

Falsos Positivos I – Identificación de las naftilaminas a través del análisis por HPLC-DAD-MS mediante la técnica descrita en la ISO 17234-1

Dr. Manila De Cicco, Gustavo Adrián Defeo F.S.L.T.C.

Ars Tinctoria SRL – Via del Bosco 125 (IT-56029) Santa Croce sull'Arno (PI) Italy +39 0571 35110 info@arstinctoria.it

Abstract

La restricción de ciertas sustancias peligrosas de acuerdo con los requisitos del REACH (Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias Químicas, así como la Lista de sustancias Restringidas (RSL) promovidas por varias marcas reconocidas está trayendo nuevos desafíos analíticos para nuestra industria. Este hecho obliga cada día a las empresas de curtidos a llevar a cabo numerosos análisis con situaciones conflictivas no deseadas en las pruebas de falsos resultados positivos por el método oficial de ensayo ISO 17234-1: 2015, dejando espacio para la duda sobre las aminas derivadas de los colorantes azoicos: 4-aminodifenilo (CAS No. 92-67-1) y 2-naftilamina (CAS N. 91-59-8). La norma estipula lo siguiente mediante la siguiente frase: *“En el caso de niveles de 4-aminodifenilo y / o 2-naftilamina > 30 mg/kg: el uso de este método de análisis ha detectado 4-aminodifenil y / o 2-naftilamina. De acuerdo con el estado actual del conocimiento no se puede confirmar de forma inequívoca y sin información adicional que se utilizaron colorantes azo que liberan dichas aminas”*. Esta incertidumbre es fuente de numerosos resultados de falsos positivos. Nuestro trabajo ilustra un caso de un resultado de 2-naftilamina erróneo según lo declarado por cuatro conocidos laboratorios. Después de una evaluación detallada de los colorantes incluidos en el proceso, hemos tenido en cuenta sus estructuras moleculares, la descomposición hidrolítica eventual, y la investigación de productos con un peso molecular similar en el banco de datos del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología). Con esta información, hemos concluido que el producto incriminado era su isómero, 1-naftilamina (CAS 134-32-7 N.),

por medio de un análisis por HPLC-DAD-MS.

Palabras clave: análisis, 2-naftilamina, 4-aminobifenilo

1 Introducción

El nuevo desafío analítico para la industria del cuero será comprender la interacción entre la química y el cuero, y la previsión de la generación involuntaria de sustancias presentes en las especificaciones RSL/MRSL. Nuestro laboratorio inició una serie de investigaciones mediante cromatografía iónica de masas para verificar la estabilidad y las interacciones de los productos químicos industriales en los escenarios de aplicación normales, así como para probar las generaciones eventuales de sustancias peligrosas y resultados de falsos positivos en los ensayos. Todos los días recibimos nuevas especificaciones químicas para los artículos de cuero con límites que a veces sobrepasan las peticiones del sector cosmético e incluso los de la industria alimentaria, y en algunos casos muy por debajo del estado del arte de los límites analíticos.

En estas condiciones, los resultados de falsos positivos son cada día más frecuentes. El alcance de este trabajo es considerar las variables instrumentales disponibles para evitar resultados de falsos positivos.

2 - Ensayos químicos para la determinación de ciertos colorantes azo en pieles teñidas

La abundancia de las especificaciones de compuestos químicos está trayendo, en muchos casos, conceptos erróneos hacia nuestra industria. Muchas veces, he leído

expresiones en ciertas peticiones tales como colorantes azoicos "libres".

"Colorantes azoicos" son la mayoría de los colorantes utilizados, no sólo para el cuero, sino también para la mayoría de aplicaciones industriales.

