



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

ماهر و خالقی مقدم

مربی، پژوهشکده شیمی و پتروشیمی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران، صندوق پستی: ۳۱۷۴۵-۱۳۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۷/۶/۱۲

چکیده

رنگ موهای دائمی محصولات پرکاربرد و حاوی تعداد زیادی مواد حساسیت‌زا هستند. نشانه‌گذاری صحیح بر روی بسته‌بندی این محصولات به منظور فراهم کردن اطلاعات در خصوص محتویات آن اهمیت دارد. پیش‌ماده رنگ موجود در این رنگ موها عموماً آمین‌های آروماتیک شامل مشتقات فنیلین آمین سولفوریک اسید یا اسید پارافنیلین 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 R_f 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 Institute (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 R_f 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.

۱- مقدمه

علاوه بر عوامل اکسند شیمیایی، پیش ماده و عوامل جفت کننده در حضور هوا نیز می توانند اکسید شوند که به این عمل خود اکسیدشوندگی ماده گفته می شود.

پیش ماده های اکسیدشونده مشتقات آنیلین هستند، به عبارت دیگر آمین ها یا آمینوفنل های دو عاملی مانند اورتو، پارا آمینو فنل می باشند که قابلیت تبدیل شدن به یون های دی ایمینیم یا کوئینو ایمینیم را به عنوان حد واسط اولیه دارند [۷].

جفت کننده ها، آمین ها یا فنل های آروماتیک غنی از الکترون می باشند، این ترکیبات اغلب رزورسینول ها یا فنیلن دی آمین های استخلاف نشده می باشند [۸] که معمولاً موضع پارا نسبت به موقعیت آمینی در آنها بدون استخلاف است، که ترکیبات مختلف از آنها، فام های متفاوتی ایجاد می کند [۹، ۱۰].

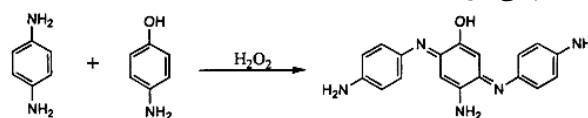
پیش ماده های اکسیدشونده وقتی در غیاب جفت کننده اکسید می شوند، ترکیبات رنگی، اغلب خاکستری یا قهوه ای - سیاه، به وجود می آورند. از طرفی، جفت کننده ها یا معمولاً بی رنگ هستند یا رنگ کمی تولید می کنند، اما این ترکیبات در حضور پیش ماده ها و عوامل اکسند، رنگ تولید شده توسط پیش ماده را بهبود می بخشد [۹-۱۱].

از میان این ترکیبات اکسید شونده (پیش ماده و عوامل جفت کننده)، هر ساله تعدادی از آنها که بیماری زایی آنها به اثبات رسیده باشد، اسامی آن در فهرست ترکیبات غیر مجاز اتحادیه اروپا^۸ و سازمان غذا و دارو قرار می گیرد، پارافنیلن دی آمین^۹ (PPD) یکی از پیش ماده های به کار رفته در فرمول بندی رنگ مو بوده که باید در حد مجاز معرفی شده از سوی مراجع ذیصلاح به فرمول اضافه شود. PPD ماده ای بی رنگ است که برای رنگی شدن به اکسیژن نیاز است؛ و این امر سبب ایجاد واکنش های حساسیتی در برخی از افراد می شود. از سوی دیگر، طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی، می تواند به عنوان مواد رنگ مو مورد استفاده قرار گیرد، و از این رو تعیین یک روش واحد برای مشخص کردن و شناسایی هم زمان 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 می یابد. در مراجع مختلف روش های متفاوت کروماتوگرافی برای تجزیه و تحلیل این ترکیبات گزارش شده است. هر ساله ترکیبات شناسایی شده بسیاری از این دست که بیماری زایی آن به اثبات رسیده باشد، در فهرست ترکیبات غیر مجاز اتحادیه اروپا و سازمان غذا و دارو قرار می گیرد. فهرست مواد غیر مجاز 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

