



EXAMINATION OF SINDOOR (VERMILLION) STAINS ON WHITE COTTON FABRIC USING THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Rajinder Singh CHANDEL, Tejasvi BHATIA, Priyanka JINDAL

Department of Forensic Science, Punjabi University, Patiala, India

Abstract

The usefulness of thin layer chromatographic analysis in the differentiation of samples of fifteen different brands of sindoor (vermillion) was evaluated. The power of various solvent systems to separate the constituents of selected sindoor samples was studied. Twenty solvent systems were examined from which a solvent system comprising butanol:propanol:water in the ratio 60:30:10 (v/v/v) was found to be the best, as it showed a high degree of separation of the constituents. It was also found that the best visualizing method for studying TLC chromatograms of sindoor samples is the iodine fuming technique.

Key words

Sindoor stains; Thin layer chromatography; Separation.

Received 15 November 2012; accepted 14 May 2013

1. Introduction

Cosmetic products are found as trace evidence in various types of criminal cases, particularly ones related to physical and sexual assault. Smeared traces of this evidence get transferred from a female victim to an assailant either onto the body or clothing according to Locard's principle of exchange. If these stains are collected, preserved and analyzed properly, they can provide a significant link between the suspect, the victim and the crime scene. Various cosmetic products available on the market include: sindoor, lipsticks, kajal, nail polish, mascara etc.

Sindoor (vermillion) stains/smears are among the most frequently encountered cosmetic product trace evidence due to sindoor's easy availability and routine use by Hindu women. It is applied by married women at the parting of the hair as a traditional symbol of prosperity. It is available in different shades like orange, red, dark red, maroon, etc. Thus, it can serve as important corroborative evidence in linking a suspect with the female victim in sexual assault cases like rape etc. Traditionally, sindoor consists of a common base

(turmeric powder), which becomes red when mixed with lime juice or lime powder (calcium compound); this is moistened in water, or with alum, iodine and camphor, or with oil and sea shell powder (calcium salts), or else aguru, chandan and kasturi are added. However, nowadays, the composition of sindoor includes synthetic dyes, filler materials, lime and salts of lead and mercury to impart the red colour [4]. All these constituents can help when drawing forensic inferences.

A variety of sophisticated chromatographic and instrumental techniques are available for the analysis of cosmetic products, like thin layer chromatography [1, 2, 3, 10], high-performance liquid chromatography (HPLC) [6, 7, 8, 11], gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) [5, 9], but such a method should be adopted for their analysis which requires a minimum amount of sample and also there should be minimum damage to the exhibit during analysis. Chromatography has played a significant role in the analysis of sindoor and scientists have successfully applied thin layer chromatography (TLC) to the examination of some common liquid sindoor

[10]. Thin layer chromatography is a versatile analytical chromatographic technique that can be used in forensic cases for the analysis and comparison of sindoor samples. Sharma et al. [10] analysed 36 samples of commonly used liquid vermilion of different colours produced by different manufacturers using TLC [2]. Thus, very little work has been done on the analysis/examination of sindoor stains with TLC. Hence it was pertinent to analyze some common sindoor produced by different manufacturers by TLC. So, in the present study an attempt was made to use TLC to analyze sindoor stains present on white cotton fabric caused by 15 different brands of sindoor (conventional and shimmering sindoor, including the latest brands) available on local markets.

2. Materials and method

Five samples each of fifteen different brands of powdered sindoor were procured from cosmetic shops in the Patiala and Karnal districts of Punjab and Haryana states respectively in North-Western India. Details regarding their brand names, respective manufacturers, colour and number of samples studied have been given in Table I.

TABLE I. LIST OF VARIOUS SINDOOR SAMPLES SELECTED FOR THE PRESENT STUDY

Sample no.	Brand manufacturer	Colour	Number of samples studied (n)
1	Shree Shyam Enterprises	Maroon	5
2	Kajal Shilpa Cosmetics (India) Varanasi	Maroon	5
3	Gopal cosmetics, Khushi Jugsalai, Jamshedpur	Red	5
4	Tulsi Cosmetics	Red	5
5	Navkar Roopshri Pvt. Ltd.	Red	5
6	Personi Himanshu Cosmetics	Maroon	5
7	Aakarshan M. S. Enterprises	Red	5
8	Blue Heaven Shingar	Red	5
9	Suhaag Cosmetics, Jaipur	Maroon	5
10	Blue Heaven Shingar, Saheli	Maroon	5
11	N. K. Sales Corporation	Red	5
12	Jalani Products	Red	5
13	Geeta International, Sub Jail Link Road, Surat	Maroon	5
14	Sharad Export, Mathura	Red	5
15	Blue Heaven, Shingar	Red	5

Five stains of each selected brand were prepared by applying 1 mg/cm² of respective sindoor samples on washed white cotton cloth pieces. The stained cotton cloth pieces were serially marked and stored in a separate paper envelope to prevent cross contamination. The stained part of the cloth sample was cut and placed in a test tube. An aliquot of 1 ml of methanol was added to the test tube and subjected to extraction for 5 min. The methanol extract was transferred to another clean test tube for TLC analysis.

Nineteen solvent systems (mobile phase) were tried on each examined sindoor brand to find out the most suitable solvent system that could be applied universally for thin layer chromatographic separation of all sindoor brands (Table II). The various chemicals used in the analysis and their respective manufacturers have been listed in Table III.

