وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی- پژوهشی علوم و فناوری رنگ/ ۱۲ (۱۳۹۷)، ۱۳۳-۱۲۵

نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

شناسایی آمین‌های آروماتیک پیش‌ماده رنگ در رنگ مو با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

ماهرو خالقی‌مقدم

مربی، پژوهشکده شیمی و پتروشیمی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران، صندوق پستی: ۱۳۹-۳۱۷۴۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۷/۶/۱۲

چکیده

رنگ موهای دائمی محصولاتی پرکاربرد و حاوی تعداد زیادی مواد حساسیت‌زا هستند. نشانه‌گذاری صحیح بر روی بسته‌بندی این محصولات به منظور فراهم کردن اطلاعات درخصوص محتویات آن اهمیت دارد. پیش‌ماده رنگ موجود در این رنگ موها عموماً آمین‌های آروماتیک شامل مشتقات فنیلن آمین سولفوریک اسید یا اسید پارافنیلن دی‌آمینو سولفوریک هستند. با مطالعات انجام شده روی حد واسط‌ها واکنش‌های حساسیتی به آمینوفنل‌ها و ۱، ۴- بنزودی آمین‌ها گزارش شده است، حتی سمیت و سرطان‌زایی برخی نیز مشاهده شده است. این مطالعه با هدف شناسایی ۶ ترکیب از آمین‌های آروماتیک به کار رفته در رنگ‌موهای تجاری توسط ۴ سیستم حلالی و ۲ افشانه آشکارساز با روش کاربردی و سریع کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. میزان حرکت لکه رنگی مربوط به آمین‌های آروماتیک مورد بررسی و مواد مرجع به وسیله فاز متحرک بر روی فاز ثابت Rf، با هم مقایسه شدند، آزمون بر روی ۶ نمونه رنگ موی تجاری انجام شد و نتایج نشان داد که هر نمونه حاوی ۳ تا ۵ ترکیب از آمین‌های آروماتیک مورد بررسی بودند، برتری این روش در مطالعه حاضر با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مقایسه شد و برای اعتبارسنجی روش مورد استفاده چهار آزمایشگاه شرکت کردند، اعتبارسنجی نتایج نشان داد که تجدیدپذیری بین آزمایشگاهی این روش مناسب است.

واژه‌های کلیدی: رنگ موی دائمی، آمین‌های آروماتیک، کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

Identification the Aromatic Amines of Color Precursor by Using Thin-Layer Chromatography (TLC)

M. Khaleghi Moghadam

Department of chemistry & Petrochemical Engineering, Faculty member of Standard Research Institue (SRI), P.O.Box:31745-139, Karaj, Iran

Received: 05-11-2017 Accepted: 17-02-2018 Available online: 03-09-2018

Abstract

Hair dyes contain strong allergens and are widely available. Correct labeling is a necessity in order to provide information about the contents, aromatic amines of color precursor are commonly derived from phenylene amine sulfuric acid or para phenylene diamine sulfuric acid. More study in hair dye precursor showed the toxicity behavior and carcinogenesis by contact with aminophenols and 1-4 benzodiazines. The aim of this study was to identify 6 aromatic amines used in commercial hair dye substances by 4 developing solvents and 2 indicator sprays, using a thin layer chromatography (TLC) method. The aromatic amines substances were identified by comparing the Rf values and colors between samples and reference substances.The results showed that each sample contains 3-5 aromatic amines. The superiority of this method in the present study was compared with high performance liquid chromatography (HPLC) and four laboratories participated in the validation and the results showed good interlaboratory reproducibility. J. Color Sci. Tech. 12(2018), 125-133©. Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Permanent hair dye, Aromatic amines, Thin layer chromatography, High Performance Liquid Chromatography.

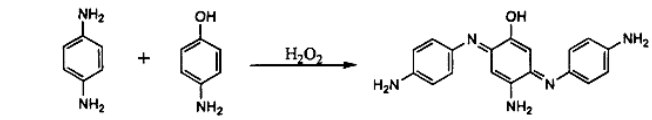
***Corresponding author: m.khaleghi@standard.ac.ir**

۱ـ مقدمه

در حال حاضر، مردم در سراسر جهان از رنگ مو استفاده می کنند تا ظاهر خود را بهبود بخشند. با توجه به میزان و تناوب تماس انسان با رنگ مو، ایمنی و خطر مواد تشکیل دهنده آن اهمیت می‌یابد. با توجه به دسته شیمیایی مواد رنگ مو و آمار بالای کاربران این محصول در کشور (زنان، مردان، سالن‌های آرایش حرفه‌ای)، و با وجود میزان بسیار بالای فروش و طیف وسیع فرآورده‌های در دسترس، هنوز هم اطلاعات ما در مورد میزان واقعی بروز و شیوع اثرات زیانبار آنها به میزان قابل توجهی اندک است. واکنش‌های ناخواسته بالقوه نسبت به محصولات زیبایی، طیف وسیعی از واکنش‌های پوستی را در بر می‌گیرند که عبارتند از واکنش‌های تحریکی، بیش‌حساسیتی، کهیر تماسی، آسیب مو و ناخن‌ها، پارونیشیا[1]، بثور آکنه‌ای[2] شکل، فولیکولیت[3] و بدتر شدن درماتوزهای[4] قبلی [۱، ۲].

واکنش‌های حساسیتی ممکن است در اولین مصرف رنگ مو به علت، عدم واکنش اولیه سیستم ایمنی نسبت به آنتی‌ژن جدید که همان مواد شیمیایی رنگ‌مو است، خود را نشان ندهند، اما با گذشت زمان، سیستم ایمنی بدن برای آن آنتی‌ژن، تولید آنتی‌بادی می‌کند و در دفعات بعدی مصرف، عوارض ناخوشایند حساسیت، ظاهر می‌شود. رنگ موهای دائمی و بادوام‌تر به سبب دارا بودن مواد شیمیایی بیشتر و قوی‌تر، هم زمینه حساسیت‌های پوستی را فراهم می‌کنند و هم ساختار مو را دستخوش تغییر بیشتری می‌نمایند [۵-۳].

