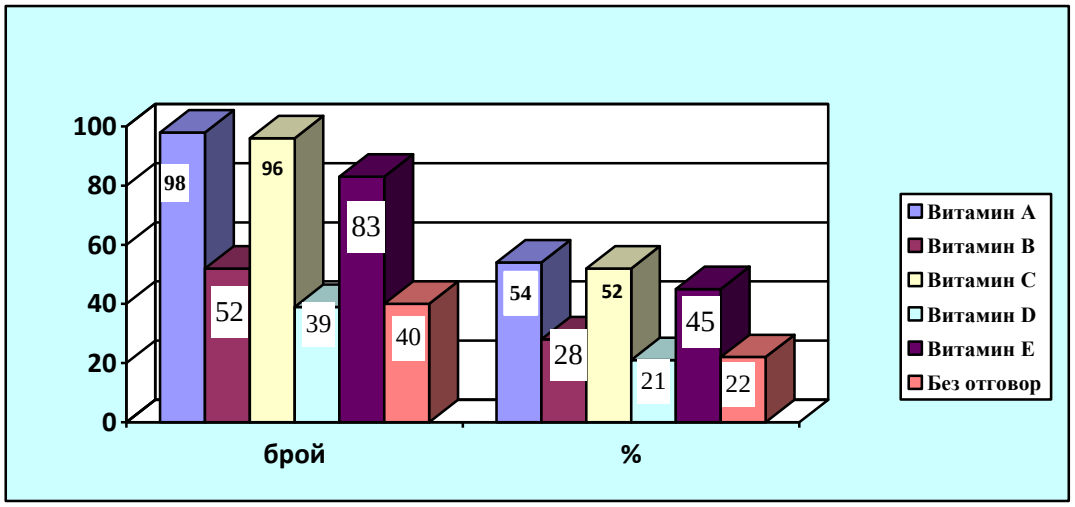
За съжаление трябва да констатираме, че сравнително голям процент от анкенираните са отговорили с не знам, което може да се дължи на по-голямия брой отговори, дадени от групата на потребителите, а не на специалистите.

На днешното ниво на развитие на научното познание можехме да очакваме много по-нисък процент на незнание. Констатираният факт отново ни дава основание да подчертаем, че съществува необходимост от повишаване на информираността на потребителите.

Таблица 31 *Моля посочете кои витамини!*

	Брой	***%***
Витамин А	98	54
Витамин В	52	28
Витамин С	96	52
Витамин D	39	21
Витамин Е	83	45
Без отговор	40	22
Брой отговори	408	
Респонденти	183	

Сборът от процентите е по-голям от 100, тъй като анкетираните са давали повече от един отговор.



Фигура 34 *Влагане на витами в КП(въпрос 23)*

Настоящият въпрос зададохме като продължение на предишния, с цел по-висока степен на сигурност в оценката на познанията на респондентите, относно участието на витамините в козметичните продукти.

Прави впечатление че най-високият процент е посочен за витамин А - 54%, следван от витамин С – 52% и витамин Е – 45%. Тези резултати показват че приблизително половината от анкетираните са наясно, че в козметиката основно се използват тези три витамина, което ни дава основание за позитивна оценка на тяхната информираност по отношение на този въпрос. Интерес представляват отговорите, включващи участието на групата на витамин В и витамин Д, но на този етап не можем да дадем коректно обяснение, тъй като тези витамини участват основно в медицинската козметика и в нутрикозметиката.

Таблица 32 *Влагат ли се в козметиката минерали? (въпрос 24)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	121	66	69.5
Не	6	3	3.5
Не знам	47	26	27.0
Без отговор	9	5	
Общо	***183/174***	***100***	***100.0***

С въпрос №24 Използват ли се в козметиката минерали?, разширяваме спектъра на познания върху активността на различните компоненти в медицинската козметика. Висок е процентът на отговорилите позитивно – 66%, но сравнително висок е и процента на отговорилите с „не знам” – 26%. Това разпределение може да се дължи на незадълбочените познания относно участието на минералите и даването на инертни отговори, предполагайки, че и минералите се използват.
Сравнявайки настоящите отговори, касаещи използването на минерали в козметиката с оценката на познанията за витамините, установяваме че процента на незнание е по-голям за минералите, в сравнение с този за витамините. Логичен е този резултат, тъй като витамините са много по-популярни, в сравнение с минералите, което е основание да потърсим подходи за повишаване на информираността.

Таблица 33 *Моля посочете кои минерали! (въпрос 25)*

Отговор	***Брой***	***%***
Se	15	8
Zn	45	25
ZnO	10	5
Fe	5	3
Mg	12	7
Ag	12	7
Без отговор	120	66
Брой отговори	205	
Респонденти	183	

Сборът от процентите е по-голям от 100, тъй като анкетираните са давали повече от един отговор.

Отговорите на този въпрос включват голямо разнообразие от минерали и някои соли. Ето защо ще обсъдим само тези, които са многократно повтарящи се. Съобщеният широк спектър от съединения говори за не добро познаване на проблема минерали и козметика, което се потвърждава и от много високия процент - 66% на не отговорилите. Тези резултати красноречиво показват необходимост от повишаване информираността и на специалистите и на

потребителите по отношение ролята и значението на минералите за ефективността на козметичните продукти.
Логично най-голям брой респонденти са посочили цинка, следван от селена, предвид дългата история на използване на цинка в козметиката и съвременната популярност на селена, като мощен антиоксидант.

Таблица 34 *Позволено ли е козметичен продукт да има претенция за лечебно приложение? (въпрос 26)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	99	54	55.6
Не	50	27	28.1
Не знам	29	16	16.3
Без отговор	5	3	
Общо	***183/178***	***100***	***100.0***

Изхождайки от настоящата законова рамка, ***претенции за лечебно приложение не може да имат козметични продукти,*** дори да имат с доказан, добър дерматологичен ефект. На този въпрос обаче много от анкетираните дават позитивен отговор, което не съответства на нормативната база. Сравнително висок е процента на лицата дали отговора „не" (27%), но трудно бихме могли да го оценим като реално познаване на законовите изисквания и може би е по-коректно да го свържем с определена несигурност на този отговор подкрепена от сравнително високия процент на отговорилите „не знам" – 16%.
Въпросът за претенциите изисква по-високо ниво на професионализъм и вероятно отговорите са замъглени в по-голяма степен от групата на потребителите. Независимо, че този въпрос е по-сложен по съдържание ние го включихме с цел да изясним зависимостите между него и въпросите, касаещи биоактивните съединения и нутриентите използвани в козметиката.
И отново установяваме тенденция на недостатъчна информираност и при специалистите и при потребителите.

Таблица 35 *Влагат ли се в козметиката мастни киселини (например омега мастни киселини)? (въпрос 30)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	145	79.2	80.1
Не	3	1.7	1.7
Незнам	33	18	18.2
Без отговор	2	1.1	
Общо	***183/181***	***100***	***100.0***

Получилите през последните години голяма популярност омега-3 мастните киселини намериха приложение и в козметиката, което ни даде основание да зададем този въпрос. От таблицата и съответната графика ясно се очертава високия % на позитивният отговор - 80%, в сравнение с отговора „не", който е пренебрежимо малък - 1,7%. Не познаване на този въпрос показват 18.2%, което можем да оценим като сравнително висока стойност. Отнасяйки тези проценти към съответните групи участници, резултатите логично показват, че по-големият процент на отговорилите позитивно се дължи на специалистите. Независимо от високият процент на позитивния отговор допускаме, че и при този въпрос е необходимо повишаване на информираността за биологичната роля на тези мастни киселини в козметиката в групата на потребителите. Със сигурност можем да предположим, че познанията не са на ниво на механизъм на действие на тези активни нутриенти.

Таблица 36 *Влагат ли се в козметиката антиоксиданти? (въпрос 31)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	136	74	76.0
Не	5	3	2.8
Не знам	38	21	21.2
Без отговор	4	2	
Общо	***183/179***	***100***	***100.0***

Разпределението на отговорите на този въпрос показва най-висок процент (76%), отговорили позитивно и 2,8% отговорили негативно. Интерес

представлява отговорът „не знам”, който е значително висок – 21,2%, предвид широката известност на значимостта на антиоксидантите в продукцията на различни козметични препарати. Този отговор е в синхрон и с незнанието, отразено при предишния въпрос, относно мастните киселини.

