

OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍICOS DE INTERÉS AUTOMOVILÍSTICO MEDIANTE DERIVATIZACIÓN Y HPLC ACOPLADO A UN DETECTOR UV-VISIBLE.

**Máster Interuniversitario en Técnicas
Cromatográficas Aplicadas** (Curso 2017/18)



AUTORA: LINA CONSUEGRA DEL COSO

TUTORA: TANIA PORTOLÉS NICOLAU

SUPERVISORA: NURIA GARCIA BATISTA



ÍNDICE

0. INTRODUCCIÓN A LA EMPRESA	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Técnicas analíticas aplicadas a la determinación de compuestos carbonílicos.....	5
2. OBJETIVOS	10
3. PARTE EXPERIMENTAL	10
3.1. Reactivos	10
3.2 Instrumentación.....	11
3.3 Tratamiento de muestra	11
3.3.1.- Derivatización de la disolución obtenida tras la exposición de la muestra	13
3.3.2.- Derivatización de las disoluciones para la validación del método analítico.....	13
3.4 Preparación de la curva de calibrado	15
3.5 Condiciones de análisis cromatográfico.	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Optimización de la separación cromatográfica	18
4.2. Determinación del LOQ y LOD de los diferentes compuestos.....	22
4.3. Validación del método analítico mediante preparación de disoluciones de concentración conocida.....	23
4.4. Validación del método analítico por comparación con otro método.....	31
5. CONCLUSIONES	33
6. BIBLIOGRAFÍA	35
7. ANEXOS	37

ABREVIATURAS

AIMPLAS Instituto Tecnológico del Plástico

AESICOM Clúster de la Industria de Composites

CIT Centro de Innovación y Tecnología

C18 Octadecylsiloxano/ Octadecilsilano

CAS Chemical Abstracts Service

2,4-DNPH 2,4-dinitrophenylhidrazine/-dinitrofenilhidrazina

DAD Diode Array Detector/ Detector de red de diodos

ENAC Entidad Nacional de Acreditación

EPA Environmental Protection Agency/ Agencia de Protección Ambiental

EuCIA Association of the European Composites Industry

EEUU Estados Unidos de América

FEDIT Federación Española De Institutos Tecnológicos

FID Flame Ionization Detector/ Detector de Ionización en Llama

HDPE High Density Polyethylene/Polietileno de Alta Densidad

HPLC High Performance Liquid Chromatography/ Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

IARC International Agency for Research on Cancer / Agencia Internacional de Investigación del Cáncer

IATA International Association of Air Transport/ Asociación Internacional de Transporte Aérea

IBERO-CIT: Red Iberoamericana de Centros de Innovación y Tecnología de la Industria del Plástico

LOD: Limit of detection /Límite de detección

LOQ: Limit of quantification / Límite de cuantificación

MS Mass Spectrometry / Espectrometría de Masas

NPLC Normal Phase Liquid Chromatography / Cromatografía Líquida en Fase Normal

OEM Original Equipment Manufactures/ Fabricantes de equipos originales

PDA Photodiode Detector Array/ Detector de matriz de fotodiodos

PFBHA O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina

PTFE politetrafluoroetileno

PVC Polyvinyl chloride/ Policloruro de vinilo

RPLC Reverse Phase Liquid Chromatography / Cromatografía Líquida en Fase Reversa

SUSCOMPNET Sustainable Composites Network / Red de Composites Sostenibles

TCPH 2,4,6-trichlorophenyl hydrazine / -triclora-fenilohidrazina

THF Tetrahydrofuran /Tetrahidrofurano

UV Ultravioleta Visible

VIAQ Vehicle Interior Air Quality/ Calidad del Aire en el Interior del Vehículo

VOC Volatile Organic Compound/ Compuesto Orgánico Volátil

RESUMEN

En el presente proyecto se presenta la validación de un método que permita la detección y cuantificación de 13 compuestos carbonílicos que forman parte de diferentes componentes del interior de los vehículos, siguiendo las normas automovilísticas FLTM BZ 156-01, D40 3004/--A y GMW 15635.

Las muestras son trozos de dichos materiales y los analitos son en su mayoría, compuestos volátiles o semi-volátiles. Por ello, se procedió a someter a las muestras a un tratamiento térmico en un recipiente cerrado con cierta cantidad de agua, en el cual, los analitos migran hacia la misma. Tras esto, los compuestos se someten a una derivatización y a su posterior detección mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de ultravioleta-visible (HPLC-UV). En primera instancia, se realizó un estudio previo con disoluciones de estos compuestos de concentración conocida, para la optimización de la derivatización y del método cromatográfico.

In this project we present the validation of a method that allows the detection and quantification of 13 carbonyl compounds that are part of different components of the interior of vehicles, following the automotive standards FLTM BZ 156-01, D40 3004 / - A and GMW 15635

The samples are pieces of those materials and the analytes are mostly volatile or semi-volatile compounds. For this reason, the samples were subjected to a heat treatment in a closed container with a certain amount of water, in which the analytes migrate towards it. After this, the compounds are subjected to derivatization and subsequent detection by high-performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet-visible detector (HPLC-UV). In the first instance, a preliminary study was carried out with solutions of these compounds of known concentration, for the optimization of the derivatization and the chromatographic method.

0. INTRODUCCIÓN A LA EMPRESA

AIMPLAS es el Instituto Tecnológico del Plástico ubicado en Paterna (Valencia), en el cuál he desarrollado mi trabajo final de máster enfocado al desarrollo de un método para la determinación de la emisión de aldehídos y cetonas procedentes de materiales poliméricos destinados a estar en el interior de un vehículo mediante HPLC acoplado a un detector UV previa derivatización de los carbonilos de acuerdo a las normas de automoción FLT M BZ 156-01, D40 3004/--A y GMW 15635.

AIMPLAS es un Centro de Innovación y Tecnología (CIT) reconocido por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología que nació en 1990 como asociación de investigación sin ánimo de lucro de ámbito nacional e internacional. Pertenece a la Red de Institutos Tecnológicos de la Comunidad Valenciana (REDIT) y a la Federación Española de Institutos Tecnológicos (FEDIT). Además, es miembro activo de otras Redes Tecnológicas como SUSCOMPNET, EuCIA, AESICOM, IBERO-CIT y FEDIT. Desde su nacimiento, AIMPLAS tiene su vocación puesta en potenciar el contacto directo con las empresas de todos los sectores vinculados al plástico para detectar sus necesidades.

AIMPLAS ofrece soluciones integrales a las empresas del sector del plástico con el fin de que éstas solucionen con un único proveedor sus necesidades tecnológicas. Los servicios de laboratorio, servicios de información técnica, cursos de formación, asesoramiento técnico y proyectos de I+D+i son sus áreas de trabajo fundamentales.

Desde este punto de vista, los laboratorios de AIMPLAS cuentan con el mayor número de acreditaciones ENAC de ensayos para el sector del plástico, disponiendo de laboratorios genéricos de tipo físico-mecánico y químico, así como específicos para envases plásticos, tuberías, láminas, fosas/depósitos y composites termoestables, realizando su actividad tanto en termoplásticos como en termoestables.

AIMPLAS pone a disposición de sus asociados y clientes 2 plantas piloto de procesado con el equipamiento necesario para que, a escala piloto, estos puedan realizar las pruebas que estimen convenientes en procesos de inyección, extrusión, termoconformado, compounding, perfilería, pultrusión, RTM, infusión, espumación, laminados y diseño y desarrollo de modelos [1, 2].

1.INTRODUCCIÓN

Nuestro ritmo de vida actual hace que pasemos buena parte de nuestro tiempo en espacios cerrados en los que no estamos a salvo de la contaminación exterior. A veces incluso, podemos estar más expuestos que al aire libre. Los vehículos son un claro ejemplo de ello, el sistema de climatización del que disponen, además de regular la temperatura, tiene una función no tan evidente que es la renovación del aire en el interior de vehículo para asegurar que la proporción de oxígeno en el interior del vehículo sea la adecuada [3]. De manera general, las personas pasan de media 1 hora diaria en el interior del vehículo, y a pesar de ello se le ha prestado muy poca atención a la calidad del aire en el interior del vehículo, VIAQ por sus siglas en inglés (vehicle interior air quality). El reducido tamaño que tienen la gran mayoría de los vehículos provoca que las concentraciones de varios componentes químicos en el aire pueden estar hasta 3 veces más concentrados que en otros ambientes cerrados.

El olor característico que se percibe al entrar en un automóvil nuevo no es más que el resultado de la emisión de diferentes productos químicos por los diferentes materiales de los que se compone el interior del vehículo. Las fuentes de estas posibles emisiones se pueden atribuir a los diferentes componentes del compartimento interior de los pasajeros, ya sean componentes estructurales, como con fines puramente estéticos o de seguridad [4]. Las concentraciones químicas de los compuestos en el VIAQ pueden variar según diversos factores como la edad de vehículo, factores ambientales como la temperatura, la humedad o la contaminación exterior (tubos de escape de otros vehículos), y los hábitos habituales del usuario, como fumar dentro del vehículo.

La gran mayoría de los componentes del interior del vehículo tienen como materia prima plásticos con diferentes propiedades que contienen diversas cantidades de compuestos orgánicos volátiles, VOC en sus siglas en inglés, y otros compuestos químicos. Entre algunos de los materiales que podemos encontrar están el PVC, poliuretano, espuma, alfombras, adhesivos, etc. [5]. Las emisiones de los VOCs son uno de los principales contribuyentes a los problemas relacionados con el VIAQ tanto en vehículos nuevos como usados. No obstante, la mayoría de las investigaciones indican que las concentraciones químicas más altas que afectan al VIAQ generalmente se encuentran en los vehículos nuevos, cuando los niveles de descarga de gases de los componentes y accesorios del interior del vehículo recién instalados son más altos. Un estudio realizado sobre el habitáculo de tres vehículos nuevos obtuvo como resultados la medición de más de 15000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de compuestos orgánicos volátiles, cuando esta misma investigación situó el límite de exposición antes de alcanzar el umbral de toxicidad en 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [4].

El inventario de sustancias químicas mantenidas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) [6] actualmente enumera más de 84.000 sustancias químicas usadas en el comercio. Aunque se cree que muchos de estos productos químicos son inofensivos, se desconoce su impacto total en la salud humana, y el impacto de la identificación de posibles efectos sobre la salud humana aumentan aún más a medida que se introducen en uso nuevas sustancias y compuestos químicos. De hecho, varios de estos compuestos encontrados comúnmente en los vehículos han sido clasificados como cancerígenos, probablemente cancerígenos o posiblemente cancerígenos para los humanos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [7].

Aunque varios países han establecido reglamentos o directrices con respecto a las concentraciones químicas aceptables en los vehículos, es la propia industria automovilística la fuerza impulsora principal para implementar los límites de las emisiones químicas y los requisitos de prueba para los componentes que forman parte del vehículo. En España se han limitado las emisiones de compuestos orgánicos volátiles en determinadas pinturas, barnices y productos de renovación del acabado de vehículos por el Real Decreto 227/2006 [8].

Para poder determinar la calidad del aire en el interior del vehículo realizan ensayos ampliamente estudiados sobre los materiales empleados en la fabricación de vehículos, ya sea por el propio fabricante de la materia prima, por el fabricante del vehículo o por una tercera empresa a la que se le encargue la realización de estos. Las emisiones que deben estudiarse sobre los materiales poliméricos son las siguientes:

- EMISIÓN DE VOCs

Los VOCs se emiten como gases de ciertos sólidos o líquidos. Los VOCs incluyen una gran variedad de productos químicos, algunos de los cuales pueden tener efectos adversos en la salud a corto y largo plazo. La exposición acumulativa a estos agentes puede provocar: insomnio, dolor de cabeza y problemas respiratorios entre otros [6].

El límite de VOCs exigido por los OEMs (Original Equipment Manufactures) [9] es de 50 µgC/g muestra, aunque este valor puede variar según el tipo material y los requisitos del fabricante. En este ensayo, se somete a la muestra a un calentamiento en un vial de Head-Space para forzar la emisión de VOCs. Mediante cromatografía de gases acoplada a un Detector de Ionización de Llama, FID en sus siglas en inglés, como detector [10], se determinará la cantidad de VOCs totales emitidos por el material.

- EMISIÓN DE OLOR

Cada material desprende un olor característico debido a las interacciones que ocurren con ciertos componentes. La reducción de los olores es un objetivo muy importante, puesto que, en los rincones más insospechados de un vehículo, como una alfombrilla, un reposacabezas o incluso el panel de recubrimiento del techo, pueden ser un foco de olores desagradables que provocan cierto malestar en los ocupantes del vehículo.

El ensayo de olor evalúa la intensidad del olor de los materiales en el interior del vehículo bajo el efecto de la temperatura y las condiciones climáticas. Dependiendo de los requisitos de cada fabricante, se ensayará diferente cantidad de muestra y se utilizarán diferentes condiciones de almacenaje (temperatura y humedad).

Cabe destacar que este ensayo posee una técnica muy subjetiva, ya que cada individuo presenta una sensibilidad olfativa diferente, por este motivo, el aspecto más crítico del ensayo es el entrenamiento de los jueces que van a evaluar las muestras. Este entrenamiento permitirá al evaluador discriminar en una escala de intensidades y estudiar la repetitividad y reproducibilidad de dicho evaluador en el ensayo. De acuerdo con las normas desarrolladas por los fabricantes de los vehículos, las escalas categorizan el olor de no-perceptible a insoportable. Por ejemplo, en la VDA 270, el ensayo se valora

con una escala del 1 al 6, siendo 1 olor no perceptible, hasta 6 que sería olor perturbador o inaguantable [10].

- **FOGGING**

Con esta técnica se puede conocer si un material es capaz de emitir partículas posibles de condensar en los cristales del vehículo. Para este ensayo se utiliza un baño termostático unido a un refrigerante. Se puede trabajar con la metodología gravimétrica o reflectométrica, midiendo la cantidad de masa depositada en los aluminios o bien, el porcentaje de luz que atraviesa los cristales de ensayo, respectivamente. Dependiendo de los requisitos del fabricante el límite puede oscilar entre 70% y 85% en el método reflectométrico, y 2 mg en el gravimétrico [10].

- **EMISION DE ALDEHÍDOS Y CETONAS**

Los aldehídos y cetonas se caracterizan porque ambos son compuestos carbonílicos, es decir, contienen un átomo de carbono por un doble enlace a un átomo de oxígeno. Estos compuestos tienen una amplia aplicación tanto como reactivos como disolventes, así como en la fabricación de telas, perfumes, plásticos y medicinas.

El interés por el análisis químico de los compuestos carbonílicos en el aire se debe a que están relacionados con procesos de fotooxidación de sustancias orgánicas, así, después del NO_2 , son los compuestos más fácilmente fotolizados y, en presencia de NO_x , son precursores de O_3 y otros oxidantes como peroxiacilnitratos y peróxidos. Además, los aldehídos son considerados tóxicos, habiéndose relacionado el formaldehído y la acroleína con posibles efectos cancerígenos [11].

Al igual que para el resto de emisiones, existen normas para la determinación de la emisión de aldehídos y cetonas de los materiales poliméricos destinados al interior del vehículo. En este sentido, el formaldehído es el compuesto carbonílico más ampliamente estudiado, existiendo normas específicas para su determinación dada su peligrosidad y riesgo para la salud.

Este ensayo consiste en suspender el material plástico en el interior de un envase que contiene una cierta cantidad de agua. Después de someter a la pieza a un calentamiento, a una temperatura y tiempo determinados, para forzar la emisión de dichos compuestos, estos quedan retenidos en el agua. Posteriormente, se lleva a cabo una reacción de derivatización para poder determinar estos compuestos mediante técnicas cromatográficas (HPLC-UV) o espectrofotométricas (UV).

Dada la importancia de la determinación de la emisión de dichos compuestos carbonílicos y la necesidad por parte de laboratorios como AIMPLAS para satisfacer las necesidades de las empresas del sector de automoción, el presente trabajo se centrará en la puesta a punto de la determinación de los compuestos carbonílicos emitidos por materiales poliméricos mediante HPLC-UV.