ترکیبات موجود در کرم رنگ موی دائمی که در دسته ترکیبات اکسید شونده جای می‌گیرند و شامل دو بخش پیش ماده اکسیدشونده و عوامل جفت‌کننده می‌شوند که در کنار عوامل دیگری مانند اصلاح‌کننده[5]، آنتی‌اکسیدان‌ها[6]، قلیایی‌کننده‌ها[7]، آمونیاک، عوامل مرطوب کننده، نرم‌کننده و اسانس، قرار می‌گیرند و تا زمان مصرف و اضافه شدن عامل اکسید کننده بدون تغییر می‌مانند. هنگام رنگ کردن مو در اثر اختلاط پراکسید هیدروژن با کرم رنگ مو، واکنش اکسایش و تشکیل رنگدانه چندهسته‌ای مطابق با شکل ۱ انجام می‌گیرد [۶].



شکل ۱: شمای کلی واکنش اکسایشی و تشکیل رنگدانه چند هسته‌ای.

1- Paronychia
2- Acneiform rash
3- Folliculitis
4- Dermatosis
5- Modifiers
6- Antioxidents
7- Alkalizers

علاوه بر عوامل اکسنده شیمیایی، پیش‌ماده و عوامل جفت‌کننده در حضور هوا نیز می‌توانند اکسید شوند که به این عمل خود اکسیدشوندگی ماده گفته می‌شود.

پیش ماده‌های اکسیدشونده مشتقات آنیلین هستند، به عبارت دیگر آمین‌ها یا آمینوفنل‌های دوعاملی مانند اورتو، پارا آمینو فنل می‌باشند که قابلیت تبدیل شدن به یون‌های دی ایمینیم یا کوئینو ایمینیم را به عنوان حدواسط اولیه دارند [۷].

جفت‌کننده‌ها، آمین‌ها یا فنل‌های آروماتیک غنی از الکترون می‌باشند، این ترکیبات اغلب رزورسینول‌ها یا فنیلن‌دی آمین‌های استخلاف نشده می‌باشند [۸] که معمولا موضع پارا نسبت به موقعیت آمینی در آنها بدون استخلاف است، که ترکیبات مختلف از آنها، فام‌های متفاوتی ایجاد می‌کند[۶، ۹].

پیش‌ماده‌های اکسیدشونده وقتی در غیاب جفت‌کننده اکسید می‌شوند، ترکیبات رنگی، اغلب خاکستری یا قهوه‌ای- سیاه، به وجود می‌آورند. از طرفی، جفت‌کننده‌ها یا معمولاً بی‌رنگ هستند یا رنگ کمی تولید می‌کنند، اما این ترکیبات در حضور پیش‌ماده‌ها و عوامل اکسنده، رنگ تولید شده توسط پیش‌ماده را بهبود می‌بخشند [۱۱-۹].

از میان این ترکیبات اکسید شونده (پیش‌ماده و عوامل جفت‌کننده)، هر ساله تعدادی از آنها که بیماری‌زایی آنها به اثبات رسیده باشد، اسامی آن در فهرست ترکیبات غیرمجاز اتحادیه اروپا[8] و سازمان غذا و دارو قرار می‌گیرد، پارافنیلن دی آمین[9] (PPD) یکی از پیش‌ماده‌های به کار رفته در فرمول‌بندی رنگ مو بوده که باید درحد مجاز معرفی شده از سوی مراجع ذیصلاح به فرمول اضافه شود. PPD ماده‌ای بی‌رنگ است که برای رنگی شدن به اکسیژن نیاز است؛ و این امر سبب ایجاد واکنش‌های حساسیتی در برخی از افراد می‌شود. از سوی دیگر، طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی، می‌توانند به عنوان مواد رنگ مو مورد استفاده قرار گیرد، و از این رو تعیین یک روش واحد برای مشخص کردن و شناسایی هم‌زمان همه آنها بسیار دشوار است [۸، ۱۲].

از این رو، به کارگیری یک روش ساده و سریع برای شناسایی ترکیبات اکسیدشونده موجود در محصولات رنگ مو بسیار اهمیت می‌یابد. در مراجع مختلف روش‌های متفاوت کروماتوگرافی برای تجزیه و تحلیل این ترکیبات گزارش شده است. هر ساله ترکیبات شناسایی شده بسیاری از این دست که بیماری‌زایی آن به اثبات رسیده باشد، در فهرست ترکیبات غیرمجاز اتحادیه اروپا و سازمان غذا و دارو قرار می‌گیرد. فهرست مواد غیرمجاز آرایشی در وبگاه اتحادیه اروپا به طور مداوم در حال به روز شدن است، بر اساس آخرین فهرست موجود در این مرجع در سال ۲۰۱۵، تعداد ۱۸۱ ماده

8- European Commission Health and Consumers -Cosing
9- Paraphenylenediamine

غیر مجاز تلقی شده‌اند، جدول ۱، نام شیمیایی ۱۰ ردیف اول این فهرست را نشان می‌دهد.

از سوی دیگر، طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی، می‌تواند به عنوان پیش ماده و جفت‌کننده در رنگ مو مورد استفاده قرار گیرد، از این رو تعیین یک روش واحد برای مشخص کردن و شناسایی هم‌زمان همه آنها بسیار دشوار است. از میان روش‌های مختلف معرفی شده در این راستا، یعنی TLC[1] [۱۲، ۱۳]، GC[2] [۱۴]، HPLC [۳] [۱۵] و GC / MS [۴] [۱۶]، با توجه به ساختار و خواص مواد رنگ مو، HPLC به عنوان روش موثر نسبت به سایر روش‌ها معرفی شده است است اما به علت ترکیب پیچیده محصولات رنگ مو، این روش معایبی نیز به همراه دارد. روش موثر و کارامد کروماتوگرافی لایه نازک TLC که برای این منظور معرفی شده است و در مقایسه با دیگر روش‌ها، سریع، بسیار کارآمد، کم هزینه و ساده برای شناسایی رنگ مو است [۱۷].

یکی از مزایای مشخص TLC آن است که احتیاج به مقدار بسیار کمی از نمونه دارد. علاوه برآن از این روش می‌توان برای محاسبات کمی نیز استفاده کرد. در این روش لکه‌های مختلف را می‌تراشند و با یک حلال مناسب می‌شویند (استخراج می‌کنند) و برای شناسایی (از طریق طیف‌سنجی) به کار می‌برند.