Независимо, че разликата между мастните киселини като нутриенти и антиоксидантите – флавоноиди и каротеноиди, като биологично-активни съединения е голяма си позволяваме да сравняваме тези въпроси единствено заради общото между тях – позитивното въздействие. За съжаление относително показаното незнание и при двата въпроса е факт, който изисква усилия от страна на науката за повишаване информираността на населението.

Таблица 37 *В слънцезащитните козметични продукти присъства ли като съставка бета-каротена? (въпрос 32)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	151	83	83.4
Не	4	2	2.2
Не знам	26	14	14.4
Без отговор	2	1	100
Общо	***183/181***	***100***	

Добре известно е, че голяма част от козметичната продукция е насочена към производство на продукти със слънцезащитна роля. Масовата им употреба предполага и добро познание, което се потвърждава и от отговорите на настоящият въпрос – 83,4%, които конкретно определят бета-каротена като съставка на подобни продукти. Тъй като по-голямата част от респондентите са жени намираме логика в този отговор. Отново установяваме сравнително висока степен на незнание по отношение на този въпрос (14,4%). Този резултат потвърждава необходимост от изясняване ползата от използването на бета-каротена в козметичните продукти.

Ако въпросът касаеше и другите активности на бета-каротена със сигурност незнанието щеше да бъде още по-високо. Подобен паралел си позволяваме да направим предвид по-високата степен на популярност на слънцезащитните свойства на бета-каротена, докато за другите му активности информация се намира основно в специализираната научна литература.

Таблица 38 *Има ли норми за съдържание на елемента флуор в продукти за устна хигиена? (въпрос 33)*

Отговор	***Брой***	***%***	***Валиден %***
Да	135	74	76.7
Не	0	0	0.0
Не знам	41	22	23.3
Без отговор	7	4	
Общо	***183/176***	***100***	***100.0***

Дискусията по отношение приложението на флуора в козметиката продължава от десетилетия, което бе основание да включим този въпрос в нашата анкета. Отговорите позволяват да разпределим респондентите само на две групи: едната, която е по-голяма 76,7% и дава позитивен отговор, че има норми за флуора и другата, която показва незнание, със значително по-нисък процент, но относително висок за оценка на информираността – 23,3%. В тези отговори се съдържа и разбирането на потребители и специалисти за контрола на безопасността от използването на козметика, съдържаща флуор. Въпросът касае повече законовата рамка, но в дълбокия си смисъл той е свързан с биологичното действие на този елемент.

Имайки предвид данните в научната литература за позитивното действие на флуора за здравето на зъбите, както и за риска при предозирането му, в настоящата разработка ние отделихме определено внимание за изясняване на този въпрос, който смятаме че е необходимо да бъде поднесен като ясна информация и за специалистите и за потребителите.

Непараметричен статистически анализ

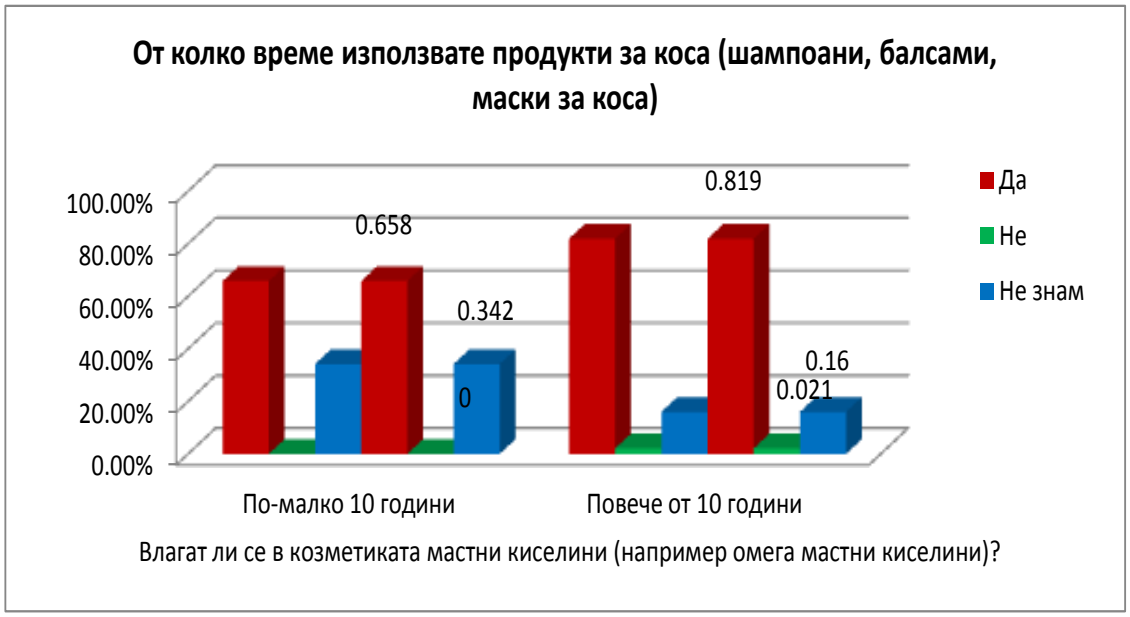
Между част от въпросите е търсена взаимовръзка. Въпросите за сравнение сме подбрали в зависимост от предположението ни за логическа връзка между тях

Взаимно честотно разпределение(%) на *(въпрос 11)"От колко време използвате козметични продукти за коса (шампоани, балсами, маски за коса и др.)?"* и 30 *информираност по отношение влагането на мастни киселини в КП*„ (таблица 39, фигура 35)

Анализът на данните от анкетата показа ***статистическа връзка между време за използване продукти за коса и информираността по отношение влагането на мастни киселини*** в продуктите: χ^2 =9,591, при ниво на значимост p=0,031 < 0.05, което може да се приеме по-скоро, като ясно изразена тенденция.

Таблица 39 *Статистическа връзка между време на ползване на продукти за коса (11 въпрос) и информираност по отношение влагането на мастни киселини (30 въпрос)*

	Да	***Не***	***Не знам***
По-малко 10 години	25	0	13
	65.8%	0.0%	34.2%
Повече от 10 години	118	3	23
	81.9%	2.1%	16.0%



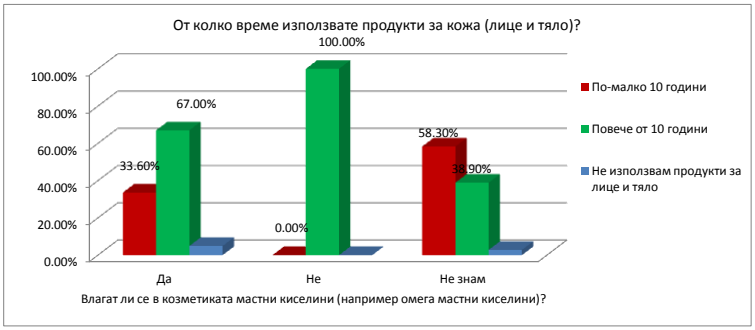
Фигура 35 *Статистическа връзка между време на ползване на продукти за коса и информираност по отношение влагането на мастни киселини*

Взаимно честотно разпределение(%) на *(въпрос 10)"От колко време използвате козметични продукти за кожа (лице и тяло)?"* и 30 „ *Влагат ли се в козметиката мастни киселини* (таблица 40, фигура 36)

При анализът на връзката между продължителност на използване на продукти за кожа и информираността по отношение влагането на мастни киселини в продуктите получихме следните резултати: Процентът на отговорилите ДА на въпроса „Влагат ли се в козметиката мастни киселини", ползващи повече от 10 години продукти за кожа 67 % е близо два пъти по-голям от тези, които не знаят дали се влагат мастни киселини – 33%. Причина за това може да бъде по-добрата информираност на потребителите, които ползват продукти от по-дълго време. В същото време се вижда, че тези които ползват продукти по-малко от 10 години и не знаят „Влагат ли се в козметиката мастни киселини" е по-голям от процента на тези, които знаят че в козметичните продукти се влагат мастни киселини. Независимо, че на пръв поглед има съществени разлики в отговорите на двете групи респонденти, ясно подчертана статистически достоверна връзка не се установява (P = 0,045 > 0,05). Касае се за тенденция.

