UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Aminas en muestras atmosféricas

Aminas en mostras atmosféricas

Amines in atmospheric samples

Directores: Purificación López Mahía

José Neira Dourado

Autor: JORGE SUÁREZ NEIRA

Curso: 2016-2017, convocatoria de julio

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias al Departamento de Química y al Instituto Universitario de Medio Ambiente de la UDC por proporcionarme los medios necesarios que han hecho posible este TFG.

Gracias a mis directores Purificación López Mahía y José Neira Dourado por su dirección, apoyo y paciencia.

La realización de este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de muchos amigos y colaboradores de la UDC

Y por último, gracias a los compañeros del IUMA, especialmente a Pili, María, Jorge, Siria y Marta.

ÍNDICE

RESUMEN/REESUMO/SUMMARY 3
1. INTRODUCCIÓN 9
1.1. MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO 10
1.2. AMINAS ALIFÁTICAS EN MATRICES ATMOSFÉRICAS 14
1.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS AMINAS OBJETO DE ESTUDIO 17
2. OBJETIVOS 23
3. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL 27
3.1. MUESTREO DE AMINAS 27
3.2. DETERMINACIÓN DE AMINAS 28
4. PARTE EXPERIMENTAL 35
4.1. EQUIPOS, INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS 35
4.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES 36
4.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS 36
4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN 37
4.5. MUESTREO DE PM10 37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 43
5.1. ENSAYOS PREVIOS 43
5.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACIÓN. DISEÑO DE EXPERIENCIAS 49
5.3.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO 53
5.4.- APLICACIÓN A MUESTRAS 54
6.- CONCLUSIONES 59
7.- BIBLIOGRAFÍA 63

Figura 1. Distribución de tamaños de las partículas atmosféricas y de sus principales procesos de formación y eliminación (adaptado de Whitby, 1978) 11
Figura 2. Composición de la materia particulada atmosférica en función de su tamaño de partícula 12
Figura 3. Diagrama esquemático del ciclo de las aminas en la atmósfera 15
Figura 4. Formación de nitrosaminas a partir de la reacción de aminas con ácido nitroso 16
Figura 5. Deslocalización del par libre de electrones en el anillo aromático de una amina aromática. 18
Figura 6. Reacción de derivatización de OPA con una amina primaria 29
Figura 7. Reacción de derivatización de DNSCl con una amina primaria 30
Figura 8. Reacción de derivatización de IPPIE con amina primaria 30
Figura 9. Reacción de derivatización de FMOC con una amina secundaria 31
Figura 10. Fotografía del equipo de muestreo DIGITEL DHA-80, de un filtro en blanco y de un filtro muestreado. 38
Figura 11. Toma de la alícuota de las muestras con los sacabocados. 39
Figura 12. Cromatograma: (a) derivado de DMA e (b) ACN (c) blanco de derivatización. [FMOC]=0,03 mM; [TAMPÓN]=0,05 M y pH=11,45 en las condiciones de derivatización iniciales. 44
Figura 13. Formación del derivado FMOC-OH 44
Figura 14. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función de la [FMOC]: — [0,3mM] — [1mM]; [tampón]=0,05 M y pH=11,45 45
Figura 15. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función del volumen del mismo (relación amina-FMOC-borato): — 1:1:1 — 1:2:1.[FMOC]= 0,3 mM; [borato]=0,05 M y pH=11,45 45
Figura 16. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función del pH: — 11,45 — 10,2. [FMOC]= 0,3 mM; [borato]=0,05 M, ratio 1:1:1 46
Figura 17. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función de la [borato]=: — 0,05M — 0,2M. [FMOC]: 0,3 mM; ratio 1:1:1; pH=11,45 46
Figura 18. Cromatograma de los derivados de las cinco aminas (—) y del blanco de derivatización (—). Condiciones de derivatización: 150 µL DMA +150 µL FMOC 0,3 mM+ 150 µL Borato 0,05M pH=11,45 47
Figura 19. Cromatograma de los derivados de las aminas [200 µg/L]: — 0 min — 13 días (nevera a 4,5ºC) 47
Figura 20. Pérdida de señal de los derivados de las aminas según el período de conservación: (a) [100 µg/L]: 0 min -12 horas y (b) [200 µg/L]: 0 min -13 días (conservados en nevera a 4,5ºC) 48
Figura 21.Gráficas de superficie de respuesta del diseño composicional 51
Figura 22. Comparación de la señal en las condiciones iniciales de partida (azul) y condicionales finales optimizadas en este trabajo (rojo) 52
Figura 23. Rectas de calibrado 53
Figura 24. Estudio de recuperación del proceso de filtración del extracto de las muestras de PM10 con filtros PVDF, PTFE, PTFHP y Acrodics 55
Figura 25. Cromatograma de las aminas presentes en una de la muestras analizadas 56

Tabla 1. Valores límites de protección a la salud para el material particulado atmosférico (PM10 y PM2,5) 13
Tabla 2. Valores Límite Ambientales de exposición diaria para las aminas alifáticas 17
Tabla 3. Fórmulas de las aminas objeto de estudio 18
Tabla 4. Propiedades físico-químicas de las aminas objeto de estudio 19
Tabla 5. Condiciones cromatográficas 37
Tabla 6. Condiciones de derivatización iniciales 43
Tabla 7. Diseño del composicional 50
Tabla 8. Condiciones derivatización optimizadas 51
Tabla 9. Parámetros cromatográficos del método optimizado 52
Tabla 10. Límite de detección y cuantificación del instrumentales 54
Tabla 11. Límite de detección y cuantificación del método 56