1.1 Técnicas analíticas aplicadas a la determinación de compuestos carbonílicos

Como se ha comentado anteriormente, todas las piezas que han de formar parte de un vehículo deben someterse a determinados controles para la detección de las emisiones de ciertos compuestos químicos que permitan asegurar la calidad del aire en el interior de este. Los compuestos carbonílicos son una de las familias a controlar y entre ellos cabe destacar la importancia de los aldehídos y cetonas, además de por su implicación en procesos fotoquímicos, como se ha indicado anteriormente, por su capacidad de volatilizarse desde los distintos materiales, ya que algunos de estos compuestos son perjudiciales para la salud.

Para la determinación e identificación de estos compuestos hay muchas vías posibles, en este trabajo solo nos centraremos en las cromatográficas. Para los compuestos tratados, volátiles o semi-volátiles, lo ideal sería trabajar en cromatografía de gases (GC), ya que resulta más sencillo la vaporización de la muestra para la entrada de los compuestos en la columna. Pero las normas en las que se basa este trabajo son muy estrictas y requieren un análisis por cromatografía líquida cuyos detectores más usados son los ultravioleta-visible, el detector de fluorescencia y, por último, la espectrometría de masas.

Basándonos en las normas de automoción FLTM BZ 156-01, D40 3004/--A y GMW 15635, los carbonilos han de pasar por una derivatización previa a la inyección en el sistema cromatográfico. La derivatización es un proceso que consiste en modificar químicamente unos compuestos para producir un derivado con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis [12]. El uso de un agente derivatizante en conjunto con un método cromatográfico es una forma de mejorar la separación de los diferentes analitos y/o la sensibilidad del método de detección [13]. La derivatización se puede realizar antes de introducir los analitos en la columna (pre-columna), o se puede llevar a cabo entre la columna y el sistema de detección (post-columna). Las técnicas pre-columna ofrecen una mayor simplicidad técnica y se pueden usar para mejorar la estabilidad, la resolución, la simetría de pico y aumentar o disminuir el tiempo de retención de los solutos [14]. Si bien la derivatización más común y la que se utiliza en este trabajo es la pre-columna por las ventajas instrumentales que tiene esta sobre la post-columna, también tiene diversas aplicaciones. Un ejemplo es la determinación de mezclas complejas de detergentes de tipo alquilsulfónicos lineales, que se caracterizan por su baja cromaticidad; la formación post-columna de pares iónicos fluorescentes con la acridina origina un cromatograma de gran nitidez [15].

Hay una gran cantidad de agentes derivatizantes pre-columna para el análisis de compuestos carbonilos, incluida la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2, 4-DNPH), 2,4,6-tricloro-fenilohidrazina (TCPH), cisteamina (2-aminoetanotiol) y O- (2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA). Cuando se selecciona un agente derivatizante para compuestos con grupos carbonilos, es importante tener en cuenta los siguientes criterios: (i) Se debe formar un producto estable en la reacción entre el reactivo y el analito. (ii) La velocidad de la reacción entre el reactivo y el analito debe ser lo suficientemente alta para lograr una reacción cuantitativa. (iii) La proporción de producto formado de la derivatización debe ser alta en comparación con el analito que reacciona.

El agente de derivatización más común para los compuestos carbonílicos es 2,4-DNPH. La reacción específica de estos compuestos con 2,4-DNPH da como resultado la formación de la correspondiente 2,4-dinitrofenilhidrazona Fig (1) siendo uno de los métodos cualitativos y cuantitativos más importantes utilizados en el análisis orgánico. De esta reacción se obtiene un

precipitado; si el producto cristalino es amarillo, esto es indicación de un compuesto carbonílico saturado; si se obtiene un precipitado naranja indica la presencia de un sistema α,β -insaturado; y un precipitado rojo es indicativo de una cetona o un aldehído aromático [16].

Este tipo de reacción es una adición nucleofílica y se ve favorecida en medio ácido ya que este contribuye a la polarización del grupo carbonilo facilitando el ataque nucleofílico del

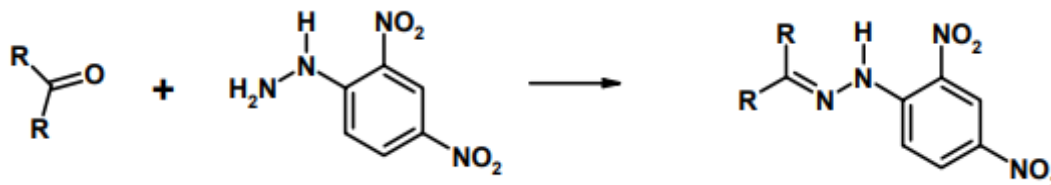


Figura 1. Reacción de derivatización con el 2,4-dinitrofenilhidrazina con un grupo carbonilo para la formación de la correspondiente hidrazona.

reactivo al carbocatión. Sin embargo, un exceso de acidez en el medio es perjudicial porque la 2,4-dinitrofenilhidrazina forma una sal en la cual el par de electrones no compartidos del átomo del nitrógeno quedan bloqueados por el protón y pierde sus propiedades nucleofílicas [17]. La principal ventaja de la derivatización con 2,4-DNPH es la capacidad de derivatizar simultáneamente una mezcla compleja de varios aldehídos y cetonas. [15].

Los compuestos que se quieren analizar son compuestos volátiles o semi-volátiles que al ser derivatizados son solubles en agua, por lo que la cromatografía más adecuada, es la cromatografía líquida. Por otro lado, el producto de la derivatización es cromóforo, y absorbe a 367 nm lo que lo hace fácilmente detectable por ultravioleta-visible. Por todo esto, el sistema utilizado para la separación y detección de estos compuestos es la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC en sus siglas en inglés, acoplado a un detector UV-visible.

La cromatografía líquida usada en este trabajo es la cromatografía líquida de partición, cuya base de separación es el equilibrio de partición entre dos líquidos, la fase móvil y la fase estacionaria que está dispuesta sobre un sólido inerte. Que la base de la separación sea un equilibrio de partición significa que los analitos interaccionan más o menos con una de las dos fases y es esto lo que determina el orden de elución y el tiempo de retención de los mismos. Por tanto, los que tengan más interacción con la fase estacionaria quedarán más retenidos y su tiempo de retención será mayor. Este tipo de cromatografía puede ser en fase normal (NPLC) o fase reversa (RPLC). La principal diferencia entre estos dos tipos de cromatografía es la polaridad de la fase estacionaria y la fase móvil, y, por tanto, la polaridad de los analitos que separan.

La fase estacionaria de la cromatografía en fase normal presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se le unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funciones de alta polaridad (ciano, amino, etc). Por otro lado, la fase móvil tiene características apolares, que suele constar de un disolvente orgánico apolar con poca fuerza de elución, en conjunto con otro disolvente más polar con mayor fuerza eluotrópica. La fuerza de elución o fuerza eluotrópica se define como la fuerza que tiene un disolvente para arrastrar los analitos a través de la fase estacionaria, es decir, cuanto mayor fuerza de elución tenga un disolvente, antes saldrán los analitos de la columna y menor tiempo de retención obtendríamos como resultado de la separación. La NPLC se caracteriza por separar compuestos con características apolares, siendo como normal general, los que menor tiempo de retención presentan en este tipo de cromatografía.

Por otro lado, RPLC se caracteriza por tener una fase estacionaria con naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilos, etc.) unidos a un sólido inerte como puede ser la sílice, alumina o zirconia; y las interacciones que se producen con los solutos son inespecíficas (efecto solvóforo). Mientras que la fase móvil consta de agua o agua tamponada con un disolvente orgánico miscible entre los que se puede elegir en función del grado de polaridad que se busque, desde el metanol (más polar) hasta el tetrahidrofurano (menos polar). RPLC separa compuestos con características polares, siendo esta la cromatografía usada en este trabajo. La cromatografía de fase reversa es, con gran diferencia, la técnica de separación por cromatografía líquida más utilizada actualmente en el laboratorio. Las principales ventajas de la cromatografía en fase reversa en contraposición a la fase normal es la uniformidad del tamaño de poro, lo que le confiere una mayor área superficial homogénea que facilita la separación de los diferentes analitos, además, RPLC evita la formación de burbujas debido a la baja viscosidad de la fase móvil en contraste con NPLC.

La elección de la columna y la fase móvil que se utilizan en un proyecto depende de muchos factores, entre ellos la polaridad de los analitos, y por tanto su afinidad por la fase estacionaria y la fase móvil, así como la disponibilidad de diferentes tipos de columnas (longitud, tamaño de poro, diámetro interno, tipo de fase estacionaria). Además, para la elección de la fase móvil se debe tener en cuenta el detector usado, si es un detector de fluorescencia, la fase móvil no puede tener esta característica, si es un ultravioleta no debe absorber a la misma longitud de onda que los analitos, etc.




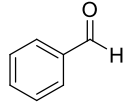
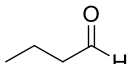
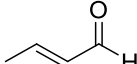

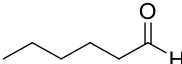
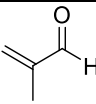
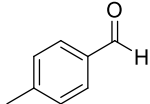

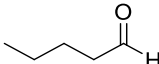

En este trabajo, tal y como se ha indicado con anterioridad se ha usado como detector el ultravioleta-visible, que es uno de los detectores más usados en HPLC junto con el de fluorescencia. El detector de ultravioleta mide la absorción de luz de la muestra a diferentes longitudes de onda, por lo que se puede identificar el analito. Dentro del ultravioleta visible, se pueden distinguir tres tipos de detectores en función de las longitudes de onda que pueda medir, longitud de onda fija, longitud de onda variable o detector de matriz de fotodiodos, PDA, en sus siglas en inglés. Este último presenta multitud de ventajas en comparación con los detectores ultravioleta tradicionales, como es la mejora de la sensibilidad o el aumento de la fiabilidad en cuanto a la identificación de los picos, además de que si los espectros de absorción son distintos se pueden cuantificar dos compuestos solapados.

La fase estacionaria de la columna utilizada en este proyecto ha sido un soporte de sílice con un grupo octadecil (C18), que le confiere a la columna características apolares, en comparación con otros grupos que se puedan enlazar a la columna, como pueden ser el grupo fenil (C₆H₅) o ciano (CN), tal y como se ha indicado anteriormente. El soporte de sílice es el más usado, pero tiene una estabilidad química limitada, es decir, el pH al que se puede someter la columna ha de encontrarse entre 2 y 8. Trabajar a pH más ácidos y más básicos que los indicados puede producir un sangrado de la columna, ya que la columna utilizada en este trabajo no es *endcapped*, es decir los grupos unidos a la sílice no están protegidos para evitar su reactividad con los analitos. Todo ello se traduce en mantener un especial cuidado en la acidificación de los carbonilos durante la derivatización, ya que la excesiva acidificación puede producir un sangrado de la columna, y la escasez de ácido no producirá la suficiente polarización del grupo carbonilo para hacer posible la reacción de derivatización.

Este trabajo se centra en el desarrollo de un método para la determinación de 13 compuestos carbonílicos (Tabla 1), mediante HPLC-UV (PDA) mediante su previa derivatización con 2,4-DNPH en matriz acuosa después de someter a plásticos procedentes de piezas de automoción a un calentamiento para favorecer la emisión de dichos compuestos.

Estos compuestos han sido ampliamente estudiados mediante esta derivatización con HPLC-UV en conjunto o por separado en diferentes matrices. Tanto en fase acuosa [18, 19,20], como en aire [21, 22] o matrices biológicas entre otras [23, 24, 25]. Estos compuestos también han sido estudiados mediante HPLC-MS [26].

Tabla 1. Compuestos carbonílicos estudiados en este proyecto con su nombre y CAS, así como el del correspondiente compuesto derivatizado.

Nombre del compuesto derivatizado	CAS del compuesto derivatizado	Nombre del correspondiente aldehído o cetona	CAS del compuesto no-derivatizado	Fórmula molecular del compuesto no derivatizado
Acetaldehyde-2,4-DNPH	1019-57-4	Acetaldehyde	75-07-0	
Acetone-2,4-DNPH	1567-89-1	2-propanone (acetone)	67-64-1	
Acrolein-2,4-DNPH	888-54-0	2-propenal (acrolein)	107-02-8	
Benzaldehyde-2,4-DNPH	1157-84-2	Benzaldehyde	100-52-7	
Butyraldehyde-2,4-DNPH	1527-84-2	Butyraldehyde (Butanal)	123-72-8	
Crotonaldehyde-2,4-DNPH	1527-96-4	2-Butenal (Crotonaldehyde)	123-73-9	
Formaldehyde-2,4-DNPH	1081-15-8	Formaldehyde	50-00-0	
Hexaldehyde-2,4-DNPH	1527-97-5	Hexaldehyde (Hexanal)	66-25-1	
Methacrolein-2,4-DNPH	5077-73-6	Methacrylaldehyde (methacrolein)	78-85-3	
p-Tolualdehyde-2,4-DNPH	2571-00-8	4-methyl-benzaldehyde (p-Tolualdehyde)	104-87-0	
Propionaldehyde-2,4-DNPH	725-00-8	Propanal (Propionaldehyde)	123-38-6	
Valeraldehyde-2,4-DNPH	2057-84-3	Pentanal (Valeraldehyde)	110-62-3	
2-Butanone-2,4-DNPH	958-60-1	2-butanona (MEK)	78-93-3	

2. OBJETIVOS

En el presente proyecto se busca desarrollar un método para la consiguiente acreditación que permita identificar y cuantificar 13 compuestos carbonílicos (Tabla 1) provenientes de la emisión de materiales poliméricos que vayan a ser instalados de manera permanente en vehículos. Para ello los objetivos en los cuales se subdivide este trabajo son:

- Desarrollar un método analítico para la detección, identificación, separación y cuantificación de 13 compuestos carbonílicos mediante HPLC-UV en piezas se automoción.
- Optimizar para ello los parámetros experimentales como el flujo, la fase móvil, gradiente, rango de longitud de onda en la que se realiza la medición, longitud de onda en la que se realiza la cuantificación, volumen de inyección, temperatura de columna, etc.
- Determinar el límite de detección y de cuantificación de los 13 compuestos.
- Validar el método tanto en el límite de cuantificación, como a 15 ppm, que es el valor más alto que pone la normativa y un punto medio de la curva de calibrado que queda definido en la parte experimental.
- Validar el método analítico en su conjunto comparando dicho método con otro método realizado en AIMPLAS para la determinación de formaldehído (VDA 275) y acreditado por ENAC.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos

Para la realización de la curva de calibrado entre 0.01 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se hizo uso de un patrón comercial que contenía los 13 compuestos de estudio previamente derivatizados con 2,4-DNPH a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CRM477651 SUPELCO).

Para realizar las pruebas de derivatización y optimización de la separación de los picos se realizaron disoluciones de los 13 compuestos haciendo uso de los siguientes compuestos químicos: formaldehyde 37% (Merk), acetldehyde acetldehyde en ampollas de 1.2 mL de concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua (Sigma-Aldrich), acetone 99.8% (Scharlau), propionaldehyde 99% (Sigma-Aldrich), crotonaldehyde 99% (Sigma-Aldrich), methyl ethyl ketone 97% (Scharlau), methacroleine 95% (Sigma-Aldrich), butyraldehyde 97% (Sigma-Aldrich), benzaldehyde 99.5% (Sigma Aldrich), Valeraldehyde 97.5% (Sigma Aldrich), p-tolualdehyde 97% (Sigma-Aldrich) y Hexanal 95% (Sigma-Aldrich) son los compuestos de interés. Y para preparar las disoluciones y la derivatización se usó 2,4-dinitrophenilhydrazine (Sigma-Aldrich), percloric acid 70% (Sigma-Aldrich), phosphoric acid 85% (Scharlau), acetonitrile (VWR), tetrahydrofurane (VWR), tamiz molecular 3Å y 5Å (Sigma-Aldrich) y agua Milli-Q (MILLIPORE Advantage A10).