Таблица 40 *Статистическата връзка между продължителност използване на продукти за кожа и информираността по отношение влагането на мастни киселини в продуктите*

Продължителност	***ДА***	***НЕ***	***НЕ ЗНАМ***
По-малко 10 години	48	0	21
	33.6%	0.0%	58.3%
Повече от 10 години	88	3	14
	67.0%	100.0%	38.9%
Не използвам продукти за лице и тяло	7	0	1
	4.9%	0.0%	2.8%



Фигура 36 *Статистическата връзка между продължителност използвате продукти за кожа и информираността по отношение влагането на мастни киселини*

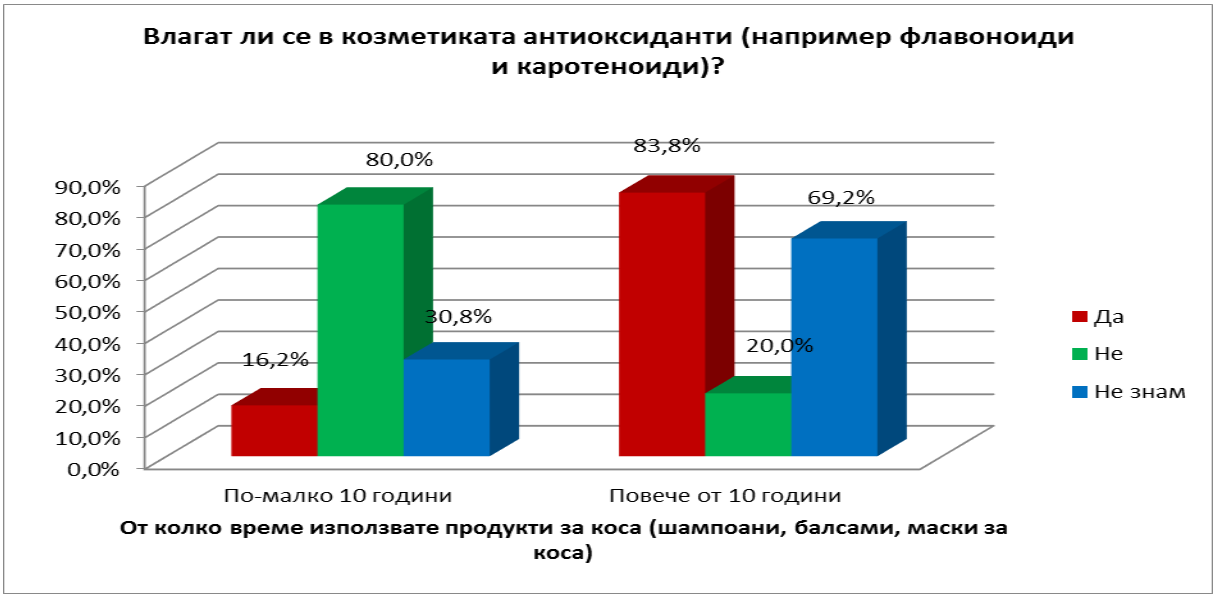
Направен е анализ на информираността на анкетираните по отношение на влагането на антиоксиданти и периода в който се използват съответно продукти за коса и кожа.

Взаимно честотно разпределение (%) на *(въпрос 11)"От колко време използвате козметични продукти за коса ?"* и 31 *информираност по отношение влагане в КП на антиоксиданти*„

Налице е ясно изразена статистически значима връзка между периода от който се използват козметични продукти и информираността по отношение на това дали се влагат или не в козметиката антиоксиданти. (фигура 37)

Ако разгледаме отговори **Да** и **Не** се вижда как се променя информираността на потребителите по отношение на влагането на антиоксиданти. Процентът на тези , които отговарят отрицателно в групата използващи продукти под 10 години е 80%, което е 4 пъти повече от тези, които отговарят отрицателно в групата използващи козметични продукти за коса над 10 години. Едновременно с това се вижда , че разпределението на положителните отговори е обратно. Процентът на отговорилите положително в групата под 10 години е пет пъти по малък /16,2%/ от процента на тези, които са

отговорили положително в групата използващи козметични продукти над 10 години /83,8%



Фигура 37 *Влагане на антиоксиданти (флавоноиди и каротеноиди) и период на ползване на продукти за коса*

Направения анализ показва подобна зависимост и при използването на козметични продукти за кожа.

И тук се вижда, че информираността за влагането на антиоксиданти в козметични продукти за кожа е значително по-висока в групата потребители над 10 години /65,4%/ срещу тези под 10 години /29,4%/. Едновременно с това процента на тези които отговарят ‚Не знам' в групата използващи козметични продукти за кожа над 10 години 35,6% е близо два пъти по-малък от процента на тези , които са в групата под 10 години.

Получените резултатина при сравняване отговорите на въпросите свързни с времето на използване на КП за коса и кожа и на тези свързани с добавянето на мастни киселини и антиоксиданти в козметиката ни карат да зададем въпроса: Може ли информираността на потребителите да се подобри, така че да се намали влиянието на фактора време при използване на козметични продукти? И ако отговора е „Да", то как може това да се случи?

Взаимно честотно разпределение (%) на *(въпрос 13*) „Има ли риск при използването на козметика?" и въпрос №15 „Четете ли етикета, когато купувате козметика?".

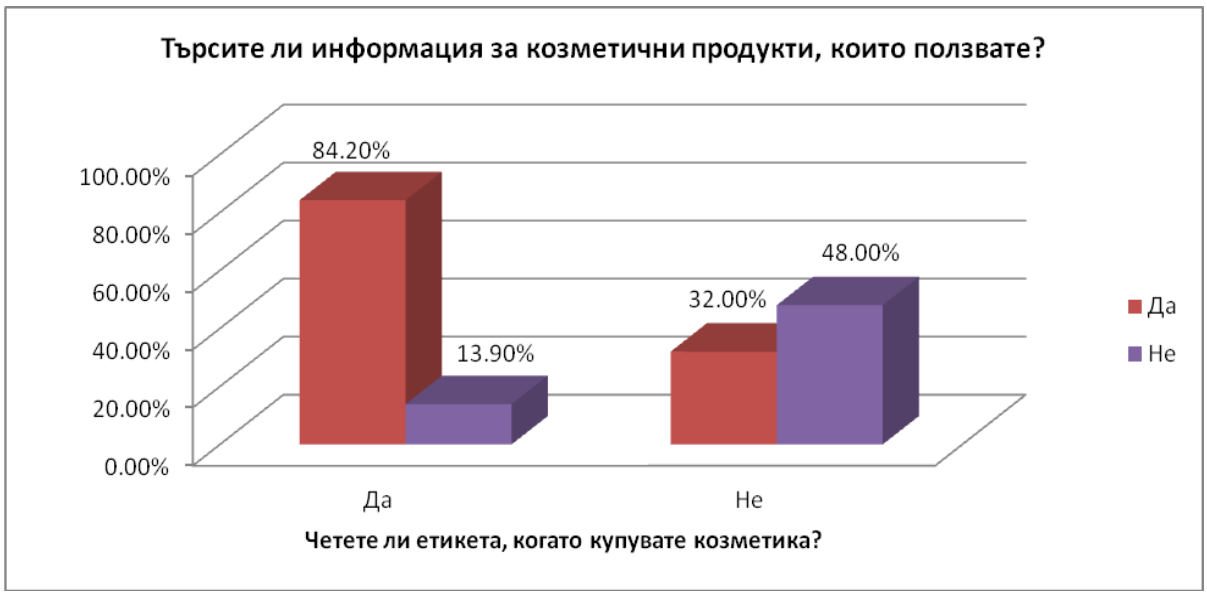
Отговорите са доста противоречиви и категорично показват, че анкетираните не свързват информацията на етикета с риска. В случая съществените разлики в отговорите могат да се обеснят до някъде не само с недостатъчна информираност, но и на значително различаващи се по познания групи участващи в анкетата, а именно „потребители" и „професионалисти".

