# ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ

## РАЗРАБОТВАНЕ И ВАЛИДИРАНЕ НА МЕТОД С ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC) ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА UV ФИЛТЪР 4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR В КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ (ПРИ САМОСТОЯТЕЛНО И ПРИ СЪВМЕСТНО ПРИСЪСТВИЕ С OCTOCRYLENE, OCTYL METHOXYCINNAMATE И OCTYL SALICYLATE, КАКТО И С ФИЗИЧНИТЕ УЛТРАВИОЛЕТОВИ ФИЛТРИ ZINC OXIDE И TITANIUM DIOXIDE)

***А. Тачев, Д. Чохаджиева и Н. Василева***

*Национален център по опазване на общественото здраве към МЗ – София*

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF 4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR UV-FILTER IN SUNSCREENS (SINGULARLY AND IN COMBINATION WITH OCTOCRYLENE, OCTYL METHOXYCINNAMATE AND OCTYL SALICYLATE CHEMICAL UV FILTERS AS WELL AS WITH PHYSICAL UV FILTERS ZINC OXIDE AND TITANIUM DIOXIDE)

***A. Tachev, D. Chohadzhieva and N. Vasileva***

*National Center of Public Health Protection – Sofia*

***Резюме**: Отсъства референтен метод за определяне на ултравиолетовия (UV) филтър 4-Methylbenzylidene Camphor в слънцезащитни козметични продукти. Целта на проучването е разработване и валидиране на HPLC метод за определяне на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor в козметични продукти (при самостоятелно и при съвместно присъствие с Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate, както и с физичните UV филтри Zinc Oxide и Titanium Dioxide). Разработен и валидиран е HPLC метод за определяне на UV филтъра 4-Methylbenzylidene Camphor в слънцезащитни козметични продукти, който е приложим както при самостоятелно, така и при съвместно присъствие с Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate, както и с физичните UV филтри Zinc Oxide и Titanium Dioxide. Методът се основава на ефективно разделяне от хроматографската колона на UV филтрите по техните времена на задържане, при съвместно присъствие в козметичния продукт и последващо количествено определяне на всеки UV филтър спрямо калибровка на сертифицирано сравнително вещество по метода на външния стандарт. Проведени са общо 58 изпитвания, на базата на които са изведени параметрите на метода: линейност от 0,25 μg/cm³ до 100 μg/cm³ (от 0,13 до 50,00%); граница на откриване (LOD) – 0,05%; граница на определяне (LOQ) – 0,15%; работен обхват от 0,30 μg/cm³ до 100 μg/cm³ (0,15 до 50,00%); повторяемост – при 3% на 4-Methylbenzylidene Camphor – стандартно отклонение (SD) – 0,0602%; възпроизводимост – при 3% на 4-Methylbenzylidene Camphor – относително стандартно отклонение (RSD) – 2,10%, в условия на повторяемост; аналитичен добив при концентрация на 4-Methylbenzylidene Camphor в козметичния продукт 1% – 98,20% (95,00-106,00%), при 2% – 99,00% (95,00-103,00%) и при 3% – 97,90% (95,00-103,30%),. Разработеният и валидиран HPLC метод за определяне на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor в слънцезащитни козметични продукти е бърз, с добра чувствителност, точност и възпроизводимост и може да бъде използван при контрола на слънцезащитните козметични продукти.*

***Ключови думи**: ултравиолетови филтри, слънцезащитни продукти, валидиране, концентрация*

***Адрес за кореспонденция**: Антон Колев Тачев, бул. „Иван Евст. Гешов" № 15, 1431 София, България, e-mail: a.tachev@ncphp.government.bg*

*Summary: So far, no referent method has been reported for determination of 4-methylbenzylidene camphor UV filter in sunscreens. The aim of this study is to develop and validate an HPLC method for determination of 4-methylbenzylidene camphor UV filter in sunscreen formulations (singularly and in combination with octocrylene, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate chemical UV filters as well as with physical UV filters zinc oxide and titanium dioxide). HPLC method has been developed and subsequently*