El título de la Norma ISO 17234-1: 2015 "Ensayos químicos para la determinación de ciertos colorantes azoicos en cueros teñidos" es claro en cuanto al concepto a pesar que no especifica el hecho de que "ciertas aminas" se obtienen por desdoblamiento reductor del ditionito. Este concepto es muy importante teniendo en cuenta las pruebas adicionales en aminas aromáticas derivadas de colorantes azoicos que deberíamos realizar de forma periódica:

- Aminas aromáticas libres según REACH: La normativa europea considera un límite de "sustancias libres" según el anexo XVII del Reglamento (CE) no 1907/2006 con respecto a "Restricciones en la fabricación, la comercialización y uso de ciertas sustancias peligrosas, mezclas y artículos". En este caso, el método aplicado es sin desdoblamiento reductor.
- Aminas aromáticas en colorantes según la IUC 21: análisis de aminas aromáticas con desdoblamiento reductor, que sirve para prever la generación eventual de aminas aromáticas después de la tintura.
- Para otras aplicaciones industriales, tales como "envasado de alimentos y tintas" la demanda es para aminas aromáticas libres en dichas materias. Esta demanda se ha extendido recientemente a través de ciertas marcas de primera calidad en el envasado de la piel y artículos textiles.

Lejos de nuestra aplicación de cuero, la norma ISO 17234.1: 2010 fue propuesta en una investigación realizada por el ISS (Istituto Superiore della Sanità) para la supervisión de tintas para tatuaje.

El método actual se desarrolló hace tres décadas para comprender qué colorantes estaban basados en ciertas aminas, y para este propósito, un límite de detección del 0.1% era suficiente. Las pruebas cualitativas iniciales se realizaron por cromatografía en capa fina (TLC). La norma IUC-20 (más tarde ISO 17234.1) sugiere límites de detección por debajo de 30 mg/kg. En realidad, ciertas

marcas solicitan 5 mg/kg, lo que desafía la validación correcta de este método de acuerdo con los parámetros de incertidumbre. En cuanto al número de aminas, está destinado que siga creciendo con el aumento del conocimiento de las propiedades ecológicas y toxicológicas de las sustancias. Este hecho condujo a la revisión inevitable de la norma ISO 17234.1: 2015, en particular la técnica del desdoblamiento reductor, para adaptarlo a una amplia gama de sustancias.

El estado-del-arte del método de ensayo deja espacio para la duda especialmente en dos aminas aromáticas: el 4-aminodifenilo y la 2-naftilamina indicando:

"En el caso de niveles de 4-aminodifenilo y/o 2-naftilamina > 30 mg/kg:

El uso de este método de análisis ha detectado 4-aminodifenilo y / o 2-naftilamina. De acuerdo con el estado actual del conocimiento no se puede confirmar de forma inequívoca y sin información adicional que se utilizaron colorantes azo que liberan aminas "ISO 17234.1: 2015 (13 inciso g pg.7)".

Aunque esta frase se escribe normalmente en la mayoría de los informes, la sospecha de presencia de 2-naftilamina y / o 4-aminodifenilo se considera una confirmación "de facto" por la mayoría de los laboratorios.

Los resultados inciertos en la identificación de isómeros (como los 2,4 y 2,6 xilidinas), pueden ser resueltos por una observación exacta de la diferencia y la igualdad de los parámetros de análisis, y por adición de patrón interno.

3 - Desdoblamiento reductor

Después de realizar el muestreo de la piel según la norma ISO 2418, y molido de la piel de acuerdo con la ISO 4044, las muestras de piel se desengrasan, se tratan en una solución tampón de citrato y se calientan a 70°C. Se añade una solución de ditionito de sodio para llevar a cabo la reducción de las aminas de los colorantes de acuerdo con el siguiente esquema de reacción (Fig. 1):

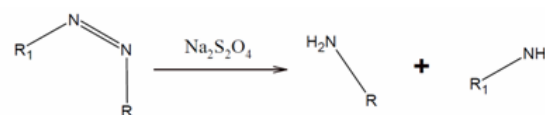


Fig. 1 Desdoblamiento reductor de un colorante genérico

Los enlaces Azo ($N = N$) se rompen en aminas aromáticas. Se lleva a cabo una separación líquido-líquido en t-butil metil éter, se obtiene el extracto concentrado con evaporador rotatorio al vacío, se seca con N_2 , después se disuelve en metanol hasta 2 ml. de volumen para el análisis instrumental.

4 – Métodos instrumentales

La norma ISO 17234.1:2015 identifica diferentes métodos instrumentales para los ensayos cualitativos y cuantitativos:

HPLC-DAD (cualitativo y cuantitativo), HPLC-MS (cualitativo), GC-MS (cualitativo y cuantitativo), CE-DAD (cualitativo), HPTLC / TLC / cualitativo.