تشخیص لکه‌های رنگی نیز در روی کروماتوگرام آسان است و برای تعیین محل لکه‌های اجسام بی‌رنگ روش‌های متعددی وجود دارد. برای مثال می‌توان با تابش پرتو فرابنفش به صفحه محل لکه، ترکیب‌هایی را که خاصیت فلوئورسانس دارند مشخص کرد. به روش دیگر می‌توان جسم جاذب را با ماده فلوئورسانس‌دار بی‌اثر دیگری مخلوط کرد. هنگامی که نور فرابنفش به این صفحه بتابد، لکه اجسامی که پرتو فرابنفش را جذب می‌کنند ولی خاصیت فلوئورسانس ندارند در زمینه فلورسانس دار صفحه به صورت تیره رنگ ظاهر می‌شوند. در بسیاری موارد دیگر، از معرف‌های آشکارساز دیگری استفاده می‌کنند. این معرف‌ها را می‌توان بر روی کروماتوگرام پاشید و لکه‌ها را ظاهر کرد [۱۸].

شناسایی ترکیبات اکسید شونده مورد بررسی در این پژوهش، از دو جنبه مورد توجه است. نخست آنکه این مواد و پیش‌ماده‌ها، ترکیباتی هستند که بیماری‌زایی آنها به اثبات رسیده و اسامی آن در فهرست ترکیبات غیرمجاز اتحادیه اروپا و سازمان غذا و دارو قرار دارد، یا منوط به استفاده با مقادیر معین می‌باشند و دوم اینکه، برای شناسایی وجود آنها در رنگ مو از روش‌های دستگاهی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده می‌شود که البته نواقصی نیز دارد، به این علت که ماتریس رنگ مو بسیار پیچیده است و تداخل ترکیبات و ایزومرهای با قطبیت نزدیک سبب ایجاد طیف‌هایی با مزاحمت‌های بسیاری می‌کند و همچنین بسیار هزینه‌بر می‌باشد، کاربرد روشی ساده مانند کروماتوگرافی لایه نازک که بتواند، به عنوان روشی مطمئن در شناسایی این ترکیبات عمل کند، همیشه با چالش و عدم اطمینان در آزمایشگاه‌های مرجع آزمون همراه بوده است.

جدول ۱: فهرست ۱۰ نمونه از مواد اولیه غیرمجاز آرایشی.

ردیف	نام شیمیایی
۱	Lead acetate p-Phenylenediamine
۲	o-Phenylenediamine
۳	2,4-Diaminotoluene
۴	1-Methoxy-2,4-diaminobenzen
۵	1-Methoxy-2,5-diaminobenzene
۶	Basic Violet 3
۷	2-Amino-4-nitrophenol
۸	2-Amino-5-nitrophenol
۹	CI 42640
۱۰	Acid Yellow 36

1- Thin-layer chromatography
2- Gas Chromatography
3- High-performance liquid chromatography
4- Gas chromatography-mass spectroscopy

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

۶ نمونه رنگ موی تجاری، کلروفرم – سیکلوهگزان – اتانل مطلق، متانل درجه HPLC – آمونیاک ۲۵ ٪، پارا – دی متیل آمینو بنز آلدهید هیدروکلریک اسید ۱۰ درصد وزنی/ حجمی، ۲، ۵- دی متیل فنل- فریک کلرید ۶ آبه، تترابورات دکاهیدرات و اسکوربیک اسید از شرکت مرک خریداری و بدون هیچ گونه خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد مرجع شامل پارافنیلن‌دی‌آمین (PPD)، اورتوفنیلن‌دی‌آمین (OPD)، متافنیلن‌دی‌آمین[5] (MPD)، ۲ ،۴- دی آمینوفنوکسی اتانل هیدروکلراید[6] (DAP)، رزورسینول[7](R)، ۲- متیل- متافنیلن‌دی‌آمین، ۲، ۵- دی آمینو تولوئن[8] (PTD) مورد استفاده قرار گرفتند.

در این تحقیق برای شناسایی و تجزیه و تحلیل آمین‌های آروماتیک پیش ماده رنگ و یک نمونه جفت کننده رنگ در رنگ مو مطابق با روش کروماتوگرافی لایه نازک از تانک شیشه‌ای حلال با ابعاد (۲۵ cm×۱۰×۲۳)، پلیت TLC (سیلیکاژل) F254 (۲۰×۲۰cm) و سایر ابزار آزمایشگاهی شامل سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ rpm و ابزار

5- M-Phenylenediamine
6-2,4-Diaminophenoxyethanol HCl
7- Resorcinol
8-2-Methyl-*m*-phenylenediamine (2,5-Diaminotoluene)

پاشنده، میکروسرنگ استفاده شد.

برای آزمون مقایسه‌ای از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC مدل Agilent، مجهز به سیستم تزریق خودکار، ستون C18، به ابعاد (۲۵۰mm×۴,۶ mm) و ثبات UV-VIS در طول موج ۴۴۰ نانومتر استفاده شد.

۲ـ۲ـ آماده‌سازی نمونه مرجع (۵۰۰ mg/l) در روش TLC

در یک لوله سانتریفوژ، محلولی از آمین‌های آروماتیک شامل پیش ماده و یک نمونه جفت‌کننده (نمونه) مرجع با غلظت ۵۰۰ mg/l، برای مقایسه؛ در حلال اتانل مطلق تهیه شد. محتویات لوله سانتریفوژ را یکنواخت کرده و سپس با گذاشتن درب لوله آن را با دور ۴۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای لکه‌گذاری استفاده شد. محلول‌ها به مدت دو روز در جای خنک و دور از نور به عنوان بهترین زمان استفاده، نگهداری شد [۱۹].

۲ـ۳ـ انتخاب اسپری آشکارساز در روش TLC

در این روش از دو شناساگر کاربردی به نام‌های ارلیش[1]، و دی‌آزو برای شناسایی و آشکارسازی لکه‌ها استفاده شد که به شرح زیر تهیه شدند.