*validated for determination of 4-methylbenzylidene camphor UV filter in sunscreen products, which is applied both singularly and in combination with octocrylene, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate chemical UV filters as well as with physical UV filters zinc oxide and titanium dioxide. The method is based on the effective chromatographic separation of UV filters according to their retention times, at combined presence in the cosmetic product and following quantitation of each UV filter versus calibration curve of certified referent substance by the method of external standard. A total of 58 tests were carried out, on which the following parameters were examined: linear range from 0,25 μg/cm³ to 100 μg/cm³ (from 0,13 to 50,00%); limit of detection (LOD) – 0,05%; limit of quantitation (LOQ) – 0,15%; working range from 0,30 μg/cm³ to 100 μg/cm³ (0,15 to 50,00%); repeatability – in 3% 4-methylbenzylidene camphor – standard deviation (SD) – 0,0602%; reproducibility – in 3% 4-methylbenzylidene camphor – relative standard deviation (RSD) – 2,10%, under conditions of repeatability; analytical yield of 1% 4-methylbenzylidene camphor concentration in the cosmetic product – 1% – 98,20% (95,00-106,00%), at 2% – 99,00% (95,00-103,00%), and at 3% – 97,90% (95,00-103,30%). The proposed HPLC method development and validation are rapid, precise and accurate, which is useful for the routine determination of 4-methylbenzylidene camphor UV filter in sunscreen products.*

*Key words: ultra-violet (UV) filters, sunscreens, validation, concentration*

*Address for correspondence: Anton Kolev Tachev, Naional Centre of Public Health Protection – Sofia, 15 Ivan Evst. Geshov blvd, Bg-1431 Sofia, e-mail: a.tachev@ncphp.government.bg*

В козметичните продукти за продължително излагане на слънце, с цел максимална защита на кожата, и в продуктите за ежедневна масова употреба се влагат UV филтри за съчетана защита от UVB и UVA лъчи – химични и физични. Съдържанието на UV филтри в козметичните продукти е строго регламентирано както в европейското законодателство (DIR.76/768/EEC и нейните изменения и допълнения), така и в българското, хармонизирано с европейското, законодателство – Наредба № 36 на МЗ от 2005 г. „за изискванията към козметичните продукти" и нейните изменения и допълнения. Необходим е строг контрол за спазване на тези норми.

Едни от най-често използваните UV филтри в козметичните продукти са 4-Methylbenzylidene Camphor, Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate, които много често присъстват съвместно в слънцезащитните козметични продукти. В публикуваните като референтни методи за проверка на състава (Приложение № 10 на Наредба № 36) [1] не фигурират методи за определяне на UV филтри в козметични продукти. Това налага разработването и валидирането на подходящи методи за тяхното разделяне и определяне при съвместното им присъствие в слънцезащитните козметични продукти, които да се използват за нуждите на контрола.

За разделянето и определянето на два и повече химични UV филтъра най-удачен се оказва HPLC методът. Той е бърз, точен и високочувствителен инструментален метод. Основава се на ефективно разделяне от хроматографската колона на UV филтрите по техните времена на задържане, при съвместно присъствие в козметичния продукт и последващо количествено определяне на всеки UV филтър спрямо калибровка на сертифицирано сравнително вещество по метода на външния стандарт.

Преди определяне на UV филтрите 4-Methylbenzylidene Camphor, Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate, при съвместното им присъствие в козметичния продукт, е осъществявано тяхното хроматографско разделяне.

За определяне на UV филтрите е използвана обратнофазова течна хроматография с UV детекция. Количествената оценка е извършвана по метода на външния стандарт.

В литературата са публикувани HPLC методи за разделяне и количествено определяне на 4-Methylbenzylidene Camphor в присъствие на други химични UV филтри (A. Chisvert и сътр., 2001; E. A. Dutra и сътр., 2002; S. Bouzid, 2005; Kedor-Hackman и сътр., 2006; A. Balaguer и сътр., 2009) [3, 4, 5, 6, 7]. Характерното при HPLC методите е, че при всяко ново съчетание на два и повече различни химични UV филтъра е необходимо да се разработи нов метод с проучване на необходимите условия.

**Целта** на проучването е разработване и валидиране на HPLC метод за определяне на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor в козметични продукти (при самостоятелно и при съвместно присъствие с Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate, както и с физичните UV филтри Zinc Oxide и Titanium Dioxide).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Разработен и валидиран е HPLC метод, който се основава на разтваряне на козметичния продукт в абсолютен алкохол и ефективно разделяне от хроматографската колона на UV филтрите по техните времена на задържане, при съвместно присъствие в козметичния продукт и последващо количествено определяне на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor спрямо калибровка на сертифицирано сравнително вещество по метода на външния стандарт.