Para obtener resultados más precisos en nuestros métodos internos, se optó por un equipo de GC-MS-MS (cromatógrafo de gases-masas de triple cuadrúpulo) y UHPLC-DAD-MS-MS (cromatógrafo líquido de alta resolución y alta presión con detector de triple cuadrúpulo). En ambos casos, estos instrumentos todavía no se han adoptado oficialmente por el método ISO. Es posible trabajar en modo de cuadrúpulo simple (MS) para emular los instrumentos aprobados, o en modo MS-MS-MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples) que permite una cuantificación alternativa precisa de las masas.

Mediante el análisis de GC-MS (Figura 2), se obtiene la siguiente información del instrumento: Tiempo de retención (tiempo necesario para salir de la columna de separación), la masa molecular nominal, la distribución de iones del compuesto (anteriormente llamado ion secundario), que muestra la distribución del peso molecular de los fragmentos generados. Además de trabajar en MS-MS y en el modo MRM, el monitoreo de la reacción seleccionada de iones múltiples de producto o más iones precursores pueden seleccionarse para conseguir una cuantificación más exacta.

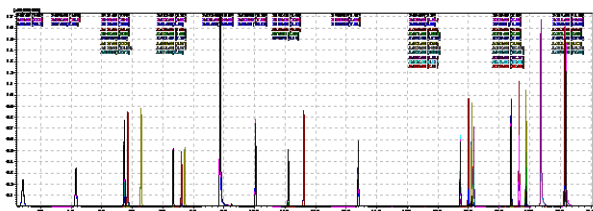


Fig. 2 – Tiempos de retención de las 25 aminas aromáticas estandarizadas por GC-MS

En el análisis HPLC-DAD-MS (Fig. 3) la información de que se dispone es el tiempo de retención, el detector DAD (Detector Array de Diodos, que muestra el espectro UV-Vis completo), una masa nominal, la distribución de los iones del producto, además de aductores (en función del eluyente y del pH del mismo). Trabajando en los modos MS-MS-MRM y en GC-MS-MS es posible conseguir una cuantificación de masas razonable.

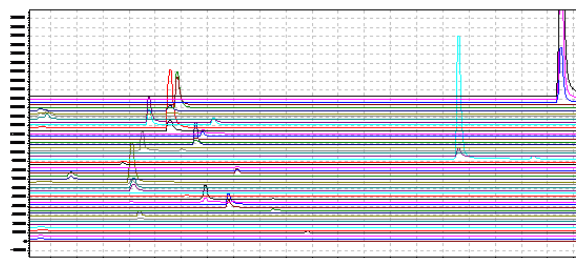


Fig. 3 – Escaneo del rango de masas de un standard de las 25 aminas aromáticas mediante UHPLC-DAD-MS-MS

El método sugiere que la confirmación se debe hacer por medio de al menos dos métodos instrumentales, normalmente uno cualitativo y otro cuantitativo: "Si se detecta una amina por un método cromatográfico, a continuación, la confirmación se realiza mediante uno o más métodos alternativos."

5– Identificación de isómeros

Los isómeros son "sustancias gemelas" bajo el punto de vista de las masas y pueden tener un comportamiento similar en el análisis instrumental, teniendo en cuenta que sus diferencias pueden ser solamente la posición de un sustituyente o una distinta disposición espacial como en los colorantes de complejos metálicos. Tomamos los recientemente añadidos a la norma ISO 17234- 1: 2015: 2,4 y 2,6 xilidinas como un ejemplo de difícil identificación de isómeros (Fig. 4).

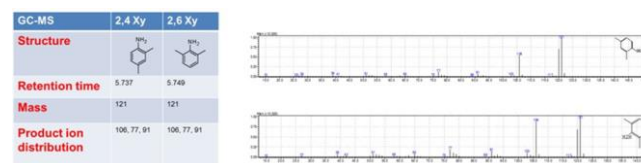


Fig. 4 – Espectro de masas GC-MS de los compuestos 2,4 and 2,6 xilidina y sus parámetros típicos (base de datos NIST).

RETANAL A FF

- Blandura
- Excelente Igualación de tinte
- Sulfona Anfótera



PLE NI TUD

CROMOGENIA LINTS
YOUR SPECIALIST FOR DYE EQUALITY

www.cromogenia.com

El análisis por GC-MS muestra tiempos de retención muy similares (con diferencia de sólo algunos segundos), las mismas masas nominales, así como los tres fragmentos más abundantes de iones. La adición de patrón interno puede definir de qué isómero se trata.