CE = Electroforésis capilar

DMA = Dimetilamina

DEA = Dietilamina;

EA = Etilamina

EtA= Etanolamina

FL = fluorescencia

GC = Cromatografía de gases

HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución

IC = Cromatografía iónica

MA = Metilamina

MS = Masas

PM = Material particulado

UV = Ultravioleta-Visib

RESUMEN/RESUMO/SUMMARY

RESUMEN

***Palabras clave*:** aminas alifáticas, derivatización, FMOC, HPLC-UV-FL, materia particulada atmosférica (PM10)

Las aminas alifáticas de cadena corta están presentes en la atmósfera, tienen un papel importante en la formación y crecimiento de las partículas atmosféricas y algunas presentan propiedades mutagénicas y carcinógenas. Por ello, en los últimos años se convierten en un tema objeto de estudio como contaminantes del aire, y aparece la necesidad de una monitorización que aporte datos acerca de su concentración en el medio atmosférico.

El presente trabajo describe la optimización de un proceso de derivatización de 5 aminas alifáticas con 9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC) y su posterior determinación por cromatografía de líquidos con detección ultravioleta y fluorescencia en serie (HPLC-UV-Fl). Se evalúan varios factores como las concentraciones del reactivo de derivatización (FMOC) y de la disolución tampón de borato, el pH del medio de derivatización, así como los diferentes volúmenes de cada uno de los reactivos empleados.

Se realiza la validación del procedimiento de derivatización obteniéndose buena precisión y reproducibilidad (desviaciones estándar relativas intra-día < 4% e inter-día < 8%). El rango líneal es hasta 300 µg/L para todos los analitos. Los lımites de detección instrumentales están comprendido entre 0,43 µg/L y 1,92 µg/L (se corresponde con los límites del método de ~ 0,05 ng/m^3 y 2.26 ng/m^3 en aire) en función de la amina.

Posteriormente el método desarrollado se aplica a la determinación de las 5 aminas de material particulado atmosférico (PM_{10}) recogidas por muestreo de aire a través de filtros de fibra de cuarzo, seguido de una extracción acuosa en ultrasonidos. Los niveles de concentración de las aminas oscilaron entre 0,61 y 9,70 ng/m^3 en el aire muestreado.

RESUMO

***Palabras clave*:** aminas alifáticas, derivatización, FMOC, HPLC-UV-FL, materia particulada atmosférica (PM10).

As aminas alifáticas de cadea curta están presentes na atmosfera, teñen un papel importante na formación e crecemento das partículas atmosféricas e algunhas presentan propiedades mutáxenas e carcinóxenas. Por iso, nos últimos anos convértense nun tema obxecto de estudo como contaminantes do aire, e aparece a necesidade dunha monitorización que achegue datos acerca da súa concentración no medio atmosférico.

O presente traballo describe a optimización dun proceso de derivatización de 5 aminas alifáticas con 9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC) e a súa posterior determinación por cromatografía de líquidos con detección ultravioleta e fluorescencia en serie (HPLC-UV-Fl). Avalíanse varios factores como as concentracións do reactivo de derivatización (FMOC) e a disolución tampón de borato, o pH do medio de derivatización, así como os diferentes volumes de cada un dos reactivos empleados.

Realízase a validación do método instrumental obténdose boa reproducibilidade (desviacións estándar relativas intra-día < 4% e inter-día <8%). A linealidade vai ata 300 µg/L para todos os analitos. Os límites de detección instrumentais están entre 0,43 µg/L e 1,92 µg/L (o que se corresponde cos límites do método de 0,05 ng/ m^3 e 2,26 ng/ m^3 de aire) en función da amina.

Posteriormente o método desenvolvido aplícase á determinación das 5 aminas en material particulado atmosférico (PM10) recollidas por mostraxe de aire a través de filtros de fibra de cuarzo seguido dunha extracción acuosa en ultrasonidos. Os niveis de concentración das aminas oscilaron entre 0,61 e 9,70 ng/m^3 no aire muestreado.

SUMMARY

***Key words*:** aliphatic amines, derivatization, FMOC, HPLC-UV-FL, atmospheric particulate matter (PM10)

Short chain aliphatic amines are present in the atmosphere, play an important role in the formation and growth of atmospheric particles and some of them have mutagenic and carcinogenic properties. For this reason, in recent years they become a subject of study as air pollutants, and the need for a monitoring, that provides data about its concentration in the atmospheric environment, appears.

The present work describes the optimization of a derivatization process of 5 aliphatic - amines with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) and their subsequent determination by liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection in series (HPLC-UV-Fl). Several factors such as concentrations of the derivatization reagent (FMOC) and the borate buffer solution, the pH of the derivatization medium, as well as the different volumes of each of the reagents used are evaluated.

The validation of the derivatization procedure is performed, obtaining good precision and reproducibility (relative standard deviations, below 4%, for intra-day values and 8% for inter-day). Linearity ranged to 300 μg/L for all analytes. Detection limits were between 0,43 μg/L and 1,92 μg/L (corresponding to ~0.05 ng / m^3 and ~2,26 ng / m^3n air) as a function of the amine.

