مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (41) العدد (2) 2019
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (41) No. (2) 2019

Methyl paraben detection in cosmetic products by synthesis of azo compounds using infrared spectroscopy

Dr. Faten Ali ALCHAB*

(Received 28 / 10 / 2018. Accepted 2 / 4 / 2019)

□ ABSTRACT □

A new method for the detection of methylparaben which is often used as preservative, alone or in combination with other parabens using infrared spectroscopy was developed. A good method for detection of methylparaben was developed using the oxidation reactions between methylparaben and many aromatic amines in order to form the colorful azo dye compounds. There have been numerous attempts to select the ideal conditions for completion of diazotization and coupling reactions of and put in terms of determining the quantities of reactants and determining the appropriate temperature to complete the interaction. The complexes were then studied and identified using infrared spectra. The proposed method was successfully applied to the assay of methylparaben in cosmetic products.

Keywords: Methyl paraben, preservative, AZO complexes, diazotization reactions

* **Assistant Prpfessor - Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control - Faculty of Pharmacy - Tishreen University - Lattakia – Syria**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (41) العدد (2) 2019
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (41) No. (2) 2019

الكشف عن الميثيل بارابين في مستحضرات التجميل عن طريق اصطناع مركبات الآزو باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء

الدكتورة فاتن علي الشب*

(تاريخ الإيداع 28 / 10 / 2018. قُبِل للنشر في 2 / 4 /2019)

□ ملخّص □

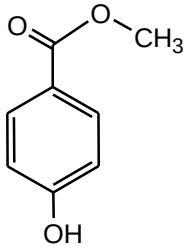
تم تطوير طريقة جديدة للكشف عن الميثيل بارابين المستخدم كمادة حافظة ، بمفرده أو بالاقتران مع البارابينات الأخرى و ذلك باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء. اعتمدت هذه الطريقة على إنجاز تفاعلات الأكسدة بين الميثيل بارابين والعديد من الأمينات العطرية بهدف تشكيل مركبات الآزو الملونة. و قد تعددت المحاولات بهدف اختيار الشروط المثالية لإتمام تفاعلات الديئزة و التزاوج من حيث تحديد كميات المواد المتفاعلة وتحديد درجة الحرارة المناسبة لإتمام التفاعل و من ثم تم دراسة المركبات المتشكلة، و تحديد هويتها باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء. تم تطبيق الطريقة المقترحة بنجاح للكشف عن الميثيل بارابين في مستحضرات التجميل.

الكلمات المفتاحية : ميثيل بارابين، مادة حافظة ، معقدات الآزو ، تفاعلات الديئزة.

*مدرسة – قسم الكيمياء الصيدلية و المراقبة الدوائية– كلية الصيدلة – جامعة تشرين– اللاذقية – سورية

مقدمة

تعددت الطرائق المستخدمة للكشف عن الميثيل بارابين، والذي يعتبر من أكثر المواد الحافظة استخدأما. يتميز الميثيل بارابين بأنه أكثر انحلالية في الماء مقارنة مع باقي البارابينات بسبب قصر سلسلته الألكيلية [1]. صيغته العامة: $C_8H_8O_3$، وزنه الجزيئي $152.15\ g.mol^{-1}$، وهو مسحوق أبيض بلوري أو إبري، عديم الرائحة أو لديه رائحة خفيفة.



Methyl paraben

الشكل (1)الصيغة الكيميائية للميثيل بارابين

استخدم الميثيل بارابين منذ أكثر من 50 عاما كمادة حافظة، وهي مادة مضادة للخمائر والفطور والميكروبات، فعالة ضمن مجال واسع من درجة الحموضة pH [2].

لكن، وبالرغم من ميزاتها المتعددة كمواد حافظة لوحظ وجود بعض الآثار الجانبية لاستخدامها خصوصاً أنها تستخدم على نطاق واسع في مختلف المنتجات حيث سجلت بعض حالات تهيج و حساسية الجلد مباشرة أو بعد فترة من استخدام المنتجات الحاوية على البارابينات سواء المطبقة موضعياً أو المأخوذة حقناً أو فموياً ، كذلك يمكن أن تسبب البارابينات خلل في الغدة الدرقية ويمكن أن يكون لها علاقة بالسمنة[3] .

بينت العديد من الدراسات وجود مستويات مرتفعة من الميثيل بارابين في أنسجة الثدي حيث أنه يملك تأثيرا تراكميا مما يجعله مرتبطاً بسرطان الثدي، حيث يمكن أن يكون له تأثير هرموني يشبه تأثير الأستروجين [4] .