3.2 Instrumentación

El equipo utilizado para realizar el análisis cromatográfico es un HPLC equipado con una bomba cuaternaria y auto-inyector (Waters Alliance 2695) y detector ultravioleta PDA (photodiode array) (Waters 2998). La columna cromatográfica usada es ZORBAX ODS 5 μ m, 4.6 x 250 mm.

Por otro lado, en referencia a la instrumentación utilizada para realizar la derivatización se ha hecho uso de una placa agitadora (Wisd Laboratory Instruments SH HS-6), una balanza analítica de precisión 0.0001g (Mettler Toledo XP 205), una estufa (Memmert) y frascos de HDPE donde se pone la muestra a exposición (Labbox, BBWN 1 L).

3.2 Preparación de la muestra y emisión de volátiles

Las muestras a analizar han de ser piezas acabadas del material o de los componentes. Las llamadas probetas, son muestras representativas del material a analizar. En el caso de que el material esté formado por diferentes componentes se analizará cada componente por separado.

En este trabajo se estudiarán tres normas de automoción (GMW 15635, FLTM BZ 156-01 y D40 3004 / --A) las cuales tienen unos requisitos diferentes en cuanto a las medidas de la probeta a ensayar.

- Norma GMW 15635: 40 mm x 100 mm x grosor.
- Norma D40 3004 / --A: 60 mm x 30 mm x grosor (máximo 20 mm).
- Norma FLTM BZ 156-01: 40 mm x 100 mm x grosor.

Una vez se dispone de las muestras en el tamaño requerido, se les aplica un agujero en un borde para colocarlas suspendidas mediante un gancho un bote de HDPE (high density polyethylene) el cual contiene una cierta cantidad de agua Milli-Q (50 mL). Un esquema de los diferentes montajes según la norma aplicada se muestra en las figuras 2, según las normas GMW 15635 y FLTM BZ 156-01, y en la figura 3, según la norma D40 3004 / --A.

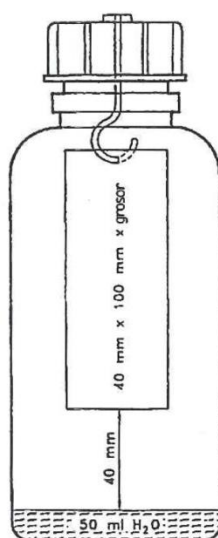


Figura 2. Montaje de la muestra según GMW 15635 y FLTM BZ 156-01.

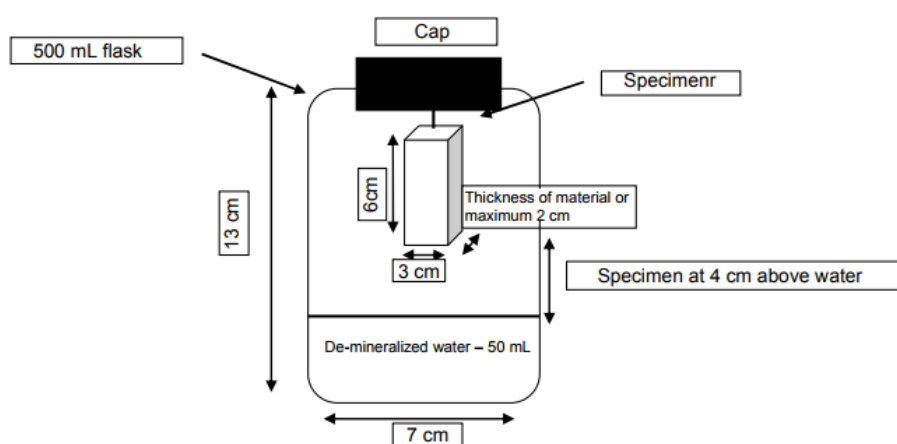


Figura 3. Montaje de la muestra según D40 3004 / --A

Una vez colocada la probeta a ensayar en el correspondiente bote de HDPE, los botes son calentados durante 3 horas a 60°C en una estufa termostaticada. De esta manera, los compuestos susceptibles al calor del material son forzados a emitirse y quedar retenidos en el agua contenida en el bote. Trascurrido este tiempo, el bote se deja enfriar durante 1 hora.

Posteriormente, se lleva a cabo la reacción de derivatización según se comentará en el apartado siguiente.

3.3 Derivatización

3.3.1.- Derivatización de la disolución obtenida tras la exposición de la muestra

- Derivatización según las normas FLTM BZ 156-01 y D40 3004 / --A:

En primer lugar, se prepara una dilución a partir del ácido perclórico concentrado al 70%. Se añaden 4.5 mL del mismo y se lleva a 50 mL enrasando con acetonitrilo, ACN a partir de ahora, el cual se había dejado 18 horas con tamiz molecular para eliminar trazas de agua.

A continuación, se prepara la disolución derivatizante de 2,4-DNPH, se pesan 1.23 g del derivatizante (2,4-DNPH), el cual se le añade 12.5 mL de la disolución del ácido perclórico, ya preparada. Y se enrasa a 1 L con ACN anhidro.

Para llevar a cabo la derivatización se añade 1 mL de la disolución derivatizante a 9 mL de la disolución acuosa y se agita durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo, se filtra utilizando filtros de nylon de 0.22 μm de tamaño de poro y se introduce en viales de HPLC de 2 mL.

➤ Derivatización según la norma GMW 15635:

Al igual que en el método anterior se prepara una disolución en derivatizante, en la cual se pesan 250 mg del 2,4-DNPH y se enrasa a 50 mL con ACN anhidro. En esta ocasión, no se lleva a cabo la dilución del ácido, que este caso es el ácido fosfórico al 85%. Se añade 0.5 mL de la disolución derivatizante, 0.5 mL de la disolución acuosa y 50 µL del ácido fosfórico, que es aproximadamente 1 gota. Se agita fuertemente y se deja reaccionar durante 30 minutos.

3.3.2.- Derivatización de las disoluciones para la validación del método analítico

Las diferentes pruebas para realizar la derivatización se hicieron sobre disoluciones de los compuestos a una concentración conocida. Por ello se prepararon disoluciones madres individuales de 1000 ppm con ACN anhidro. Los compuestos son separados en parejas para realizar la derivatización, los cromatogramas correspondientes a estas disoluciones se encuentran en los ANEXOS I-VI en lo cual hay que destacar que en el momento en el cual se realizaron los ensayos el hexanal no estaba disponible en el laboratorio.

MIX 1: Formaldehído y Acetaldehído

MIX 2: Acetona y MEK

MIX 3: Benzaldehído y Metacroleína

MIX 4: Propanal y Crotonaldehído

MIX 5: Butanal y Valeraldehído

MIX 6: Tolualdehído y Hexanal

Debido a la imposibilidad de encontrar distribuidores que nos suministraran acroleína (la IATA, Asociación Internacional de Transporte Aéreo se niega a transportar dicho compuesto en avión desde China, EEUU o Canadá donde se fabrica), la validación del método se llevó a cabo con los otros 12 compuestos y se supone un comportamiento similar en este compuesto.

Para realizar el estudio, se prepararon diluciones a diferentes niveles, en el límite de cuantificación (determinado en el apartado 4.2), dos puntos intermedios de la curva de calibrado y el punto más elevado de la recta de calibrado (15 ppm), el cual viene determinado por las normas del presente estudio. Se elegirán dos puntos intermedios, que serán 0.5 ppm o 1 ppm, dependiendo del LOQ del compuesto en cuestión, y un punto intermedio alto de 3 ppm. Con este punto se buscaba un punto alto no muy alejado del segundo punto ya que es poco realista de cara a la aplicación en muestras reales encontrar resultados cercanos a 15 ppm.

En función de la norma a aplicar la metodología es diferente. Aunque el agente derivatizante es el mismo, su concentración es diferente, así como el ácido utilizado para promover la reacción de derivatización. Otra de las diferencias, es la proporción de disolución derivatizante y disolución a analizar. En la siguiente tabla se resumen las principales diferencias.

Tabla 2. Principales diferencias en cuanto a la metodología en cuanto a la norma aplicada.

Diferencias principales	FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A	GMW 15635
Ácido	HClO ₄	H ₃ PO ₄
Proporción agente derivatizante/disolución a analizar	1:9	1:1

Como puede verse en la tabla 2, en el caso de la norma GMW 15635, la proporción de agente derivatizante/disolución a analizar es 1:1. Por tanto, para poder evaluar la metodología en el LOQ según esta norma, han de prepararse disoluciones con el doble de la concentración de los analitos en este punto (2xLOQ). Ya que, de otro modo, al añadirse la disolución de agente derivatizante, la disolución se diluirá a la mitad, por lo que si se prepara una disolución con la concentración del LOQ no podrá determinarse con exactitud. Lo mismo ocurre con las disoluciones en los niveles intermedios y finales de la curva, se prepararán con el doble de concentración que las disoluciones de las normas FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A.

• DERIVATIZACIÓN POR LA NORMA FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A

Dependiendo de la concentración de los compuestos en las disoluciones se utilizarán concentraciones diferentes de ácido y agente derivatizante ya que tanto el ácido como dicho agente derivatizante deben estar en exceso para que la reacción de derivatización tenga lugar.

En primer lugar, se prepara una dilución de ácido perclórico tomando 4.5 mL de ácido perclórico concentrado (70%) y se enrasa con acetonitrilo seco a 100 mL. Posteriormente, se preparan las siguientes disoluciones:

- Disolución derivatizante para las diluciones 1 y 2 (LOQ y cercana al LOQ): 0.123 g de 2,4-DNPH + 1.25 mL HClO₄ diluido en 100 mL de ACN seco.
- Disolución derivatizante para las diluciones 3 y 4 (3 y 15 ppm): 0.492 g de 2,4-DNPH + 5 mL HClO₄ diluido en 100 mL de ACN seco.

Una vez están preparadas las diferentes disoluciones derivatizantes, se toman 9 mL de la disolución que contiene los compuestos en concentración conocida y 1 mL de la disolución derivatizante correspondiente y se lleva a agitación durante media hora. Tras esto, se filtra la disolución mediante un filtro de jeringa (PTFE, 0.2 µm) y se coloca en viales de 2 mL para introducirlos en el cromatógrafo.

• DERIVATIZACIÓN POR LA NORMA GMW 15635

En este caso, según la norma GMW 15635, la preparación del derivatizante no lleva el ácido incluido, pues este se añade directamente en la reacción de derivatización sin dilución previa. Sin embargo, al igual que con el método anterior, se preparan dos disoluciones de agente derivatizante distintas en función de la concentración de los analitos en las diluciones:

- Disolución derivatizante para las diluciones 1 y 2 (2xLOQ y cercana a 2xLOQ): 0.250 g de 2,4-DNPH en 50 mL de ACN seco.
- Disolución derivatizante para las diluciones 3 y 4 (6 y 30 ppm): 0.500 g de 2,4-DNPH en 50 mL de ACN seco.

Como se comentaba anteriormente, las disoluciones en el LOQ han de prepararse con una concentración 2xLOQ ya que se hace una dilución al 50% al añadir el agente derivatizante. Lo mismo ocurre con el resto de las disoluciones, cuya concentración debe ser el doble de la concentración preparada según las normas FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A.

Así pues, se añade 0.5 mL de la disolución con los compuestos carbonílicos de concentración conocida, 0.5 mL de la disolución con 2,4-DNPH en la concentración adecuada y 50 μ L de ácido fosfórico concentrado. La reacción, se agita vigorosamente y se deja reaccionar media hora. Posteriormente, se filtra la disolución mediante un filtro de jeringa (PTFE, 0.52 μ m) y se coloca en viales de 2 mL para introducirlos en el cromatógrafo.

3.4 Preparación de la curva de calibrado

La curva de calibrado se prepara a partir de una ampolla preparada industrialmente de los analitos recogidos en la tabla 1 ya derivatizados con una concentración de 30 μ g/mL. La curva de calibrado requerida ha de tener al mínimo 5 puntos y ser entre 0.01 y 15 ppm. Con ello se preparan las diferentes diluciones de la ampolla directamente en los viales, y en el caso de los patrones de 15 y 5 ppm se ponen en injertos.

P 15: 100 μ L ampolla + 100 μ L ACN

P 10: 200 μ L ampolla + 400 μ L ACN

P 5: 100 μ L P10 + 100 μ L ACN

P 3: 100 μ L ampolla + 900 μ L ACN

P 1: 100 μ L P10 + 900 μ L ACN

P 0.1: 10 μ L P10 + 990 μ L ACN

P 0.5: 50 μ L P10 + 950 μ L ACN

P 0.3: 30 μ L P10 + 970 μ L ACN

P 0.05: 100 μ L P 0.5 + 900 μ L ACN

P 0.01: 100 μ L P 0.1 + 900 μ L ACN

El patrón de 10 ppm no se añade como punto en la recta de calibrado, ya que no se incluye en la normativa aplicada y no es un punto necesario para la cuantificación de las muestras reales puesto que es una cantidad poco realista.

3.5 Condiciones de análisis cromatográfico.

Tanto muestras como patrones son analizados con las siguientes condiciones de análisis, las cuales permiten obtener una buena separación de las trece sustancias, así como un límite de detección igual o superior a 0.0075 µg/mL y una relación señal/ruido (S/N) superior a 10 para el patrón que es un 10% del límite especificado (requisitos de la norma GMW 15635).

- Flujo: 1 mL/min
- Columna: C18 Zorbax ODS 5µm, 4.6 x 250 mm
- Temperatura columna: 40°C
- Volumen de inyección: 20 µL
- Longitud de onda: 367 nm
- Fase móvil: Disolvente A: H₂O/ THF (72'5:27'5) Disolvente B: Acetonitrilo
- Gradiente:

Tabla 3. Gradiente del Sistema Cromatográfico

Tiempo (min)	% A	% B
0	65	35
18	65	35
23	30	70
27	65	35
30	65	35

Obteniendo como resultado de la separación el cromatograma mostrado en la figura 4, en el cual se observa un patrón a 15 ppm. Los tiempos de retención obtenidos con esta separación y que se han usado como guía para la identificación de los picos se muestran en la tabla 4 organizados en orden creciente del tiempo de retención.

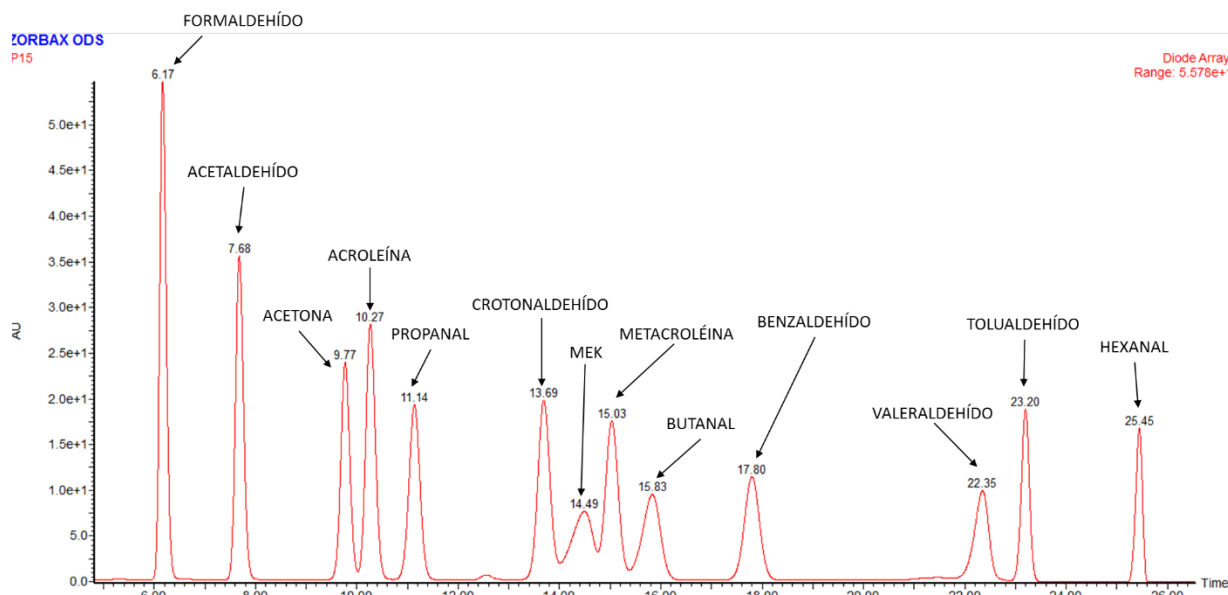


Figura 4. Cromatograma completo de un patrón a 15ppm en el cual se muestran los compuestos en su orden de elución con las condiciones cromatográficas.