شناساگر ارلیش، با افزودن ۲g از پارا – دی متیل آمینو بنز آلدهید را در ml ۱۰۰ اسید هیدروکلریک ۱۰ درصد وزنی/ حجمی آبی تهیه شد [۲]. همچنین محلول‌های مورد نیاز برای تهیه شناساگر دی آزو شامل، محلول ۵ درصد آبی با نسبت ۱:۱ از نمک ۳- نیترو- ۱- بنزن دی‌آزونیم کلروبنزن سولفونات (جزء الف) و نمک –کلرو-۴ نیترو-۱- بنزن دی‌آزونیم نفتالن بنزوات (جزء ب) تهیه شد، این دو جزء محلول هنگام کاربرد و در لحظه با هم مخلوط شدند[۲]. از بخار ید به عنوان شناساگر سوم مورد در این تحقیق استفاده شد.

۲ـ۴ـ آماده‌سازی نمونه در روش TLC

برای این منظور، ابتدا ۳ -۲ سانتی‌متر ابتدایی کرم را از خروجی تیوپ رنگ موی تجاری دور انداخته شد. g ۳ از کرم هموژن شده به همراه mg ۳۰۰ اسید اسکوربیک در لوله سانتریفوژ که پیشتر با نیتروژن هواگیری شده بود، ریخته شد. سپس محلول ۲۵ ٪ آمونیاکی قطره قطره تا رسیدن به pH، ۱۰ اضافه شد و با اتانل ۹۶ ٪ به حجم ml ۱۰ رسانده شد. محتویات لوله سانتریفوژ یکنواخت شده و سپس با گذاشتن درب لوله، آن را با دور ۴۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای لکه‌گذاری استفاده شد.

سیستم حلالی شامل کلروفرم – سیکلوهگزان –اتانل مطلق – آمونیاک ۲۵ ٪ (۸۰ : ۱۰ : ۱۰ : ۱) به عنوان حلال آشکارساز استفاده شد. و میزان اندازه حرکت لکه‌های رنگی نمونه و مرجع‌ها، Rf[2] ، در ۶ نمونه رنگ مو شناسایی شد.

۲ـ۵ـ روش اجرا در روش TLC

تحت اتمسفر نیتروژن از پلیت کروماتوگرافی استفاده شد و از μL ۱ از هرکدام از محلول‌های استاندارد (مرجع) به وسیله میکرو سرنگ در فاصله cm ۱,۵ ازهمدیگر با ارتفاع cm ۱,۵ از لبه پایینی پلیت لکه‌گذاری شد. لکه‌های محلول‌های استاندارد نیز به همین ترتیب چیده شدند و اجازه داده شد تا کاملاً خشک شوند. پلیت تا هنگامی که کروماتوگرافی در حال انجام بود تحت اتمسفر نیتروژن قرار داده شد.

پلیت در تانکی که قبلاً با نیتروژن هواگیری شده بود، در یک سیستم حلالی اشباع شده قرار داده (جدول ۲) و اجازه داده شد تا، کروماتوگرافی در محل تاریک و دمای ^oC (۲۵-۲۰) تا بالا رفتن حلال به فاصله cm ۱۵ از خط زمینه ادامه پیدا کند. پس از این مدت، پلیت برداشته و تحت نیتروژن در دمای اتاق خشک شد. در ادامه و بلافاصله افشانه شناساگر روی پلیت اسپری شد و اندازه حرکت لکه‌های رنگی نمونه و استانداردها ، Rf، یکدیگر مقایسه گردید.

۲ـ۶ـ آماده‌سازی نمونه در روش HPLC

ابتدا فاز متحرک (A) شامل: مخلوطی از ml ۶۰۰ محلول بافر (الف) و ml ۴۰۰ محلول(ب)، به شرح زیر تهیه شد.

- محلول بافر (الف) : محلولی از ml ۴۴۰ از اسیدهیدروکلریک ۰,۱ مولار و ۲ گرم اسید اسکوربیک در ml ۵۶۰ سدیم تترابورات دکاهیدرات ۰,۱ مولار، که برای استفاده آن را صاف و pH آن به ۸ رسانده شد.
- محلول (ب): متانل درجه HPLC

برای تهیه محلول‌های استاندارد، مقدار g ۰,۱ از هر ۶ ترکیب مرجع؛ به طور جداگانه در یک بشر ml ۱۰۰ که پیشتر با نیتروژن هواگیری شده بود ریخته شد؛ سپس در محلول فاز متحرک (A) حل شده و به حجم رسانده شد. محتویات پس از یکنواخت شدن (تحت جو نیتروژن) به لوله سانتریفوژ منتقل گردیده و سپس با گذاشتن درب لوله با دور ۴۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای تزریق استفاده شد.

برای تهیه محلول نمونه رنگ مو، حدود g۳ گرم از کرم یکنواخت شده در یک بشر ml ۱۰۰ ریخته شده و مانند روش بالا عمل می‌شود.

۳ـ نتایج و بحث

۳ـ۱ـ نتایج شناسایی کیفی با روش TLC

برای شناسایی لکه‌های آشکار شده، سه سیستم شناساگر مورد استفاده قرار گرفت. در حضور بخار ید، لکه‌های رنگی حاصل از

1-Ehrlich,s

2- Retention Factor

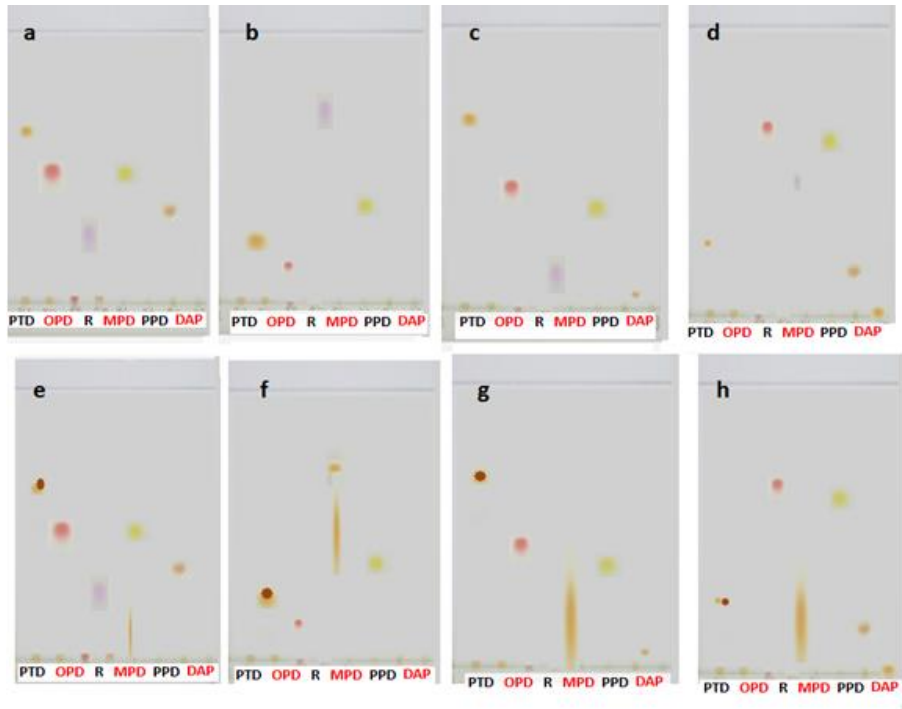
ترکیبات مورد بررسی بر روی کاغذ TLC، به رنگ قهوه‌ای درآمدند، این آشکار کنندگی لکه‌ها موثر و کارآمد بود، ولی به سرعت محو شدند، افشانه ارلیش، یک شناساگر ویژه برای آمین‌ها به شمار می‌رود و لکه‌ها را با رنگ قرمز یا زرد آشکار می‌کند و به راحتی می‌تواند به صورت پاششی به کار رود و واکنشگر دی آزو نیاز به آماده‌سازی قبل از استفاده دارد.