Subsequently the method developed is applied to the determination of the 5 amines of atmospheric particulate material (PM10) collected by air sampling through quartz fiber filters, followed by an aqueous extraction in ultrasound. The concentration levels of amines ranged from 0.61 to 9,70 ng / m^3 in the sampled air.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los niveles de aminas atmosféricas han aumentado significativamente en los últimos años. Debido al gran número y variedad de fuentes de emisión, las aminas son compuestos ubicuos en el medio ambiente. La deposición del nitrógeno orgánico de la atmósfera puede constituir un aporte sustancial de nitrógeno a los ambientes terrestres y acuáticos, contribuyendo alrededor de un tercio al nitrógeno total en la atmósfera. Por eso, las aminas atmosféricas desempeñan un papel importante en el ciclo global del nitrógeno y aunque el número de datos de aminas atmosféricas es menor que otros compuestos orgánico volátiles atmosféricos (COV), el interés en su investigación ha crecido en los últimos años reportándose niveles de 154 aminas y 32 aminoácidos presentes en la atmósfera.

En la industria, las aminas alifáticas se emplean en grandes cantidades como materias primas y productos intermedios en la producción de tensioactivos, plásticos, tintes, etc. También se utilizan como inhibidores de la corrosión y como agentes de lavado para la absorción de CO_2 en las emisiones industriales (ej. etanolamina o ciertas alquilaminas) [Poste et al., 2014; Ge et al., 2011; Prieto-Blanco et al., 2009]

Entre las aminas, las aminas alifáticas de cadena corta (C1-C6) se pueden emitir a la atmósfera en grandes cantidades, a partir tanto de fuentes de naturaleza antropogénica (industrias, especialmente la alimentaria y del petróleo, combustiones, compostaje, automoción, tratamiento de aguas residuales, cría de animales, etc.) como de fuentes naturales (la biodegradación de materia orgánica, quema de biomasa, emisión por los océanos y la vegetación).

Sin embargo, existen muchas dificultades para determinar estas aminas alifáticas en muestras ambientales debido a la degradación y al efecto de dilución de éstas hace que se encuentren a niveles traza [G. Chen et al. 2014]. La determinación analítica de las aminas en las matrices atmosféricas se basa principalmente en técnicas cromatográficas tales como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía iónica (IC) y la electroforesis capilar (CE). Huang et al., 2016 y Chen et al. 2014 combinan dichas técnicas principalmente con los detectores de espectrometría de masas (MS) y de fluorescencia (FLD) por su superior selectividad y sensibilidad.
Pero dado que son compuestos polares y que muestran una interacción muy pobre con las columnas cromatográficas requieren de un proceso de derivatización previo al análisis cromatográfico.

1.1. MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

La atmósfera es una mezcla de gases y aerosoles cuyas principales funciones son la regulación de la temperatura terrestre y de las radiaciones. Si se altera la composición de la misma se dice que la atmósfera está contaminada.

El material particulado presente en la atmósfera se define como una mezcla de partículas sólidas y/o líquidas presentes en la atmósfera cuyo tamaño puede oscilar entre 0,001 y 100 µm [Chen et al. 2014]. Las denominadas partículas sedimentables (diámetro aerodinámico (Da) > 20 µm) tienen un corto tiempo de residencia en la atmósfera por lo que no se engloban en el término material particulado atmosférico (PM) que hace referencia a la fracción granulométrica que se encuentra en suspensión en el aire.
Pueden clasificarse en primarias, si conservan la misma forma química en la que fueron emitidas a la atmósfera, o secundarias, si se generan en la atmósfera a partir de otros gases o precursores como NO_x , SO_2, NH_3 y COV.

Así, en función de su tamaño se clasifican en partículas gruesas, finas y ultrafinas. Las partículas gruesas se miden por los niveles de PM_{10} (Da ≤ 10µm) y su origen es principalmente el aerosol marino, agricultura, minería, volcanes, etc. El indicador de las partículas finas en el $PM_{2,5-1}$ (1µm ≤ Da ≤ 2,5µm) que provienen principalmente de procesos de combustión (vehículos, procesos industriales y de producción de energía), de la transformación de sustancias primarias (SO_X y NO_X) en secundarias y como aerosoles orgánicos secundarios (procedentes de precursores como son los COV). La partículas finas PM_1 (Da ≤ 1µm) y ultrafinas (Da ≤ 0,01µm) son el principal constituyente del material particulado en número pero crecen rápidamente mediante condensación, siendo su principal fuente las actividades de origen antropogénico.

En la actualidad, es considerado uno de los contaminantes más importantes a nivel mundial, junto con el NO_2 y el O_3, pero a diferencia de los gases está formado por una gran cantidad y variedad de especies químicas, poseen diferentes tamaños, formas y propiedades físicas, constituyendo una mezcla muy heterogénea [Youn et al., 2015].

En la siguiente figura 1 se indican los principales mecanismos de formación de material particulado (ejemplo: condensación de gases sobre partículas existentes, nucleación a partir de gases de baja presión de vapor).