Tabla 4. Tiempo de retención que se han usado de guía a lo largo del trabajo para la identificación de los compuestos.

NÚMERO	COMPUESTO	TR (min)	NÚMERO	COMPUESTO	TR (min)
1	Formaldehído	6.2	8	Metacroleína	15.0
2	Acetaldehído	7.7	9	Butanal	15.8
3	Acetona	9.7	10	Benzaldehído	17.8
4	Acroleína	10.3	11	Valeraldehído	22.3
5	Propanal	11.1	12	Tolualdehído	23.2
6	Crotonaldehído	13.7	13	Hexanal	25.4
7	MEK	14.5			

Esto en cuanto a la separación, para realizar la cuantificación se filtra a longitud de onda de 367nm, ya que es la longitud a la que es máxima la absorción de los compuestos y derivados tal y como muestra la figura 5. En el cromatograma superior se encuentra un patrón de 0.1 ppm filtrado a la longitud de onda indicada, y en el cromatograma inferior, el mismo patrón mostrando la suma de todas las longitudes de onda detectadas.

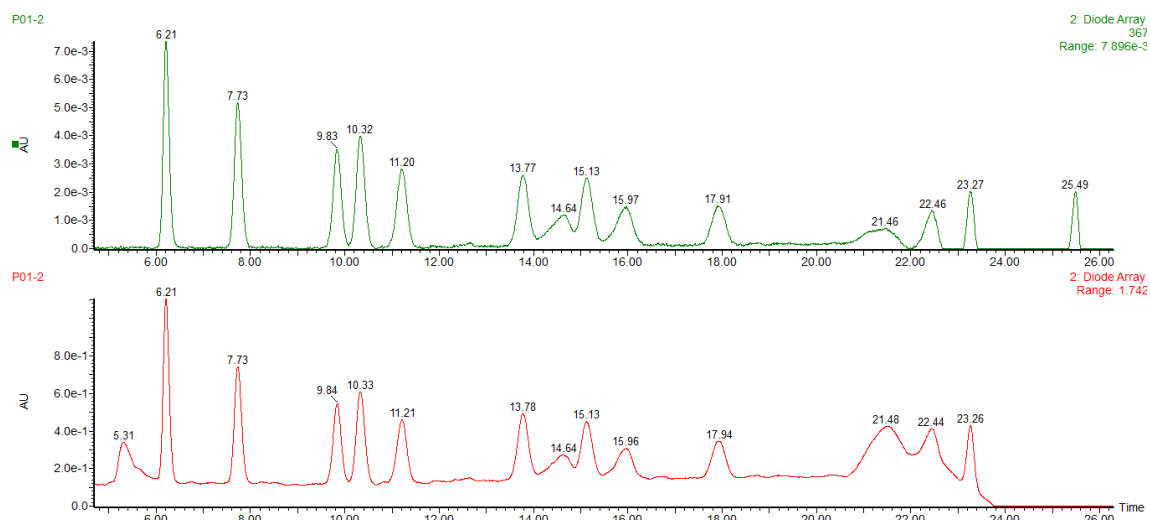


Figura 5. Cromatogramas comparativos filtrando a 367nm, cromatograma superior, y sin filtrar, cromatograma inferior.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Optimización de la separación cromatográfica.

El primer paso en la optimización de un método cromatográfico es la separación adecuada de los analitos haciendo pruebas en el gradiente, disolventes y flujo de la fase móvil. Para ello se hicieron unas primeras pruebas usando como disolventes de la fase móvil el agua y el acetonitrilo. En la figura 6 se muestran los cromatogramas donde se observa la evolución de la separación de los compuestos con la modificación de la proporción de los disolventes y el gradiente. Estas pruebas se realizaron sobre patrones de diferentes concentraciones siendo el patrón de 10 ppm el que se muestra en el cromatograma.

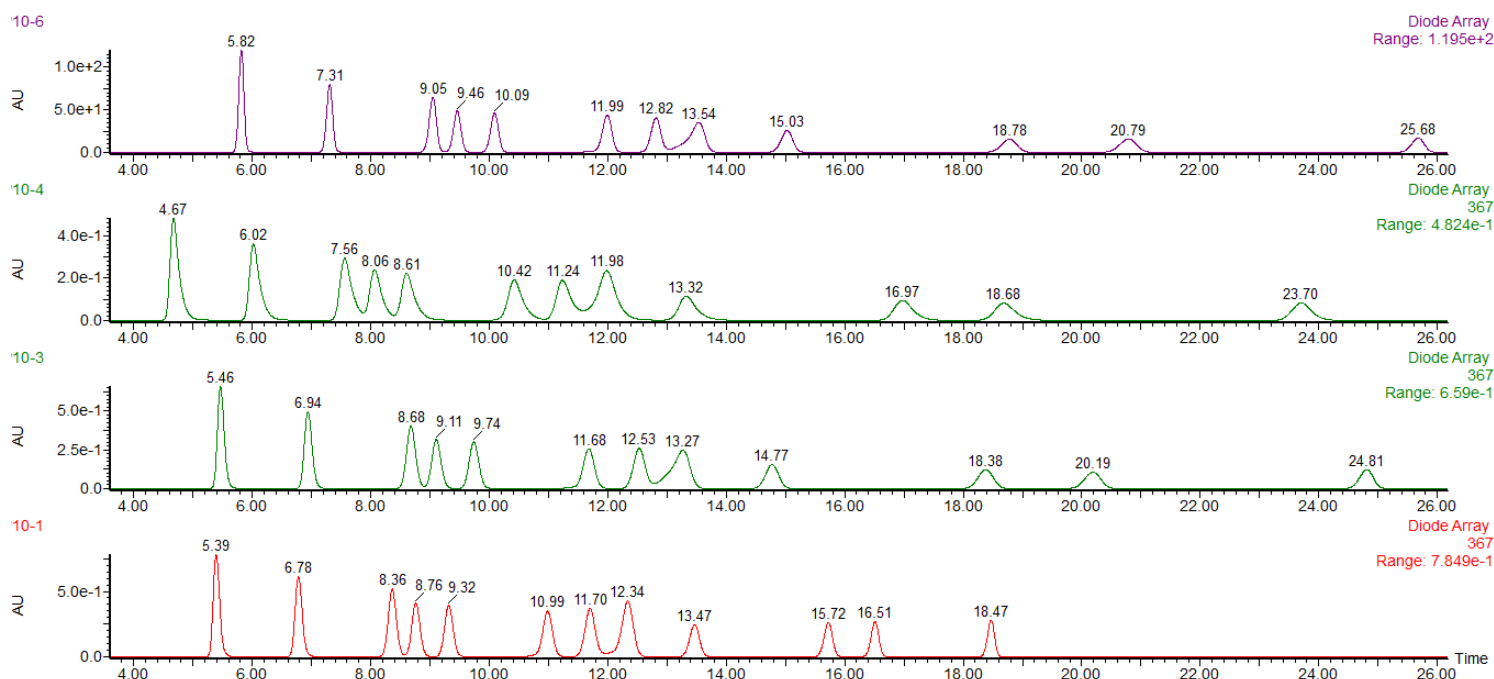


Figura 6. Cromatogramas que muestran los cambios producidos en la separación de los compuestos con la modificación de la proporción de la fase móvil y del gradiente.

Observando la figura 6, en la parte de la izquierda está el nombre del cromatograma, donde el primer número corresponde a la concentración y seguido de un guion está el número de prueba realizada. Observando esta figura, aparecen solo 12 de los 13 compuestos, ya que dos de ellos aparecen solapados, los cuales corresponden al MEK y al Butanal. En el cromatograma 10-3, en el minuto 13.27 se observa un ligero hombro donde queda de manifiesto la existencia de dicho solapamiento como se ve en la ampliación de dicho cromatograma en figura 7.

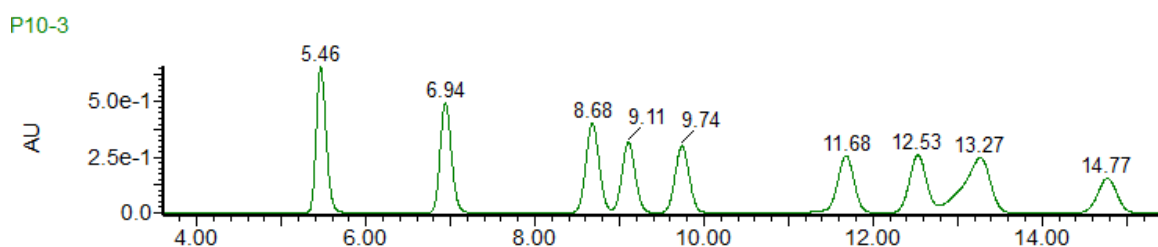


Figura 7. Ampliación de la prueba 3 a 10 ppm, donde se observa el hombro a tiempo de retención de 13.27 correspondiente al MEK y al butanal.

Tras realizar estas pruebas, se comprobó que la mezcla de agua y acetonitrilo no consigue separar de manera satisfactoria los 13 picos. Para intentar separar estos compuestos se quiso probar a hacer una mezcla de 3 disolventes, cambiando la polaridad del agua con otro disolvente orgánico de menor polaridad que el acetonitrilo, como puede ser el tetrahidrofurano (THF), consiguiendo así modificar la fuerza eluotrópica de la fase móvil. Se hizo una primera prueba poniendo una mezcla de agua:THF en una proporción 70:30 en un canal y acetonitrilo en otro canal y se estudiaron diferentes gradientes y flujos. Como esta proporción no fue satisfactoria, se realizaron pruebas con el mismo gradiente y flujo, pero cambiando la proporción de THF. Estas modificaciones se pueden comprobar en la figura 8a donde se encuentra el cromatograma completo y la figura 8b donde aparece la zona ampliada de los compuestos que se busca separar.

En la figura 8a se muestran los cromatogramas de las pruebas 14, 16, 17 y 19, siendo la prueba 14 con la proporción agua:THF comentada anteriormente. La prueba 16 muestra una mezcla 75:25 con el mismo gradiente que la prueba 14, mientras que las medidas 17 y 19 se observa las separaciones producidas por las proporciones 75:25 y 72,5:27,5, respectivamente.

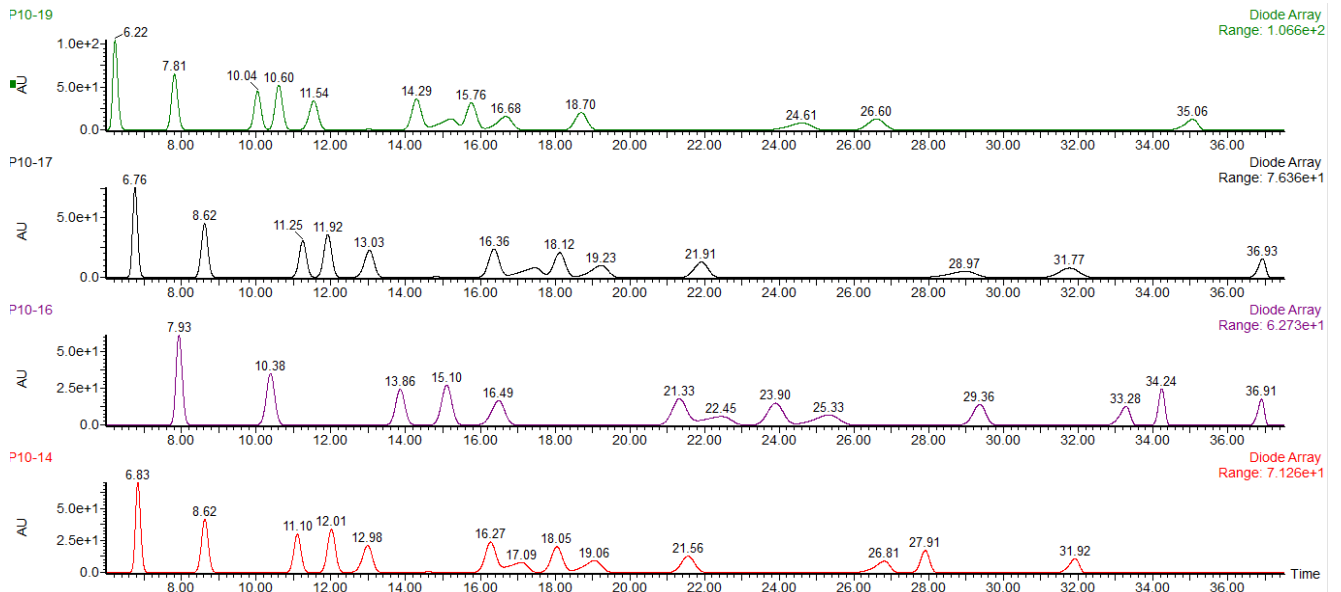


Figura 8a. Cromatograma completo de las pruebas 14, 16, 17 y 19 a 10ppm, donde se han probado diferentes gradientes y flujos con una mezcla de agua:THF 70:30 en un canal con acetonitrilo en el otro canal

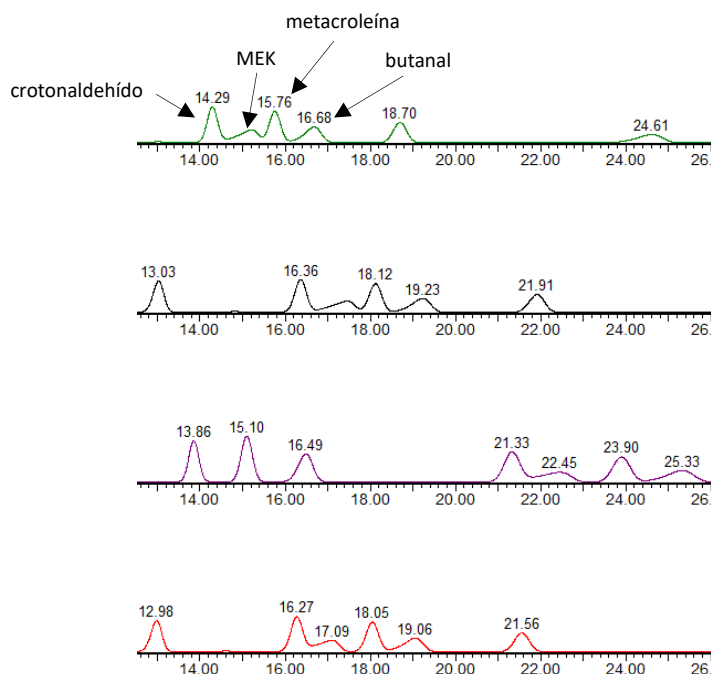


Figura 8b. Ampliación de los cromatogramas correspondientes a las pruebas 14, 16, 17 y 19.

En esta misma línea se realizó la prueba número 15, con una proporción agua:THF 65:35, cuya separación queda reflejada en la figura 9.