بر اساس مراجع [۲۰، ۲۱] چهار سیستم حلال آشکارساز (جدول ۱) برای شناسایی ۶ نمونه مرجع پارا فنیلن دی آمین (PPD)، اورتو فنیلن دی آمین (OPD)، متا فنیلن دی آمین (MPD)، ۲، ۴-دی آمینوفنوکسی اتانل هیدروکلراید (DAP)، و رزورسینول (R)، ۲-متیل- متا فنیلن دی آمین، ۲، ۵- دی آمینو تولوئن (PTD)، انتخاب شد [۲۰، ۲۱].

با به‌کارگیری یک سری از آزمون‌های مقایسه‌ای در میزان تفکیک لکه‌های رنگی در فرمول‌های شناخته شده با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (شکل ۲ و جدول ۳) ، بهترین سیستم حلالی انتخاب شد، نتایج نشان داد میزان Rf و شکل لکه‌ها در سیستم حلالی شامل کلروفرم – سیکلوهگزان –اتانل مطلق – آمونیاک ۲۵ درصد (۸۰ : ۱۰ : ۱۰ : ۱) قابل اعتمادتر است و به عنوان حلال آشکار ساز برگزیده از این آزمون بهینه سازی با بیشتری درصد تفکیک برای مطالعات بیشتر انتخاب شد.

جدول ۲: حلال‌های آشکارساز مورد مطالعه در کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) مقایسه‌ای

کد شناسایی	سیستم حلال آشکارساز	نسبت حجمی
سیستم الف	استن-کلروفم-تولوئن	۳۵ : ۲۵ :۴۰
سیستم ب	بنزن- بوتان ۲-ال-آب	۵۰ : ۲۵ : ۲۵
سیستم ج	دی اتیل اتر- اتیل استات –اسید استیک	۱۰۰ : ۱۰ : ۱
سیستم د	کلروفرم –سیکلوهگزان –اتانل مطلق –آمونیاک ۲۵ درصد	۸۰ : ۱۰ : ۱۰ : ۱



شکل ۲: کروماتوگرام لایه نازک برای ۶ نمونه آمین آروماتیک (a) شناساگر ارلیش- سیستم حلالی الف، (b) شناساگر ارلیش- سیستم حلالی ب، (c) شناساگر ارلیش- سیستم حلالی ج، (d) شناساگر ارلیش- سیستم حلالی ج، (e) شناساگر دی‌آزو- سیستم حلالی الف، (f) شناساگر دی‌آزو- سیستم حلالی ب، (g) شناساگر دی‌آزو- سیستم حلالی ج و (h) شناساگر دی‌آزو- سیستم حلالی د.

جدول ۳: فام‌های حاصله بلافاصله بعد از پاشش شناساگر برای نمونه مرجع (استاندارد).

استانداردها	ارزش Rf سیستم حلالی از جدول ۱				فام حاصله پس از کاربرد پاشش شناساگر		
	سیستم ۱	سیستم ۲	سیستم ۳	سیستم ۴	ارلیش	دی آزو	بخار ید
OPD	۰,۶۰	۰,۳۰	۰/۵۷	۰,۶۲	قرمز	قهوه‌ای کم رنگ	قهوه‌ای
MPD	۰,۶۰	۰,۴۷	۰,۴۸	۰,۴۰	زرد	بنفش قهوای	قهوه‌ای مایل به زرد
PPD	۰,۵۰	۰,۳۰	۰,۴۸	۰,۲۰	قرمز روشن	قهوه‌ای	قهوه‌ای- بنفش
PTD	۰,۶۵	۰,۳۷	۰,۷۰	۰,۳۳	نارنجی	قهوه‌ای	قهوه‌ای مایل به زرد
DAP	۰	۰	۰,۰۵	۰,۰۷	نارنجی	قهوه‌ای	قهوه‌ای تیره
R	۰,۳۷	۰,۸۰	۰,۱۷	۰,۵۰	بنفش کم رنگ	نارنجی	بژ(کرم روشن)

همانگونه که به آن اشاره شد، محصولات رنگ‌مو شامل پیش‌ماده رنگ، اصلاح کننده)، آنتی‌اکسیدان، قلیایی‌کننده‌ها، آمونیاک، عوامل مرطوب کننده و نرم‌کننده، اسانس، و انواع دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده در مقادیر کم است که خواص اضافی (مانند نرم‌شدن بافت) و میزان دوام رنگ مو را تنظیم می‌کند مواد شیمیایی معمولاً ترکیبات آمینه، مانند آمینو فنل‌ها، اکسیدهای فلزی، مانند دی اکسید تیتانیم و اکسید آهن استفاده می‌شود [۱۶، ۱۷].

در این بررسی ۶ نمونه از نمونه‌های رنگ‌موهای تجاری با فرمول‌بندی شناخته شده از ۳ تولیدکننده داخلی انتخاب شد مطابق نتایج جدول ۲، با سیستم حلال آشکارساز انتخابی (کلروفرم – سیکلوهگزان - اتانل مطلق - آمونیاک ۲۵ ٪ (۸۰ : ۱۰ : ۱۰ : ۱) میزان اندازه حرکت لکه‌های رنگی نمونه و استانداردها، Rf، در ۶ نمونه رنگ مو تعیین گردید (شکل ۳ و جدول ۴).