TABLE II. VARIOUS SOLVENT SYSTEMS TRIED FOR TLC ANALYSIS. SATURATION TIME IS 60 min

Solvent system no.	Composition (v/v/v)	Development time	Temperature
1	Chloroform:methanol: water (60:20:20)	50 min	34°C
2	Butanol:acetic acid:water (70:10:20)	30 min	34°C
3	Water:acetonitrile (80:20)	60 min	38°C
4	Toluene:acetone(95:5)	60 min	32°C
5	Methanol:water (80:20)	60 min	34°C
6	Ethanol:butanol:water: acetic acid (20:50:10:20)	50 min	32.5°C
7	Methanol:ethylacetate: acetic acid (30:30:40)	60 min	32°C
8	Ethyl acetate:methanol: water (50:30:20)	80 min	38°C
9	Benzene:chloroform: acetic acid (80:15:5)	50 min	34°C
10	Chloroform:benzene (20:80)	40 min	38°C
11	Toluene:chloroform: methanol (70:20:10)	50 min	32°C
12	Chlorobenzene (100)	60 min	34°C
13	Chloroform: methanol (90:10)	50 min	38°C
14	Ethylacetate:acetic acid (60:40)	50 min	34°C
15	Benzene:chloroform: methanol (50:40:10)	80 min	38°C
16	Benzene:methanol:acetic acid (80:15:5)	1 h 25 min	32°C
17	Butanol:propanol: water(80:15:5)	1 h 30min	34°C
18	Butanol:propanol:water (60:30:10)	1 h 30 min	34°C
19	Butanol:benzene:water (50:40:10)	1 h 30 min	34°C

TABLE III. LIST OF VARIOUS CHEMICALS USED IN THE ANALYSIS

No.	Chemicals	Manufacturer
1	Acetic acid	E. Merck Ltd., Worli Mumbai 18
2	Acetone	LOBA CHEMIE Pvt. Ltd., Mumbai 05
3	Acetonitrile	Merck specialist Pvt. Ltd., Shiv Sagar Estate "A", Dr. Annie Besant Road, Worli Mumbai 18
4	Benzene	Merck specialist Pvt. Ltd., Shiv Sagar Estate "A", Dr. Annie Besant Road, Worli Mumbai 18
5	Butanol	Qualigens fine chemicals, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals Ltd., Dr. Annie Besant Road, Mumbai 30
6	Chloroform	Merck specialist Pvt. Ltd., Shiv Sagar Estate "A", Dr. Annie Besant Road, Worli Mumbai 18
7	Chlorobenzene	Qualigens fine chemicals, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals Ltd., Dr. Annie Besant Road, Mumbai 30
8	Diethyl ether	Merck specialist Pvt. Ltd., Shiv Sagar Estate "A", Dr. Annie Besant Road, Worli Mumbai 18
9	Ethanol	Bengal Chemicals and Pharmaceuticals, Maniktala Road 164, Kolkata 54
10	Ethyl acetate	E. Merck Ltd., Worli Mumbai 18
11	Methanol	Merck specialist Pvt. Ltd., Shiv Sagar Estate "A", Dr. Annie Besant Road, Worli Mumbai 18
12	Propanol	Merck specialist Pvt. Ltd., Shiv Sagar Estate "A", Dr. Annie Besant Road, Worli Mumbai 18
13	Toluene	Merck specialist Pvt. Ltd., Shiv Sagar Estate "A", Dr. Annie Besant Road, Worli Mumbai 18
14	Silica gel G	Qualigens India, Dr. Annie Beasant Road, Mumbai 25

The TLC plates were prepared manually, using Silica Gel G having a thickness of 0.25 mm, followed by their activation for an hour at a temperature of 110°C in an oven. Aliquots of respective samples were then applied on activated plates using a Hamilton syringe (2 µl). The spots were allowed to air dry at room temperature for 2 min. A solvent chamber was saturated using various solvent systems. The spotted TLC plates were placed in this saturated solvent chamber at an angle of 45° and the chamber was covered properly with a lid. The solvent front was allowed to migrate to a distance of 10 cm above the origin. After the run had been completed, the developed plates were taken out and dried at room temperature. The separated colour spots of the samples were visualized in strong day light and with the iodine fuming method, and their respective *hRf* values were calculated using the following equation:

$$hRf = \frac{\text{Distance travelled by solute from origin}}{\text{Distance travelled by solvent from origin}} \times 100.$$

3. Results and discussion

In the present study, nineteen solvent systems (Table III) were tried out for the separation of various constituents of selected sindoor samples. The developed thin layer chromatographic plates were examined in strong day light and using the iodine fuming technique. The results obtained in terms of *hRf*, number of spots and respective colour by the TLC analysis of selected sindoor stains were found to be different for different solvent systems.

Solvent systems 2, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 and 19 failed to separate the constituents of the selected sindoor samples as they gave no spots. Solvent systems 1, 3, 4, 5, 8, and 9 gave an insufficient number of spots (one or two spots for each sample) for different samples when viewed under strong day light and using iodine fuming. Solvent system 16 produced four spots of purple, red, pink and orange colour at *hRf* values 52, 61, 69 and 94 for sindoor brand 1; four spots of pink, purple, red and pink at *hRf* 19, 68, 79 and 96 for brand 2; two spots of pink and red colour at *hRf* 72 and 80 for brand 3; two spots of red colour at *hRf* 72 and 74 for brand 4; and one spot of pink at *hRf* 62 for brand 5, under strong day light. The analysis with the above solvent systems did not produce any separation of analytical significance.