لقد تم الكشف عن الميثيل بارابين بعدة طرائق، اعتمدت في معظمها على استخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء [5] ، أو الكروماتوغرافيا الغازية[6] ، أو الكروماتوغرافيا السائلة [7] .إلا أن هذه الطرائق اتسمت بأنها طرائق مكلفة و تحتاج مواد غالية الثمن. و اعتمدت بعض الطرائق على استخدام السبيكتروفوتوميتر [8-9]. استخدمت طرائق أخرى مبنية القياس اللوغاريتمي المتعاقب باستخدام السبيكتروفوتوميتر[10].

نظرا لكون الميثيل بارابين من أكثر المواد الحافظة استخداما في مختلف المنتجات الدوائية، الغذائية والتجميلية ،وهذا يعني أن الإنسان يتعرض له بكثرة ،لذلك يجب أن تكون تراكيزه في هذه المنتجات ضمن الحدود الدنيا للتقليل من أخطاره التي تتمثل بكونه مرتبط باضطراب الهرمونات، و بسرطان الثدي عند النساء [11] ، بالإضافة إلى تأثيره على جهاز التكاثر الذكري كما أنه يسبب حساسية جلدية وعينية. لذلك كان من الضروري تقصي وجود الميثيل بارابين باستخدام طرائق أقل كلفة، و قد أوضحت بعض الدراسات السابقة إمكانية الحصول على مركبات الآزو باستخدام تفاعلات التزاوج بين أملاح الديازونيوم المحضرة من الامينات العطرية و المركبات الحاوية على مجموعات منشطة مانحة للالكترونات، وذلك في خطوة واحدة في وسط قلوي من هيدروكسيد البوتاسيوم و دي ميتيل فورماميد[12] .

أهمية البحث وأهدافه

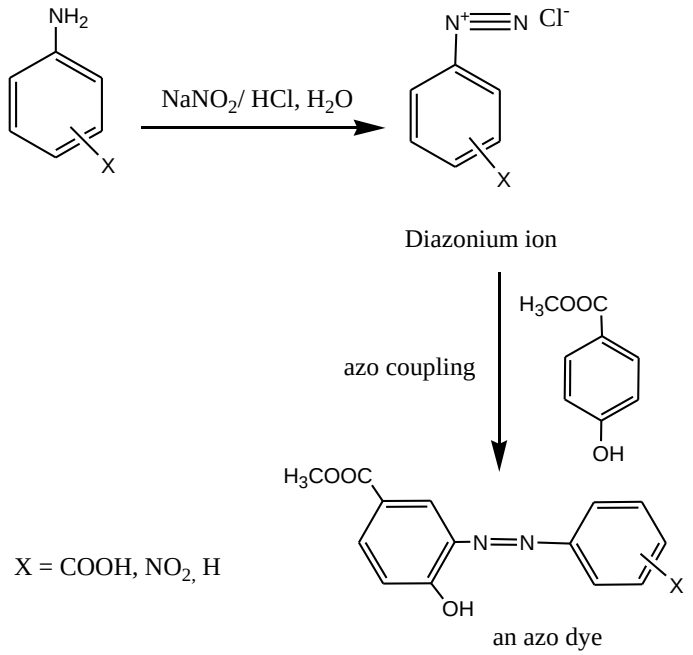
يهدف البحث إلى إيجاد طريقة سهلة و غير مكلفة للكشف عن الميثيل بارابين، و ذلك عن طريق اصطناع مركبات الآزو بإجراء تفاعلات التزاوج بين الميثيل بارابين و أمينات عطرية مختلفة [13] ، و من ثم التأكد من بنية مركبات الآزو المتشكلة باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء.

هذا و قد اتسمت الطرائق المستخدمة في الكشف عن الميثيل بارابين بأنها طرائق مكلفة، و تحتاج مواد غالية الثمن. من هنا برزت أهمية البحث في ضرورة إيجاد طريقة بسيطة، و غير مكلفة لاستخدامها في الكشف عن الميثيل بارابين من خلال الحصول على مركبات الآزو المختلفة باستخدام أمينات عطرية متوافرة، و اقتصادية كالأنيلين و حمض بارا أمينو البنزوئيك ...

طرائق البحث و مواده

تم إجراء البحث في مخابر كلية الصيدلة جامعة تشرين، ففي المرحلة الأولى تم الحصول على أملاح الديازونيوم بتفاعل الديئزة لعدد من الأمينات العطرية المختلفة. أما المرحلة الثانية فقد تم اصطناع مركبات الآزو الملونة من خلال تفاعلات التزاوج بين أملاح الديازونيوم و الميثيل بارابين ، للحصول على مركبات الآزو الملونة. تم تحديد هوية مركبات الآزو المتشكلة باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء.

يوضح الشكل (2) مخططا لتفاعلات اصطناع مركبات الآزو و التي تم الحصول عليها .