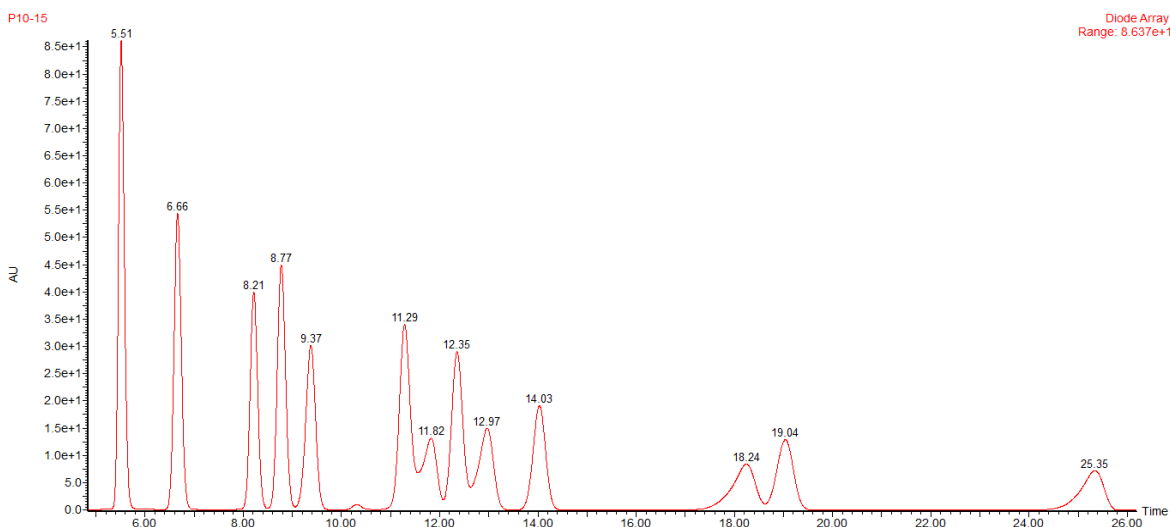


Figura 9. Cromatograma que muestra la separación de la prueba 15, realizada con una proporción agua:TFH 65:25.

A pesar de que la separación de los picos de interés mostrados en la figura 8b es muy similar en todas las proporciones probadas, se debe resaltar que el hombro que antes era el MEK solapado con el butanal, introduciendo el THF con el agua, aparece entre el crotonaldehído y la metacroleína. Por otro lado, observando el tiempo de análisis y la separación del resto de compuestos elegimos la separación proporcionada por la mezcla de agua:THF 72,5:27,5, correspondiente a la prueba 19. Elegida ya la mezcla de disolventes adecuada para la correcta separación de los picos, se realizaron distintas pruebas de gradientes para intentar mejorar el tiempo de análisis. Se consiguió que el último pico del cromatograma, el hexanal, cambiara su tiempo de retención del minuto 36 al 25. En la figura 10 se muestra la comparativa de los cromatogramas correspondientes a las pruebas de gradiente 19, 20 21 y 22 con la mezcla de agua:THF decidida.

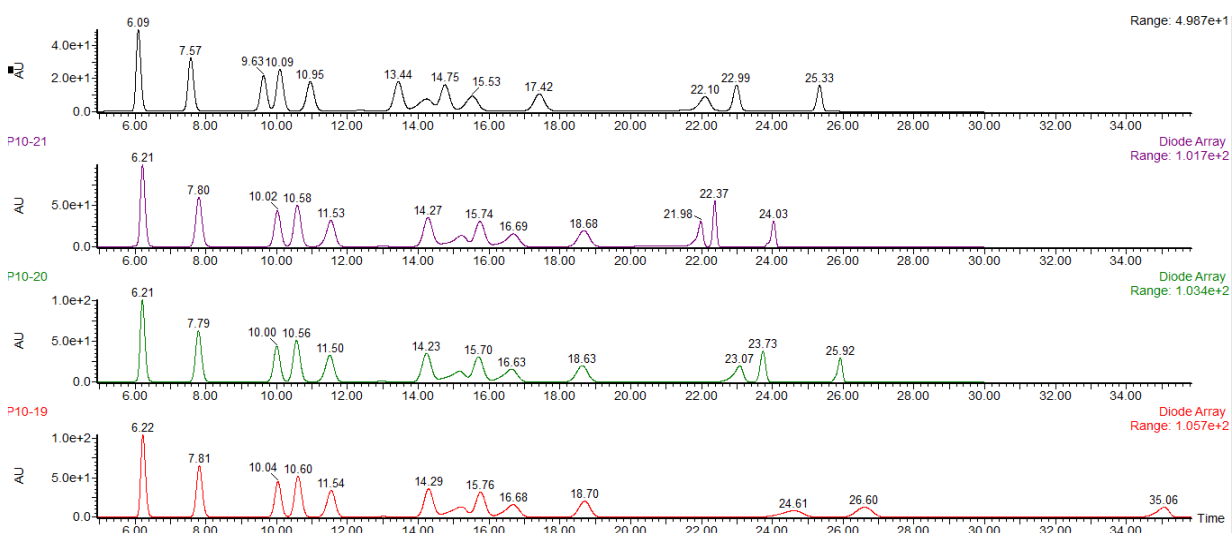


Figura 10. Cromatogramas que representan diferentes gradientes para la mezcla de agua:THF (72,5:27,5)

En estos ensayos se hicieron diferentes pruebas de gradiente y rampas de los dos canales usados, teniendo en el canal A, la mezcla de agua:THF (72,5:27,5) y en el canal B el acetonitrilo.

El gradiente elegido corresponde al cromatograma de la prueba 22, que es el cromatograma superior de la figura 10, y se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Gradiente elegido como el adecuado para los 13 compuestos.

Tiempo (min)	% A	% B
0	65	35
18	65	35
23	30	70
27	65	35
30	65	35

4.2. Determinación del LOQ y LOD de los diferentes compuestos.

A la hora de validar un método analítico, la determinación del límite de cuantificación y de detección es un aspecto muy importante. El límite de detección puede definirse como la cantidad más pequeña de un compuesto que se puede detectar mediante un método determinado, y el límite de cuantificación como la cantidad más pequeña que se puede cuantificar. Aunque existen diferentes métodos para la determinación de ambos límites, en este caso se determinó teniendo en cuenta la relación señal/ruido (S/N).

El límite de detección se calcula como la concentración de analito que proporciona una señal con una relación S/N de 3 y el límite de cuantificación de 10. Teniendo en cuenta esto, se ha determinado el LOD y el LOQ para los 13 compuestos.

Tabla 6. Límites de detección y de cuantificación de los compuestos mediante el método estudiado.

	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Formaldehído	0,02	0,05
Acetaldehído	0,03	0,1
Acroleína	0,04	0,1
Acetona	0,03	0,1
Propanal	0,05	0,2
Crotonaldehído	0,05	0,2
2-butanona	0,08	0,3
Metacroleína	0,05	0,2
Butanal	0,09	0,3
Benzaldehído	0,1	0,3
Valeraldehído	0,08	0,3
Tolualdehído	0,06	0,2
Hexanal	0,05	0,2

De este modo se ha calculado el LOQ y LOD del análisis cromatográfico. Para poder determinar el LOQ y LOD en la determinación de dichos compuestos en el material plástico, hay que tener en cuenta la masa de la probeta utilizada para realizar el ensayo, la cantidad de agua introducida en el bote de HLPE donde se ha suspendido la probeta, la alícuota tomada para el ensayo y el volumen de disolución derivatizante utilizada para derivatizar dicha alícuota.

Por ejemplo, en el caso del formaldehído donde el LOQ es 0.05 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$), si tenemos en cuenta una masa de probeta de 10 gramos, un volumen de agua de 50 mL, una alícuota de 9 mL y 1 mL de agente derivatizante, el LOQ es de 0.3 ppm ($\mu\text{g}/\text{g}$).

$$LOQ (\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{0,05 \cdot (9 + 1) \cdot 50}{9 \cdot 10} = 0,3 \mu\text{g}/\text{g}$$

4.3. Validación del método analítico mediante preparación de disoluciones de concentración conocida

Debido a la imposibilidad de obtener material polimérico con cantidades conocidas y en diferentes concentraciones de los compuestos estudiados para poder validar el método, se procedió a preparar disoluciones con cantidades conocidas de los diferentes compuestos (salvo de la acroleína, que como ya se ha comentado no podía suministrarse). Se prepararon, por tanto, disoluciones con concentración próxima al LOQ (para el caso GMW 15635, como ya se ha comentado, $2 \times \text{LOQ}$), dos puntos intermedios de la curva de calibrado y 15 ppm (para el caso de GMW 15635, 30 ppm), que según indican ambas normas, es el punto más concentrado que ha de prepararse para la curva de calibrado.

• VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO SEGÚN FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A

Como ya se ha adelantado en el apartado 3.4.2, se prepararon disoluciones individuales de cada compuesto con una concentración de 1000 ppm, en primera instancia se hicieron en agua, a excepción del hexanal, valeraldehído y Tolualdehído, que se hicieron en acetonitrilo, ya que en agua no son solubles. Posteriormente, se hicieron mezclas con los diferentes compuestos a diferentes niveles de concentración, como ya se ha comentado, en el LOQ, dos puntos intermedios de la curva de calibrado y otra con la concentración más elevada de la curva de calibrado. Las mezclas de compuestos que se prepararon fueron las siguientes:

MIX 1: Formaldehído, MEK, Valeraldehído y p-Tolualdehído.

MIX 2: Acetaldehído, Crotonaldehído, Metacroleína y Hexanal.

MIX 3: Propanal, Butanal y Benzaldehído.

MIX 4: Acetona

Las disoluciones preparadas, así como los blancos de procedimiento (ACN al que no se le ha añadido ninguno de los compuestos), fueron sometidas a la reacción de derivatización. Para ello, se preparó la disolución derivatizante con la concentración descrita en el apartado 3.4.2 para las disoluciones 1 y 2, que es la que describen las normas a estudiar (0.123 g de 2,4-DNPH + 1.25 mL HClO_4 diluido en 100 mL de ACN).

Una vez preparada la disolución con el agente derivatizante y el ácido, se tomaron 9 mL de las disoluciones de cada uno de los mixes y de las diferentes concentraciones de cada uno de ellos, y se añadió a cada una de ellas 1 mL de la disolución con el agente derivatizante y el ácido. Después de agitar durante media hora, la mezcla se filtró e inyectó en el sistema cromatográfico tal y como se indica en la parte experimental (apartado 3.5).

En todos los casos, pero sobre todo a niveles más altos de concentración se encontró que las recuperaciones eran muy bajas. Se probó a llevar a cabo la reacción de derivatización durante más tiempo, incluso a calentar, o aplicar ultrasonidos, para favorecer la reacción de derivatización, pero el resultado fue similar. Sin embargo, después de realizar los cálculos oportunos, determinando el número de moles de compuesto carbonílico en las disoluciones, así como la cantidad de agente derivatizante y ácido, se encontró que en las disoluciones más concentradas, la cantidad de DNPH y ácido perclórico eran insuficientes, por lo que en las sucesivas pruebas, se añadió más cantidad de agente derivatizante y ácido para poder llevar a cabo la reacción (0.492 g de 2,4-DNPH + 5 mL HClO₄ diluido en 100 mL de ACN).

Después de llevar a cabo esta corrección, aunque los resultados mejoraron, aún se seguían obteniendo valores muy bajos de recuperación. Se encontró que, en todos los casos, incluso en los blancos, se encontraba la presencia de un pico con el mismo tiempo de retención que el compuesto derivatizado de la acetona, tal y como se observa en la figura 11. Este pico estaba presente incluso en las disoluciones que no contenían acetona. Se pudo confirmar, superponiendo el espectro de absorbancia de esta sustancia con el del compuesto derivatizado de la acetona, que el compuesto se trataba en efecto de acetona derivatizada. La presencia de acetona no solo interfiere en los resultados de recuperación de la acetona, que hace que los valores de recuperación sean superiores al 100%, sino que, por tratarse de un compuesto carbonílico, consume parte del agente derivatizante y ácido necesario para derivatizar el resto de los compuestos.

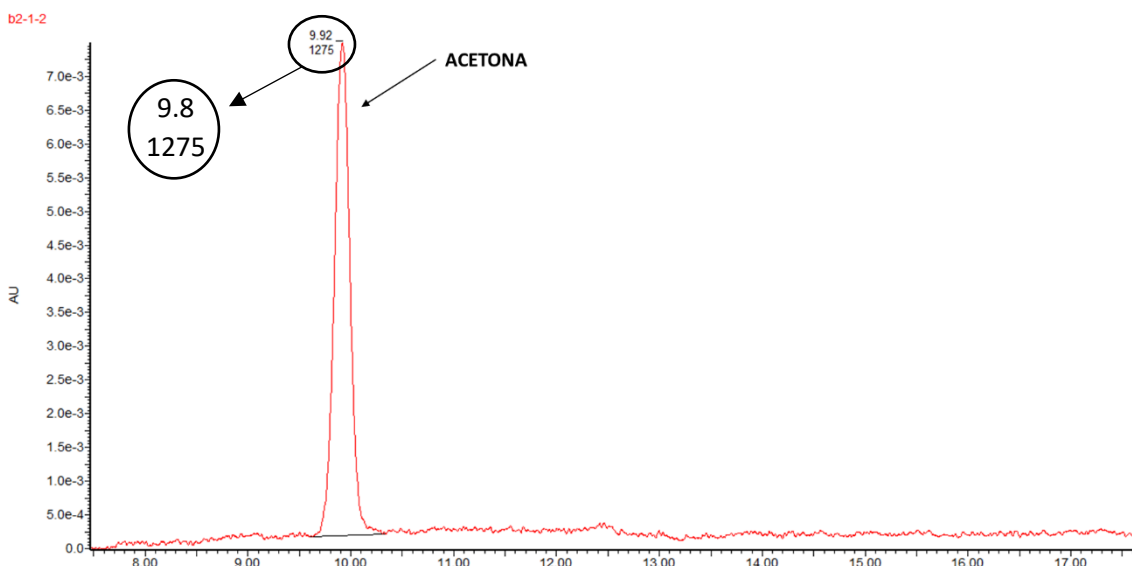


Figura 11. Cromatograma que muestra el blanco de procedimiento, donde se observa el pico de la acetona derivatizada como interferente

Debido a que esta interferencia estaba presente también en el blanco de procedimiento, se descartó que pudiera proceder de alguna traza de contaminación de alguno de los compuestos. Por lo tanto, solo podía proceder, del ACN, del ácido, del agente derivatizante y del material de

vidrio del laboratorio puesto que el material se lava con agua destilada y posteriormente con acetona.

De hecho, comparando las áreas del banco de procedimiento de la figura 11 (1275) con el área de este mismo compuesto del mix 3 (273) o del propio mix 4 (886) que solo contiene acetona, figura 12. Se puede observar que el área correspondiente a la acetona es bastante superior en el blanco de procedimiento a la existente en la propia disolución que solo contiene acetona, que corresponde al mix 4 en la parte inferior de la figura 9b. También se puede observar que, a pesar de que, en el mix 3 tampoco se añade acetona como analito, también se detecta, aunque con un área bastante inferior a la recogida en el blanco de procedimiento. Tanto en el mix 3 como en el 4, los cromatogramas mostrados son los correspondientes a la concentración 2, en el caso de la acetona corresponde a 0.5 ppm. Con todo ello, se deduce que el área detectada en el blanco de procedimiento corresponde a una cantidad superior a 0.5 ppm.