Solvent system 18, comprising butanol:propanol:water in the ratio of 60:30:10 (v/v/v), was found to be the most suitable solvent system for thin layer chromatographic analysis of the studied sindoor samples as it gave best results in terms of their separation and differentiation. Comparative analysis of selected sindoor brands was performed by visualizing the respective TLC developed plates under strong day light and after treating with iodine fuming. The results obtained under strong day light are given in Figure 1 and Table IV. Samples 1, 4, 10 and 11 gave four separated spots at different or same *hRf* values and colours.

Sample 2 also gave four separated spots, of which one spot of yellow colour at *hRf* 77 was characteristic. Samples 3, 6, 12, 13 and 15 gave three separated spots of the same or different colours at characteristic *hRf* values. Five separated spots were observed for sample 5, of which two spots at *hRf* 62 (purple coloured) and *hRf* 77 (orange coloured) were characteristic. Sample 7 showed only one purple coloured spot at characteristic *hRf* value 77. Sample 8 also showed five separated spots, but at characteristic *hRf* values and colours. Sample 9 showed 6 different coloured spots, of which two pink and one yellow coloured spot at *hRf* 45, 62 and 72 respectively were characteristic. Sample 14 showed only two separated spots, one pink coloured

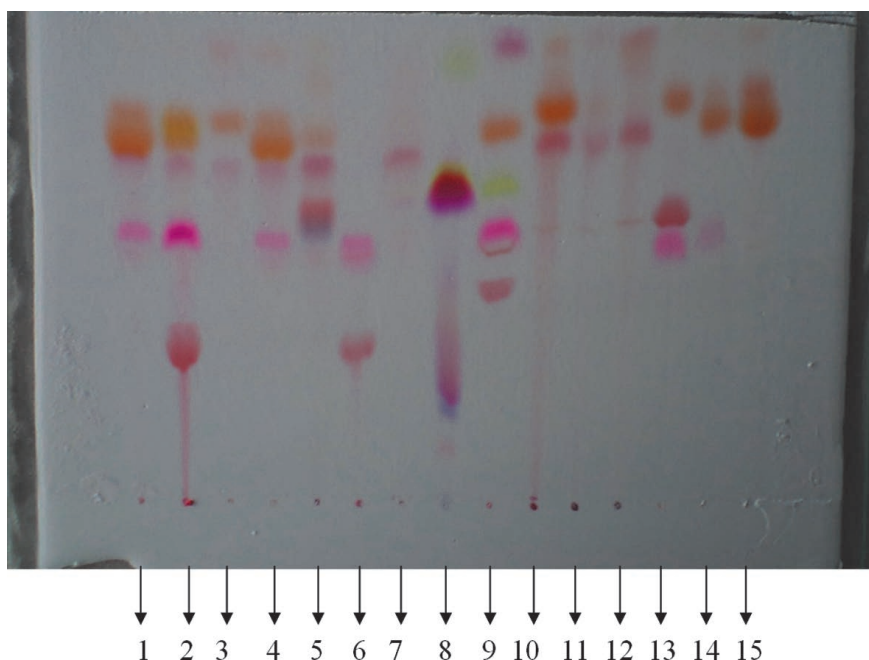


Fig. 1. TLC Plate of selected sindoor stains developed by using solvent system butanol:propanol:water 60:30:10 (v/v/v) under strong day light (1 – Shree Shyam Enterprises; 2 – Kajal Shilpa Cosmetics Varanasi; 3 – Gopal Cosmetics; Khushi Jugsalai Jamshedpur; 4 – Tulsi Cosmetics; 5 – Navkar Roop Shri Pvt. Ltd; 6 – Personi Himanshu Cosmetics; 7 – Aakarshan M. S. Enterprises; 8 – Blue Heaven Shingar; 9 – Suhaag Cosmetics, Jaipur; 10 – Blue Heaven Shingar Saheli; 11 – N. K. Sales Corporation; 12 – Jalani Products; 13 – Geeta International, Sub Jail Link Road, Surat; 14 – Sharad Export, Mathura; 15 – Blue Heaven Shingar).