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 می یابد. با توجه به دسته شیمیایی مواد رنگ مو و آمار بالای کاربران این محصول در کشور (زنان، مردان، سالن های آرایش حرفه ای)، و با وجود میزان بسیار بالای فروش و طیف وسیع فرآورده های در دسترس، هنوز هم اطلاعات ما در مورد میزان واقعی بروز و شیوع اثرات زیانبار آنها به میزان قابل توجهی اندک است. واکنش های ناخواسته بالقوه نسبت به محصولات زیبایی، طیف وسیعی از واکنش های پوستی را در بر می گیرند که عبارتند از واکنش های تحریکی، بیش حساسیتی، کهیر تماسی، آسیب مو و ناخن ها، پارونیشیا^۱، بثور آکنه ای^۲، فولیکولیت^۳ و بدتر شدن درماتوزهای^۴ قبلی [۱، ۲]. واکنش های حساسیتی ممکن است در اولین مصرف رنگ مو به علت، عدم واکنش اولیه سیستم ایمنی نسبت به آنتی ژن جدید که همان مواد شیمیایی رنگ مو است، خود را نشان ندهند، اما با گذشت زمان، سیستم ایمنی بدن برای آن آنتی ژن، تولید آنتی بادی می کند و در دفعات بعدی مصرف، عوارض ناخوشایند حساسیت، ظاهر می شود. رنگ موهای دائمی و بادوام تر به سبب دارا بودن مواد شیمیایی بیشتر و قوی تر، هم زمینه حساسیت های پوستی را فراهم می کنند و هم ساختار مو را دستخوش تغییر بیشتری می نمایند [۳-۵].

ترکیبات موجود در کرم رنگ موی دائمی که در دسته ترکیبات اکسید شونده جای می گیرند و شامل دو بخش پیش ماده اکسیدشونده و عوامل جفت کننده می شوند که در کنار عوامل دیگری مانند اصلاح کننده^۵، آنتی اکسیدان ها^۶، قلیایی کننده ها^۷، آمونیاک، عوامل مرطوب کننده، نرم کننده و اسانس، قرار می گیرند و تا زمان مصرف و اضافه شدن عامل اکسید کننده بدون تغییر می مانند. هنگام رنگ کردن مو در اثر اختلاط پراکسید هیدروژن با کرم رنگ مو، واکنش اکسایش و تشکیل رنگدانه چند هسته ای مطابق با شکل ۱ انجام می گیرد [۶].



پیش ماده رنگ

جفت کننده رنگ

رنگدانه چند هسته ای

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

- 1- Paronychia
- 2- Acneiform rash
- 3- Folliculitis
- 4- Dermatitis
- 5- Modifiers
- 6- Antioxidants
- 7- Alkalizers

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

مخلوط کرد. هنگامی که نور فرابنفش به این صفحه بتابد، لکه اجسامی که پرتو فرابنفش را جذب می‌کنند ولی خاصیت فلورسانس 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.

۲- بخش تجربی

۲-۱- 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 پارافنیل‌دی‌آمین (PPD)، اورتوفنیل‌دی‌آمین (OPD)، متافنیل‌دی‌آمین^۵ (MPD)، ۲، ۴- دی آمینوفنوکسی اتانل هیدروکلراید^۶ (DAP)، رزورسینول^۷ (R)، ۲- متیل - متافنیل‌دی‌آمین، ۲، ۵- دی آمینو تولوئن^۸ (PTD) مورد استفاده قرار گرفتند.

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

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 پیش‌ماده و جفت کننده 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^۱ [۱۳، ۱۲]، GC^۲ [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 اما به علت ترکیب پیچیده محصولات رنگ مو، این روش معایبی نیز به همراه دارد. روش موثر و کارآمد 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 بر آن 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 فلورسانس دارند مشخص کرد. به روش دیگر می‌توان جسم جاذب را با ماده فلورسانس دار بی‌اثر دیگری

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

5- M-Phenylenediamine

6-2,4-Diaminophenoxyethanol HCl

7- Resorcinol

8-2-Methyl-m-phenylenediamine (2,5-Diaminotoluene)

شد. و میزان اندازه حرکت لکه‌های رنگی نمونه و مرجع‌ها، R_f ، در ۶ نمونه رنگ مو شناسایی شد.

۲-۵- روش اجرا در روش TLC

تحت اتمسفر نیتروژن از پلیت کروماتوگرافی استفاده شد و از μL ۱ از هر کدام از محلول‌های استاندارد (مرجع) به وسیله میکرو سرنگ در فاصله ۱٫۵ cm از هم‌دیگر با ارتفاع ۱٫۵ cm 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 $^{\circ}\text{C}$ (۲۵-۲۰) تا بالا رفتن حلال به فاصله ۱۵ cm 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، R_f ، یکدیگر مقایسه گردید.