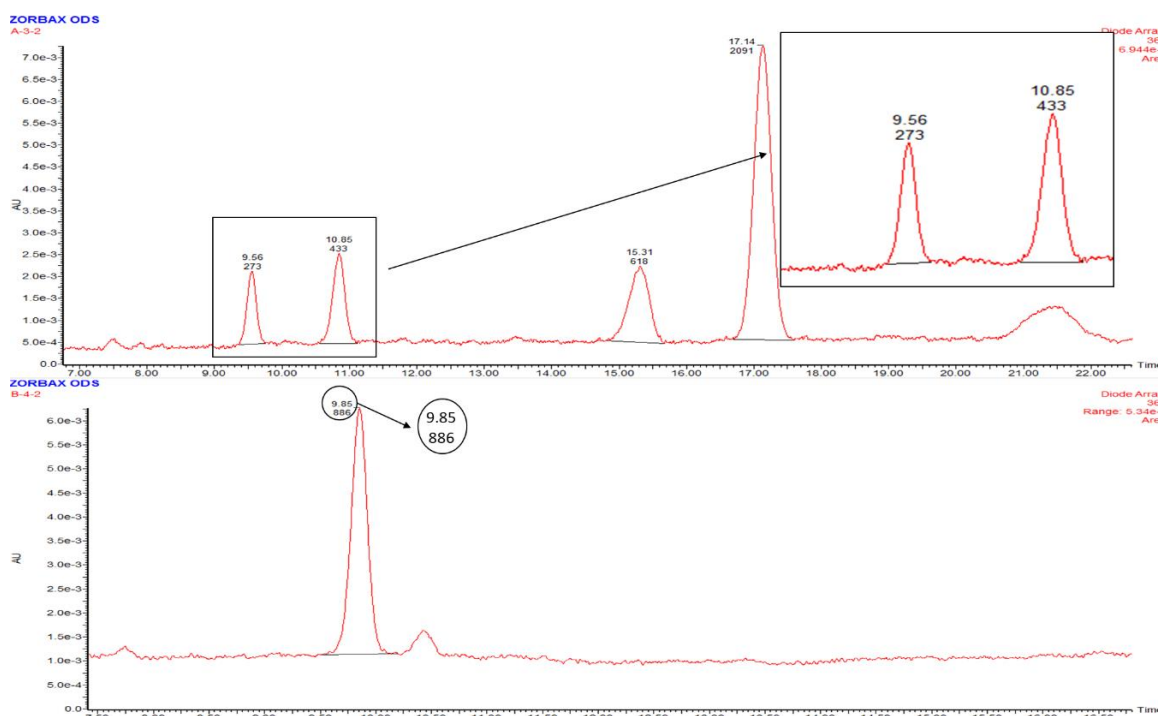


Figura 12. Cromatograma del mix 3 en la parte superior y el mix 4 en la parte inferior.

Para evitar contaminación debida al material de laboratorio, todo el material de vidrio se lavaba con agua destilada, posteriormente con etanol y se colocaba una hora en una estufa con una temperatura no superior a 60°C para asegurar que el material estuviera bien seco antes de su utilización.

Una vez hecho esto, como todavía se seguía observando la presencia del pico debido a la derivatización de la acetona, se realizaron diferentes blancos de procedimiento utilizando agua y acetonitrilo como matriz, en las dos cantidades de derivatizante y con los dos ácidos (perclórico y fosfórico, para poder descartar si podía proceder del ácido), tal y como se muestra en la tabla 7. Las cantidades de derivatizante utilizadas quedan recogidas en 1, la cantidad más pequeña, y 2 la más grande. Por otro lado, el método queda indicado añadiendo una P detrás del valor asignado a la cantidad del derivatizante, cuando se trata del método en el cual se usa el ácido fosfórico.

Tabla 7. Quedan recogidas todas las combinaciones de derivatizante en acetonitrilo y agua con los dos métodos de derivatización.

ACN + Derivatizante 1	H ₂ O + Derivatizante 1
ACN + Derivatizante 2	H ₂ O + Derivatizante 2
ACN + Derivatizante 1P	H ₂ O + Derivatizante 1P
ACN + Derivatizante 2P	H ₂ O + Derivatizante 2P

A continuación, se muestran algunos de los cromatogramas de las pruebas realizadas comparando en la figura 13 los cromatogramas de agua en la parte superior en contraposición con el acetonitrilo en la parte inferior, ambos cromatogramas muestran el derivatizante más concentrado. Como puede observarse, en ambos casos, se observa la presencia de la acetona derivatizada.

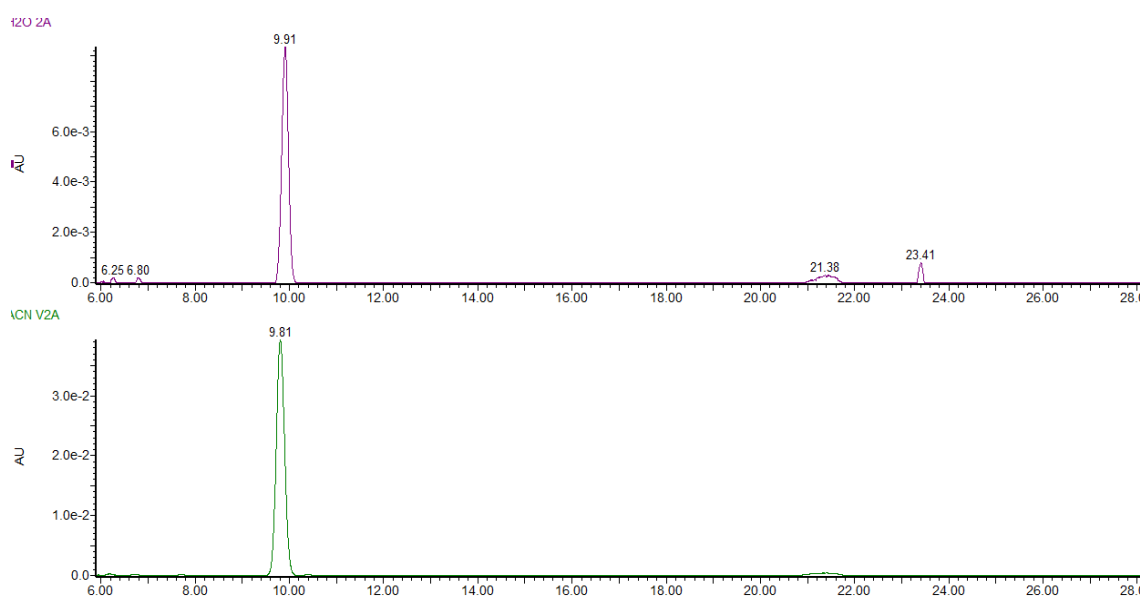


Figura 13. Cromatogramas de las pruebas de blancos de procedimiento. Ambos corresponden a la cantidad más alta de derivatizante, el cromatograma superior corresponde al blanco con agua, y el de abajo con acetonitrilo.

Por otro lado, en la figura 14 se muestra la comparativa de los dos métodos de derivatización, en la parte superior, encontramos el método del ácido perclórico y en la parte inferior el método del ácido fosfórico, ambos con la cantidad más pequeña de derivatizante. Se puede comprobar que con el método del ácido perclórico el área de la acetona es más pequeña, ya que el ruido de la línea base se ve con más claridad en el cromatograma superior.

Con estas pruebas, se descartó que la acetona pudiera proceder del ácido, pues se observaba en ambos casos. También se descartó que pudiera proceder de la matriz, pues se observaba tanto en agua como en acetonitrilo. Debido a que no se pudo determinar cual era la procedencia de la acetona como contaminante, solo se pudo asegurar que el material de vidrio no tuviera ninguna traza, lavando el material con etanol y secándolo posteriormente en la estufa.

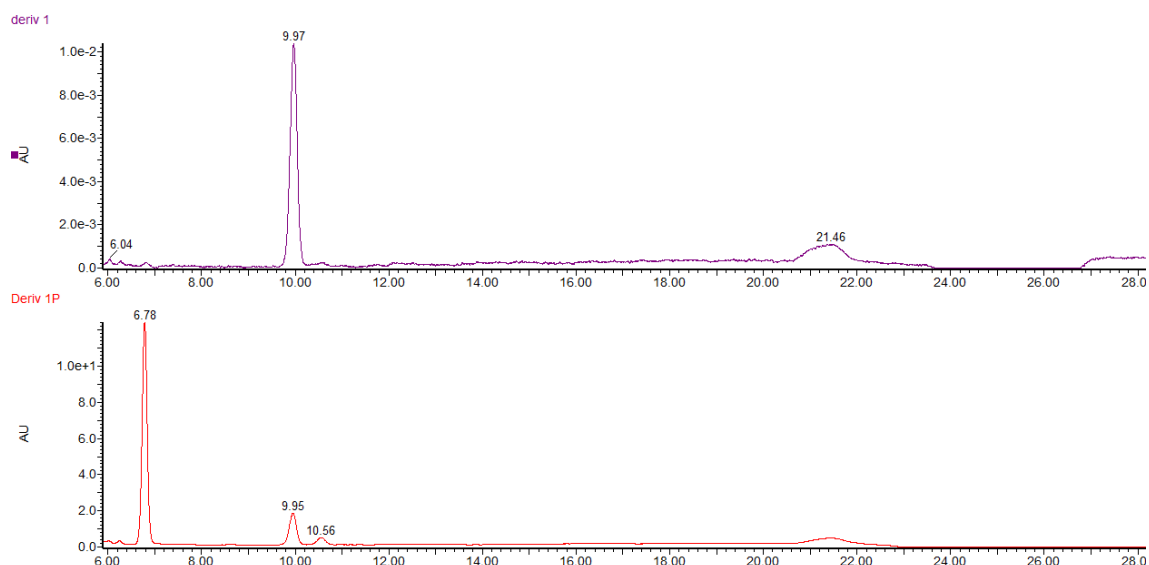


Figura 14. Cromatogramas que muestran una comparativa entre los dos métodos estudiados, en la parte superior el método del ácido perclórico y la parte superior el ácido fosfórico.

Por otra parte, y después de tomar todas estas precauciones, la recuperación de los compuestos, a todos los niveles de concentración seguían siendo bajas (salvo para la acetona, que debido a la interferencia, se obtenían valores muy altos). Hasta ahora se habían hecho las disoluciones madre de los diferentes compuestos con agua Milli-Q para reproducir la situación real del ensayo, excepto unos pocos que no eran solubles (hexanal, tolualdehído y valeraldehído) y se disolvían en acetonitrilo. De hecho, estos compuestos se tuvieron que desechar, debido a que se estropearon con el ambiente, observándose la formación de un precipitado en algunos casos. Entonces se estudió la posibilidad de que los analitos estuvieran reaccionando con la humedad o el aire, o con el agua en la que se disolvía mediante la siguiente reacción, figura 15, formando gen-dioles.

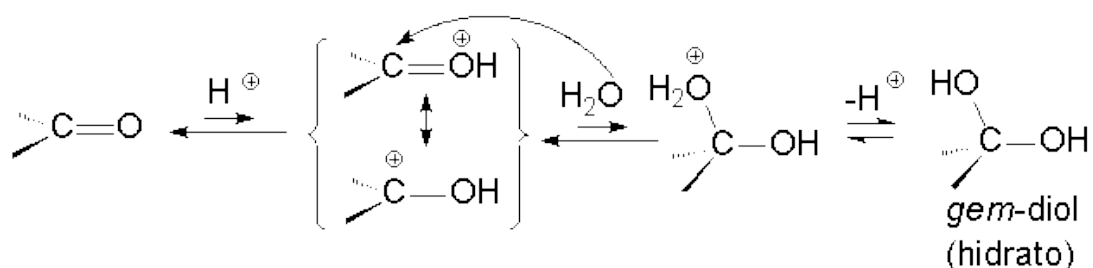


Figura 15. Reacción de los carbonilos con agua en medio ácido.

Por otro lado, los aldehídos son fácilmente oxidados al correspondiente ácido carboxílico por la mayoría de los agentes oxidantes, incluso por el oxígeno del aire, por lo que no es descartable que en los recipientes tuviéramos una mezcla de gem-dioles, ácidos y aldehídos.

Por ello, de manera preventiva se pidieron de nuevo todos los reactivos por si hubiera alguna contaminación y se probó a realizar todas las disoluciones madre de 1000 ppm, así como los diferentes mixes y diluciones, en acetonitrilo anhidro (al que se añadió previamente tamiz molecular).

Un tamiz molecular es un material que contiene poros pequeños de un tamaño preciso y uniforme que se usa como agente adsorbente para gases y líquidos. Las moléculas que son lo suficientemente pequeñas para pasar a través de los poros son absorbidas, mientras que las moléculas mayores no. A diferencia de un filtro, el proceso opera a nivel molecular. Por ejemplo, una molécula de agua puede ser lo suficientemente pequeña como para pasar a través de los poros mientras que las moléculas más grandes no lo son, por lo que el agua es forzada a pasar por los poros que actúan como una trampa para las mismas, que se mantienen dentro de los poros. Debido a esto, a menudo funcionan como un desecante. Un tamiz molecular puede adsorber el agua hasta el 22% de su propio peso [25].

En este proyecto se hizo uso del tamiz molecular para absorber el agua presente en el acetonitrilo y de este modo, evitar la degradación de los analitos. Para este fin, el tamaño de poro más ampliamente usado es el de 3 Å, cuyos principales usos es como agente desecante de uso general en medios polares y no polares, y como secado de líquidos polares como el metanol o el etanol [26]. También se hizo uso de un desecante con tamaño de poro de 5 Å, ya que no se disponía de suficiente cantidad con el tamaño de poro de 3 Å, aunque la función es la misma. En la figura 16 queda recogida una comparativa de los dos tamices moleculares usados en este proyecto, a la izquierda el tamiz molecular de 5 Å, y a la derecha el tamiz molecular de 3 Å.



Figura 16. Tamices moleculares, de tamaño de poro distinto, el de la izquierda es de 5 Å y el de la derecha de 3 Å.

La gran ventaja de los tamices moleculares es que son reutilizables, es decir, cuando ya ha quedado retenido toda el agua de un disolvente lo puedes regenerar y volver a utilizarlo. La regeneración o activación de un tamiz molecular es la restauración de su capacidad original y puede llevarse a cabo de diferentes maneras, la más usada es la reactivación térmica. Esta técnica consiste en introducir el tamiz molecular en la mufla sin superar los 300°C, ya que es la temperatura máxima que a la cual la sílice de la que se compone es estable; durante el tiempo suficiente para que el agua retenida en el tamiz se evapore por completo de los poros. El proceso de activación es lento y lo más recomendable es dejarlo a alta temperatura mínimo entre 3 o 4 horas, aunque para aprovechar mejor el tiempo, en este proyecto se ha dejado como normal general toda la noche para tener el tamiz listo por la mañana.

Por otro lado, para que el tamiz absorba el agua contenida en el disolvente también es requerido cierto tiempo. El tiempo necesario para este fin va a depender de varios factores, que van a ser la cantidad de disolvente que se quiere desecar y la cantidad de tamiz utilizada por ello; cuanto más disolvente se quiera desecar, será necesario más tiempo para asegurar que el tamiz absorba toda la cantidad de agua para la que tiene capacidad, en la figura 17 se muestra

una botella mientras que se está secando el ACN con el tamiz molecular de 3 Å. Tras este tiempo, el disolvente, en este caso el acetonitrilo se filtra o se decanta, y el tamiz molecular se mete en la mufla para poder reutilizarlo. En este proyecto, el tiempo requerido para que el tamiz molecular absorba el agua, con la proporción tamiz molecular-ACN que se observa la imagen, ha sido de 18 horas.



Figura 17. Ejemplo de cómo se secaba el acetonitrilo con el tamiz molecular de 3 Å.