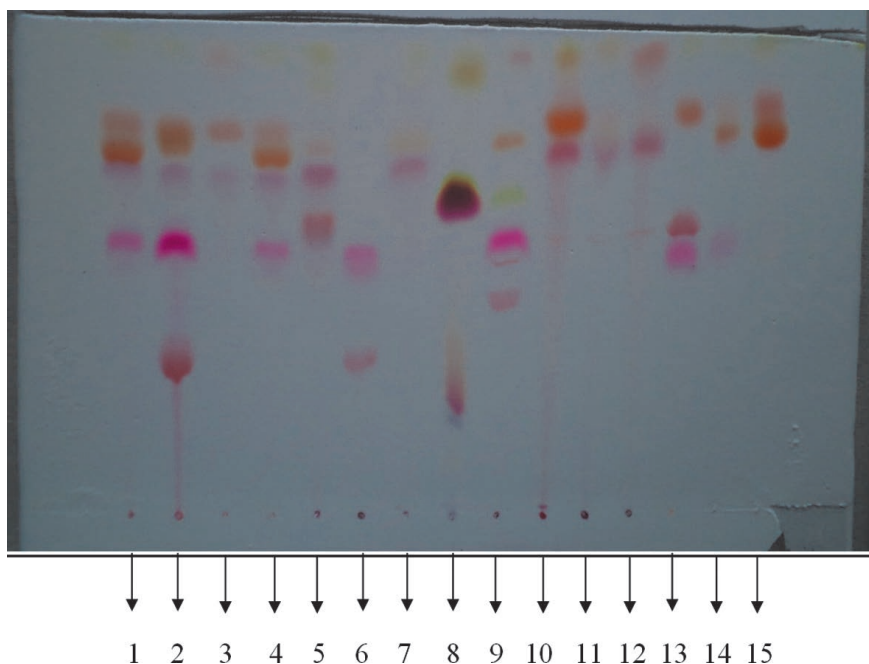


Fig. 2. TLC plate of selected sindoor stains developed by using solvent system butanol:propanol: water 60:30:10 (v/v/v) when visualized with iodine fuming (1 – Shree Shyam Enterprises; 2 – Kajal Shilpa Cosmetics Varanasi; 3 – Gopal Cosmetics, Khushi Jugsalai Jamshedpur; 4 – Tulsi Cosmetics; 5 – Navkar Roop Shri Pvt. Ltd; 6 – Personi Himanshu Cosmetics; 7 – Aakarshan M. S. Enterprises; 8 – Blue Heaven Shingar; 9 – Suhaag Cosmetics, Jaipur; 10 – Blue Heaven Shingar Saheli; 11 – N. K. Sales Corporation; 12 – Jalani Products; 13 – Geeta International, Sub Jail Link Road, Surat; 14 – Sharad Export, Mathura; 15 – Blue Heaven Shingar).

TABLE IV. THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SELECTED SINDOOR SAMPLES USING SOLVENT SYSTEM BUTANOL:PROPANOL:WATER (60:30:10 v/v/v) UNDER STRONG DAY LIGHT

Sample no.	Brand	Colour hrf	Purple 14	Pink 16	Maroon 24	Pink 45	Red 58	Pink 60	Red 60	Pink 62	Purple 62	Pink 65	Red 70	Purple 72	Yellow 72	Purple 73	Yellow 73	Orange 74	Purple 74	Orange 74	Pink 76	Orange 77	Yellow 77	Orange 80	Orange 83	Orange 85	Yellow 90	Pink 95	Orange 95
1	Shree Shyam Enterprises							+								+								+					
2	Kajal Shilpa Cosmetics			+				+						+									+						
3	Gopal Cosmetics													+										+					+
4	Tulsi Cosmetics							+						+										+					
5	Navkar Roop Shri Pvt. Ltd									+												+				+			
6	Personi Himanshu Cosmetics			+			+																						
7	Aakarshan M. S. Enterprises																		+										
8	Blue Heaven Shingar		+										+														+		
9	Suhaag Cosmetics, Jaipur					+				+														+					+
10	Blue Heaven Shingar Saheli								+												+				+				+
11	N. K. Sales Corporation								+												+				+				+
12	Jalani Products								+												+								+
13	Geeta International								+																+				+
14	Sharad Export, Mathura									+															+				+
15	Blue Heaven Shingar																								+				+

TABLE V. THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SELECTED SINDOOR SAMPLES USING SOLVENT SYSTEM BUTANOL:PROPANOL:WATER (60:30:10 v/v/v) AFTER TREATING WITH IODINE FUMING

Sample no.	Brand	Colour hrf	Purple 14	Pink 16	Maroon 24	Pink 45	Red 58	Pink 60	Red 60	Pink 62	Purple 62	Pink 65	Red 70	Purple 72	Yellow 72	Purple 73	Yellow 73	Orange 74	Purple 74	Orange 74	Pink 76	Orange 77	Yellow 77	Orange 80	Orange 83	Orange 85	Yellow 90	Pink 95	Orange 95
1	Shree Shyam Enterprises							+								+								+				+	
2	Kajal Shilpa Cosmetics			+				+						+									+					+	
3	Gopal Cosmetics													+										+					+
4	Tulsi Cosmetics							+						+										+					+
5	Navkar Roop Shri Pvt. Ltd																							+				+	
6	Personi Himanshu Cosmetics			+			+																					+	
7	Aakarshan M. S. Enterprises																							+					
8	Blue Heaven Shingar		+										+														+		
9	Suhaag Cosmetics, Jaipur					+				+														+				+	
10	Blue Heaven Shingar Saheli							+													+				+				+
11	N. K. Sales Corporation							+													+				+				+
12	Jalani Products								+												+								+
13	Geeta International								+																+				+
14	Sharad Export, Mathura									+															+				+
15	Blue Heaven, Shingar																								+				+

spot (hRf 62) in common with sample 9 and another orange coloured spot (hRf 83) in common with samples 10, 11, 13 and 15 under strong day light.