Los tiempos de retención en HPLC-DAD-MS difieren medio minuto entre sí, los picos y valles del DAD difieren de unos pocos nanómetros, las masas nominales son las mismas, mientras que la distribución de iones difiere por encima de la tercera más abundante (Fig. 5). La adición de patrón interno puede definir el isómero teniendo en cuenta más exactamente la diferencia en el tiempo de retención.

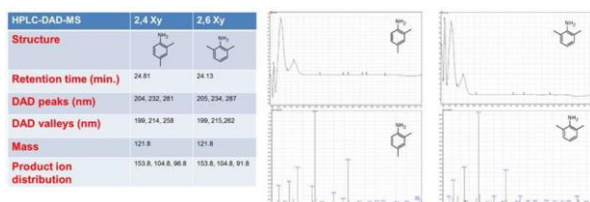


Fig. 5- Parámetros HPLC-DAD-MS de 2,4 y 2,6 xilidinas y resultados obtenidos por DAD/MS.

6- Un caso de falso positivo de la 2-naftilamina

Una empresa de curtidos afirmó que aplicó un colorante sobre piel que dio 150 mg/kg de 2-naftilamina. Dos laboratorios italianos locales y dos laboratorios europeos conocidos apoyaron la reclamación, lo que confirma la presencia de esta sustancia. El colorante utilizado para este proceso de tinción fue el C.I. Ácido Negro 24.

El desdoblamiento reductor con ditionito de este colorante (Fig. 6) generará tres productos principales y otros residuos y contaminantes eventuales: 1,4 naftalendiamina, así como pueden extraerse otros residuos lipófilos eventuales de la fase etérea, mientras que la mayoría de los productos sustituidos por $-SO_3^-$ deben ser retenidos en el absorbente durante la separación líquido - líquido. Teniendo en cuenta que el 1, 4 naftaleno sustituido en la fase etérea y las posiciones relativas de los productos restantes (todos los derivados de naftaleno), se sospecha de un caso de falso positivo en 2-naftilamina. Se realizó un ensayo

paralelo con el colorante en polvo utilizando el método de la IUC 21.

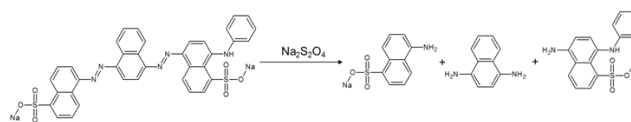


Fig. 6 - Desdoblamiento reductor del colorante Acid Black 24

Ambos extractos fueron analizados instrumentalmente en HPLC-DAD-MS: Análisis del colorante Acid Black 24 sobre el cuero teñido (ISO 17234.1: 2015) en comparación con el análisis del colorante (IUC 21). En el ensayo de la piel se obtienen 150 mg/kg que se sospecha son de 2-naftilamina y 240 mg/kg de anilina que no está presente en el colorante en polvo (Fig. 7).

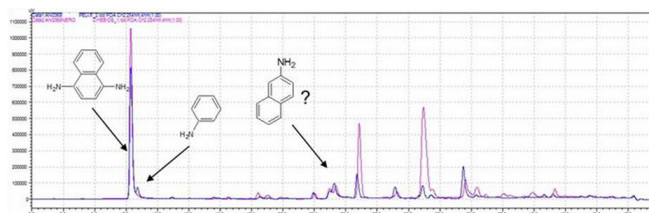


Fig. 7 - Cromatograma HPLC de aminas aromáticas del colorante C.I. Acid Black 24 a través del método ISO 17234.1:2015 en piel (azul) y mediante la IUC 21 en el polvo de colorante (rojo).

La comparación de la muestra de piel teñida inyectada contra la norma de aminas aromáticas (Fig. 8) muestra una ligera diferencia en el tiempo de proceso: una sustancia con $Tr = 24$ min. y peso molecular 143,7 mientras que un patrón de 2-naftilamina fluye a un $Tr = 25$ min. en las mismas condiciones de análisis.