۲-۶- آماده‌سازی نمونه در روش HPLC

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

- محلول بافر (الف): محلولی از ۴۴۰ ml از اسید هیدروکلریک ۰٫۱ مولار و ۲ گرم اسید اسکوربیک در ۵۶۰ ml 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 ۰٫۱ g از هر ۶ ترکیب مرجع؛ به طور جداگانه در یک بشر ۱۰۰ ml 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 ۳g گرم از کرم یکنواخت شده در یک بشر ۱۰۰ ml ریخته شده و مانند روش بالا عمل می‌شود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- 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

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 (۲۵۰ mm × ۴٫۶ mm) و ثابت UV-VIS در طول موج ۴۴۰ نانومتر استفاده شد.

۲-۲- 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].

۲-۳- انتخاب اسپری آشکارساز در روش TLC

در این روش از دو شناساگر کاربردی به نام‌های ارلیش^۱ 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 ۱۰۰ ml 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 نفتال 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.

۲-۴- آماده‌سازی نمونه در روش TLC

برای این منظور، ابتدا ۳- ۲ سانتی‌متر ابتدایی کرم را از خروجی تیوپ رنگ موی تجاری دور انداخته شد. ۳g از کرم هموزن شده به همراه ۳۰۰ mg 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 ۱۰ ml 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

2- Retention Factor

1-Ehrlich,s

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.

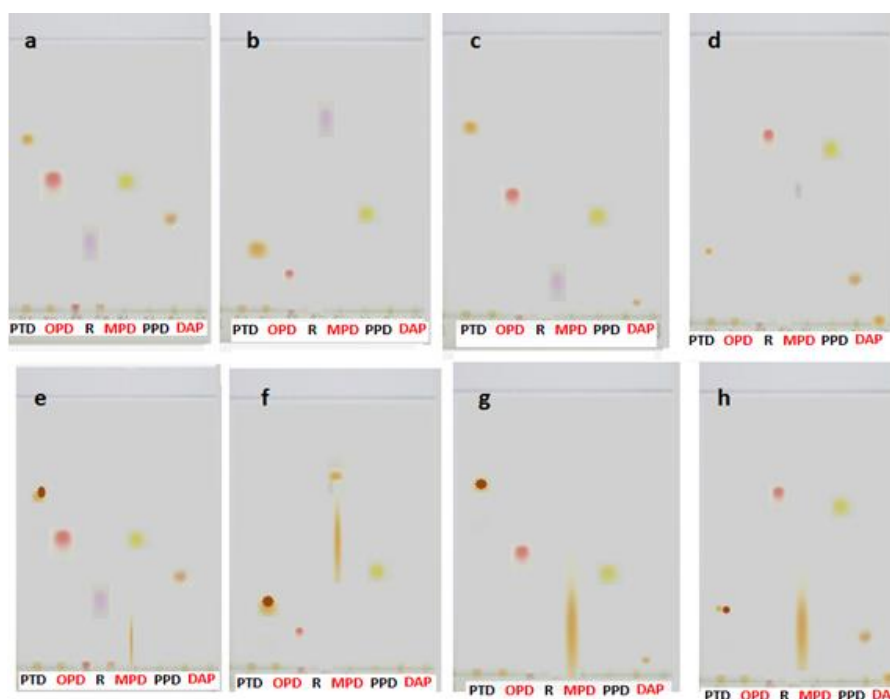
جدول ۲: حلال‌های آشکار ساز مورد مطالعه در کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) مقایسه‌ای

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

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 اریلیش، 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 آشکار ساز (جدول ۱) برای شناسایی ۶ نمونه مرجع پارافینیل دی آمین (PPD)، اورتو فنیلین دی آمین (OPD)، متا فنیلین دی آمین (MPD)، ۲، ۴-دی آمینوفنوکسی اتانل هیدروکلراید (DAP)، و رزورسینول (R)، ۲-متیل- متا فنیلین 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



شکل ۲: کروماتوگرام لایه نازک برای ۶ نمونه آمین آروماتیک (a) شناساگر اریلیش - سیستم حلالی الف، (b) شناساگر اریلیش - سیستم حلالی ب، (c) شناساگر اریلیش - سیستم حلالی ج، (d) شناساگر اریلیش - سیستم حلالی د، (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.