The TLC results obtained after treating with iodine fuming are given in Figure 2 and Table V. Samples 1 and 4 showed five spots, out of which four spots were found to be in common at given hRf values (60, 74, 80, 95), and one purple coloured spot was found to be different at hRf value 72 and 73 in samples 4 and 1 respectively. Sample 2 also showed five separated spots, and a yellow coloured spot at hRf 77 was found only in this sample. Samples 3, 6, 12 and 15 gave 3 spots at the same or different hRf values and colours. Samples 5 and 9 showed 6 separated spots, with no spot in common between them, but both showed two characteristic separated spots at hRf value 62 and 77, and 45 and 72 for sample 5 and 9 respectively. Samples 7 and 14 showed two separated spots, with one characteristic pink coloured spot at hRf 74 shown by sample 7. Nine different coloured spots showing a characteristic hRf values pattern were observed in sample 8. Four separated spots were observed for samples 10, 11 and 13. Samples 10 and 11 showed the same chromatographic profile, except at hRf value 95, where sample 10 showed an orange coloured spot and sample 11 showed a pink coloured spot. A pink coloured spot at hRf value 76 was found to be common to samples 10, 11 and 12. An orange coloured spot at hRf 83 was found to be common for samples 10, 11, 13, 14 and 15 after treating with iodine fuming.

The results indicated that the chromatographic profile of each sindoor brand was different under strong day light and after treating the TLC plates with iodine fuming. Thus, all the selected samples could be differentiated from each other using the above solvent system. The iodine fuming method was found to be better in comparison to strong day light, as the former revealed a greater number of spots. Aliquots of sindoor samples were analyzed four times under the same set of experimental conditions to check the reproducibility of results and they were in concordance with each other.

Sharma et al. [10] analysed 36 samples of commonly used liquid vermilion of different colours and produced by different manufacturers and recommended that the solvent system isoamylalcohol:acetone:water:ammonia (50:50:30:4) was best for the separation of constituents of vermilion samples using TLC [10]. In the present study, a new solvent system, i.e. butanol:propanol:water (60:30:10 v/v/v), was found to be the best to analyze sindoor samples of various brands, as each sindoor brand sample got separated into its constituents, showing a variable number of spots having

different hRf values and colour under similar experimental conditions.

4. Conclusion

We consider that it is appropriate to use thin layer chromatography for the preliminary analysis of sindoor samples, as it is the best technique and a reliable one too. The comparative examination of chromatograms of selected sindoor brand samples showed that all samples can be distinguished from each other using solvent system butanol:propanol:water in the ratio of 60:30:10 (v/v/v). The TLC plates when subsequently visualized with iodine fuming give excellent separation of constituents of all the samples under similar experimental conditions. Each sindoor sample showed a different combination of spots having different hRf values under similar conditions.

References

1. Barker A. M., Clarke P. D. B., Examination of small quantities of lipstick, *Journal of Forensic Science Society* 1972, 12, 449–451.
2. Gupta N., Saroa J. S., Sharma R. M., Forensic characterization of some common nail enamels by thin layer chromatography, *Journal of Forensic Identification* 2006, 56, 198–209.
3. Jasuja O. P., Singh R., Thin layer chromatographic analysis of liquid lipsticks, *Journal of Forensic Identification* 55, 28–35.
4. Kapoor V. P., Katiyar K., Pushpangadan P. [et al.], Development of natural dye based sindoor, *Natural Product Radiance* 2008, 7, 22–29.
5. Keagy R. L., Examination of cosmetic smudges including transesterification and gas chromatography/mass spectrometric analysis, *Journal of Forensic Sciences* 1983, 28, 623–631.
6. Puttemans M. L., Dryon L., Massart D. L., Evaluation of thin layer, paper and high- performance liquid chromatography for identification of dyes extracted as ion pairs with tri-n-octylamine, *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 1982, 65, 730–736.
7. Reuland D. J., Trinler W. A. A., Comparison of lipstick smears by high-performance liquid chromatography, *Journal of Forensic Science Society* 1980, 20, 111–120.
8. Reuland D. J., Trinler W. A. A., Comparison of lipstick smears by high-performance liquid chromatography: Part II. The effect of wear-time and subject on the chromatograms, *Journal of Forensic Science Society* 1984, 24, 509–518.
9. Russel L. W., Welch A. E., Analysis of lipsticks, *Forensic Science International* 1984, 25, 105–116.

10. Sharma R. M., Joshi B., Saroa J. S., Thin layer chromatography of some common liquid vermillion, *The Indian Journal of Criminology and Criminalistics* 2006, 27, 76–82.
11. Tebbett L. R., Tulloch I. A., Knusten P., The analysis of nail varnishes of high performance liquid chromatography, *Journal of Forensic Sciences* 1987, 32, 778–783.

Corresponding author

Priyanka Jindal
Punjabi University
Department of Forensic Science
147002 Patiala
India
e-mail: priyanka.jfs@gmail.com

ANALIZA Z WYKORZYSTANIEM METODY CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ ŚLADÓW SINDURU (VERMILLIONU) UJAWNIAJANYCH NA BIAŁYCH TKANINACH BAWELNIANYCH

1. Wstęp

Ślady produktów kosmetycznych znajdują się na miejscu różnego typu przestępstw, szczególnie związanych z użyciem przemocy fizycznej i seksualnej. Zgodnie z zasadą Locarda, ślady kosmetyku przenoszą się z kobiety będącej ofiarą na ciało lub ubranie napastnika. Jeśli zostaną one odpowiednio pobrane, zabezpieczone, a następnie właściwie zanalizowane, mogą w znaczący sposób przyczynić się do powiązania podejrzanego z ofiarą oraz miejscem zdarzenia. Wśród różnorodnych produktów kosmetycznych w Indiach dostępne są w sprzedaży: sindur, szminki do ust, kajal, lakiery do paznokci, maskary itp.