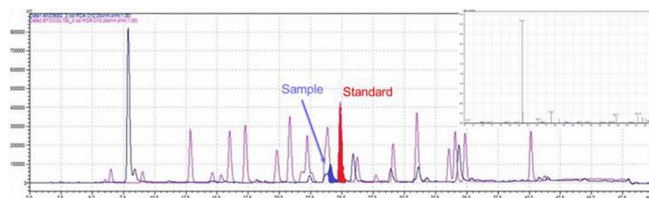


Fig. 8 - Cromatograma HPLC de aminas aromáticas del colorante C.I. Acid Black 24 (azul) mediante la ISO 17234.1:2015 comparado con el patrón (rojo) y el espectro de masas (esquina derecha superior).

La comparación entre los espectros DAD mostró resultados muy diferentes. Teniendo en cuenta que tanto la muestra y como el patrón tienen exactamente el mismo peso molecular y

un tiempo de retención muy cercano, los picos y valles espectrales tienen una longitud de onda diferente. El hecho de que los eluyentes en la cromatografía están dispuestos para mantener un pH estable, la enorme diferencia encontrada no puede atribuirse a un efecto batocrómico pero sí a sustancias con una estructura molecular diferente.

Teniendo en cuenta el 1,4 naftaleno sustituido, el contaminante más probable es la 1-naftilamina.

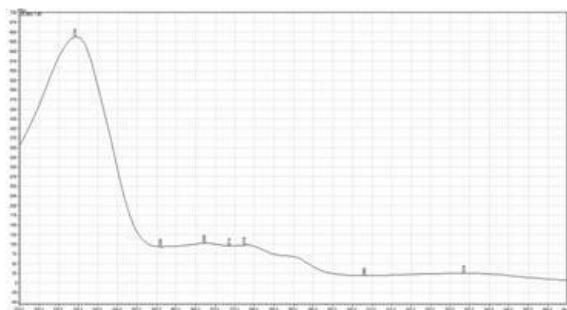


Fig. 9 – Espectro DAD de la muestra a un Tr= 24 min.

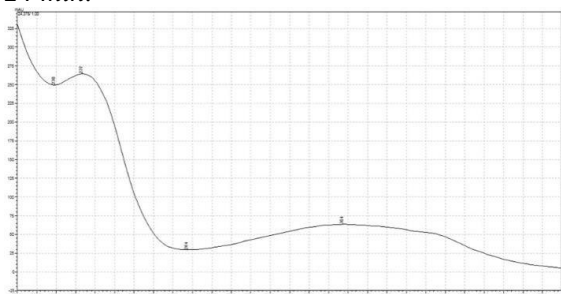
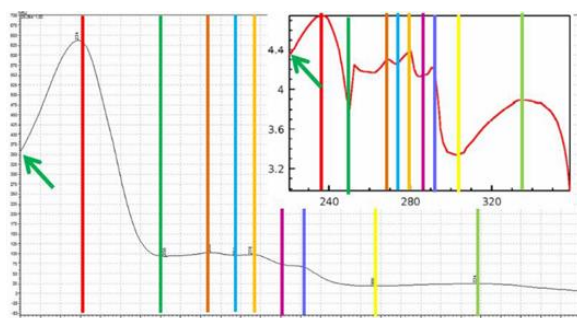


Fig. 10 – Espectro DAD de la 2-naftilamina a un Tr= 25 min.

Se realizaron búsquedas en la base de datos espectral NIST, (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) del perfil espectral UV de la 1 y 2-naftilamina y se compararon con los espectros obtenidos por HPLC-DAD. El análisis de la 1-naftilamina (Fig. 11) muestra 10 puntos de similitud:



Incremento desde 220nm.

Pico @ 234 nm

Valle @ 256 nm

Pico @ 266 nm

Valle @ 274 nm

Pico @ 278 nm

Valle @ 286 nm

Pico @ 290 nm, Valle

@ 306 nm

Pico @ 334 nm

Fig. 11 – Extracto de la muestra comparado con la base de datos de NIST de la 1-naftilamina

En este caso existen 5 puntos de coincidencia: Decremento hasta 229 nm, un valle a 229 nm, un pico a 236 nm. Un valle a 263 nm, y un pico a 304 nm.

En el caso del perfil DAD de la 2-naftilamina fue confirmación suficiente para definir los falsos positivos sin necesidad de adición de patrón interno. Es evidente que en función del conjunto de instrumentos elegidos en la aplicación de la ISO 17234.1: 2015 (por ejemplo, CG-EM / HPLC-MS) este resultado no habría sido confirmado.