الشكل (2)تفاعلات الديئزة والتزاوج المستخدمة في تشكيل مركبات الآزو

1- تفاعلات الديئزة باستخدام ملح الديازونيوم المتشكل من 4- نترو الأنيلين

1-1 **تحضير ملح الديازونيوم** يضاف 1.5 مل من حمض كلور الماء المركز HCl الى 1.5 مل من الماء المقطر، في أنبوب اختبار مقاس 0.5 × 4. ثم وضع أنبوب الاختبار في حمام ثلجي.

يوضع 0.7 غرام(5 mmol) من 4- نترو أنيلين ، 0.38 غرام (5.5 mmol) من نتريت الصوديوم $NaNO_2$، و 1.5 مل من الماء، في أنبوب اختبار آخر بنفس الحجم ويحرك المزيج بشكل جيد. يضاف المعلق الناتج إلى محلول HCl عند درجة الحرارة 0 C° باستخدام الماصة. مع تحريك خليط التفاعل أثناء الإضافة بقضيب زجاجي من حين لآخر لمدة حوالي 10 دقائق. يرشح محلول ملح الديازونيوم الناتج باستخدام قمع زجاج للتخلص من البقايا الصلبة. و يحتفظ بالرشاحة الناتجة – محلول ملح الديازونيوم- في انبوب اختبار.

2-1 **تفاعل التزاوج** يذاب (5.1 mmol) من الميثيل بارابين في 10 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم M 2.5 في أرلينة Erlenmeyer سعة 25 ml و توضع في حمام ثلجي. ثم يضاف رشاحة الديازونيوم من الخطوة السابقة إلى الأرلينة قطرة فقطرة مع التحريك المستمر.

تركت الأرلينة في حمام ثلجي لمدة 10 دقائق، وتم تسجيل التغير الحاصل في اللون. يضاف بعد ذلك حوالي1.5 ml من حمض كلور الماء المركز ببطء إلى الخليط، حتى تصبح درجة الحموضة PH بين 3 و 4.

يضاف غرام واحد من ملح الطعام NaCl مع تسخين الأرلينة على السخان الكهربائي حتى يغلي. ثم يبرد الخليط حتى درجة حرارة الغرفة ومن ثم التبريد في حمام الماء الثلجي. يرشح بعد ذلك الخليط تحت الفراغ باستخدام قمع بوخنر. تغسل المادة الصلبة مع 2-5 مل من الماء، و تجفف باستخدام المجففة.

2- تفاعلات الديئزة باستخدام ملح الديازونيوم المتشكل من بارا أمينو حمض البنزوئيك

2-1 **تحضير ملح الديازونيوم** يضاف 0.6 غرام(5mmol) من بارا أمينو حمض البنزوئيك ،و 0.19 غرام من بيكربونات الصوديوم $NaHCO_3$، الى 5 مل من الماء في أنبوب اختبار مقاس 0.5 × 4 ، يخلط المزيج جيدًا و وضع في حمام مائي دافئ ، و بعد إتمام عملية الحل يضاف 0.38 غ من نتريت الصوديوم في 7 مل ماء. يوضع 1.5 مل من حمض كلور الماء المركز HCl و 6 غ من الثلج في أنبوب اختبار آخر بنفس الحجم. يضاف المعلق في انبوب الاختبار الأول إلى محلول HCl في الأنبوب الثاني عند درجة الحرارة 0 C° باستخدام الماصة. مع تحريك مزيج التفاعل أثناء الإضافة بقضيب زجاجي من حين لآخر لمدة حوالي 10 دقائق. يرشح محلول ملح الديازونيوم الناتج باستخدام قمع زجاج للتخلص من البقايا الصلبة. و يحتفظ بالرشاحة الناتجة – محلول ملح الديازونيوم- في انبوب اختبار.

2-2 **تفاعل التزاوج** يذاب 0.7 غ (5.1 mmol) من الميثيل بارابين في 10 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH2.5 M في أرلينة سعة25 ml ، و توضع في حمام ثلجي. يضاف بعد ذلك رشاحة الديازونيوم من الخطوة السابقة إلى الأرلينة قطرة فقطرة مع التحريك المستمر.

تركت الأرلينة في حمام ثلجي لمدة 10 دقائق، وتم تسجيل اللون الناتج. اضيف بعد ذلك حوالي 1.5 mlمن حمض كلور الماء المركز ببطء إلى الخليط.

يضاق غرام واحد من ملح الطعام NaCl مع تسخين الأرلينة على حمام مائي. يبرد الخليط حتى درجة حرارة الغرفة ثم يبرد في حمام الماء الثلجي. تم بعد ذلك ترشيح الخليط تحت الفراغ باستخدام قمع بوخنر، ثم تم غسل المادة الصلبة باستخدام 2-5 مل من محلول مشبع من كلوريد الصوديوم. تم تجفيف الناتج باستخدام المجففة.