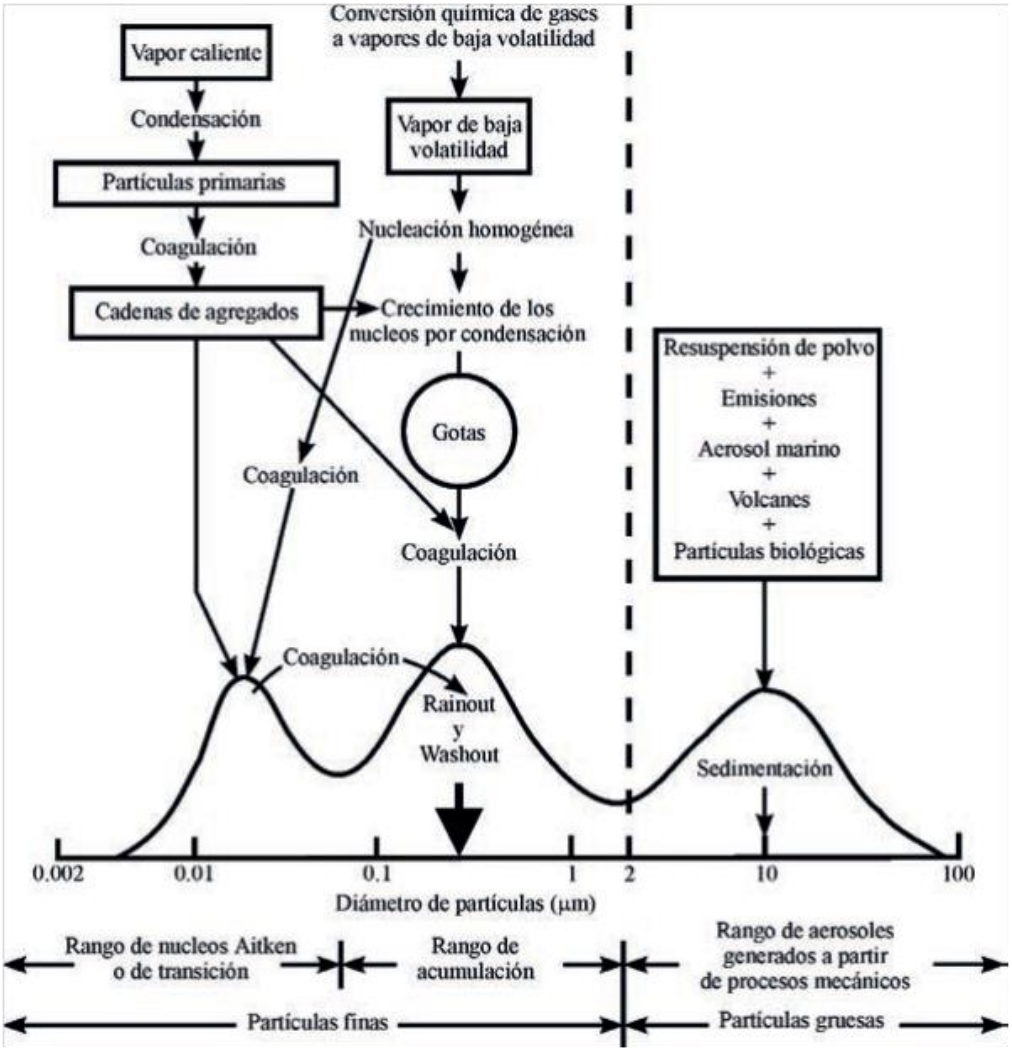


Figura 1. Distribución de tamaños de las partículas atmosféricas y de sus principales procesos de formación y eliminación (adaptado de Whitby, 1978)

Según la composición, los principales constituyentes son la material mineral y el aerosol marino aunque de manera menos importante también influyen los compuestos derivados del azufre, del nitrógeno, del carbono y los bioaerosoles (figura 2).

La materia mineral está compuesta principalmente por cuarzos, feldespatos, fosfatos, óxidos metálicos, etc. (suelen ser de origen natural aunque también hay que tener en cuenta la minería, industria, tráfico).

Los aerosoles marinos son partículas primarias de origen natural compuestas por cloruros y sulfatos de sodio y magnesio y por productos de descomposición biogénica de algas y plancton.