Do najczęściej spotykanych śladów dowodowych należą zaplamienia sindurem (vermillionem). Powodem może być łatwa dostępność tego kosmetyku oraz jego rutynowe wykorzystywanie przez zamężne wyznawczynie hinduizmu, które nakładają go sobie na przedziałek we włosach jako tradycyjny symbol pomyślności. Sindur dostępny jest w różnych odcieniach – pomarańczowym, czerwonym, ciemnoczerwonym, kasztanowym itp., a jego znalezienie może dostarczyć dowodów dotyczących powiązania podejrzanego z ofiarą np. gwałtu. Tradycyjne wytwarzanie tego kosmetyku opiera się na naturalnych składnikach. Jego bazę stanowi szafran, który barwi się na czerwono poprzez domieszkę soku z limonki lub proszku limonkowego (zawierającego związki wapnia). Całość nawilża się wodą lub alunem, jodyną i kamforą lub też olejem ze sproszkowanymi muszlami morskimi (związkami wapnia) albo dodaje się aguru, sandałowca lub piżmo. Obecnie w skład sinduru dostępnego w handlu wchodzi syntetyczne barwniki, wypełniacze, wapno oraz sole ołowiu i rtęci nadające kosmetykowi czerwone zabarwienie [4]. Wszystkie te składniki mogą mieć znaczenie przy wysnuwaniu wniosków w sprawach sądowych.

Do badania produktów kosmetycznych stosuje się różnorodne zaawansowane metody analizy instrumentalnej. Należą do nich: chromatografia cienkowarstwowa [1, 2, 3, 10], wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [6, 7, 8, 11], chromatografia gazowa (GC), a także techniki łączone, jak chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC/MS) [5, 9]. Wymienione metody muszą jednak zostać odpowiednio przystosowane tak, by można było zużyć minimalną ilość próbek lub w nieznacznym stopniu zniszczyć próbkę podczas analizy. Metody chromatograficzne odgrywają znaczą-

cą rolę w badaniu sinduru. Należy do nich zwłaszcza chromatografia cienkowarstwowa jako uniwersalna metoda analityczna, która może być wykorzystana do analizy porównawczej próbek sinduru na potrzeby wymiaru sprawiedliwości. Naukowcy z powodzeniem zastosowali chromatografię cienkowarstwową (TLC) w badaniu niektórych marek tego kosmetyku występującego w formie płynnej [10]. Sharma i in. [10] wykorzystali tę metodę do analizy 36 próbek płynnego vermillonu różniącego się kolorem i rodzajem producenta [2]. Niewiele jest jednak publikacji opisujących badania metodą TLC płam pozostawianych przez ten kosmetyk. W związku z tym zasadne było przebadanie, wykorzystując tę metodę, pewnych powszechnie używanych typów sinduru w formie sypkiej wytwarzanych przez różnych producentów. W niniejszej pracy podjęto też próbę przeanalizowania śladów sinduru pozostawianych na białej tkaninie bawełnianej. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową, przeanalizowano próbki 15 różnych marek dostępnych na lokalnym rynku (tradycyjnych i lśniących, z uwzględnieniem najnowszych ich rodzajów).

2. Materiały i metody

Przedmiotem badań były próbki sypkiego sinduru piętnastu różnych marek dostępnych w drogeriach w Patiali i Karnal (odpowiednio dystrykty: Panjabi i Haryana) w północno-zachodnich Indiach. Sindur każdej marki zakupiono w liczbie pięciu opakowań. Szczegółowe informacje dotyczące nazw handlowych kosmetyków, producentów, koloru oraz numeru analizowanych próbek zamieszczono w tabeli I.

Próbki przygotowywano poprzez naniesienie 1 mg sypkiego sinduru na powierzchnię około 1 cm² zwilżonego kawałka białej tkaniny bawełnianej. W ten sposób z każdej marki kosmetyku uzyskano po pięć zaplamień. Zaplamione kawałki bawełny oznaczono i zapakowano do oddzielnych papierowych kopert celem zabezpieczenia ich przed kontaminacją. Przystępując do badań, zabrudzoną część tkaniny wycinano i umieszczano w probówce. Następnie do próbki wprowadzano 1 ml metanolu i poddawano ekstrakcji przez 5 min. Ekstrakt metanolu przenoszono do kolejnej czystej próbki w celu jego dalszej analizy metodą TLC.

Podczas optymalizacji fazy ruchomej przetestowano dziewiętnaście układów rozwijających (tabela II), z których każdy zastosowano do wszystkich analizowanych

marek sinduru. Szczegóły dotyczące wszystkich substancji użytych w badaniach zamieszczono w tabeli III.