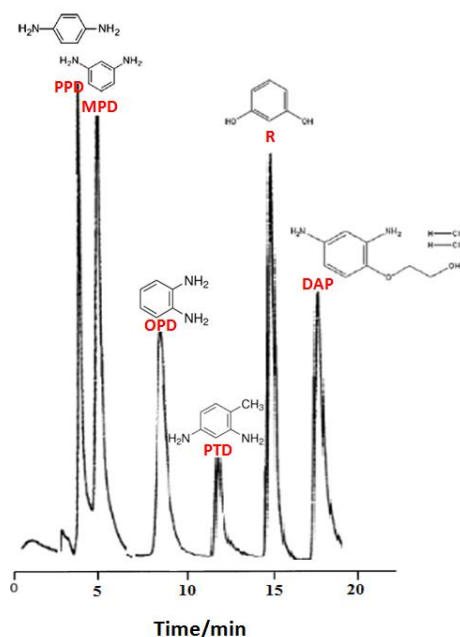
جدول ۳: فام‌های حاصله بلافاصله بعد از پاشش شناساگر برای نمونه مرجع (استاندارد).

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

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.

همانگونه که به آن اشاره شد، محصولات رنگ‌مو شامل پیش‌ماده رنگ، اصلاح‌کننده، آنتی‌اکسیدان، قلیایی‌کننده‌ها، آمونیاک، عوامل مرطوب‌کننده 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 دی‌اکسید تیتانیوم 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)) 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 مشاهده شده، انجام یک روش کنترلی موازی مانند HPLC بسیار مناسب می‌باشد.

۳-۲- نتایج شناسایی کیفی با روش HPLC

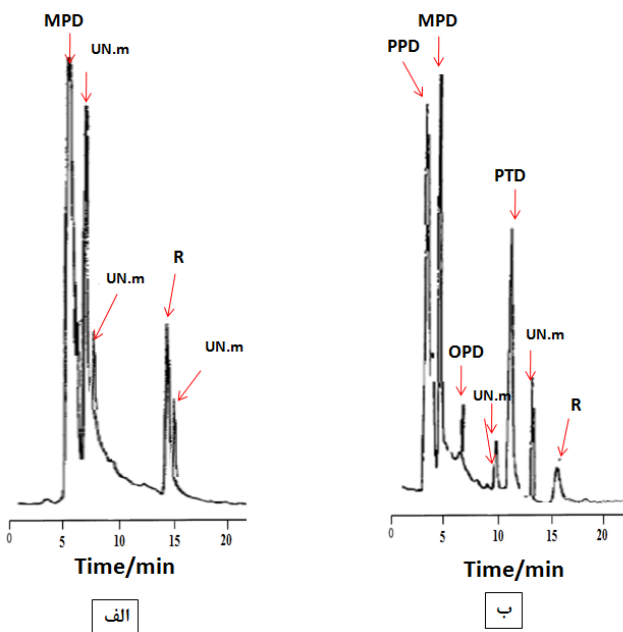
ابتدا کروماتوگرام حاصل از محلول‌های استاندارد ترکیبات مرجع (شکل ۴) و سپس کروماتوگرام دو نمونه رنگ‌موی تجاری، مشکی و بلوند

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

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

D: شناسایی گردید، ND: شناسایی نگردید

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 کروماتوگرام‌های 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).

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 رزورسینول 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 کروماتوگرام‌های روش HPLC [۲۲، ۲۳] مطابقت داشت و آمین‌ها و

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

۴- 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 می‌تواند از آن برای تعیین بهترین حلال استخراج کننده جهت کروماتوگرافی ستونی نیز استفاده کرد. در این روش‌ها لکه‌های مختلف را می‌توانند 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 اریلیش بسیار کارآمد بود. برتری این روش در مطالعه حاضر با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مقایسه شد و پیشنهاد شد که در مواردی که R_f 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 بخود لازم می‌دانم که از مدیریت محترم شرکت اوژن اشتهاارد، 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.

۳-۳- 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 در نمونه‌های 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 با کوچک‌ترین عامل اکسنده بیرونی، احتمال اکسید شدن و جفت شدن 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 اکسید شدن محلول آزمون از ترکیبات مورد بررسی در حین عمل تزریق کروماتوگرافی، آلودگی زود هنگام 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.

۳-۴- صحت‌گذاری درون آزمایشگاهی

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

۵- 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.
5. س. اوسطی، آ. پیری صدیق، ل. عدل نسب، معرفی رنگدانه‌ها و عوامل رنگزا در محصولات آرایشی، زینتی رنگی، نشریه علمی ترویجی مطالعات در دنیای رنگ. (۱۳۹۳)، ۴، ۳۳-۴۷.

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 کلو-۴-هیدروکسی کینولین ۲-(H1)-آن: تعیین ساختار، حلال پوشی و خواص طیف سنجی، نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ. ۱۳۹۶(۵)، 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. بنزاده، رنگ موهای دائمی، فرمولاسیون، سازوکار عملکرد آن و واکنش های جایگزین، نشریه 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. 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.