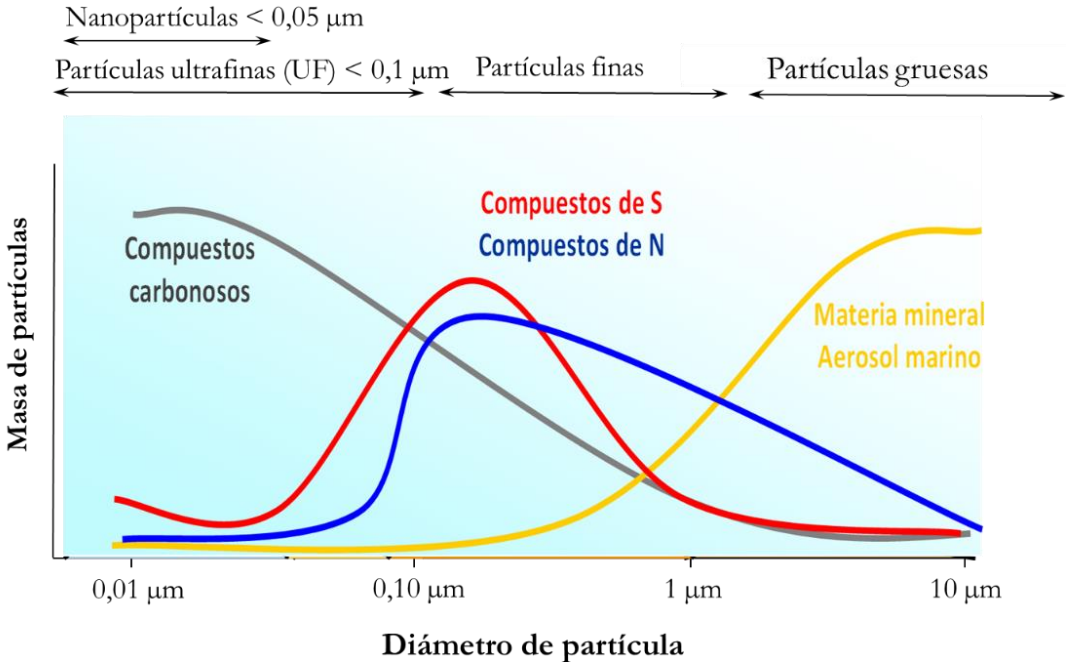


Figura 2. Composición de la materia particulada atmosférica en función de su tamaño de partícula [López Mahía; 2016]

Las fuentes naturales más comunes son las emisiones biogénicas, spray marino, las erupciones volcánicas, transporte de polvo, etc. Por otra parte, los procesos de combustión (domésticos e industriales), construcción, actividades agrícolas y las emisiones del tráfico (tubos de escape, abrasión de frenos, desgaste, etc.) son las principales fuentes de origen antrópico.

El estudio del PM resulta de gran interés debido a sus efectos negativos sobre el clima, los ecosistemas, la visibilidad y la salud humana. Además, el PM proporciona una superficie para reacciones químicas (en fase condensada o de superficie), participando por tanto en la química de la atmósfera.

Mientras que sus efectos sobre el clima se deben fundamentalmente a sus propiedades ópticas (dispersión y absorción de la luz solar y la radiación térmica) que alteran el balance energético de la Tierra fomentan el cambio climático [Blanco Heras; 2009], en los ecosistemas puede afectar a procesos como la fotosíntesis y alterar los ciclos de nutrientes (acidificación, eutrofización) [Putaud et al., 2010].

En lo que se refiere a sus efectos sobre la salud, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer de la OMS, a través del Informe realizado en 2013, determinó que la contaminación del aire exterior es carcinógena para el ser humano, y que las partículas del aire contaminado están estrechamente relacionadas con la

creciente incidencia del cáncer, especialmente el cáncer de pulmón. También se ha observado una relación entre la contaminación del aire exterior y el aumento del cáncer de vías urinarias y vejiga.

Según estimaciones de 2012, la contaminación atmosférica en las ciudades y zonas rurales de todo el mundo provoca cada año 3 millones de defunciones prematuras; esta mortalidad se debe a la exposición a pequeñas partículas (PM_{10}) o menores ($PM_{2,5}$ o PM_1) y que pueden causar cardiopatías, neumopatías y cáncer, como consecuencia de alcanzar la región traqueobronquial y alveolar.

En las Directrices de la OMS sobre la Calidad del Aire se estima que una reducción media anual de las concentraciones de partículas (PM_{10}) de 70 µg/m^3, común en muchas ciudades en desarrollo, a 20 µg/m^3, permitiría reducir el número de defunciones relacionadas con la contaminación atmosférica en aproximadamente un 15%.

Sin embargo, incluso en la Unión Europea, donde las concentraciones de PM de muchas ciudades cumplen los niveles fijados en las Directrices, se estima que la exposición a partículas de origen antropogénico reduce la esperanza media de vida en 8,6 meses.

El Real Decreto RD 102/2011, relativo a la mejora de la calidad del aire, y la guía de calidad del aire de la Organización Mundial de la Salud (OMS), incluyen el PM_{10} y el $PM_{2,5}$ entre los contaminantes regulados, estableciendo los valores límite que se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Valores límites de protección a la salud para el material particulado atmosférico (PM_{10} y $PM_{2,5}$)

	Real Decreto 102/2011			**Guía calidad (OMS)**
Contaminante	Período	Valor límite protección a la salud (µg/m^3)	Nº máximo de superaciones	Valor límite protección a la salud (µg/m^3)
PM_{10}	Diario	50	35	50
	Anual	40	-	20
$PM_{2,5}$	Diario	-		25
	Anual	25 (que se reducirá a 20 en el año 2020)		10

1.2. AMINAS ALIFÁTICAS EN MATRICES ATMOSFÉRICAS

Como hemos visto, las aminas son compuestos derivados de nitrógeno que tienen su origen natural (quema de biomasa o producción a partir de organismos dada su participación en funciones biológicas muy importantes) y principalmente antrópico (combustión de residuos, tratamiento de aguas residuales, plantas de procesamiento de pescado, agricultura y las granjas de animales etc).

La mayoría de las fuentes emiten tanto aminas alifáticas como aromáticas, si bien en la ganadería, una de las fuentes de mayor importancia, se emiten fundamentalmente aminas alifáticas. Las aminas más abundantes y frecuentes en la atmósfera son las alifáticas de bajo peso molecular, con entre 1 y 6 átomos de carbono: metilamina (MA), dimetilamina (DMA), trimetilamina (TMA), etilamina (EA), dietilamina (DEA), trietilamina (TEA), 1-propilamina y 1-butilamina.