Płytki do analizy TLC przygotowano własnoręcznie, nanosząc żel krzemionkowy G o grubości 0,25 mm, aktywowany termicznie w piecu nagrzanym do 1100°C przez 1 h. Następnie za pomocą strzykawki Hamiltona na powierzchnię aktywowanej płytki наносzono po 2 µl wcześniej przygotowanych próbek sinduru tak, że na każdej płytce umieszczano wszystkie marki tego kosmetyku. Naniesione próbki roztworu pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez 2 min. Następnie nasycano komorę rozwijającą, stosując różne układy rozwijające. W tak przygotowanej komorze umieszczano płytki TLC pod kątem 45° i całość dokładnie przykrywano wieczkiem. Chromatogram rozwijano do czasu, aż czoło eluentu przesunęło się na odległość 10 cm od miejsca naniesienia próbek, po czym rozwinięte chromatogramy wyjmowano z komory i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Rozdzielone składniki analizowanych próbek sinduru w postaci kolorowych plamek na płytce obserwowano w świetle dziennym lub dodatkowo przy zastosowaniu metody par jodu. Dla każdego rozdzielonego składnika badanej próbki obliczono współczynnik przesunięcia hRf , korzystając ze wzoru:

$$hRf = \frac{\text{Odległość przebyta przez substancję rozdzieloną}}{\text{Odległość przebyta przez czoło eluentu}} \times 100.$$

3. Dyskusja wyników

W celu rozdzielania składników wchodzących w skład wybranych próbek sinduru przetestowano dziewiętnaście układów rozwijających (tabela III). Rozwinięte płytki chromatograficzne analizowano następnie w świetle dziennym oraz przy użyciu techniki par jodu. Uzyskane wyniki (wielkość współczynników migracji hRf , liczba rozdzielonych składników próbki, tj. odpowiadająca im liczba plamek na chromatografie oraz ich kolor) były różne w zależności od użytego układu rozwijającego.

Zastosowanie układów rozwijających nr 2, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 oraz 19 nie pozwoliło na rozdzielanie żadnego składnika analizowanych próbek. Użycie układów rozwijających oznaczonych numerami 1, 3, 4, 5, 8, 9 również okazało się niewystarczające (jedna lub dwie plamki obserwowane na każdej próbce) w zależności od marki sinduru po wizualizacji w świetle dziennym i metodą par jodu. Zastosowanie układu rozwijającego nr 16 pozwoliło na rozdzielanie czterech składników próbki nr 1, tj. na uzyskanie czterech plamek barwy fioletowej, czerwonej, różowej i pomarańczowej o współczynnikach migracji hRf 52, 61, 69, 94; czterech składników z próbki nr 2, tj. 4 plamek w kolorze różowym, fioletowym, czer-

wonym i różowym (hRf 19, 68, 79 i 96); dwóch składników próbki nr 3, tj. plamki różowej i czerwonej (hRf 72 i 80); dwóch z próbki nr 4, tj. dwóch plamek w kolorze czerwonym (hRf 72 i 74), a dla próbki nr 5 uzyskano jedynie jedną plamkę barwy różowej o hRf 62. Obserwacje rozwiniętej płytki TLC prowadzono w świetle dziennym. Zastosowanie wyżej wymienionych układów rozwijających nie doprowadziło zatem do istotnego rozdzielania składników badanych próbek.

Najlepszym układem rozwijającym testowanym podczas optymalizacji rozpuszczalników do analizy TLC badanych tu próbek sinduru okazał się układ nr 18 stanowiący mieszaninę butanolu, propanolu i wody w stosunku objętościowym 60:30:10 (v/v/v). Układ ten dał najlepsze rezultaty zarówno jeśli chodzi o liczbę rozdzielonych składników, jak i możliwość dyskryminacji porównywanych próbek. Uzyskane wyniki rozdziału oraz analizę porównawczą wybranych marek sinduru wykonano po wizualizacji odpowiednio rozwiniętej płytki TLC w świetle dziennym i po zastosowaniu techniki par jodu. Rycina 1 oraz dane zamieszczone w tabeli IV przedstawiają rezultaty uzyskane po wizualizacji w świetle dziennym.

Próbki sinduru oznaczone numerami 1, 4, 10 i 11 uległy rozdzielaniu na cztery składniki, tj. dały 4 plamki o różnym lub tym samym kolorze i tej samej wartości współczynnika przesunięcia hRf . W przypadku próbki nr 2 również wydzielono cztery plamki, z których jedna koloru żółtego przy wartości współczynnika hRf 77 okazała się charakterystyczna dla tej próbki. Dla próbek o numerach 3, 6, 12, 13 oraz 15 uzyskano trzy osobne plamki o tym samym lub różnym kolorze przy charakterystycznej wielkości współczynników hRf . Pięć oddzielnych plamek zaobserwowano natomiast dla próbki nr 5, z których dwie – fioletowa przy hRf 62 i pomarańczowa przy hRf 77 – były dla niej charakterystyczne. Dla próbki nr 7 zaobserwowano tylko pojedynczą plamkę koloru fioletowego opisaną współczynnikiem hRf o wartości 77. Dla próbki nr 8 również zaobserwowano pięć oddzielnych plamek, przy czym wszystkie były dla niej charakterystyczne ze względu na uzyskane kolory i wielkości współczynników migracji. Dla próbki nr 9 uzyskano 6 różnych kolorowych plamek, z których charakterystyczne dla tej próbki były dwie plamki barwy różowej oraz jedna barwy żółtej o współczynnikach hRf odpowiednio 45, 62 i 72. Dla próbki sinduru oznaczonej numerem 14 zaobserwowano tylko dwie oddzielne plamki, jedną koloru różowego (hRf 62) wspólną z próbką nr 9 oraz drugą, pomarańczową (hRf 83), którą ujawniono też w przypadku próbek nr 10, 11, 13 i 15, stosując wizualizację w świetle dziennym. Rezultaty analizy TLC przy zastosowaniu techniki par jodu ukazano na rycinie 2 i w tabeli V.