Използван е базисен козметичен продукт без съдържание на UV филтри с хомогенна кремообразна консистенция, с тип на емулсията – вода в масло.

За стандартните и работните разтвори са използвани сертифицирани сравнителни вещества UV филтри: 4-Methylbenzylidene Camphor, Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate. Пробите са разработвани в лабораторни условия чрез смесване на базисния козметичен продукт с UV филтрите, последващо хомогенизиране, разтваряне, филтруване и хроматографиране.

Валидирането на метода е осъществено съгласно БДС EN ISO/IEC 17025:2006 [2] по параметрите: линейност; проверка на стабилността на калибрационната крива; граница на откриване; граница на определяне; работен обхват; повторяемост; възпроизводимост; аналитичен добив.

- **Линейност.** От изходните сертифицирани сравнителни вещества UV филтри са приготвяни изходни стандартни разтвори, с концентрация 1 mg/cm$^3$ (1000 μg/cm$^3$) за всеки UV филтър. За целта на аналитична везна с точност ± 0,0001 g е претегляно 0,1 g от стандартното вещество в бехерова чаша от 25 cm$^3$ и количествено е прехвърляно с етилов алкохол в мерителна колба от 100 cm$^3$. От така получените изходни стандартни разтвори на UV филтрите 4-Methylbenzylidene Camphor, Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate са приготвени работни стандартни разтвори с концентрации – 0,25; 2,5; 5,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 μg/cm$^3$.

За установяване на линейния диапазон са използвани 7 различни концентрации на стандартни разтвори на UV филтрите, като всяка от тях е инжектирана по 3 пъти. След хроматографиране е построявана калибрационна крива на зависимостта височина на пика / концентрация в μg/cm$^3$.

Определяна е линейната област, която се използва за последващи стъпки при валидирането на методите.

- **Проверка на стабилността на калибрационните криви.** Проверката на стабилността на калибрационните криви е осъществявана чрез инжектиране на стандартни разтвори на UV филтрите с концентрация 5 μg/cm$^3$ преди всяка серия анализи. При разлика между сигналите на стандартните разтвори, по-голяма от 10%, калибрационните криви са построявани отново. Всички проби са анализирани с успоредни на тях. В случай, че разликата между успоредните проби е била по-голяма от 10%, анализът е повтарян.

- **Граница на откриване (LOD).** Границата на откриване е определяна като три пъти полуширината на средната амплитуда на шума на нулевата линия.
- **Граница на определяне (LOQ).** Границата на определяне е вземана като три пъти границата на откриване.
- **Работен обхват.** За долна граница на работния обхват е приемана установената граница на определяне (LOQ). Горната граница на работния обхват е определяна въз основа на линейността на калибрационната крива на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor.
- **Повторяемост и възпроизводимост**

Повторяемостта на метода, изразена чрез стандартното отклонение (SD), е определяна след анализ на успоредни проби в рамките на един ден (n = 6).

Възпроизводимостта е изразявана чрез относителното стандартно отклонение (RSD, %). Изпитаната концентрация на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor е 3%.

- **Аналитичен добив** – за определянето му са приготвяни проби от базисен козметичен продукт, с добавка от 1%, 2% и 3% от UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor.

Концентрацията е подбирана в съответствие с линейната част на калибрационната крива и по нея е изчислявано съдържанието на UV филтъра в μg/cm$^3$. От пробите, с различна концентрация на UV филтъра, количества от 0,01 g са претегляни на аналитична везна с точност ± 0,0001 g, разтваряни са в етилов алкохол и е доливано в мерителни колби до 50 cm$^3$. Така приготвяните разтвори са филтрувани и хроматографирани. Успоредно е пускана и празна проба от базисния козметичен продукт, без съдържание на UV филтър. За всеки един UV филтър са пускани общо по 15 броя проби.