Взаимно честотно разпределение (%) на въпрос 14 „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате"? с въпрос 15 „Четете ли етикета, когато купувате козметика?"(таблица 41, фигура 38)

Таблица 41 *Сравнение на въпрос 14 „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате" с въпрос 15 „Четете ли етикета, когато купувате козметика*

Информация /етикет	***Да***	***Не***
Да	133	8
	84.2%	32.0%
Не	22	12
	13.9%	48.0%
нямам отношение	3	5
	1.9%	20.0%

При сравнение на въпрос 14 „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате" с въпрос 15 „Четете ли етикета, когато купувате козметика?" установяваме, че 84.2% от търсещите информация я намират на етикета на козметичните продукти. Докато респондентите, които не търсят информация в етикета, но го четат е едва 13.9%. В същото време % на тези респонденти, които търсят информация в етикета е 2.5 пъти по-голям (84%/32%) от тези, които не ползват етикета като основен източник на информация. *Следователно, етикетът е важен източник на информация и влияе съществено при избора на КП.*



Фигура 38 *Сравнение на въпрос „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате" с въпрос „Четете ли етикета, когато купувате козметика*

Взаимно честотно разпределение (%) на въпрос 14 „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате"? с въпрос 16 „Консултирате ли се със специалист при купуване на козметика, съдържаща биоактивни съставки. (таблица 42, фигура 39)

Таблица 42 *Връзка между търсенето на информация и консултацията със специалист при купуване на козметика, съдържаща биоактивни съставки.*

	Да	***Не***	***Не купувам такава козметика***
Да	74	54	13
	52.5%	38.3%	9.2%
Не	6	26	2
	17.6%	76.5%	5.9%
нямам отношение	1	6	1
	12.5%	75.0%	12.5%

52,5% от респондентите, които търсят информация за козметичните продукти всъщност се обръщат към консултант, което е доста повече от не ползващите консултантски услуги, но търсещи информация - 38,3%.

В същото време резултатите от сравнение на въпрос „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате" с въпрос „Четете ли етикета, когато купувате козметика (% респонденти, които търсят информация в етикета е 2.5 пъти по-голям от не търсещите) показват, че потребителя има по-голям афинитет към етикета, като информативен източник. Този интерес към етикета поставя по-високи изисквания към него.



Фигура 39 *Връзка между търсенето на информация и консултацията със специалист при купуване на козметика, съдържаща биоактивни съставки*

Установените взаимовръзки между отговорите на различните въпроси, оценени с непараметричния статистически анализ, дават сериозни аргументи, които могат да се ползват от различни групи специалисти, ангажирани с производството и разпространението на КП, а и в още по-голяма степен от научно-практичните звена, отговарящи за информирането на потребителите за всички аспекти на използване на КП, включително и безопасност.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стремежът на човека за постигане на дълголетие е свързан с многобройни и разнообразни подходи за реализацията му. Един от тези подходи е стремежът към красота и добър външен вид. В този проект потърсихме и надяваме се намерихме някои от отговорите за достигане на този стремеж, с данни за ролята при прилагане на биоактивни съединения в козметика, както и при познание и спазване на законовата рамка. Направеният обстоен анализ на законовата рамка в областта на козметичните продукти, на национално и европейско ниво и сравняването на ключови показатели, касаещи общественото здраве ни позволи да предоставим съвременна информация за ролята на биологично активни съединения, намиращи приложимост в състава на козметичните продукти.

Внедрените високотехнологични методи за анализ на биоактивни съединения в които използвахме техники даващи достоверни резултати са принос към познанието за БАС като значими съставки на КП, които освен за добрия външен вид допринасят и за здравето на потребителите. Методите са валидирани и апробирани върху реални продукти, закупени от търговска мрежа. Методът за анализ на мастно-киселинен състав е представен на юбилейна научна конференция на специалисти по здравни грижи. Методът за анализ и контрол на съдържанието на флуор в продукти за дентална хигиена е уникален с факта, че инжектирането се извършва от паровата фаза на пробата, което е щадящ за хроматографската колона способ. Публикуван е в списание с IF, което е доказателство за приноса не само към аналитичната практика, но и за общественото здраве като приложим за изпитването на вещество, подлежащо на здравен контрол.

Проучена е информираността на потребители и участници във веригата на производството и контрола на козметични продукти, във връзка с познанието за ползите от съдържащите се в тях биоактивни съединения и относно безопастността на козметичните продукти. Създадените **информационни материали (Приложение 5)** ще допринесат за повишаване здравната грамотност на потребители и специалисти по отношение на безопасността на биологично активните съставки в козметичните продукти.

ИЗВОДИ

1) При анализът на законовата рамка и на стандартизационните документи в не са намерени методи за анализ и контрол на биологично активни съединения в козметичните продукти.
2) Предложеният от нас UHPLC/HRMS метод за анализ на витамини позволява елиминиране на сложната пробоподготовка, идентифициране и количествено определяне на съединенията;
3) Методът за контрол на съдържанието на флуор в продукти за дентална хигиена, позволява подобряване на селективността на метода, елиминиране на пречещите влияния и не на последно място предпазване на хроматографската колона.
4) Приложеният метод за анализ, чрез дериватизация до летлива форма по преестерификационен метод е подходящ за анализ на мастни киселини, с дължина на веригата от C4 до C24 и позволява количествено определяне на 37 индивидуални или по групи – наситени, ненаситени, омега-3, 6 и 9 киселини.
5) Преимущество на разработените методи е тяхната рентабилност, състояща се в съкращаване на времето за анализ и в облекчената процедура по пробоподготовка.
6) Статистически значима връзка бе установена между периода на използване на козметични продукти и информираността за влагане в тях на антиоксиданти. При 65,4% от респондентите ползващи такива продукти над 10 години са информирани за влагането на антиоксиданти, докато при тези, които ползват под 10 години само 29.4% са информирани.
7) Проучването на информираността на потребители относно ролята на биологично активни съставки в козметичните продукти установи, че 94% от респондентите смятат, че биоактивните съставки в козметичните имат принос за здравето.

ПРИНОСИ

Приноси с научно – методичен характер:

- Принос за аналитичната практика са разработените методи за анализ на биологично активни съединения в козметиката.
- Предложените методи са готов инструментариум за анализ на биоактивни съединения в козметика и са апробирани за определяне съдържанието на витамин А, витамин Е и ß-каротен в козметични продукти с UHPLC-HRMS метод, на мастно-киселинен състав в козметични масла с GC/FID метод и на флуор, с GC/FID/HS метод за контрол на продукти за дентална хигиена.

Приноси с научно- приложен характер:

- Разработени са информационни материали по отношение на ролята, контрола и методите за анализ на биологично активните съставки в козметичните продукти, което се очаква да повиши здравната грамотност на потребителите.
- Оценено е нивото на информираност на респонденти, имащи отношение към козметичните продукти, в аспекта на значението за здравето и на най-големия орган в човешкото тяло – кожата, запазване на красотата и добрия външен вид.
- Установенията взаимовръзки между отговорите на различните въпроси, оценени с непараметричния статистически анализ дават сериозни аргументи, които могат да се ползват от различни групи специалисти, ангажирани с производството и разпространението на КП, а и в още по-голяма степен от научно-практичните звена, отговарящи за информирането на потребителите за всички аспекти на използване на КП, включително и безопасност.

Принос с потвърдителен характер имат данните от анализа на растителни масла с такива от признати литературни източници.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атанасов Н., Маслинков Д., Флуорна профилактика на зъбния кариес, София, Медицина и физкултура, 1987
2. БДС EN 12136:2000 Плодови и зеленчукови сокове. Определяне на общото съдържание на каротеноиди и отделните фракции
3. БДС EN 12823:2001 Определяне на витамин А чрез високоефективна течна хроматография
4. БДС EN 45020:2007 Стандартизация и свързаните с нея дейности. Речник на общите термини (ISO/IEC Guide 2:2004)].
5. БДС EN ISO 9000:2015 Системи за управление на качеството. Основни принципи и речник
6. БДС EN ISO/IEC 17025/AC:2018 Общи изисквания относно компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране, БИС
7. БДС ISO/IEC 17000:2004 "Оценяване на съответствието - Речник и общи принципи";
8. Ботушанов. П. Зъбен кариес и неговата профилактика. МФ.С.1997.102-112.
9. Български институт за стандартизация, Основни термини, Хармонизирани стандарти, БИС, 2016
10. Вълчанова, В., Петкова, В., Фармаковижиланс и козметовижиланс според европейското законодателство, Наука Фармакология 2/2014
11. Д. Иванова, В. Константинова, Начини и възможности за осигуряване качеството на резултатите в областта на химичните измервания, Национален научен симпозиум с международно участие „Метрология и Метрологично Осигуряване” - Двадесет и пет годишен юбилей, 2015г.
12. Директива на съвета от 27 юли 1976 година относно сближаването на законодателствата на държавите-членки, свързани с козметични продукти (76/768/ЕИО) (ОВ L 262, 27.9.1976 г., стр. 169)
13. Доклад на комисията до европейския парламент и съвета относно претенциите на продукти, направени въз основа на общи критерии в областта на козметичните продукти, ЕК, Брюксел, 19.9.2016г.
14. Закон за здравето, 2005 г., последно изм. ДВ. бр.24 от 22 Март 2019г