Dla próbek nr 1 i 4 zaobserwowano pięć plamek, z czego cztery o jednakowych współczynnikach hRf 60, 74, 80, 95. Próbki różniło jedynie położenie jednej plam-

ki barwy fioletowej, dla której hRf wyniosło 72 i 73 (dla próbek nr 4 i nr 1). W przypadku próbki nr 2 również zaobserwowano pięć oddzielnych plamek, z czego plamka barwy żółtej przy hRf 77 została zidentyfikowana tylko dla tej próbki. Próbki sinduru oznaczone jako 3, 6, 12 i 15 uległy rozdzieleniu na trzy składniki charakteryzujące się tą samą lub różną wartością współczynnika hRf i kolorem plamki. Dla próbek numer 5 i 9 zaobserwowano 6 oddzielnych plamek, przy czym żadna nie miała tej samej wartości hRf i tego samego koloru. Jednakże w obu tych próbkach wykazano obecność dwóch charakterystycznych układów oddzielnych plamek o wartościach współczynnika migracji 62 i 77 oraz 45 i 72 dla próbek numer 5 i 9. W przypadku próbek nr 7 i 14 zaobserwowano dwie oddzielne plamki, przy czym jedna charakterystyczna barwy różowej przy hRf 74 została zidentyfikowana tylko w próbce nr 7. Dziewięć różnobarwnych plamek układających się w specyficzny wzór mających różne wartości hRf zaobserwowano dla próbki nr 8. Z kolei dla próbek oznaczonych numerami 10, 11 i 13 zidentyfikowano cztery oddzielne plamki. Próbki nr 10 i 11 charakteryzowały się bardzo zbliżonym profilem chromatograficznym różniącym się jedynie kolorem plamki przy hRf 95. Dla próbki nr 10 była to plamka koloru pomarańczowego, a dla próbki nr 11 koloru różowego. Plamki koloru różowego przy hRf 76 zaobserwowano w przypadku wszystkich trzech próbek oznaczonych numerami 10, 11 i 12. Z kolei pomarańczowa plamka przy hRf 83 została zidentyfikowana dla próbek o numerach 10, 11, 13, 14 i 15 po potraktowaniu rozwiniętych płytek TLC parami jodu.

Profile chromatograficzne uzyskane dla każdej z analizowanych próbek sinduru były różne przy wizualizacji w świetle dziennym od próbek uzyskanych po potraktowaniu rozwiniętych płytek TLC parami jodu. Stąd wszystkie badane próbki sinduru mogły zostać rozróżnione między sobą przy użyciu wyżej opisanego układu rozwijającego. Ponadto technika par jodu okazała się lepsza od wizualizacji w świetle dziennym, gdyż pozwalała zaobserwować więcej rozdzielonych składników, tj. obserwowano większą liczbę plamek. W celu sprawdzenia powtarzalności uzyskanych wyników próbki sinduru analizowano czterokrotnie, stosując te same warunki eksperymentalne, a uzyskane wyniki okazały się zgodne.

Sharma i inni [10] przebadali 36 rodzajów próbek płynnego vermillionu różniących się między sobą kolorem i marką lub producentem. Według opublikowanych przez nich badań, mieszanina alkoholu izoamylowego, acetonu, wody i amoniaku zmieszanych w stosunku objętościowych (50:50:30:4) okazała się najlepszym układem rozwijającym pozwalającym rozdzielić przy użyciu metody TLC składniki wchodzące w skład próbek vermillionu [10]. Autorzy prezentowanych tu badań wskazali na nowy układ rozwijający, tj. butanol:propanol:woda (60:30:10 v/v/v) jako najlepszy układ do analizy

próbek sinduru różnych marek jako ten, który umożliwia rozdzielanie składników każdej z analizowanych próbek. Zastosowanie tego układu rozwijającego w zbliżonych warunkach pomiarowych daje różną liczbę rozdzielonych składników, tj. plamek, które dodatkowo posiadają różne wartości współczynnika migracji hRf oraz charakteryzują się różnym kolorem rozdzielonych składników.

4. Podsumowanie

Autorzy są zgodni, że chromatografia cienkowarstwowa jest wiarygodną i pewną techniką, którą z powodzeniem można zastosować do wstępnej analizy próbek sinduru. Analiza porównawcza chromatogramów próbek wybranych marek sinduru pokazała, że rozróżnienie wszystkich jest możliwe po zastosowaniu układu rozwijającego złożonego z mieszaniny butanol:propanol:woda w stosunku objętościowym 60:30:10 (v/v/v). Analiza próbek sinduru za pomocą techniki TLC, wspartej wizualizacją metodą par jodu, pozwoliła na rozdzielanie składników wszystkich analizowanych próbek. Tym samym umożliwiła ona rozróżnienie próbek sinduru, ponieważ każda z próbek badana w tych warunkach charakteryzowała się odmienną kombinacją plamek, które posiadały różne wartości współczynników hRf .