Estudios recientes han demostrado que es probable que las aminas puedan mejorar los procesos de nucleación en la atmósfera de forma más eficaz que el amoníaco, a pesar de que las concentraciones de aminas atmosféricas son típicamente varias magnitudes inferiores a las del amoníaco. El comprender las fuentes, las transformaciones y el destino de las aminas en el material particulado es muy importante, ya que estas especies tienen más probabilidades de aumentar la formación de partículas nuevas (figura 3).

Las alquil aminas tienen un papel fundamental en los procesos de crecimiento de aerosoles, impacto radiactivo y propiedades higroscópicas de las partículas. Su marcado carácter básico las convierte en compuestos “especiales” entre las especies orgánicas que se hallan en la atmósfera. Debido a su capacidad de neutralizar ácidos pueden actuar como sumideros de ácidos inorgánicos y/o orgánicos.

Esta producción de aerosoles orgánicos secundarios (SOA) se produce vía ácido-base, con ácidos inorgánicos y orgánicos y a través de reacciones con el ozono (O_3), el radical hidroxilo (OH), y el radical nitrato (NO_3). Las aminas más comunes (MA, DMA y TMA) sometidas a reacciones fotoquímicas contribuyen a la formación del 10% de N_2O anual, siendo éste un gas importante en el efecto invernadero, que podría influir en el cambio climático.

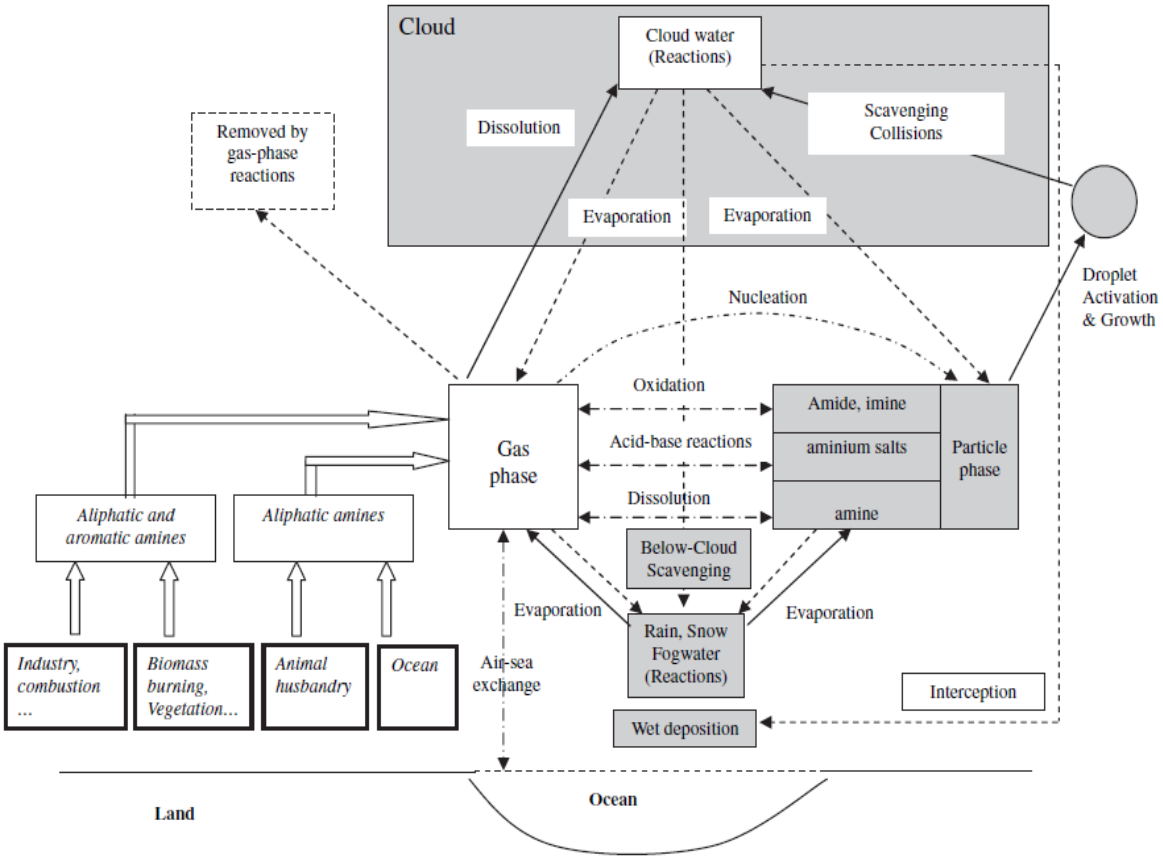


Figura 3. Diagrama esquemático del ciclo de las aminas en la atmósfera

A pesar de su importante participación en las reacciones atmosféricas, existe poca información acerca de las propiedades termodinámicas y cinéticas de las aminas en la atmósfera [Ge et al., 2011].

Las aminas en la atmósfera pueden separarse de la fase gas a las fases acuosas condensadas en forma de partículas y en las nubes y la niebla. La dimetilamina es la amina más importante en la formación de aerosol ya que es menos volátil el NH_3 (presión de vapor de 203 kPa y 1003 kPa a 298,15 K, respectivamente).

Los niveles de DMA en nubes de agua se incrementan significativamente durante los periodos de incendios forestales a diferencia de los niveles de DMA en partículas, incluyendo en partículas residuales de gotas, debido a la disolución de DMA en el agua de nubes y probablemente la volatilización de DMA después de la evaporación de la gota.