7- Conclusiones

Se debe tomar un cuidado extremo en la selección de la técnica instrumental correcta. Ciertas combinaciones de instrumentos (GC-MS + HPLC-MS) pueden dar lugar a resultados de falsos positivos, hecho que muestra la importancia de un análisis preciso de los datos disponibles a partir del análisis (tiempo de retención, el espectro DAD, la distribución de iones del compuesto, etc.). En casos como este, se debe diferenciar entre resultados "aceptables" y resultados "incorrectos".

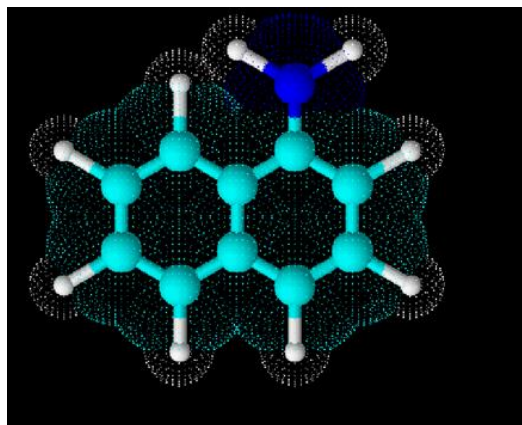
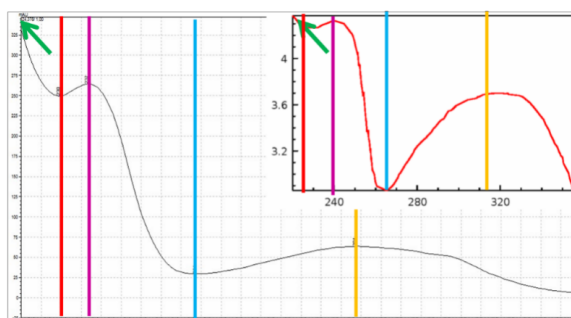


Fig. 13 - 1-naftilamina



Decremento hasta 229 nm

Valle @ 229 nm

Pico @ 236 nm

Valle @ 263 nm

Pico @ 304 nm

Fig. 12 – Patrón comparado con la base de datos de NIST de la 2-naftilamina

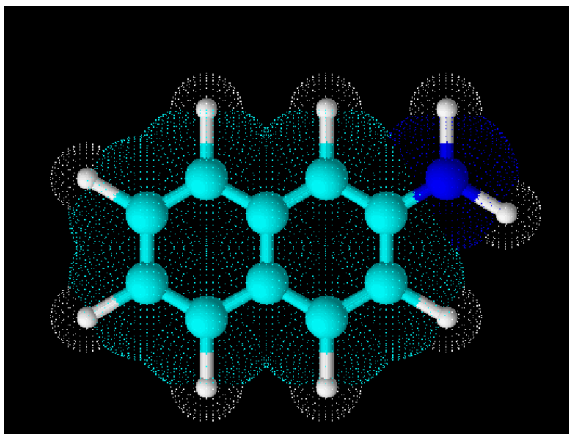


Fig. 14 - 2- naftilamina (REACH Anexo XVII)

El compuesto 2-naftilamina se incluye en el Anexo XVII del REACH. Esta sustancia está limitada como amina libre al 0,1%, mientras que el límite para el cuero es de 30 mg/kg (ISO 17234.1: 2015) y en textiles de 20 mg/kg (ISO 14362.1). Ambas pruebas de cuero y textiles se realizan con desdoblamiento reductor. La 1-naftilamina no está incluida en el Anexo XVII, pero se presenta como posible carcinógeno en los protocolos de OSHA.

5 – Referencias

1. (Official Journal of the European Union, L 164/7, 26.6.2009), COMMISSION REGULATION (EC) No 552/2009 of 22 June 2009 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XVII.
2. (M.Fontana, M. Fenoglio, M. Agnello 2014) Regione Piemonte, ARPA (Agenzia Regionale di Protezione Ambientale),cosmetici e rischi emergenti in campo estetico vigilanza consolidata e problemi emergenti.
3. ISO 17234-1:2015 10 pg. 6.