Teniendo como objetivo observar el pico de la acetona en un blanco de procedimiento utilizando el ACN anhidro, se hace la comparativa de este último con otro blanco sin hacer uso del disolvente tratado, obteniendo la figura 18. En la parte superior de la figura, se encuentra el cromatograma de un blanco de procedimiento usando ACN sin tratar como disolvente, y en el cromatograma inferior se hizo uso del ACN anhidro. El uso del tamiz molecular ha producido una significativa disminución del pico de la acetona en los blancos, ya que, tal y como se puede observar en la figura 18, en el cromatograma del ACN tratado la línea base es más intensa en

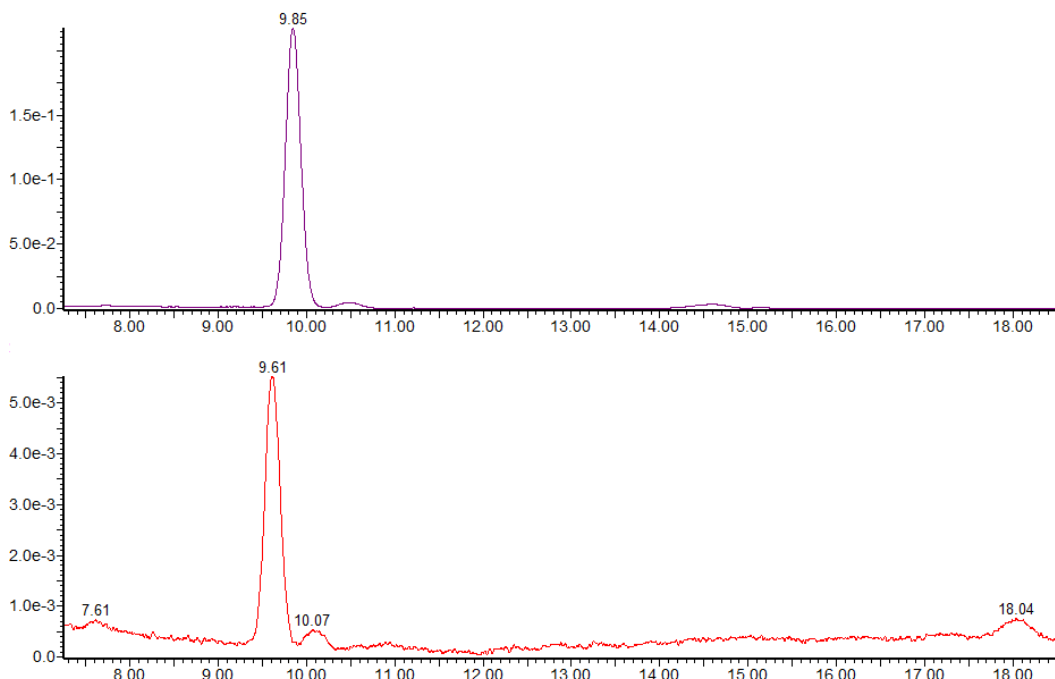


Figura 18. Comparativo de dos cromatogramas de blancos de procedimiento para observar el comportamiento de la acetona como contaminante. En la parte superior se ha usado como disolvente ACN, y en la parte de abajo ACN anhidro.

comparación con el pico que del cromatograma superior. Con ello, a pesar de que no se ha conseguido eliminar por completo el pico, se pudo considerar que su área era estable y, por lo tanto, se podría restar el área obtenida en los blancos de procedimiento a las disoluciones que contienen la acetona.

En este punto, para asegurar que la totalidad de los compuestos presentes en las diferentes disoluciones, sobre todo en las concentraciones altas, son detectados, y, por tanto, derivatizados; se procedió a realizar la derivatización por parejas. Dejando las diferentes disoluciones de la manera siguiente:

MIX 1: Formaldehído y Acetaldehído;

MIX 2: Acetona y MEK;

MIX 3: Benzaldehído y Metacroleína;

MIX 4: Propanal y Crotonaldehído;

MIX 5: Butanal y Valeraldehído, y

MIX 6: Tolualdehído y Hexanal.

Por lo tanto, para poder llevar a cabo el proceso de validación del método se han de tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La cantidad de agente derivatizante y ácido deben ser aumentadas para las disoluciones donde los analitos se encuentren en una concentración más elevada.
- El material de vidrio ha de lavarse con etanol y secarse en la estufa durante al menos una hora para evitar contaminación de acetona.
- Las disoluciones han de prepararse en acetonitrilo anhidro (al que se añadió tamiz molecular activado durante 4 horas a 300°C en la mufla).

Teniendo en cuenta estas premisas, se llevó a cabo la validación del método, obteniendo los resultados que se recogen en la siguiente tabla. Para el cálculo se ha tenido en cuenta la dilución 9:1 que se produce al añadir la disolución de agente derivatizante y ácido a las diferentes disoluciones de los analitos.

Tabla 8. Resultados de las recuperaciones obtenidas para la metodología aplicada con las normas FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A.

Compuesto	LOQ	P1 (0,5 ó 1 ppm)	3 ppm	15 ppm
Acetaldehído	94%	91%	91%	91%
Acetona	<99%	80%	97%	92%
Benzaldehído	98%	98%	90%	89%
Butanal	94%	>99%	>99%	>99%
Crotonaldehído	96%	83%	94%	86%
Formaldehído	99%	93%	95%	85%
MEK	86%	99%	99%	90%
Metacroleína	96%	88%	91%	89%
Propanal	97%	93%	88%	91%
Tolualdehído	>99%	>99%	>99%	>99%
Valeraldehído	>99%	92%	98%	94%

Después de llevar a cabo estas precauciones, en el blanco de procedimiento y en los mixes que no contenían acetona como analito, apenas se observaba la presencia de acetona como contaminante tal y como se observa en la figura 18. En el caso del mix con acetona, se restó el área obtenida en el blanco de procedimiento para esta interferencia a las áreas obtenidas en cada una de las disoluciones preparadas con acetona, para realizar el cálculo de la recuperación.

Debido a que en el momento de redacción de esta memoria no se había recibido el hexanal, no han podido añadirse los resultados a la tabla anterior. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el resto de los compuestos, que en todos los casos el valor obtenido de recuperación supera el 80%, suponemos que tanto el hexanal, como la acroleína, van a comportarse de la misma manera.

No obstante, para poder dar como concluida la validación del método, faltaría llevar a cabo al menos otras 3 repeticiones.

• VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO SEGÚN GMW 15635

Como se ha comentado en el apartado 3.4.2, debido a que en este método se hace una dilución 1:1 para llevar a cabo la reacción de derivatización, todas las disoluciones se han preparado con el doble de concentración que las disoluciones preparadas para la validación por las normas anteriores. En este caso, para la reacción de derivatización, se toma 0.5 mL de la disolución a analizar, 0.5 mL de la disolución derivatizante (0.250 g de 2,4-DNPH en 50 mL de ACN) y 50 µL de ácido fosfórico concentrado.

De nuevo, se estudió la cantidad de moles necesarios de 2,4-DNPH, así como de ácido para llevar a cabo la reacción de derivatización en los diferentes niveles de concentración de los analitos a estudiar. Aunque los moles añadidos de ácido eran suficientes, de nuevo hubo que aumentar la concentración de la disolución de 2,4-DNPH ya que, para las disoluciones más concentradas, ya que la cantidad de derivatizante era insuficiente (0.500 g de 2,4-DNPH en 50 mL de ACN).

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 9. Tabla resumen de los resultados de las recuperaciones mediante la metodología basada en la norma GMW 15635

Compuesto	2xLOQ	P1 (2 ppm)	6 ppm	30 ppm
Acetaldehído	80%	73%	121%	68%
Benzaldehído	119%	86%	89%	54%
Butanal	39%	87%	86%	82%
Crotonaldehído	34%	22%	18%	17%
Formaldehído	143%	95%	92%	83%
Hexanal	81%	73%	69%	66%
MEK	92%	83%	85%	78%
Metacroleína	161%	92%	85%	85%
Propanal	174%	81%	84%	80%
Tolualdehído	91%	81%	80%	49%
Valeraldehído	81%	78%	66%	61%

Con respecto a los resultados reflejados en la tabla 9, a pesar de que con este método las recuperaciones son mejores que en una primera instancia con el método anterior, son mejorables. Con ello, este método se realizó con los reactivos antiguos, por lo que puede que algunos o todos los reactivos estuviesen contaminados, en consecuencia, la cantidad introducida para realizar las madres no era real. Por otro lado, las disoluciones madres de 1000 ppm estaban preparadas en agua, a excepción del hexanal, tolualdehído y valeraldehído. Por otro lado, estas derivatizaciones no se llevaron a cabo haciendo uso del ACN anhidro, este es el motivo por el cual la acetona no está incluida en la tabla anterior. Pese a ello, las recuperaciones de la mayoría de los compuestos estudiados son bastante buenas (≥ 75 -80%), a excepción del Crotonaldehído cuyas recuperaciones no superan el 35%. Con todo esto, se ha de tener en cuenta que las disoluciones que se derivatizan en este método son los 4 mixes diferentes, en los cuales puede haber hasta 4 compuestos. De modo que, hay más cantidad de analito para derivatizar que en el caso por el cual hemos optado para validar el método, en el que se realizan las derivatizaciones por parejas en 6 mixes diferentes. Todo esto, afecta en mayor o menor medida a las buenas recuperaciones y a la reproducibilidad de las mismas en los compuestos de estudios.

Para poder llevar a cabo la validación de este método en los 12 compuestos estudiados se debe preparar las madres de 1000 ppm en ACN anhidro, tal y como se ha hecho en el método anterior, y realizar las replicar pertinentes para ello.

4.4. Validación del método analítico por comparación con otro método.

Como se ha comentado en la introducción, existen métodos específicos para la determinación de formaldehído en materiales plásticos destinados al interior del vehículo. Algunas de las normas utilizadas para su determinación son, por ejemplo, las normas VDA 275, PV 3925 o VCS 1027,2739. En este caso, la exposición de la muestra es similar a las normas con las que hemos trabajado en este proyecto, pero la determinación se lleva a cabo mediante espectrofotometría UV y la reacción de derivatización, utilizando acetilacetona como agente derivatizante mediante la reacción de Hantzsch, cuyo esquema se observa en la figura 19. En este sentido, el laboratorio de AIMPLAS está acreditado por ENAC para la determinación de formaldehído mediante la aplicación de estas normas.

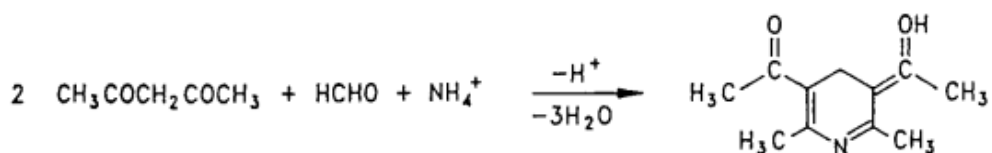


Figura 19. Esquema de la reacción de Hantzch mediante la cual se realiza la derivatización del formaldehído por las normas VDA 275 y PV3925.

Para poder valorar la efectividad del método analítico desarrollado en este proyecto, se analizó el formaldehído emitido por dos muestras reales, y analizadas previamente en el laboratorio de AIMPLAS por personal cualificado para realizar el ensayo según la norma VDA 275, mediante la norma FLTM BZ 156-01.

Para ello, tal y como se ha comentado en la parte experimental (apartado 3.3), se han de cortar las muestras en unas dimensiones específicas y suspender en un bote de HDPE que contiene 50 mL de agua Milli-Q. Pasado el tiempo de exposición en la estufa (3 horas a 60°C) se toman 9 mL de la disolución y se lleva a cabo la reacción de derivatización según las condiciones descritas para la norma FLTM BZ 156-01 del apartado 3.4.

En la siguiente tabla 10 se muestran los resultados obtenidos por el laboratorio de AIMPLAS aplicando la norma VDA 275 y, por tanto, la derivatización con acetilacetona, y los resultados obtenidos aplicando la norma FLTM BZ 156-01 utilizando 2,4-DNPH como derivatizante y ácido perclórico.

Tabla 10. Tabla comparativa de los resultados de formaldehídos en muestras reales de los métodos aplicados según las normas VDA275 y FTLM BZ 156-01, para a validación de este último.

Muestra	ppm formaldehido s/n VDA 275	ppm formaldehido s/n FLTM BZ 156-01
18/0267/3	11,9	11,7
18/0267/13	7,4	6,8

Aunque esta comparativa nos ha permitido comparar la emisión de formaldehido en dos muestras mediante dos técnicas diferentes y los resultados han sido comparables, tenemos previsto realizar un ensayo cruzado con otro laboratorio, acreditado para las normas de este proyecto, para poder comparar nuestros resultados y analizar no solamente el formaldehido, sino el resto de los compuestos carbonílicos.

Hay que destacar que, en este caso, en el que se ha analizado una muestra real, no se ha observado la presencia de acetona tanto en el blanco de procedimiento (frasco de HDPE con agua, sin material plástico) ni en las disoluciones procedentes de la exposición de las muestras.

5. CONCLUSIONES

Se puede decir que se han cumplido los objetivos principales de este trabajo:

- Se ha desarrollado un método analítico para la detección, identificación, separación y cuantificación de 13 compuestos carbonílicos mediante HPLC-UV en piezas de automoción.
- Se han optimizado los parámetros experimentales como el flujo, la fase móvil, gradiente, rango de longitud de onda en la que se realiza la medición, longitud de onda en la que se realiza la cuantificación, volumen de inyección, temperatura de columna, etc.
- Se ha determinado el límite de detección y de cuantificación de los 13 compuestos.
- Se ha validado el método tanto en el límite de cuantificación, como en 15 ppm, que es el valor más alto que pone la normativa y un punto medio de la curva de calibrado que queda definido en la parte experimental.
- Se ha validado el método analítico en su conjunto comparando dicho método con otro método realizado en AIMPLAS para la determinación de formaldehído (VDA 275) y acreditado por ENAC.

Estos objetivos se han cumplido por completo en lo que concierne al método de las normas FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A, pero las recuperaciones en cuanto a la norma GMW 15635 no llegan a ser reproducibles en todos los compuestos. Esto es debido a que no se ha llegado a usar el tamiz molecular para secar el ACN, al igual que no se ha llegado a realizar la derivatización con los reactivos nuevos, asegurando así la calidad de los compuestos, entre otras consideraciones comentadas en el apartado 4.3. Por tanto, habría que realizar las pruebas necesarias en cuanto a este método haciendo uso del ACN anhidro tanto en las disoluciones madre, como en la disolución derivatizante.

Por otro lado, en referencia al método según las normas FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A, teniendo en cuenta la ausencia del hexanal para la obtención de resultados, cuyo comportamiento suponemos similar al resto de compuestos, faltaría hacer más repeticiones para poder hacer un ensayo inter-comparativo con otro laboratorio y, de esta manera, poder recibir la acreditación de ENAC.

En conclusión, para poder llevar a cabo la validación de los dos métodos estudiados siguiendo las normativas pertinentes se han de tener diversas consideraciones; entre la que destaca el uso del tamiz molecular para secar el ACN, con el cual se preparan tanto las diferentes disoluciones derivatizantes, así como las disoluciones madres, las cuales, por cierto, hay que preparar de manera diaria para evitar su degradación con el ambiente. Para asegurar que se derivatiza la totalidad del analito se cuadruplicó la cantidad de derivatizante y ácido usado para realizar la derivatización a las dos concentraciones más altas, 3 y 15 ppm para las normas FLTM BZ 156-01 y D40-3004/--A, y 6 y 30 ppm para la GMW 15635. También se debe tener la precaución de enjuagar todo el material de vidrio con etanol y después secarlo en una estufa a 60°C para, de este modo, evitar la importancia de la interferencia de la acetona.

Por lo que corresponde a lo relacionado en este proyecto con lo aprendido en el máster, hay que hacer hincapié en que no se ha hecho referencia a lo importante del estudio del aire interior en el vehículo, ya que solo se ha hecho referencia al aire doméstico, entendiéndose como tal, el aire que se respira en el interior de edificios o naves industriales, haciendo especial alusión al

aire industrial, ya que es en el que más contaminantes pueden encontrarse, ya que en muchas ocasiones es un foco de los mismos.

En relación con los vehículos, durante el curso se ha hecho referencia a que son una importante fuente de contaminación debido a los combustibles fósiles, pero en cambio, no se ha mencionado la precaución que hay que tener en cuanto a la ventilación del interior del vehículo. Bajar las ventanillas durante un atasco, o no realizar una correcta ventilación del vehículo tras una prolongada exposición al sol, sobre todo cuando se trata de vehículos nuevos, puede favorecer la emisión de los compuestos estudiados dentro del vehículo, algunos de los cuales se ha comprobado que tienen diferentes efectos adversos en la salud humana.