## РЕЗУЛТАТИ

### *Хроматографско разделяне*

Хроматографското разделяне на UV филтрите 4-Methylbenzylidene Camphor, Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate е осъществено при следните хроматографски условия:

Подвижна фаза : ацетонитрил : дейонизирана вода (80 : 20) (V/V)

Поток – 1,2 ml/min

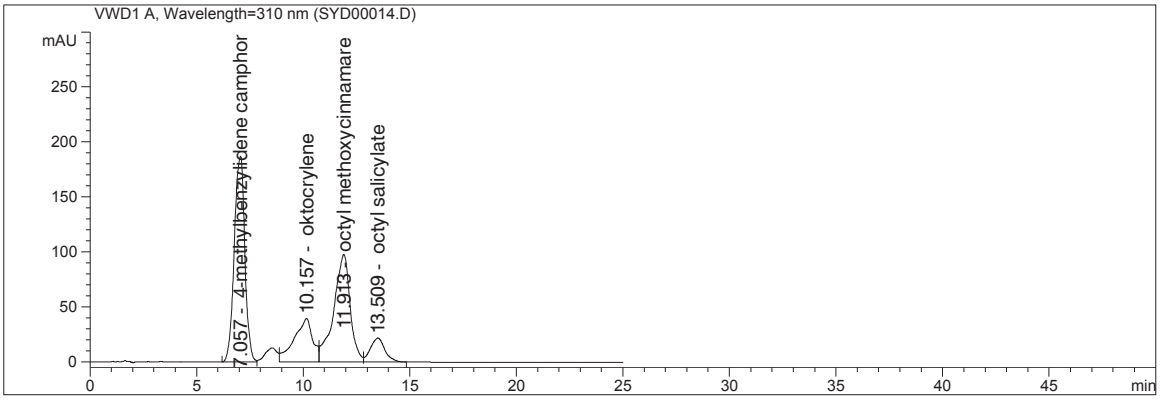
Детекция – 310 nm

Обем на инжектиране – 50 μl.

На фиг. 1 е представена хроматограмата на стандартна смес от UV филтрите: 4-Methylbenzylidene Camphor, Octocrylene, Octyl Metho-

xycinnamate и Octyl Salicylate (всеки по 25 μg/cm$^3$ в етанол), която показва доброто им разделяне. Пиковете са симетрични, което показва, че е постигнато пълно разделяне на определяемите компоненти и в минимален срок – 15 min.

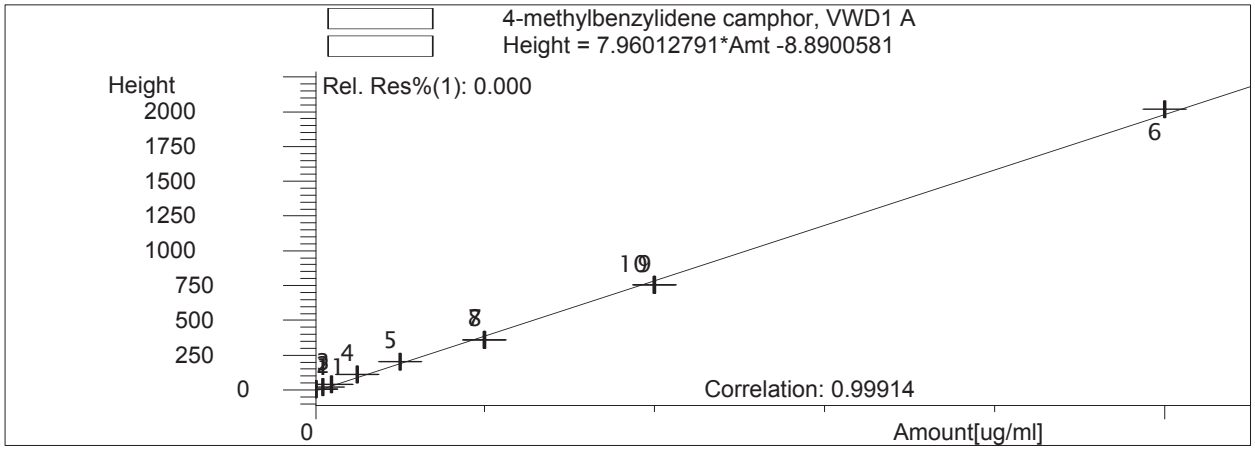
**Линейност.** На табл. 1 и фиг. 2 са показани данните от височините на пика на 4-Methylbenzylidene Camphor и концентрацията на стандартните разтвори и съответната калибрационна крива. Получената линейност е много добра, коефициент на корелация 0,99914.