3- تفاعلات الديئزة باستخدام ملح الديازونيوم المتشكل من الأنيلين

3-1 **تحضير ملح الديازونيوم** تم إضافة 1.5 مل من حمض الكبريت المركز H_2SO_4 الى 1.5 مل من الماء المقطر، في أنبوب اختبار مقاس 0.5 × 4. ثم وضعنا أنبوب الاختبار في حمام ثلجي. في أنبوب اختبار آخر

بنفس الحجم ، تم إضافة 0.5 غرام(5 mmol) من الأنيلين الى 0.38 غرام (5.5 mmol) من نتريت الصوديوم $NaNO_2$، و 1.5 مل من الماء وتم خلط المحتوى جيدًا. أضيف المعلق إلى محلول حمض الكبريت عند درجة الحرارة 0 C° باستخدام الماصة. مع تحريك خليط التفاعل أثناء الإضافة بقضيب زجاجي من حين لآخر لمدة حوالي 10 دقائق. بعدها تم إزالة كل الجسيمات الصلبة عن طريق الترشيح البسيط باستخدام قمع زجاج صغير و ورقة ترشيح . جمع ناتج الترشيح في أنبوب اختبار آخر.

3-2 **تفاعل التزاوج** تم إضافة (5.1 mmol) من الميثيل بارابين في 10 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم 2.5M في أرلينة سعة 25 ml وتم وضعها في حمام ثلجي. ثم تم إضافة محلول ملح الديازونيوم من الخطوة السابقة قطرة فقطرة مع التحريك المستمر.

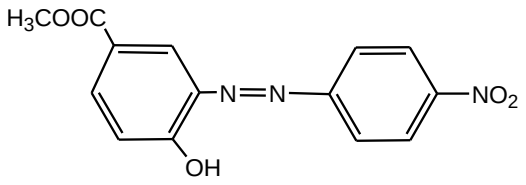
تترك الأرلينة في حمام ثلجي لمدة 10 دقائق وتسجل التغيرات التي تطرأ في اللون. تم بعد ذلك إضافة حوالي 1.5 mlمن حمض كلور الماء المركز ببطء إلى الخليط . تم إضافة غرام واحد من ملح الطعام NaCl مع تسخين الأرلينة على سخان كهربائي حتى يغلي. يبرد الخليط حتى درجة حرارة الغرفة ومن ثم التبريد في حمام الماء الثلجي. يرشح المحلول تحت الفراغ باستخدام قمع بوخنر. و تغسل المادة الصلبة باستخدام 2-5 مل من الماء و تجفف باستخدام المجففة.

4- تحديد هوية المركبات المحضرة باستخدام جهاز الأشعة تحت الحمراء

تم تسجيل الأطياف باستخدام جهاز الأشعة تحت الحمراء SPECTRUM ONE، حيث حضرت اقراص من المادة مع بروم البوتاسيوم بطحن 3 ملغ من مركب الآزو الناتج مع 5 غ من بروم البوتاسيوم في هاون عميق، و من ثم حضر قرص شفاف بواسطة المكبس، و تم تسجيل IR للمركب الناتج.

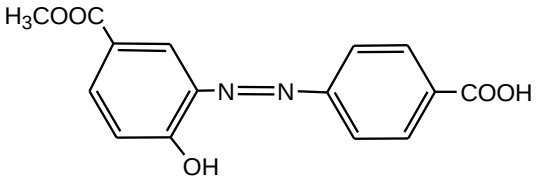
النتائج و المناقشة

سمحت التفاعلات التي أجريت بالحصول على ثلاثة مركبات آزو مختلفة بناها الكيميائية موضحة في الشكل (3).