Las aminas por lo general tienen olores característicos, son peligrosas, tóxicas y reactivas. Aunque algunas aminas son tóxicas de por sí, especialmente las aromáticas, en general muchas aminas alifáticas tan solo provocan irritación de ojos, piel y tracto respiratorio superior, tos, dificultad para respirar. Pero en cualquier caso son compuestos peligrosos debido a que sus productos de degradación, especialmente las N-nitrosaminas y las N-nitraminas, sí presentan una toxicidad más elevada que sus aminas precursoras (principalmente a partir de aminas secundarias) [Klein, D. (2004)].

En la figura 4 se indica la oxidación de las dietilamina, en su reacción con nitratos y nitritos. Además, la oxidación de aminas (ejemplo la dietilamina) puede dar lugar a compuestos carcinogénicos y mutagénicos.

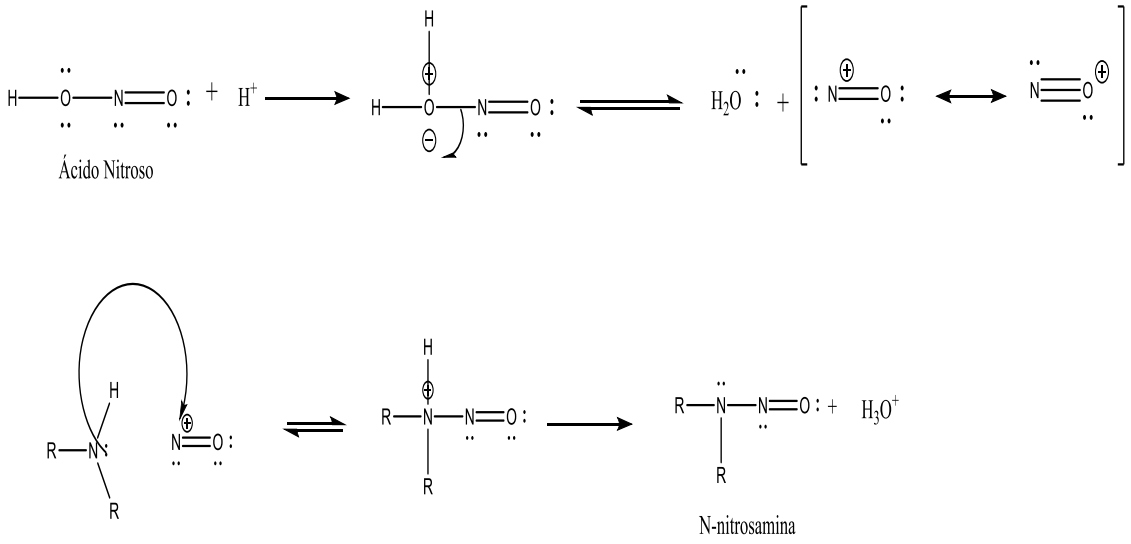


Figura 4. Formación de nitrosaminas a partir de la reacción de aminas con ácido nitroso

La metilamina ha sido incluida en la lista de Hoffmann de tóxicos en el humo del cigarrillo. La ingestión o inhalación de metilamina conduce a vasoespasmos, lesiones endoteliales, así como las complicaciones hepáticas asociadas con enfermedad inflamatoria intestinal [Zhanga et al., 2012]. Una exposición masiva a la metilamina causa graves irritaciones y daños en el pulmón y ojos, hipotensión, coma y muerte.
Como ya se comentó anteriormente no existe una normativa sobre los límites permitidos de aminas en el aire ambiente. Pero el Instituto de Higiene y seguridad en el trabajo establece los Valores Límite Ambientales (VLA) de exposición diaria para las aminas alifáticas, referidos a los ambientes de trabajo [INSHT, 2017].

Son valores de referencia para las concentraciones de los agentes químicos en el aire, y representan condiciones a las cuales se cree, basándose en los conocimientos

actuales, que la mayoría de los trabajadores pueden estar expuestos día tras día, durante toda su vida laboral, sin sufrir efectos adversos para su salud (tabla 2).

Tabla 2. Valores Límite Ambientales de exposición diaria para las aminas alifáticas [INSHT, 2017].

Abreviatura	VLA-ED(1)	VLA-EC(2)	Efecto
EtA	1 ppm; 2,5 mg/m^3	3 ppm, 7,5 mg/m ^{3}	Vía dérmica
MA	15 ppm; 6,5 mg/m^3	5 ppm, 19 mg/m^3	-
DMA	5 ppm, 9,4 mg/m^3	2 ppm, 3,8 mg/m^3	-
EA	5 ppm; 9 mg/m^3	-	-
DEA	5 ppm; 15 mg/m^3	10 ppm, 30 mg/m^3	Vía dérmica

(1) VLA-ED: *Es la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador medida, o calculada de forma ponderada con respecto al tiempo, para la jornada laboral real y referida a una jornada estándar de ocho horas diarias.*

(2) VLA-EC: *Es la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador, medida o calculada para cualquier período de 15 minutos a lo largo de la jornada laboral, excepto para aquellos agentes químicos para los que se especifique un período de referencia inferior, en la lista de Valores Límite.*

1.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS AMINAS OBJETO DE ESTUDIO

Las aminas son derivados del amoníaco en los que uno o más de sus átomos de hidrógeno están sustituidos por grupos alquilo (aminas alifáticas) o arilo (aminas aromáticas). Dependiendo del número de hidrógenos sustituidos, se distingue entre aminas primarias, secundarias y terciarias. El nitrógeno forma tres enlaces simples a través de los orbitales con hibridación sp^3 con ángulos de 108º. El par solitario ocupa el cuarto orbital con hibridación sp^3 y es el responsable del comportamiento básico o nucleófilo de las aminas.