15. Кабакчиева Р., Алексиева Р. (2011). Флуорни зъбни пасти и води за уста за деца. Съвременна стоматология, 42, (2), 32 – 48
16. Наредба 36 на МЗ/2005 за изискванията към козметичните продукти
17. Наредба № 14 от 28 юли 2014 г. за определяне на подробни правила за представяне на информацията по чл. 19, пар. 4 на регламент (ео) № 1223/2009 относно козметичните продукти, изисквания за ефикасност на слънцезащитните козметични продукти и химичните методи за проверка състава на козметичните продукти
18. Наредба за принципите, инспекцията и удостоверяването на добрата лабораторна практика Обн. ДВ. бр.74 от 24 Август 2004г.
19. Национална Програма за Профилактика на Оралните Заболявания в България за периода 2015-2020г.
20. Любомирова К., Ст.Узунова, А.Тачев, Л.Мечкуева Оценка на естрогенния потенциал на някои УВ-филтри, използвани в козметичните продукти. Възможности за контрол на здравния риск. Ендокринология, 2006г, бр.3, 13-21.
21. Любомирова К., Узунова Ст., Обрешкова Д., Тачев А., Пенчева И. Оценка на канцерогенния риск при експозиция на нитрозамини в козметични продукти , Военна медицина 2006, бр.3.,38-41.
22. Марголина А.А., Эрнандес Е.И. Новая косметология - Практическое пособие Том 1, 2010
23. Оценяването на съответствието, БИС, 2007
24. Панева, С., Пашов, Й., Ангелова, Й., Николов, А., Флуор – дентално здраве – за и против, Колективна монография, Здраве и Наука, стр. 175-182, 2018
25. Панева С., Асанова Б., Рибарова Ф., Селенът в козметиката - фактор за здравето на кожата. Здраве и Наука, бр.3, (027), 2017.
26. Регламент (ЕО) No 1907/2006 на Европейския Парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. за регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химични вещества., 1 юни 2007
27. Регламент (ЕО) № 1223/2009 на Европейския парламент и на Съвета от 30 ноември 2009 г. относно козметичните продукти

28. Регламент (ЕО) № 440/2008 на Комисията от 30 май 2008 година за определяне на методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH)
29. Решение на комисията от 8 май 1996 година относно съставяне на списък и обща номенклатура на съставките, използвани в козметичните продукти (96/335/ЕО)
30. Рибарова, Ф., Храна и витамини, 2007
31. Ръководство на на Европейската Комисия, изготвено със съдействието на Cosmetics Europe, EFFCI, IFRA, UEAPME, UNITIS, BEUC, South-East Europe
32. Станчева М., Научни трудове, МУ-Варна, том 36, кн. 5, 2008
33. Сухарева О.Ю., Делеган-Кокайко С.В., Сухарев С.М., Р, Спектрофотометричне визначення фторидів у природних водах, Наук. вісник Ужгород. ун-ту (Сер. Хімія), 2018, № 1 (39)
34. Цанова-Савова, Н. Ризов. Значение на международните стандарти за качество и безопасност на храните. Медицински меридиани, 4**, 2013,** 44-51
35. Цанова-Савова С., Медицински меридиани, 2010
36. Закон за националната акредитация на органи за оценяване на съответствието (загл. изм. - дв, бр. 41 от 2010 г., в сила от 01.06.2010 г.]
37. Abdel-Hakim T. Kandil 1 , Hady S. Gado 2 , Mohamed F. Cheira et al, Potentiality of Fluoride Determination from Egyptian Phosphogypsum Using an Ion Selective Electrode, IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC) e-ISSN: 2278-5736.Volume 9, Issue 4 Ver. II (Apr. 2016), PP 01-11
38. Abdelkarim Guaadaoui, Soumaya Benaicha, Naima Elmajdoub, et all, What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus, International Journal of Nutrition and Food Sciences 2014; 3(3): 174-179
39. Antony R. Young, Claveau, J. and Beatris A., Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection, J AM ACAD DERMATOL V.76, N.3

40. AOAC Authors. Official methods of analysis Lipids, Fats and Oils Analysis Carotene - item 30. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Method 970.64
41. Atanasova, M., Biologically active substances – sources of antioxidants, Sofiaq 2011
42. Bernecke, S., Maruska, A., Analisis of free fatty acids in soap samples by means of gas chromatography-mass spectrometry, January 2013, Chemija 24(4):307-311
43. Blake C. J., Status of Methodology for the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods, Dietary Supplements, and Vitamin Premixes, Committee on Food Nutrition, Journal of AOAC International, 90, 1, 2007, 897-910
44. Blake C. J., Status of Methodology for the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods, Dietary Supplements, and Vitamin Premixes, Journal of AOAC International, vol. 90, No. 4, 2007
45. Brown, M. J.; Ferruzzi, M. G.; Nguyen, M. L.; Cooper, D. A.; Eldridge, A. L.; Schwartz, S. J.; White, W. S.: Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with lectrochemical detection, Am. J. Clin. Nutr., 80: 396-403, 2004
46. Chanchal Deep Kaur and Swarnlata Saraf, In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics, Pharmacognosy Res. 2010 Jan-Feb; 2(1): 22–25.
47. Chromatography. Online Etymology Dictionary.
48. Cosmetics - CosIng [EC Regulation (v.2)
49. Cosmetics legislation Cosmetic products Methods of analysis, Volume 2, European Communities, 2000
50. Dalziel KL. Aspects of cutaneous aging. Clin Exp Dermatol 1991;16:315–23
51. David I Thurnham, Review Bioequivalence of β-carotene and retinol, J Sci Food Agric 87:13–39 (2007)
52. Dineva, S., Topic 7 Lipids. Species, structure and biological function. Chapter (PDF Available) September 2018 with 1,204 Reads In book: Biochemistry, Publisher: Thracian University, pp. 123-145

53. Dinkova-Kostova AT. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms. Planta Med 2008;74: 1548–59
54. Escriva A., M.J. Esteve, R. Farre, A. Frigola, Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 947, 2002, 313–318
55. Esther Boelsma, Henk FJ Hendriks, and Len Roza, Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids1–3, The American Journal of Clinical Nutrition, Volume 73, Issue 5, May 2001, Pages 853–864,
56. Ettre LS, Zlatkis A, eds. (26 August 2011). 75 Years of Chromatography: A Historical Dialogue. Elsevier. ISBN 978-0-08-085817-3
57. Evans HM, Emerson OH, Emerson GA. The isolation from wheat germ oil of an alcohol, alphatocopherol, having the properties of vitamin E. J Biol Chem. 1936;113:319–32.
58. FAO, Fats and fatty acids in human nutrition Report of an expert consultation, 2010
59. Final version of the Opinion on Vitamin A (Retinol, Retinyl Acetate and Retinyl Palmitate) and corrigendum, SCCS/1576/16
60. Firestone, D.; AOCS Method Ca 5a-40. Official methods and recommended practices of the AOCS: Sampling and analysis of commercial, Revised 2017
61. Fiume, MM, Bergfeld WF, et al, Safety Assessment of Tocopherols and Tocotrienols as Used in Cosmetics, International Journal of Toxicology 37(2_suppl):61S-94S • September 2018
62. Fluoride & iq: the 53 studies, fluoride action network by michael connett & tara blank, phd updated september 11, 2016.
63. Gerson M. (2002). A Cancer Therapy, Gerson Institute, Second Ave.. San Diego, CA 92101, pp 171 – 172.
64. Guide 34, General requirements for the competence of reference material producer, 2009
65. Guide 35, Reference materials — General and statistical principles for certification, 2007
66. Guillarme, D.,Veuthey, J.,Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry, Chapter 1 Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS Techniques, 2017, Pages 1-38

67. Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development - 2nd ed, World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases 2009
68. Hitoshi Masaki, Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects, J. of Derm. Science, 2010
69. http://www.bds-bg.org/bg/standard/index.php?national_committee_id=20
70. https://www.bds-bg.org/bg/tc/work_programme.php?national_committee_id=35
71. http://www.ewg.org/2010sunscreen
72. https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing_en];
73. https://www.cebos.com/blog/the-beginners-guide-to-quality-management-systems/#Chapter1
74. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022065/
75. Hubinger JC, Determination of retinol, retinyl palmitate, and retinoic acid in consumer cosmetic products., J Cosmet Sci. 2009 Sep-Oct;60(5):485-500
76. Hubinger JC, Determination of retinol, retinyl palmitate, and retinoic acid in consumer cosmetic products., J Cosmet Sci. 2009 Sep-Oct;60(5):485-500.
77. Igielska-Kalwat J., et al, Chemik, 66, 2, 140-144, 2012
78. Igielska-Kalwat , J., Analysis of Composition and Stability of Emulsions Containing Carotenoids with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Biomed J Sci & Tech Res 13(1)-2019. BJSTR. MS.ID.002355. DOI: 10.26717/ BJSTR.2019.13.002355.
79. ILAC-G24, Guidelines for the determination of calibration intervals of measuring instrument, 2007
80. Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Automated Sample Preparation Techniques Rebecca Veeneman Agilent Technologies Pittcon 2011 March 16, 2011 1370-5
81. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 2012
82. ISO 12966-1:2014 Animal and vegetable fats and oils -- Gas chromatography of fatty acid methyl esters -- Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters

83. Jianing Mi, Kun-Peng Jia, Jian You Yo Wang, Salim Al-Babili, A rapid LC-MS method for qualitative and quantitative profiling of plant apocarotenoids, Analytica Chimica Acta 1035, 2018
84. Jones Sh., Burt B.A., Petersen P.E., et al, (2005). The effective use of fluorides in public health. Bulletin of the World Health Organization, SciELO
85. Juncan, A. , Analysis of some antioxidants used in cosmetics by chromatographic methods, tesis abstract, 2011
86. Kang S., et al. Photoaging: pathogenesis, prevention and treatment. Clin Geriatr Med , 17, 643-659;
87. Karen Laszlo Keller, MD, and Neil A. Fenske, MD, Uses of vitamins A, C, and E and related compounds in dermatology, J Am Acad Dermatol. 1998 Oct;39(4 Pt 1):611-25
88. Khan SA, Singh RK, at al., Relationship between dental fluorosis and intelligence quotient of school going children in and around Lucknow district: a cross-sectional study, J Clin Diagn Res. 2015 Nov;9(11):ZC10-5
89. Kligman, L.H., Duo, C.H., Kligman, A.M., Topical retinoic acid enhances the repair of ultraviolet damaged dermal connective tissue, Connective Tissue Research, Volume 12, Issue 2, 1984, Pages 139-150
90. Krutmann, Add all, The skin aging exposome, Journal of Dermatological Science, DESC 3069 No. of Pages 10, 2016
91. Lands WEM. Biochemistry and physiology of n−3 fatty acids. FASEB J 1992;6:2530-6.
92. Lautenschleger H. 2014. Vitamins in cosmetics. Beauty Forum, (10), 18-21; (11),38-40
93. Lupo M.P, .Antioxidants and Vitamins in Cosmetics. Clinics in Dermatology, 2001, 19, 467-473.
94. Lyubomirova, K., Lalev, N., Antioxidants in cosmetic products, in Antioxidants – prevention and healthy ageing., edit Ribarova, F., p. 289-297, Simelpres, Sofia, 2010
95. M. Guidoni 1, M.M. de Christo Scherer 1, M.M. Figueira, et all., Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications, Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2019) 52(2)

96. Marcia Ramos-e-Silva add all, Anti-aging cosmetics: Facts and controversies, 2013 Elsevier
97. MD Steven Q. Wang Steven Q. Wang, Stephen W. Dusza, DrPHa, Henry W. Lim, MDb, Safety of retinyl palmitate in sunscreens: A critical analysis,AAD, 63, 5, 903–906
98. Mukherjee S. Date, A, Patravale, V., et al ., Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety, Clin Interv Aging. 2006 Dec; 1(4): 327–348
99. Murray Berdick, The role of fats and oils in cosmetics, Journal of the American Oil Chemists' Society July 1972, Volume 49, Issue 7, pp 406–408
100. Nastova, B., Atanasovska, S., Doneva, D., Arsova-Sarafinovska, Z., Determination of All-Rac-Alpha-Tocopherol and All-Rac-Alpha-Tocopheryl Acetate (Synthetic Vitamin E) in Cosmetic Preparations. Macedonian Pharmaceutical Bulletin, (2011) 57 (11). pp. 50-51. ISSN 1409 - 8695
101. Online Etymology Dictionary (website): http://www.etymonline.com; 2013.
102. Olson J.M.; Shah N. A., Vitamin A Toxicity, StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan
103. Orfanos, C., Christos Z., Brigitte Almond-Roesler, Geilen, C..,Current Use and Future Potential Role of Retinoids in Dermatology 1997
104. Platform of European Market Surveillance Authorities for Cosmetics - PEMSAC
105. Ribarova, F., alpha-Tocopherol, fatty acids and their correlations in Bulgarian foodstuffs, 2003
106. Risk assessment of vitamin A (retinol and retinyl esters) in cosmetics, Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) 10/405-3 final
107. Rizov T.N., Paneva S.S., Determination of fluoride in toothpaste and in mouthwash products by GC/FID/HS, Bulgarian Chemical Communications, Volume 50, Issue 2, (pp. 250 – 253), 2018
108. Sarathchandraprakash, K., Jampala Balaji, K. Manral et al, A simple Gas Chromatography Method Developed for Fluoride Content Quantification in Oral Hygiene Formulations by Using Capillary Column, International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology (An ISO 3297: 2007 Certified Organization) Vol. 3, Issue 12, December 2014

109. Sarkar R, Podder I, Gokhale N, Jagadeesan S, Garg V. Use of vegetable oils in dermatology: an overview. Int J Dermatol 2017; 56: 1080–1086, doi: 10.1111/ijd.13623
110. Sautebin L1., A cosmetovigilance survey in Europe, Pharmacol Res. 2007 May; 55(5):455-60. Epub 2007
111. SCCS/1564/15 Revised version of 25 April 2016
112. Schierle et al.: journal of aoac international vol. 87, NO. 5, 2004, Method for the Determination of b-Carotene in Supplements and Raw Materials by Reversed-Phase Liquid Chromatography: Single Laboratory Validation
113. Seité S, Bredoux C, Compan D, et al. Histological evaluation of a topically applied retinol-vitamin C combination. Skin Pharmacol Physiol. 2005;18:81-7.
114. Sies H, Stahl W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. Annu Rev Nutr 2004;24:173–200
115. Stahl W., et al., Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim. Biophys Acta, 1740, 101-107, 2005
116. Steven Darlington, BSc; Gail Williams, PhD; Rachel Neale, PhD; et al, A Randomized Controlled Trial to Assess Sunscreen Application and Beta Carotene Supplementation in the Prevention of Solar Keratoses, Arch Dermatol. 2003;139(4):451-455. doi:10.1001/archderm.139.4.451
117. Švarc-Gajića, J., Stojanovića, Z., et. All., Determination of fluorides in pharmaceutical products for oral hygiene, Journal of Food and Drug Analysis Volume 21, Issue 4, December 2013, Pages 384-38
118. The Scope of Accreditation and Consideration of Methods and Criteria for the Assessment of the Scope in Testing, ILAC-G18:2002
119. The SCCS adopted this guidance documentat its plenary meeting on 24 – 25 October 2018
120. Thiele JJ, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and consideration for its use in dermatology. Mol Aspects Med. 2007;28:646–67
121. Thiele JJ, Hsieh SN, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E: Critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. Dermatol Surg. 2005;31:805–13. [PubMed] [Google Scholar
122. Toklu, H., Antigua A., Lewis V., et al, Cosmetovigilance: A review of the current literature, J Family Med Prim Care. 2019 May; 8(5): 1540–1545.