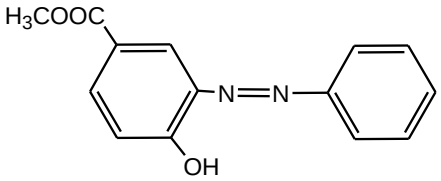
I

أصفر برتقالي



II

برتقالي

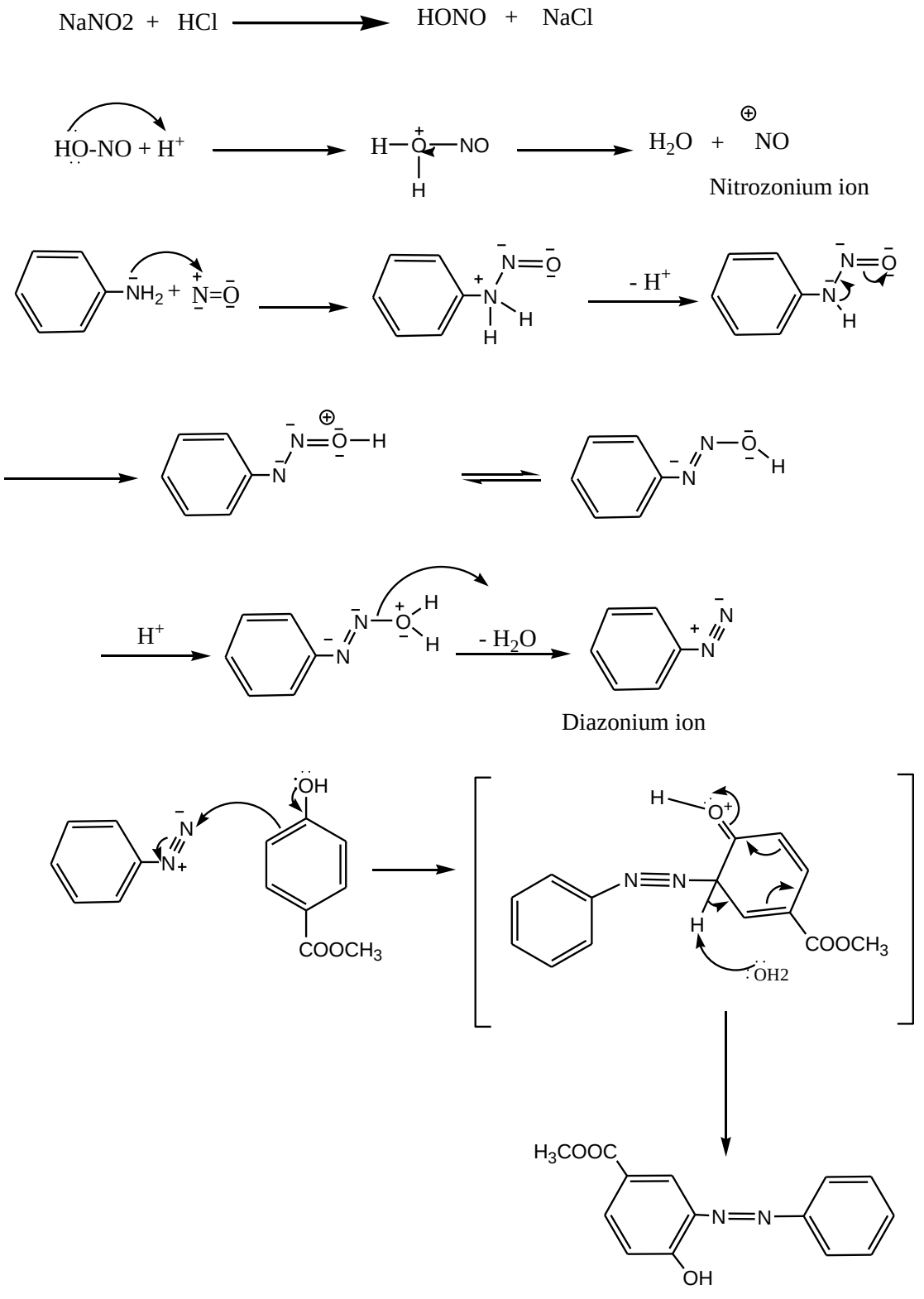


III

أحمر برتقالي

الشكل (3) مركبات الآزو المحضرة

يوضح الشكل (4) آلية تشكل مركبات الآزو، كما يوضح الالية التي يتم فيها تفاعل الديئزة و الحصول على أملاح الديازونيوم.



III

الشكل (4) آلية تشكل مركبات الآزو

1-دراسة تأثير نوع القلوي المستخدم : بما أن مركبات الآزو تم تشكيلها في وسط قلوي. لذلك، تمت دراسة تأثيرات المحاليل القلوية المختلفة مثل هيدروكسيد البوتاسيوم، و هيدروكسيد الصوديوم، و كربونات الصوديوم،

وهيدروكسيد الأمونيوم حيث تم اجراء تفاعلات التزاوج باستخدام القلويات المذكورة انفا من ثم تم حساب المردود. لقد وجد أن هيدروكسيد الصوديوم هو الوسط القلوي الأكثر ملاءمة لإعطاء أفضل مردود. لذلك تم استخدامه في جميع التجارب اللاحقة. يفسر ذلك بان تفاعل التزاوج يتم في وسط قلوي لأنه يسبب تنشيط النواة الفينولية حيث أنه يؤدي الى تشكل شرسبة الفينوكسيد و التي تنشط الحلقة تجاه تفاعلات الاستبدال الالكتروفيلية العطرية حيث تملك (I^+, R^+) بالتالي تكون أكثر فعالية من المجموعة الفينولية $OH(I^-, R^+)$.