***Фиг. 1. Хроматограма на стандартна смес от UV филтрите: 4-Methylbenzylidene Camphor, Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate (всеки по 25 μg/cm$^3$ в етанол)***

***Таблица 1. Линейност на зависимостта на височина на пика (h) / концентрация (C в μg/cm$^3$) на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor***

| C, μg/cm$^3$ | h |
|---|---|
| 0,250 | 5,42385 |
| 2,500 | 21,50173 |
| 5,000 | 42,36176 |
| 12,500 | 110,25607 |
| 25,000 | 204,61568 |
| 50,000 | 359,60712 |
| 100,000 | 754,02905 |




***Фиг 2. Калибрационна крива на зависимостта височина на пика (h) / концентрация (C в μg/cm$^3$) на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor***

Методът е линеен в областта от 0,25 μg/cm$^3$ до 100 μg/cm$^3$ (0,13-50%).

- **Граница на откриване** (LOD) – съгласно методиката определената LOD е 0,05%.
- **Граница на определяне** (LOQ) – съгласно методиката определената LOQ е 0,15%.
- **Работен обхват.** На базата на изчисленото LOQ за долната граница на работния обхват се приема 0,15% (0, 30 μg/cm$^3$), а въз основа на линейността на калибрационната крива за горна граница се определя 50% (100 μg/cm$^3$). Работният обхват показва много добрите възможности на метода, като се има предвид максимално допустимата концентрация на UV филтъра 4-Methylbenzylidene Camphor – 4% по българското и европейското законодателство.
- **Повторяемост.** Приготвени са проби от първи базисен козметичен продукт, с добавка на 3% UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor. Проведени са успоредни проби в рамките на един ден (n = 6). Резултатите са представени на табл. 2. Доказва се добрата повторяемост на резултатите, което се вижда от изчисленото стандартно отклонение (SD), в условия на повторяемост – 0,0602%.

***Таблица 2. Повторяемост на резултатите от определяне на концентрацията (C в %) при добавени 3 % UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor в базисен козметичен продукт***

| Добавено количество UV филтър, % | Намерена концентрация (C), % | | | |
|---|---|---|---|---|
| | n | $\bar{X}$, % | SD, % | RSD, % |
| 3 | 6 | 2,87 | 0,0602 | 2,10 |

- **Възпроизводимост.** При изчисленията се получава относително стандартно отклонение (RSD) при условия на повторяемост – 2,10%.
- **Аналитичен добив.** На табл. 3 са представени данните от аналитичния добив на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor. Проведени са 15 изпитвания, като полученият аналитичен добив е много добър: за концентрация 1% – от 95,00 до 106,00%, за концентрация 2% – от 95,00 до 103%, и за концентрация 3% – от 95 до 103,3%.

***Таблица 3. Аналитичен добив при определяне на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor, добавен 1%, 2% и 3% в базисен козметичен продукт***

| Добавено количество UV филтър, % | n | Намерено количество, % | | | Аналитичен добив, % | | | SD, % | RSD, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | min | max | $\bar{X}$ | min | max | $\bar{X}$ | | |
| 1 | 5 | 0,95 | 1,06 | 0,98 | 95 | 106 | 98,20 | 4,4385 | 4,52 |
| 2 | 5 | 1,90 | 2,06 | 1,98 | 95 | 103 | 99,00 | 2,9155 | 2,94 |
| 3 | 5 | 2,85 | 3,10 | 2,94 | 95 | 103,3 | 97,90 | 3,2700 | 3,34 |

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработен и валидиран е HPLC метод за определяне на UV филтър – 4-Methylbenzylidene Camphor, в козметични продукти (при самостоятелно и при съвместно присъствие с Octocrylene, Octyl Methoxycinnamate и Octyl Salicylate, както и с физичните UV филтри Zinc Oxide и Titanium Dioxide).

Методът се основава на разтваряне на козметичния продукт в абсолютен алкохол и ефективно разделяне от хроматографската колона на UV филтрите по техните времена на задържане, при съвместно присъствие в козметичния продукт и последващо количествено определяне на всеки UV филтър спрямо калибровка на сертифицирано сравнително вещество по метода на външния стандарт.