123. Tozera S., O'Mahonyb C., Hannah J., et al, Aggregate exposure modelling of vitamin A from cosmetic products, diet and food supplements, Food and Chemical Toxicology, Volume 131, 2019, 110549]
124. Uzunova St., A.Tachev, Lyubomirova K., Obreshkova D., Pencheva I., Legislation on cosmetic products in regards with nitrosamines. Journal on Environmental Protection and Ecology, 9, 2008, 4, 903-913
125. Vasiljevic, D., Radonjić, N., Vuleta, V., Vitamins in cosmetic products: Current opinions and practice, Arh.farm. 2017; 67: 248 – 264
126. Vigan M, Castelain F., Cosmetovigilance: definition, regulation and use "in practice, Eur J Dermatol. 2014
127. Vitamin A: Intake via cosmetic products should be restricted, Updated BfR opinion 005/2014, 31 January 2014
128. Vitlianova, K. , Ribarova, F., Plasma α -tocopherol and coronary risk in Sofia acute myocardial infarction study, 2014
129. Wellness Resources. Nutrients that protect your skin. 2019. www.wellnessresources.com/news
130. Wilhelm Stahl and Helmut Sies, b-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight, Am J Clin Nutr 2012;96(suppl):1179S–84S
131. William W. Christie, Isoprenoids: 1. Tocopherols and Tocotrienols (Vitamin E), April 9th, 2019
132. Zhimin X., Howard, L. R., Analysis of Antioxidant Rich Phytochemicals, Chapter: Analysis Methods of Carotenoids, Publisher: John Wiley & Sons, pp.105-148
133. Zussman J, Ahdout J, Kim J. Vitamins and photoaging: do scientific data support their use? J Am Acad Dermatol. 2010;63:507-25
134. 2017/2922(RSP) Resolution on a global ban to end animal testing for cosmetics

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 - Анкетна карта

Настоящата анкета се провежда във връзка с научно проучване върху информираността на потребители и специалисти, относно ролята, значението и безопасността на биоактивните съставки в козметичните продукти. Анкетата е анонимна и всички данни от нея ще бъдат използвани единствено с научно-изследователска цел. Моля, прочетете внимателно въпросите, за да дадете коректен отговор, който е от значение за формиране на прецизен научен резултат

1) Моля отбележете дали Вие сте?

□ Потребител на козметика;

□ Специалист (*козметик/дерматолог/друг*)

□ Отговорно лице (*производител, търговец, лаборатория, представител на контролен орган)*;

2) Вашата възрастова група е:

□ До 30 години

□ От 30 до 50 години

□ Над 50 години

3) Пол

□ Мъж

□ жена

4) Моля, посочете Вашата степен на образование

□ Средно

□ Висше (*бакалавър/магистър*)

□ Научна степен (*доктор и по-високо)*

5) Знаете ли що е козметичен продукт?

□ Да

□ Не

6) Има ли връзка козметичният продукт със здравето на човека?

□ Да

□ Не

□ Не зная

7) Използвате ли козметични продукти?

□ Да

□ Не

8) Ако използвате козметични продукти, моля отговорете с какво предназначение?

□ За кожа

□ За коса

□ За нокти

□ За зъби

9) От колко време използвате продукти за кожа (лице и тяло), моля отговорете?

□ По-малко от 10 години

□ Повече от 10 години

□ Не използвам продукти за лице и тяло

10) Какъв е ефекта от използването на козметика за кожа (лице и тяло)?

□ Добър

□ Лош

□ Няма ефект

11) От колко време използвате продукти за коса (*шампоани, балсами, маски за коса и др.*)

□ По-малко от 10 години

□ Повече от 10 години

□ Не използвам продукти за коса

12) Какъв е ефекта от използването на козметика за коса?

□ Добър

□ Лош

□ Няма ефект

13) Има ли риск при използването на козметика?

□ Да

□ Не

□ Не знам

14) Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате?

□ Да;

□ Не;

□ Нямам отношение

15) Четете ли етикета, когато купувате козметика?

□ Да

□ Не

16) Консултирате ли се със специалист преди за закупите козметика с биоактивни съставки?

□ Да

□ Не

□ Не купувам такава козметика

17) Смятате ли, че биоактивните съставки в козметичните продукти имат принос за здравето?

□ Да

□ Не

□ Не зная

18) Подлежат ли на законова регулация козметичните продукти?

□ Да

□ Не

□ Не зная

19) Хармонизирано ли е националното ни законодателство в козметиката с европейското?

□ Да

□ Не

□ Не зная

20) Какъв е режимът на контрол и отговорност при пускане на нов козметичен продукт?

□ Нотификационен

□ Регистрационен

□ Не зная

21) Задължително ли е козметичните продукти да имат етикет на български език, с обявен състав?

□ Да

□ Не

□ Не зная

22) Влагат ли се в козметиката витамини?

□ Да

□ Не

□ Не зная

23) Ако отговора е „Да”, посочете кои витамини!

24) Използват ли се в козметиката минерали?

□ Да

□ Не

□ Не зная

25) Ако отговора е „Да”, посочете кои минерали!

26) Позволено ли е козметичен продукт да има претенция за лечебно приложение?

□ Да;

□ Не;

□ Не зная

29) Консултирате ли се със специалист преди за закупите козметика с биоактивни съставки?

□ Да

□ Не

□ Не купувам такава козметика

30) Влагат ли се в козметиката мастни киселини *(например омега мастни киселини)?*

□ Да

□ Не

□ Не зная

31) Влагат ли се в козметиката антиоксиданти?

□ Да

□ Не

□ Не зная

32) В слънцезащитните козметични продукти присъства ли като съставка бета-каротена?

□ Да

□ Не

□ Не зная

33) Има ли норми за съдържание на елемента флуор в продукти за устна хигиена?

□ Да

□ Не

□ Не знам

Благодаря Ви за отзивчивостта и отделеното време!

Приложение 2 - Списък на фигурите

Фигура №	*Наименование*
1.	Механизъм на гасене от ß -каротена на синглетния молекулен кислород и превръщането му в триплетна форма
2.	Структурна формула и наименование на ретинол
3.	Структурна формула и наименование на α–tocopherol
4.	Механизмът на прекъсване на радикалова реакция от α–tocopherol
5.	Графично представяне на стандартите, групирани по предназначение
6.	Хроматограма на стандартен разтвор retinol
7.	Хроматограма на проба „А“ за retinol
8.	Хроматограма на стандартен разтвор на tocopherol acetate
9.	Хроматограма на проба „А” за tocopherol acetate
10.	Мас-спектър и хроматограма на стандартен разтвор на β-carotene
11.	Хроматограма на хексанов екстракт от проба „В“ за β-carotene
12.	Хроматограма на референтен микс FAME
13.	Хроматограма на FAME в ленено масло, сравнена с FAME в RM
14.	Хроматограма на проба за флуор в паста за зъби
15.	Разпределение по групи
16.	Разпределение по възраст
17.	Разпределение по пол
18.	Разпределение по степен на образование
19.	Връзка между козметичните продукти и здравето на човека
20.	С какво предназначение?
21.	Разпределение по възраст при използване на КП с различно предназначение
22.	Време на използване на КП за кожа
23.	Време на използване на КП за коса
24.	Ефект от използване козметика за коса
25.	Риск при използване на козметика
26.	Информация за козметиката преди закупуване
27.	Четене на етикетите

28. Биоактивни съставки в КП и здраве
29. Консултиране със специалист преди закупуване на козметика с биоактивни съставки
30. Законова регулация на КП
31. Хармонизиране на закнодателството
32. Режим на контрол и отговорност при пускане на нов КП
33. Национални стандарти за анализ на биоактивни съставки в козметични продукти
34. Влагане на витами в КП(въпрос 23)
35. Статистическа връзка между време на ползване на продукти за коса и информираност по отношение влагането на мастни киселини
36. Статистическата връзка между продължителност използвате продукти за кожа и информираността по отношение влагането на мастни киселини
37. Влагане на антиоксиданти (флавоноиди и каротеноиди) и период на ползване на продукти за коса
38. Сравнение на въпрос „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате” с въпрос „Четете ли етикета, когато купувате козметика
39. Връзка между търсенето на информация и консултацията със специалист при купуване на козметика, съдържаща биоактивни съставки