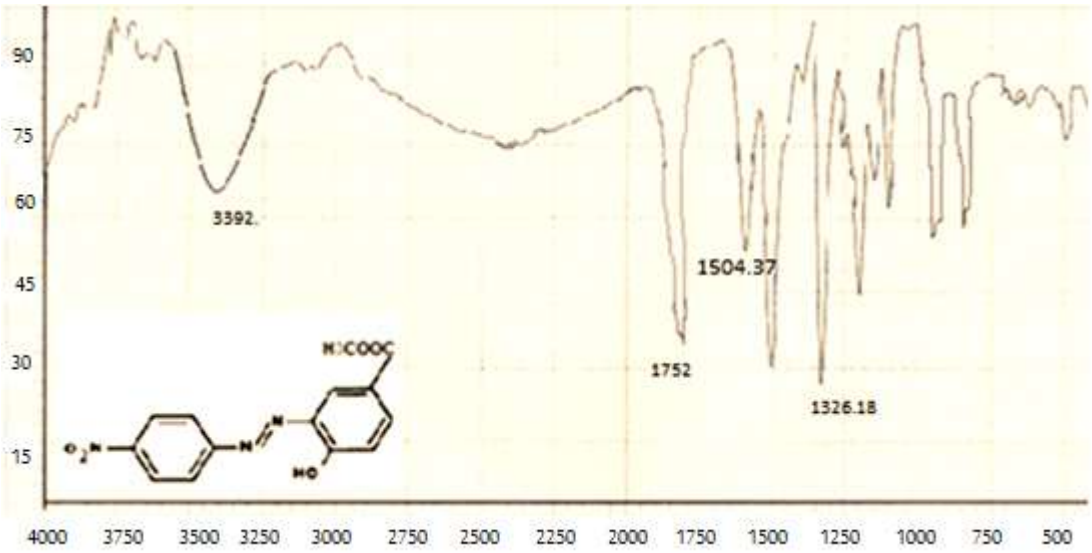
2–دراسة ألوان المركبات الناتجة : كانت ألوان هذه المركبات متقاربة كما هو موضح في الشكل (3)

3–دراسة المطيافية باستخدام جهاز الأشعة تحت الحمراء: تم تسجيل طيوف الأشعة تحت الحمراء IR للمركبات الناتجة.

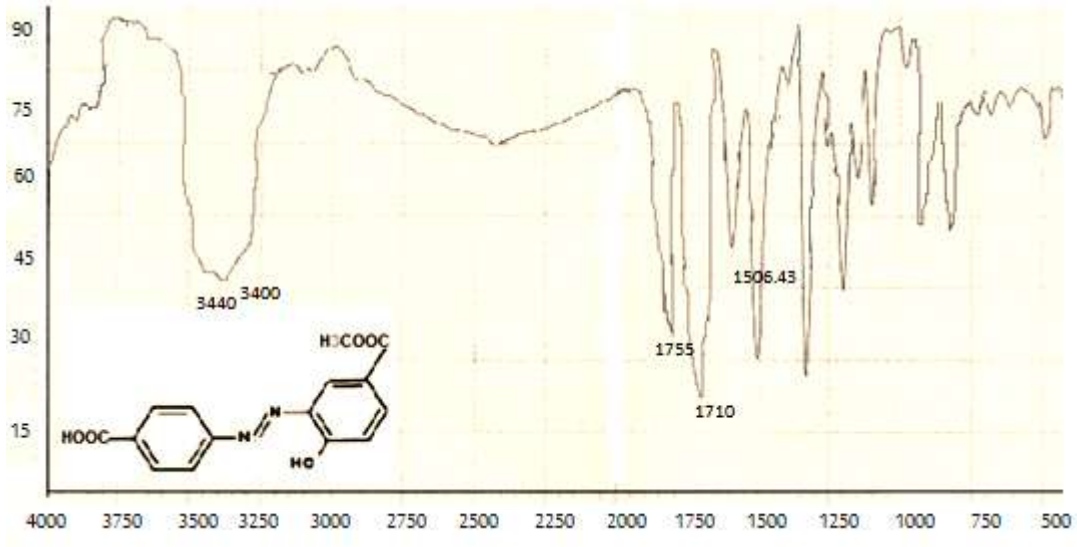
يظهر في طيوف الأشعة تحت الحمراء وجود عصابات مميزة للمجموعات الوظيفية في المركبات المدروسة، حيث تشير عصابة الامتصاص الممتدة في المجال 1504.37–1512.35 سم$^{-1}$ على الرابطة (N=N) من مجموعة الآزو. و تشير العصابة في المجال 3392– 3440 سم$^{-1}$ على مجموعة الهيدروكسيل الفينولية . يظهر طيف IR للمركب I وجود عصابتين في المجال 1326.18- 1540 سم$^{-1}$، و التي تميز مجموعة النترو، أما في طيف المركب II فيظهر وجود عصابتين إحداهما عند 3400 سم$^{-1}$ تميزالمجموعة O-H للمجموعة الكربوكسيلية، و عصابة عند 1710 سم$^{-1}$ تميز مجموعة الكربونيل C=O في المجموعة الكربوكسيلية . يبين الجدول (1) عصابات الامتصاص الرئيسية المميزة للمجموعات الوظيفية في المركبات الناتجة I, II, III.