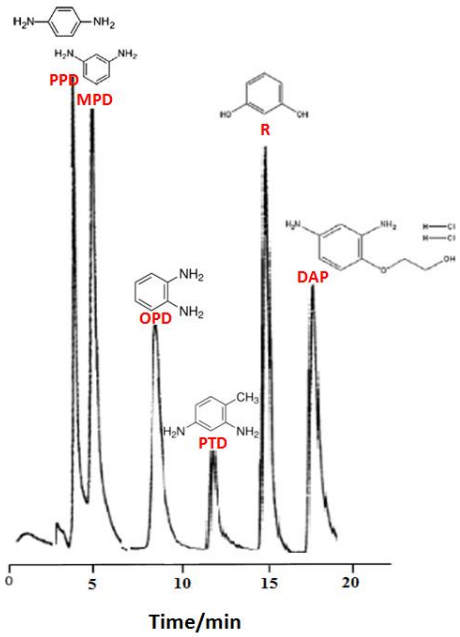
سرعت شناسایی و تفکیک لکه‌ها بسیار بالا بود، در ۶ نمونه تحت بررسی به طور متوسط بین ۳-۵ ترکیب در هر محصول شناسایی شد، و بیشترین تعداد لکه‌های رنگی در رنگ‌های مشکی و شرابی تیره مشاهده شد (شکل ۳). این روش از میزان تفکیک پذیری بسیار خوبی برخوردار است. بر اساس نتایج به دست آمده افزودنی‌های موجود در ساختار رنگ‌مو نمی‌تواند در شناسایی آمین‌های آروماتیک تحت بررسی، تداخل ایجاد کند.

البته نکته دیگری که در این بررسی مشهود است، یکسان بودن Rf دو ماده متفاوت به علت نزدیک بودن قطبیت دو ترکیب، در شناسایی با شناساگرهای مختلف می‌باشد. در این موارد با وجود تفاوت فام مشاهده‌شده، انجام یک روش کنترلی موازی مانند HPLC بسیار مناسب می‌باشد

۳ـ۲ـ نتایج شناسایی کیفی با روش HPLC

ابتداکروماتوگرام حاصل از محلول‌های استاندارد ترکیبات مرجع (شکل ۴) و سپس کروماتوگرام دو نمونه رنگ‌موی تجاری، مشکی و بلوند روشن، به عنوان نماینده فرمول‌بندی‌های انتخابی (شکل ۵)، بررسی شد.

شکل ۳: کروماتوگرام لایه نازک برای ۶ نمونه رنگ موهای تجاری با فرمول‌های شناخته شده.



شکل ۴: کروماتوگرام مایع با کارایی بالا HPLC محلول استاندارد آمین‌های آروماتیک مرجع.

جدول ۴: شناسایی آمین‌های آروماتیک موجود بلافاصله بعد از پاشش شناساگر و ارزش Rf برای نمونه رنگ موهای تجاری با فرمول‌های شناخته شده

نمونه رنگ مو	تن رنگ	ارزش Rf					
		OPD	MPD	PPD	PTD	DAP	R
۱	مشکی	D	D	D	ND	ND	D
۲	قهوه‌ای تیره	ND	ND	D	ND	ND	D
۳	بلوند روشن	ND	D	ND	ND	ND	D
۴	بلوند تیره	ND	D	D	ND	ND	D
۵	ماهاگونی تیره	ND	D	D	ND	ND	D
۶	شرابی تیره	D	ND	D	D	D	D

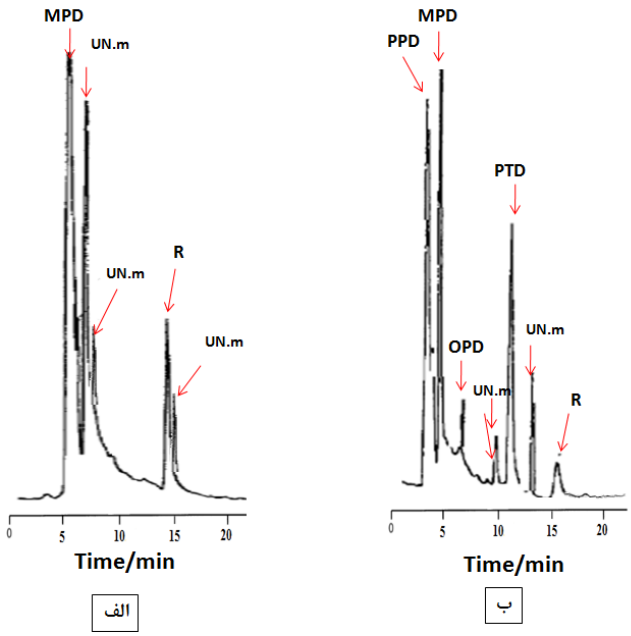
D: شناسایی گردید، ND: شناسایی نگردید

در کروماتوگرام ترکیبات مرجع، زمان بازداری مواد مشخص گردید، این نتایج نشان می‌دهد که زمان بازداری برای ترکیب PPD حدود ۴،۵۰ دقیقه، برای ترکیب MPD حدود ۶ دقیقه، برای ترکیب OPD، حدود ۸،۵۵ دقیقه، برای ترکیب PTD، حدود ۱۲،۳۰ دقیقه؛ برای R، حدود ۱۵،۲۰ دقیقه و برای ترکیب DAP، حدود ۱۸،۱۰ دقیقه به دست آمد. از این زمان‌های بازداری در شناسایی کیفی وجود ترکیبات آمینی و رزورسینول در زمینه رنگ موهای تجاری نیز مورد بررسی استفاده شد.

شکل ۵ (الف و ب)، کروماتوگرام‌های رنگ‌موی مشکی و بلوند روشن را نشان می‌دهد؛ مطابق نتایج به دست آمده در کروماتوگرام ۵ (الف) که مربوط به رنگ بلوند روشن است، MPD با زمان بازداری ۶ دقیقه و رزورسیول R، با زمان بازداری ۱۵،۲۰ دقیقه شناسایی شدند. در این کروماتوگرام ترکیبات ناشناخته‌ای که ناشی از اثر ترکیبات همراه در زمینه رنگ‌مو بود، در زمان‌های بازداری ۷،۳۰ دقیقه، ۸ دقیقه و ۱۶،۱۰ دقیقه نیز مشخص شد.