Приложение 3 - Списък на таблиците

Табл. №	*Наименование*
1.	Данни за ß -каротен в Cosmetics - CosIng
2.	Превръщане на производните на витамин А в международни единици (IU)
3.	Информация за Витамин А от Cosmetics - CosIng
4.	Методи за анализ и контрол, групирани според принципа изпитване
5.	Стандарти в БИС, ТК 19, групирани по предназначение
6.	Съдържание на мононенаситени мастните киселини в %
7.	Съдържание на полиненаситени мастните киселини в %
8.	Съдържание на Омега-3 и Омега-6 мастните киселини в %
9.	Изчисления при три концентрации на FAME в RM
10.	Резултати на FAME в проба ленено масло
11.	Сравнителна таблица с данни за FAME
12.	Разпределение по групи
13.	Връзка между козметичните продукти и здравето на човека. (въпрос 6)
14.	Използвате ли козметични продукти? (въпрос 7)
15.	С какво предназначение? (въпрос 8)
16.	Разпределение по възраст при използване на КП
17.	От колко време използвате козметични продукти за кожа (лице и тяло) (въпрос 9)
18.	Непараметричен анализ на времеползването на продукти за кожа, отнесено към съответните възрастови групи.
19.	Ефект от използването на козметични продукти за кожа (въпрос 10)
20.	От колко време използвате козметични продукти за коса (шампоани, балсами, маски за коса и др.) (въпрос 11)
21.	Какъв е ефекта от използването на козметика за коса? (въпрос 12)
22.	Сравнение на въпрос 14 „Търсите ли информация за козметични продукти, които ползвате” с въпрос 15 „Четете ли етикета, когато купувате козметика“
23.	Връзка между търсенето на информация и консултацията със специалист при купуване на козметика, съдържаща биоактивни

съставки.

24. Смятате ли, че биоактивните съставки в козметичните продукти имат принос за здравето? (въпрос 17)
25. Подлежат ли на законова регулация козметичните продукти? (въпрос 18)
26. Хармонизирано ли е националното ни законодателство в козметиката с европейското? (въпрос 19)
27. Какъв е режимът на контрол и отговорност при пускане на нов козметичен продукт? (въпрос 20)
28. Влагат ли се в козметиката витамини? (въпрос 22)
29. Моля посочете кои витамини! (въпрос 23)
30. Влагат ли се в козметиката минерали? (въпрос 24)
31. Моля посочете кои минерали! (въпрос 25)
32. Позволено ли е козметичен продукт да има претенция за лечебно приложение? (въпрос 26)
33. Влагат ли се в козметиката мастни киселини (например омега мастни киселини)? (въпрос 30)
34. Статистическа връзка между време на ползване на продукти за коса (11 въпрос) и информираност по отношение влагането на мастни киселини (30 въпрос)
35. Статистическата връзка между продължителност на използване на продукти за кожа и информираността по отношение влагането на мастни киселини в продуктите.
36. Влагат ли се в козметиката антиоксиданти? (въпрос 31)
37. Тест на Фишер за влагане на антиоксиданти и период на ползване на продукти за коса и кожа.
38. В слънцезащитните козметични продукти присъства ли като съставка ß-каротена? (въпрос 32)
39. Има ли норми за съдържание на елемента флуор в продукти за устна хигиена? (въпрос 33)

Приложение 4 – Информационна брошура

Витамин А се влага против бръчки в кремове за лице и за ръце, в лосиони за тяло и в слънцезащитни продукти с цел противодействие на стареенето на кожата и предотвратяване на оксидативния стрес. Витамин Е защитава кожата от свободните радикали и слънцето, намалява бръчките, хидратира и действа противовъзпалително. Каротеноидите осигуряват защита на кожата от вредното въздействие на слънчева светлина. Мастните киселини са жизнено важна съставка на мазнините като градивни елементи на клетъчната мембрана, отговорна за обмяната на веществата и клетъчното функциониране.

Внедрените методи за анализ, в които са приложени техники даващи достоверни резултати са принос към познанието за биоактивните съединения, като съставки на козметичните продукти. Методите са валидирани и апробирани върху реални продукти, закупени от търговска мрежа. Методът за анализ на мастни киселини е представен на юбилейна научна конференция на специалисти по здравни грижи .Методът за определяне съдържанието на флуор в продукти за дентална хигиена е публикуван в реферирано списание, което е доказателство за приноса не само към аналитичната практика, но и за общественото здраве като приложим за изпитването на вещество, подлежащо на здравен контрол.

Задълбоченото проучване на законовата рамка в козметиката е принос за информираността на заинтересованите лица, особено във връзка с безопасността на козметичните продукти, познанието за биоактивните съединения, и връзката с общественото здраве. Надяваме се създадените материали да допринесат за повишаване информираността на потребители и специалисти по отношение на биологично активните съставки в козметичните продукти.

Медицински Университет—София,
Факултет по Обществено Здраве,
Медицински Колеж „Йорданка Филаретова“

„Човек вижда толкова, колкото знае“

БИОАКТИВНИ СЪЕДИНЕНИЯ В КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ – АНАЛИЗ И КОНТРОЛ

ЦЕЛ

да се проучат и разработят методи за анализ и контрол на биоактивните съединения в козметични продукти, да се оцени и анализира информираността на потребителите относно ролята на биоактивните съединения.

В житейския си път човекът естествено се стреми да запази здравето и красотата си, използвайки силата на редица биоактивни вещества, изграждащи множество козметични продукти. Биоактивните съединения в козметичните продукти са предмет на обстойни проучвания, с фокус върху антиоксидантното им действие, водещо до забавяне процесите на стареене, запазване свежестта, младостта на кожата и здравината на косата и ноктите.

Акцентирайки на контрола, ролята на информираността в постигането на безопасни за човека козметични продукти и с цел постигане на максимален здравен ефект си поставихме следните задачи:

* Проучване на законовата рамка на козметичните продукти;
* Внедряване на методи за анализ и контрол и апробирането им върху продукти за идентификация и количествено определяне на биоактивните съставки;
* Предоставяне на съвременна информация за биоактивни съединения в козметичните продукти.

Отговорите на поставените въпроси са с акцент върху контрола и ролята на информираността, като са предложени съвременни методи за анализ на избраните биоактивни съединения. Разработени и валидирани са три аналитични метода за определяне в козметични продукти на витамините-ретинол, токоферол и ß-каротен, на мастни киселини в ленено масло и на флуор в продукти за дентална хигиена.

При разработването на методите за анализ на биоактивните съединения са приложени високотехнологични, хроматографски, аналитични техники.

За изследване съдържанието на витамини-ретинол, токоферол и ß-каротен е приложена ултра високо ефективна течна хроматография (UHPLC), с детекция масова спектрометрия, с висока разделителна способност (HRMS). В изследваните проби, закупени на случаен принцип и с цел апробиране на методите е установено съдържание на ретинол 3,1mg/g, при RT=4,09’ и маса на дехидратирания йон m/z=269,226, на токоферол 4,2mg/g, RT=2,78’ и m/z=473,392, а при RT=2,78’ и m/z=536.438 ß-каротен не е открит.

За анализ на мастно-киселинния състав е приложен GC/FID метод на метилирани естери. Методът позволява, както анализ на индивидуални, така и на групи мастни киселини, като Ω-3 , Ω-6 и Ω-9. Резултатът от анализа на ленено масло показа съдържание на Ω-3 мастни киселини 55.9%, а на Ω-6 13,7%.

Методът за анализ на флуор в продукти за дентална хигиена се основава на дериватизация на флуорните йони до триетилфлуорсилан, определяем с GC/FID, посредством парофазово пробоподаване, чрез който се избягва продължителната подготовка и загубите от нея. Анализът на паста за зъби с добавен флуор, при RT=2.45’ установи съдържание на флуор 1480,52 mg/g.

Анализът на законовата рамка и на стандартите в областта на козметичните продукти обхваща основополагащи за Европейското и за националното ни законодателства документи — Регламент 1223/2009, Наредба 14/2014 на МЗ и публикувани в БИС стандарти.

Регламентът въвежда единни за ЕО правила за регистрация, в които са предвидени всички възможни обстоятелства, касаещи здравната безопасност, чието осигуряване на пазара на ЕС е чрез постигане на баланс между „отговорността на производителя“ и „подробно нормативно регулиране на отделните съставки“.

Анализът на публикуваните стандарти в БИС/ТК-19 „Козметични и ароматични продукти“ показва, че от общо 206 стандарта, 181 са методични, но сред тях не са намерени методи за анализ и контрол на биологично активните съединения.

БИС стандарти в ТК 19 козметика

	брой	%
Методични	181	88
Продуктови	18	9
Практики	5	2
Опаковки	2	1
Общо	206	100