الجدول (1) العصابات الرئيسية للامتصاص في جهاز الأشعة تحت الحمراء

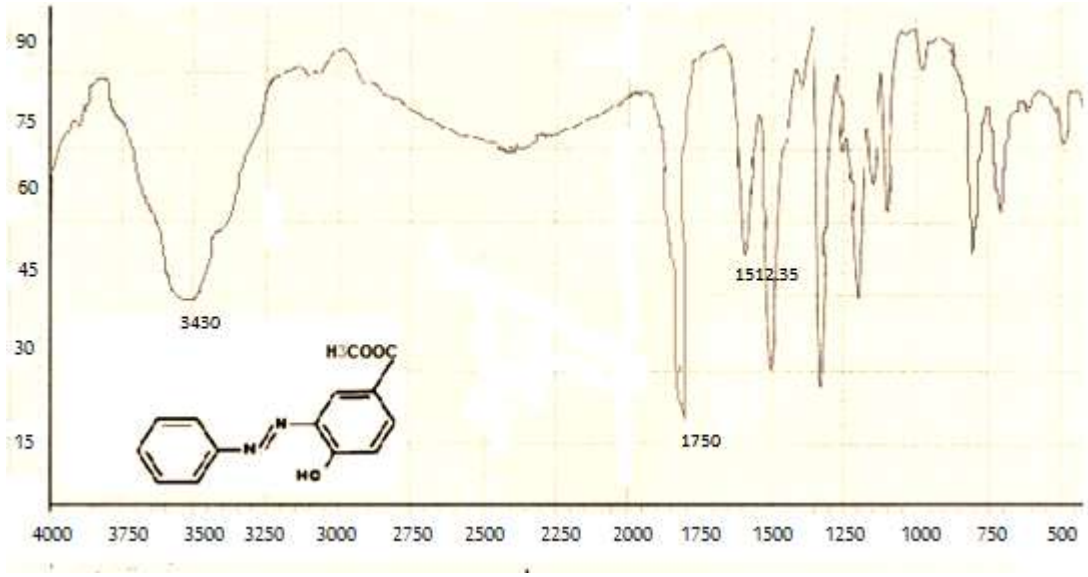
المركب	$\nu_{N=N}$	ν_{NO2}	ν_{O-H}	$\nu_{C=Oester}$	ν_{COOH}
I	1504.37	1326.18	3392	1752	-
II	1506.43	-	3440	1755	3400, 1710
III	1512.35	-	3430	1750	-