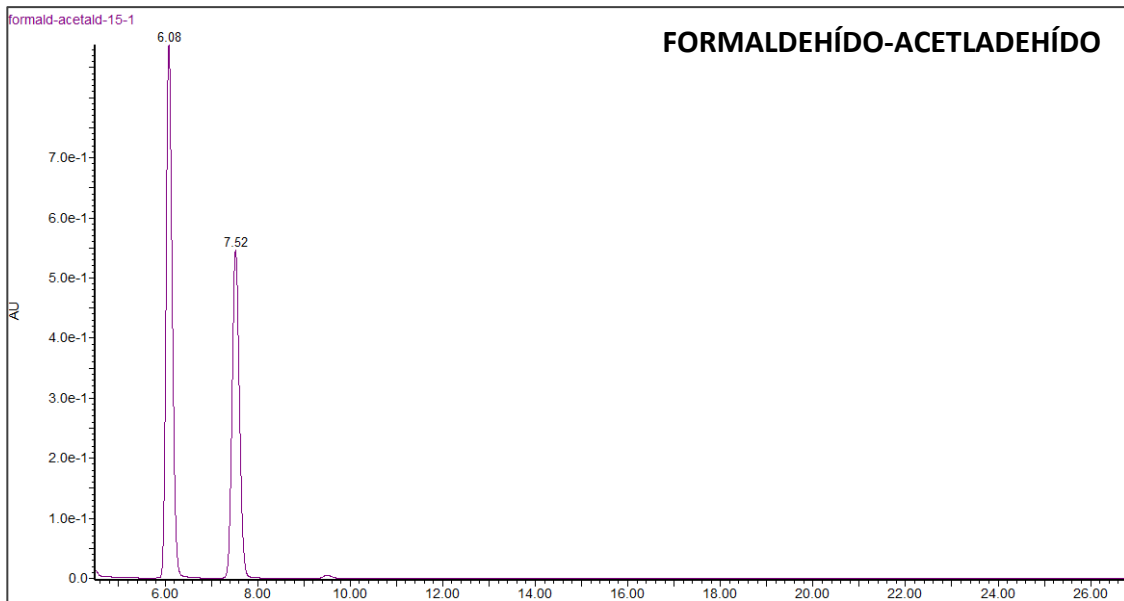
6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] <http://www.ptvalencia.es/empresa/aimplas-instituto-tecnologico-del-plastico>
- [2] <https://www.aimplas.es/AIMPLAS>
- [3] Laguacil M. (2017, 24 de enero) ¿Estamos a salvo de la contaminación dentro del coche? Corriente eléctrica. Recuperado de: <https://corrienteelectrica.renault.es/estamos-salvo-la-contaminacion-dentro-del-coche/>
- [4] <http://www.ladyverd.com/la-contaminacion-dentro-del-coche/>
- [5] <https://www.markes.com/markets/Material-emissions/Vehicle-interior-air-quality/default.aspx>
- [6] <https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/volatile-organic-compounds-impact-indoor-air-quality>
- [7] https://library.ul.com/wp-content/uploads/sites/40/2015/11/Vehicle-Interior-Air-Quality_final.pdf
- [8] Ministerio de la Presidencia (2012) Real Decreto 227/2006, de 24 de febrero, por el que se complementa el régimen jurídico sobre la limitación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles en determinadas pinturas y barnices y en productos de renovación del acabado de vehículos. Recuperado de: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2006/BOE-A-2006-3377-consolidado.pdf>
- [9] <https://www.hpe.com/es/es/what-is/oem.html>
- [10] https://www.aec.es/c/document_library/get_file?uuid=81176b65-bd9c-4c27-b44d-93496248be9c&groupId=10128
- [11] Es el documento que no se si es un libro o una tesis
- [12] <https://es.slideshare.net/lichog/derivatizacion-de-analtos>
- [13] Osório, V.M., y Cardeal, Z. L. (2013). Analytical Methods to Assess Carbonyl Compounds in Food and Beverages. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 24, No. 11, 1711-1718. Recuperado de: <https://www.crossref.org/iPage?doi=10.5935%2F0103-5053.20130236>
- [14] Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA) (2014). Técnicas Afines. Recuperado de: <http://www.secyta.es/es/node/15>
- [15] M. Valcárcel, Cases, A. GómezHens (1998). Técnicas analíticas de separación. Barcelona, España: Reverte
- [16] <http://www.ugr.es/~quiorred/doc/p14.pdf>
- [17] Calderón, J., Fuentes, J.P., Ensayo para el reconocimiento de Aldehídos y Cetonas. (2011) Universidad Tecnológica Metropolitano. Laboratorio de Química Orgánica III. Recuperado de: https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/test-analisis-funcional-2011/e7-e8_2011/ensayos-para-el-reconocimiento-de-aldehidos-y-cetonas?tmpl=%2Fsystem%2Fapp%2Ftemplates%2Fprint%2F&showPrintDialog=1

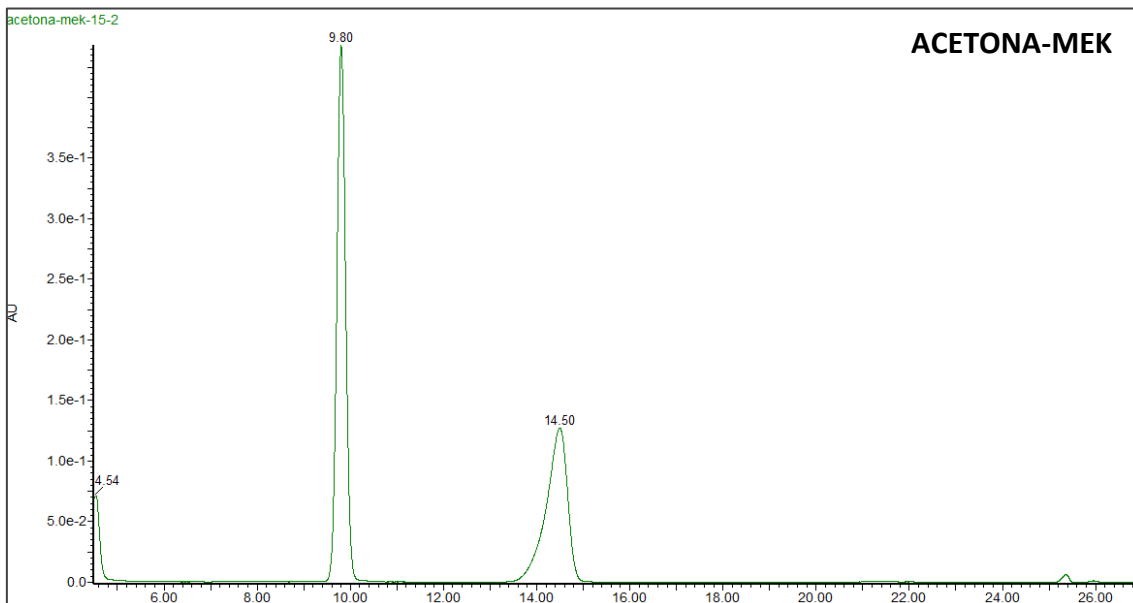
- [18] Wang H., Zhang X. y Chen Zhongming. (2009). Development of DNPH/HPLC method for the measurement of carbonyl compounds in the aqueous phase: applications to laboratory simulation and field measurement. *Environmental Chemistry*, 6(5) 389-397. Doi: 10.1071/EN09057
- [19] Cotsaris E. y Nicholson B. C. (1993) Low level determination of formaldehyde in water by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, (118) 265-268. Recuperado de: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1993/an/an9931800265#!divAbstract>
- [20] Cardoso D. R., Bettin S. M., Reche R. V., Lima-Neto B. S. y Franco D. W. (2003) HPLC–DAD analysis of ketones as their 2,4-dinitrophenylhydrazones in Brazilian sugar-cane spirits and rum. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16 (5), 563-573. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157503000619?via%3Dihub>
- [21] M Ochs S, Fasciotti M, Barreto RP, de Figueiredo NG, Albuquerque FC, Massa MC, Gabardo I y Pereira Netto AD. (2010). Optimization and comparison of HPLC and RRLC conditions for the analysis of carbonyl-DNPH derivatives. *Talanta*, 81 (1-2), 521-9. Doi: 10.1016/j.talanta.2009.12.036
- [22] Cirera-Doménech E., Estrada-Tejedor R., Broto-Piug F., Teixidó J., Gassiot-Matas M., Comellas L., Delgado-Ortiz M. R. (2013) *Journal of Chromatography A*, 1276, 65-77. Doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.027
- [23] Seppanen C. M. y Csallany A. S. (2001) *JAOCS*, 78 (2), 1253. Doi: 10.1007/s11745-001-0422-9
- [24] Guan X., Rubin E. y Anni H. (2012). An Optimized Method for the Measurement of Acetaldehyde by High-Performance Liquid Chromatography. *Alcohol Clin Exp Res*, 36 (3), 398-405. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2011.01612.x
- [25] Dye C. y Oehme M. (1992) Comments concerning the HPLC separation of acrolein from other C3 carbonyl compounds as 2,4-dinitrophenylhydrazones: A proposal for improvement. *Journal of Separation Science*, 15 (1), 5-8. Doi: 10.1002/jhrc.1240150103
- [26] Schulte-Ladbeck R, Lindahl R, Levin JO y Karst U. (2001) Characterization of chemical interferences in the determination of unsaturated aldehydes using aromatic hydrazine reagents and liquid chromatography. *J Environ Monit*, 3 (3), 306-10. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432268?dopt=AbstractPlus>

7. ANEXOS

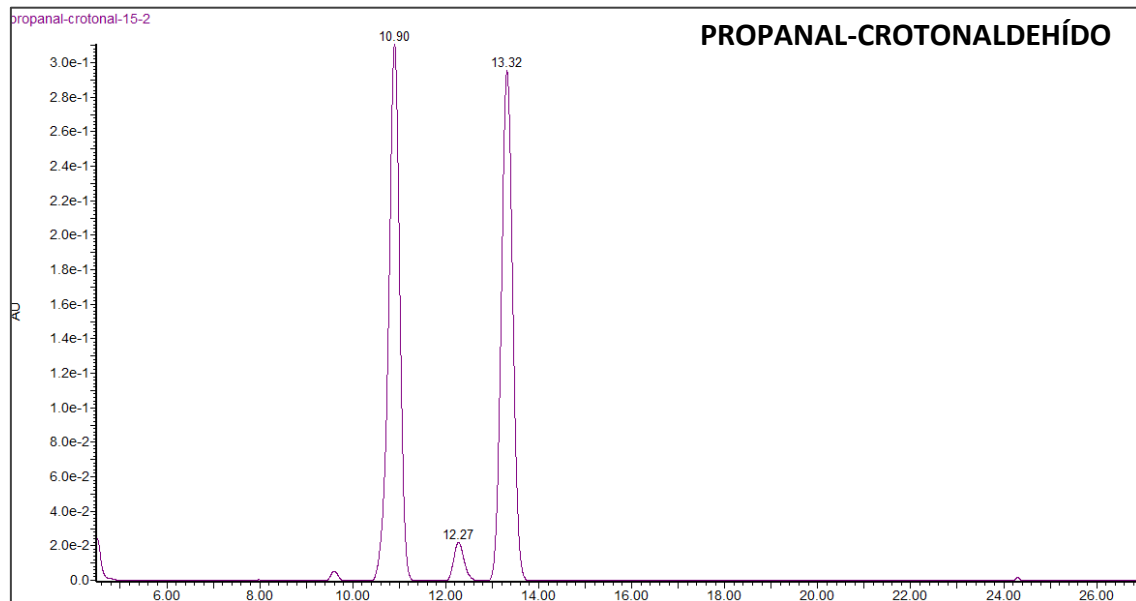
ANEXO I



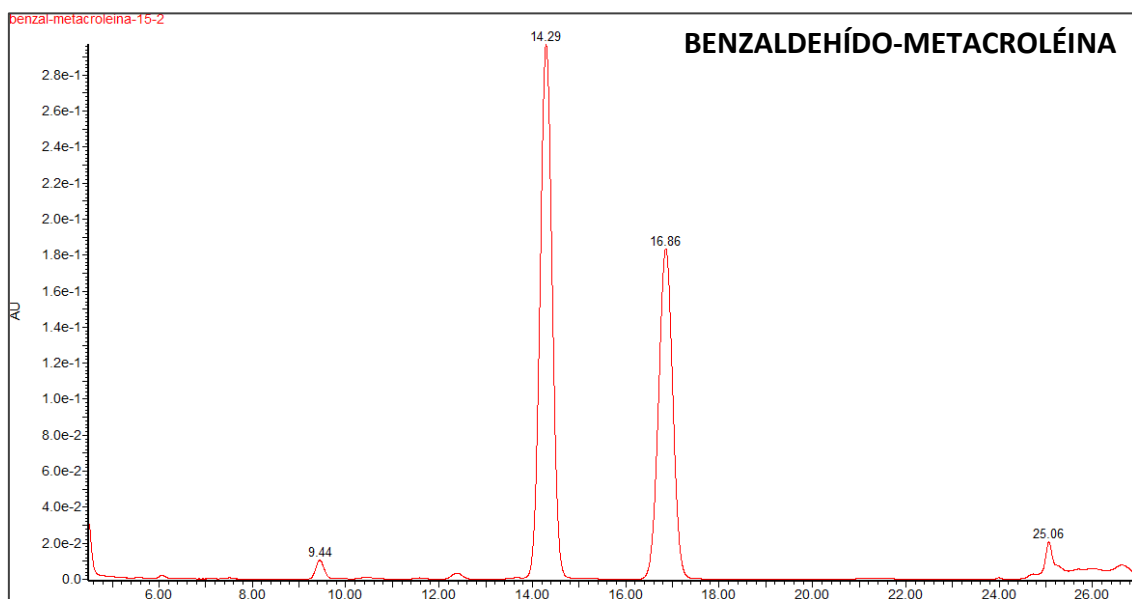
ANEXO II



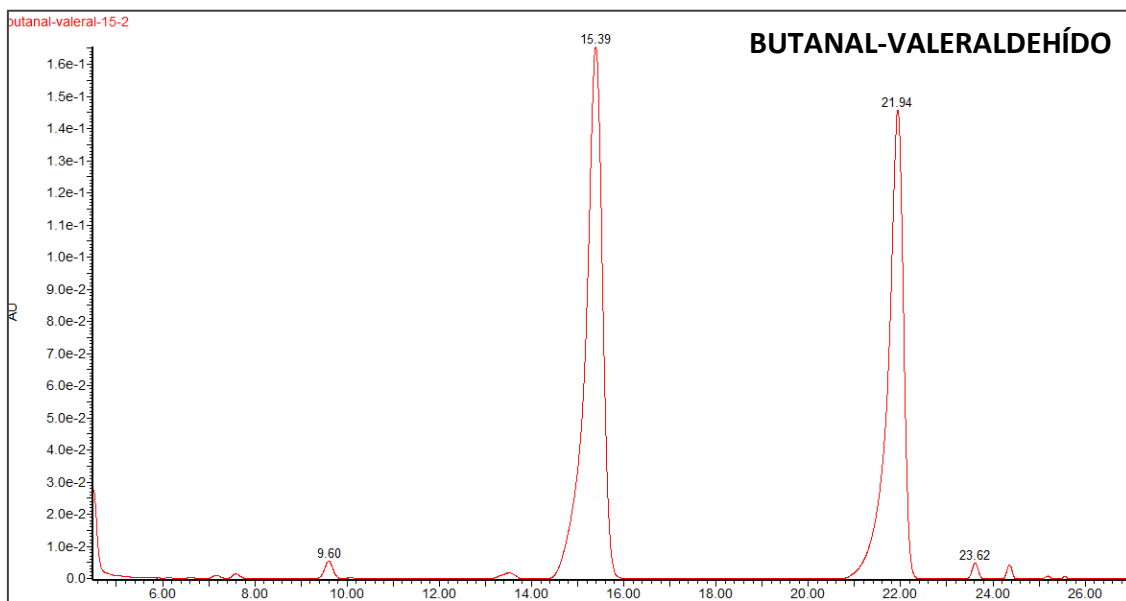
ANEXO III



ANEXO IV



ANEXO V



ANEXO VI