در کروماتوگرام ۵ (ب) متعلق به رنگ مشکی، PPD با زمان بازداری ۴،۵۰ دقیقه، MPD با زمان بازداری ۶ دقیقه، OPD، با زمان بازداری ۸،۵۵ دقیقه و R، با زمان بازداری حدود ۱۵،۲۰ دقیقه شناسایی شدند. قله مشاهده شده در زمان بازداری ۱۲،۱۰ به این علت که نزدیک به محل قرارگیری قله شاهد مربوط به PTD بود، با تردید به این ترکیب اختصاص داده شد (در نتایج TLC شناسایی نشده بود). در این کروماتوگرام نیز ترکیبات ناشناخته‌ای که ناشی از اثر ترکیبات همراه در ماتریس رنگ مو بود، در زمان‌های بازداری ۹،۳۰ تا ۱۰ دقیقه و ۱۳،۲۰ دقیقه نیز رویت شد.

با مقایسه روش‌ها مشخص شد که، در شناسایی ترکیبات موجود در دو فرمول‌بندی تجاری مشکی و بلوند روشن نتایج TLC تقریباً با کرماتوگرام‌های روش HPLC [۲۲، ۲۳] مطابقت داشت و آمین‌ها و ترکیبات تحت بررسی با هر دو روش قابل شناسایی هستند؛ ولی نتایج بازداری برخی از ترکیبات در روش HPLC بسیار به هم نزدیک بوده و همپوشانی قابل ملاحظه‌ای داشتند [۲۳]. همچنین وجود قله‌های ناشناخته در کرماتوگرام‌های به دست آمده نشان‌دهنده زمینه پیچیده در فرمول‌بندی تجاری می‌باشد.



شکل ۵: کروماتوگرام مایع با کارایی بالا HPLC محلول رنگ موهای تجاری مشکی (الف) و بلوند روشن (ب).

۳ـ۳ـ مقایسه روش‌ها

برای اثبات کارایی روش کیفی به کار رفته در این مطالعه، روش کروماتوگرافی لایه نازک TLC با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC مقایسه شد [۲۲].

بر این اساس، اگر چه روش HPLC در هر دو تجزیه و تحلیل کمی و کیفی نسبتاً مناسب است، ولی به دلیل ماهیت ناپایدار و مشابه درنمونه‌های با آمین‌های آروماتیک متعدد، گاهی شناسایی ساده به وسیله زمان بازداری با این روش بسیار دشوار و دارای تردید است[۲۲]. مشکل دیگری که در این روش مشاهده گردید، عدم خلوص محلول مورد آزمون برای تزریق به ستون، به علت حضور هم‌زمان پیش‌ماده و جفت کننده در کنار هم و مواد افزودنی بود. که باکوچک‌ترین عامل اکسنده بیرونی، احتمال اکسید شدن و جفت‌شدن آمین‌های آروماتیک مورد بررسی و تغییر ماهیت دادن آنها، تردید در صحت نتایج را به دنبال داشت؛ همچنین به علت فرمول پیچیده رنگ مو و نزدیک بودن قطبیت ایزومرهای مختلف آمین‌های آروماتیک نسبت به هم، امکان تداخل در کروماتوگرام نهایی و تشخیص نادرست همواره وجود داشت و در نتیجه نتایج به خصوص در بسترهای پیچیده‌تر دقت بالایی نداشت.

معضل دیگر در این روش این مورد بود که به علت اکسیدشدن محلول آزمون از ترکیبات مورد بررسی در حین عمل تزریق کروماتوگرافی، آلودگی زودهنگام ستون و به دنبال آن خرابی ستون ایجاد شد که این امر مستلزم هزینه بود. بنابراین به کارگیری این روش به عنوان روش آزمون با دقت و صحت بالا از محدوده این پژوهش خارج بوده و نیاز به بررسی‌های بیشتری داشت.

۳ـ۴ـ صحه‌گذاری درون آزمایشگاهی

برای این منظور نتایج به دست آمده از چهار آزمایشگاه با یکدیگر مقایسه شدند. بر اساس آن میزان تفکیک نقاط و ارزش Rf در رنگ موهای مورد مطالعه تقریباً یکسان بودند، اختلاف در تشخیص و تفکیک‌پذیری بسیار ناچیز و قابل صرف‌نظر کردن بود.

این نتایج نشان می‌دهد که روش کروماتوگرافی لایه نازک تجدیدپذیری مناسبی در مورد تشخیص آمین‌های آروماتیک مورد آزمون در بستر رنگ مو دارد.

۴ـ نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که روش کروماتوگرافی لایه نازک روشی، سریع و قابل اعتماد است و می‌تواند به طور واضح برای شناسایی آمین‌های آروماتیک در رنگ‌مو مورد استفاده قرار گیرد. این روش برای تفکیک اجزاء یک مخلوط بسیار مفید است و همچنین می‌توان از آن برای تعیین بهترین حلال استخراج کننده جهت کروماتوگرافی ستونی نیز استفاده کرد. در این روش‌ها لکه‌های مختلف را می‌تراشند و با یک حلال مناسب می‌شویند (استخراج می‌کنند) و برای شناسایی (از طریق طیف‌سنجی) به کار می‌برند. تشخیص لکه‌های رنگی در روی کروماتوگرام آسان است و برای تعیین محل لکه‌های اجسام بی‌رنگ شناساگرهای مختلفی وجود دارد که در این بررسی پاشش ارلیش بسیار کارامد بود. برتری این روش در مطالعه حاضر با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مقایسه شد و پیشنهاد شدکه در مواردی‌که Rf دو ماده متفاوت، مقدار یکسانی داشت، انجام یک روش کنترلی موازی مانند HPLC بسیار مناسب می‌باشد و برای اعتبارسنجی روش مورد استفاده چهار آزمایشگاه شرکت کردند، اعتبارسنجی نتایج نشان داد که تجدیدپذیری بین آزمایشگاهی این روش مناسب است.