الشكل (5) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب I

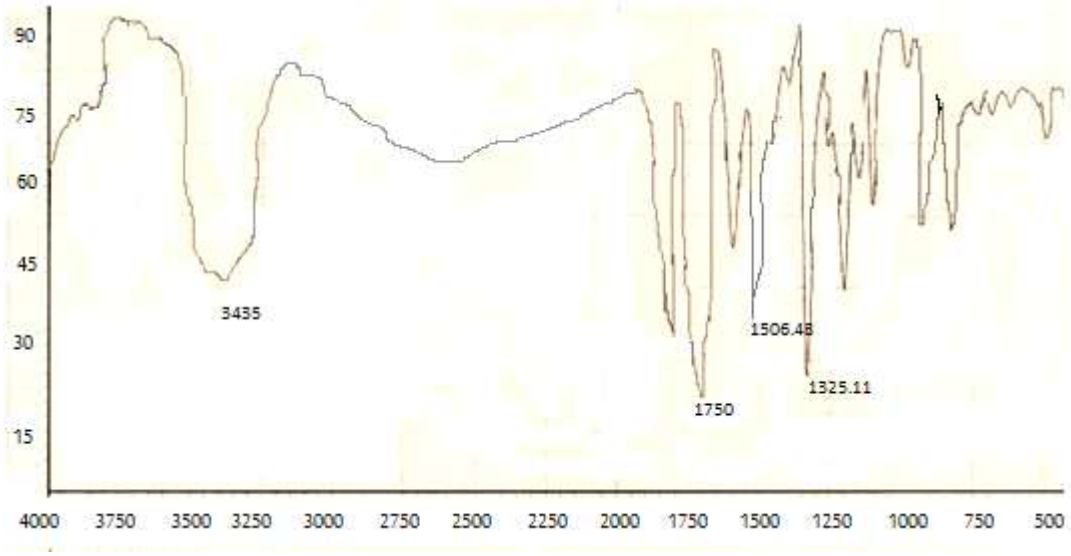


الشكل (6) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب II



الشكل (7) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب III

تم تطبيق الطريقة المقترحة للكشف عن الميثيل بارابين على بعض مستحضرات التجميل كبلسم الشعر على سبيل المثال حيث أخذت عينة و تم اجراء تفاعل التزاوج بين عينة مأخوذة من بلسم الشعر مع ملح الديازونيوم المتشكل من تفاعل بارا أمينو حمض البنزوئيك و نتريت الصوديوم في وسط من حمض كلور الماء. تم الحصول على مركب الآزو الملون باللون البرتقالي و يوضح الشكل (8) طيف الأشعة تحت الحمراء الذي تم تسجيله للمركب III و عند تحديد هوية المركب باستخدام جهاز الأشعة تحت الحمراء تم الكشف عن العصابات الدالة على وجود مجموعة الآزو و هي 1506.48 سم$^{-1}$ أما العصابة 3435 سم$^{-1}$ فهي تدل على وجود مجموعة الفينول و العصابة 1325.11 سم$^{-1}$ تدل على مجموعة النترو كذلك تدل العصابة 1750 سم$^{-1}$ على الاستر.



الشكل (8) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب III

الاستنتاجات والتوصيات

إن الطريقة المقترحة للكشف عن الميثيل بارابين هي طريقة بسيطة كيفية حساسة و اقتصادية، وأبدت فعالية كبيرة في الكشف عن الميثيل بارابين. حيث أثبتت النتائج التي تم التوصل إليها أن مركبات الآزو التي تم تحضيرها باستخدام تفاعلات التزاوج بين الميثيل بارابين، و الأمينات العطرية المختلفة سمحت بالكشف عن الميثيل بارابين.و قد تم تحديد هوية المركبات باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء حيث ميزت العصابة (N=N) وجود مركبات الآزو.

المراجع

[1] GIORDANO, F., BETTINI, R., DONINI, C., GAZZANIGA, A., CAIRA, R., ZHANG,G., *Physicalproperties of parabens and their mixtures: Solubility in water, thermal behavior, and crystal structures*. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 88, N° .11. 1999. 1210-1216.

[2] ANDERSEN, D., LARSEN, P., *Survey of parabens*. The Danish Environmental Protection Agency, Denemark, 2013, 58.

[3] GANNES, M.G., *The health controversies of parabens Kirchhof*, Skin Therapy Letter,Vol. 18, N°.2, 2013, 5-7.

[4] GENUIS. J., D.,CURTIS,L., SANDAU,C., *Paraben Levels in an Urban Community of Western Canada*. ISRN.Toxicology, ID 507897, 2013. 8.

[5] KAMBLE, R. M., SINGH, S. G.,Singh, S., *Simultaneous determination of preservatives (methyl paraben and propyl paraben) in sucralfate suspension using high performance liquid chromatography*. E-Journal of Chemistry, Vol.8, N°.1, 2013, 40-346.

[6] SHNMUGAN, G., RAJENDRAN, B., RALHAKRISHNAN, V.,*GC-MS method for the determination of parabenpreservatives in the human breast cancerous tissue*, Michrochemical Journal,Vol. 96, N°.2,2010, 391-396.

[7] MINCEA, M., IOANA, R., CINGHIŢĂ, F., RADOVAN,C.,TALPOS, I., OSTAFE,V.,*Determination of methylparaben from cosmetic products by ultra performance liquid chromatography*. Journal of Serbian Chemical Society, Vol.*74* ,N°.6 ,2009,669–676.

[8] DHAHIR, S.,HUSSEIN, H.. *Spectrophotometric Determination of Methyl Paraben in Pure and Pharmaceutical Oral Solution*, Advances in Natural Science, Vol. 6, N°. 4, 2013, 69.

[9] AHMED, A., KHAZAA, A., AHMED, A., *Spectrophotometric Determination of Methyl Paraben in Pharmaceutical Formulations by Oxidative Coupling Reaction*, Journal of Pure Science ,Vol. 21, N°. 6 , 2016, 85-89.

[10] ESTEKI ,M., NOUROOZI,S., SHAHSAVARI, Z., *A fast and direct spectrophotometric method for the simultaneous determination of methyl paraben and hydroquinone in cosmetic products using successive projections algorithm*. International Journal of Cosmetic Science, Vol. 38, N°. 1, 2016, 25-34.

[11] DARBRE, D., ALJARRAH, A., MILLER, R., COLDHAM, G., SAUER, J., *Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours*, Journal of Applied Toxicol, Vol.24, N°. 1, 2004, 5-13.

[12] ZHAO, R., CHUNYAN, T., *One step synthesis of azo compounds from nitroaromatics and anilines*, Tetrahedron Letters, Vol. 52, N°.29, 2011, 3805-3809.

[13] GUNG, B., TAYLOR, R., *Parallel Combinatorial Synthesis of Azo Dye*. Journal of Chemical Education, Vol. 81, N°.11, 2004, 1630-1638.