Проведени са общо 58 изпитвания, на базата на които са изведени параметрите на метода: линейност от 0,25 μg/cm$^3$ до 100 μg/cm$^3$ (от 0,13 до 50,00%); граница на откриване (LOD) – 0,05%; граница на определяне (LOQ) – 0,15%; работен обхват от 0,30 μg/cm$^3$ до 100 μg/cm$^3$ (0,15 до 50,00%); повторяемост – при 3% на 4-Methylbenzylidene Camphor – стандартно отклонение (SD) – 0,0602%; възпроизводимост – при 3% на 4-Methylbenzylidene Camphor – относително стандартно отклонение (RSD) – 2,10%, в условия на повторяемост; аналитичен добив при концентрация на 4-Methylbenzylidene Camphor в козметичния продукт 1% – 98,20% (95,00-106,00%), при 2% – 99,00% (95,00-103,00%), и при 3% – 97,90% (95,00-103,30%).

Разработеният и валидиран HPLC метод за определяне на UV филтър 4-Methylbenzylidene Camphor в слънцезащитни козметични продукти е бърз, с висока чувствителност, точност и възпроизводимост и може да бъде използван при контрола на слънцезащитните козметични продукти.

**БИБЛИОГРАФИЯ**

1. Наредба № 36 от 30 ноември 2005 г. за изискванията към козметичните продукти (обн., ДВ, бр. 101 от 2005 г., изм. и доп., бр. 44 от 2006 г., изм., бр. 75 от 2006 г., изм. и доп., бр. 39 от 2007 г., изм. и доп., бр. 106 от 2007 г., изм. и доп. бр. 80 от 2008 г., изм. и доп., бр. 35 от 2009 г., изм. и доп., бр. 2 от 2010 г., изм. и доп., бр. 62 от 2010 г.).
2. БДС EN ISO/IEC 17025/2006. Общи изисквания относно компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране.
3. Bouzid, S. HPLC/formulation stabilization. Optisol UV Absorber improves the retention of organic UV absorbers during solar exposure. – Oxonica Commercial Solutions from Nanotechnology, 2005.
4. Chisvert, A., M. C. Pascual-Marti et A. Salvador. Determination of UV filters in sunscreens by HPLC. – Fresenius J. Anal. Chem., **369**, 2001, № 7-8, 638-641.
5. Dutra, E. A., E. R. M. Kedor-Hackman et M. I. R. M. Santoro. Validation of a high performance liquid chromatography method for sunscreen determination in cosmetics. – Int. J. Cosmetic Sci., **24**, 2002, 97.
6. Kedor-Hackman, E. R. M. et al. Validation of a high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of five sunscreen in lotion preparation. – Int. J. Cosmetic Sci., **28**, 2006, 219.
7. Balaguer, A. et al. Rapid LC determination of UV filters in cosmetics using ethanol as mobile phase. – LCGC Europe, 2009.

*Постъпила – 9 февруари 2011 г.*


**НОЗОКОМИАЛНИ ИНФЕКЦИИ**
**С.**, **ИК „СИМЕЛПРЕС**”, 2010, 268 **с.**
**Н. Рибарова**

Независимо от непрекъснатите опити за решаване на проблема „нозокомиални инфекции”, и днес той е един от широко обсъжданите в световната медицинска литература и продължава да бъде актуален за здравеопазването на страните по света. Величината и многоаспектната значимост на проблема са предпоставки, обосноваващи необходимостта от провеждане на цялостни епидемиологични и социални екосистемни проучвания за разкриване на причините и закономерностите в динамиката и колебанията на нозокомиалните инфекции. Въпросът се разглежда в теоретичен аспект, като се извършва епидемиологичен анализ на съществуващите знания – понятия, хипотези и теории, теоретико-методологични модели на нозокомиалните инфекции. Съществено място заема и формирането на актуалните и приоритетни задачи на здравната система в България, като се посочват идеи за рационализиране на приложната епидемиология в областта на нозокомиалните инфекции. Разглежда се ефективната болнична система като критерий за добра медицинска практика и фактор в превенцията и контрола на нозокомиалните инфекции. Изложени са аргументирани съображения и дефиниции за утвърждаване на профилната дисциплина „Болнична епидемиология”. Формулирани са научно и практически обосновани предложения и постановки за създаване на Национална стратегия за превенция и контрол на нозокомиалните инфекции.