تشکر و قدردانی

در اینجا برخود لازم می‌دانم که از مدیریت محترم شرکت اوژن اشتهارد، جناب آقای مهندس سید مهدی حسینی و ریاست محترم آزمایشگاه آرایشی و بهداشتی مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو سرکار خانم مهندس فاطمه ذوالفقاری و سرکار خانم مهندس پری غفاری از آزمایشگاه مهر طاهر به دلیل همکاری موثر در تأمین اطلاعات مورد نیاز در انجام این تحقیق تشکر نمایم.

۵ـ مراجع

1. M. Bruze, A. Goossens, M. Isaksson, Recommendation to increase the test concentration of methylchloroisothiazolinone/ methylisothiazolinone in the European baseline patch test series–on behalf of the European Society of Contact Dermatitis and the European Environmental and Contact Dermatitis Research Group. *Contact Dermatitis*, 71(2014), 35-40.
2. H. Zhu, Y. Yang, Y. Zhu, An efficient and rapid thin-layer chromatography method for the identification of 32 dye substances in hair dye products. *Int. J. Cosmet. Sci.* 36(2014), 369-378.
3. W. Steiling, Safety evaluation of cosmetic ingredients regarding their skin sensitization potential. *Cosmetics*. 3(2016), 14.
4. W. Uter, L. Bensefa-Colas, P. Frosch, A. Giménez-Arnau, SM. John, JP. Lepoittevin, C. Lidén, IR. White, J. Duus Johansen, Patch testing with hair cosmetic series in Europe: a critical review and recommendation. *Contact Dermatitis.* 73(2015), 69-81.
۵. س. اوسطی، آ. پیری صدیق، ل. عدل نسب، معرفی رنگدانه ها و عوامل رنگزا در محصولات آرایشی، زینتی رنگی، *نشریه علمی ترویجی مطالعات در دنیای رنگ*. (۱۳۹۳) ۴، ۴۷-۳۳.

Bioanal. Chem. 391(2008), 653-659.

15. A. Antelmi, M. Bruze, E. Zimerson, M. Engfeldt, E. Young, L. Persson, C. Foti, Ö. Sörensen, C. Svedman., Evaluation of concordance between labelling and content of 52 hair dye products: overview of the market of oxidative hair dye. *Eur. J. Dermatol.* 27(2017), 123-131.
16. M. L. Di Gioia, A. Leggio, A. Le Pera, A. Liguori, A. Napoli, F. Perri, C. Siciliano, Determination by gas chromatography/mass spectrometry of p-phenylenediamine in hair dyes after conversion to an imine derivative. *J. Chromatogr. A.* 1066(2005), 143-148.
17. H. Zhu, W. Zhang, Y. Zhu, Determination of 22 components in hair dyes by high performance liquid chromatography. *Se pu= Chin. J. Chromatogr.* 26(2008), 554-558.
18. X. Liang, J. Zhang, T. T. Liu, L. Li, Illegally additives determination by thin layer chromatography. in MATEC Web of Conferences. 2016 . EDP Sciences.

۱۹. م. خالقی، فرآورده‌های آرایشی – کرم رنگ موی دائمی - ویژگی ها و روش‌های آزمون. طرح پژوهشی، ۱۳۹۵.

20. R. Resua, P. DeForest, H. Harris, The evaluation and selection of uncorrelated paired solvent systems for use in the comparison of textile dyes by thin-layer chromatography. *J. Forensic Sci.* 26(1981), 515-534.
21. Standards, B.o.I., Oxidation Hair Dyes Liquid. IS 8481, 2005.
22. N. A. Penner, P. N. Nesterenko, Simultaneous determination of dihydroxybenzenes, aminophenols and phenylenediamines in hair dyes by high-performance liquid chromatography on hypercross-linked polystyrene. *Analyst*. 125(2000), 1249-1254.
23. U. Vincent, G. Bordin, A. R. Rodriguez, Validation of an analytical procedure for the determination of oxidative hair dyes in cosmetic formulations. *J. Cosmet. Sci*. 53(2002), 43-58.

6. J. C. Warner, L. Muollo, A. Stewart, Formulation and processes for hair coloring. 2016, Google Patents.

۷. ع. مرادی روفچاهی، سنتز تعدادی از مواد رنگزای آزوی جدید مشتق شده از ۶، ۸- دی کلرو- ۴- هیدروکسی کینولین -۲ (H1)-اُن: تعیین ساختار، حلال پوشی و خواص طیف سنجی، *نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ*. ۵(۱۳۹۶)، ۲۱۳-۲۰۳.

8. N. Noroozi-Pesyan, J. Khalafy, Z. Malekpoor, Diazotization of Aniline derivatives and diazo couplings in the presence of p-toluenesulfonic acid by grinding. *Prog. Color Colorants Coat.* 2(2009), 61-70.

۹. ف. آریا نسب، ح. سلیمی، ع. بنازاده، رنگ موهای دائمی،فرمولاسیون، سازوکار عملکرد آن و واکنش های جایگزین، ن*شریه علمی ترویجی مطالعات در دنیای رنگ*، (۱۳۹۲)۳، ۶۸-۵۵.

10. d S. A. a França, M. F. Dario, V. B. Esteves, A. R. Baby, M. V. R. Velasco, Types of hair dye and their mechanisms of action. *Cosmetics*. 2(2015), 110-126.

۱۱. ز. شاهی، م. خواجه مهریزی، م. هادی زاده، مروری بر انواع رنگ مو، ساختار و ویژگی های آنها، *نشریه علمی ترویجی مطالعات در دنیای رنگ*. (۱۳۹۶)۸، ۱۰۴-۸۳.

12. D. Hamann, K. Yazar, CR. Hamann, JP. Thyssen, C. Liden, p-Phenylenediamine and other allergens in hair dye products in the United States: a consumer exposure study. *Contact Dermatitis.* 70(2014), 213-218.
13. D. Koh, C. Tan, SK. Ng, BT. Tan, YH. Leow, CL. Goh, Screening for p-phenylenediamine (PPD) in hair-care products by thin-layer chromatography (TLC). *Contact Dermatitis.* 43(2000), 182.
14. S. Dong, L. Chi, S. Zhang, P. He, Q. Wang, Y. Fang, Simultaneous determination of phenylenediamine isomers and dihydroxybenzene isomers in hair dyes by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. *Anal.*