En las aminas aromáticas, como la anilina, la característica más destacable es la deslocalización del par libre en el anillo aromático. Esta deslocalización produce un aumento en la densidad electrónica del grupo fenilo, aumentando la reactividad de la anilina en reacciones de sustitución electrófila, y como consecuencia son menos básicas. La estabilización por resonancia se pierde si el par solitario se protona, y por ello el átomo de nitrógeno de una arilamina es menos básico que el átomo de nitrógeno de una alquilamina.

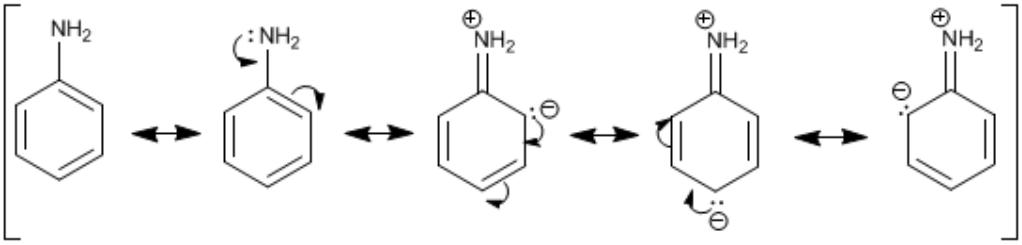


Figura 5. Deslocalización del par libre de electrones en el anillo aromático de una amina aromática.

En la tabla 3 se indican las fórmulas de las 5 aminas alifáticas objeto de estudio. Las propiedades químicas de las aminas son semejantes a las del amoniaco. Al igual que éste, son sustancias básicas, aceptores de protones, según la definición de Brønsted-Lowry:

$$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$$

$$RNH_2 + H_2O \leftrightarrows RNH_3^+ + OH^-$$

Esta basicidad de las aminas depende de los efectos inductivo y estérico. Así, el pKa aumenta con la longitud de la cadena carbonada (efecto inductivo). La cadena carbonada cede carga al grupo amino, por efecto inductivo, aumentando su basicidad. La base fuerte tiene un ácido conjugado débil, por tanto el pKa aumenta. Pero si la cadena es muy voluminosa, comienzan a predominar efectos estéricos, que provocan una disminución del pKa. Cuanto más elevado sea el valor del pKa, la amina será más básica y esta propiedad se utiliza para extraerlas o separarlas de las mezclas con otras sustancias orgánicas (extracción con disolventes). Así, cuando se añade un ácido acuoso, las aminas se protonan formando iones amonio, los cuales son más solubles en la fase acuosa que en la fase orgánica poseer carga.

Tabla 3. Fórmulas de las aminas objeto de estudio

Abreviatura	Formula empírica	Fórmula desarrollada
EtA	C_2H_7NO / $H_2NCH_2CH_2OH$	H_2N OH
MA	CH_5N / CH_3NH_2	H_3C-NH_2
DMA	$(CH_3)_2NH$	H_3C H N CH_3
EA	$C_2H_5NH_2$/C_2H_7N	NH_2
DEA	$C_4H_{11}N$/ $(C_2H_5)_2NH$	N H

Las aminas forman puentes de hidrógeno más débiles que los alcoholes, debido a la menor polarización del enlace N-H frente al O-H. Por tanto, los puntos de ebullición de las aminas son más bajos (por ej. 17ºC para la etilamina por 78ºC para el etanol) y también presentan una menor solubilidad en agua.

Además, las aminas primarias tienen mayores puntos de ebullición que las secundarias y éstas a su vez mayores que las aminas terciarias. Esto se debe a que la amina terciaria no puede formar puentes de hidrógeno (carece de hidrógeno sobre el nitrógeno), lo que explica su bajo punto de ebullición. En el caso de la amina secundaria, los impedimentos estéricos debidos a las cadenas que rodean el nitrógeno dificultan las interacciones entre moléculas.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas de las aminas objeto de estudio

Amina	NºCAS	PM (g/mol)	pKa	$Pv_{20ºC}$ (kPa)	P. fusión (ºC)	P. ebullición (ºC)	Solubilidad en agua
EtA	141-43-5	61,1	9,5	53	10	170	Muy soluble
MA	74-89-5	31,1	10,6	304	-92	-7,5	Muy soluble
DMA	124-40-3	45,1	10,7	170	-96	7,5	Muy soluble
EA	75-04-7	45,1	10,6	121	-81	17	Miscible
DEA	109-89-7	73,1	11,0	25,9	-50	55.5	Miscible

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método para la determinación de cinco aminas alifáticas: etanolamina (EtA), metilamina (MA), dimetilamina (DMA), etilamina (EA), dietilamina (DEA) en material particulado atmosférico de diámetro aerodinámico inferior a 10 μm (PM_{10}) por cromatografía de líquidos (HPLC-UV-FL).

Dadas las características de estas aminas (polaridad, inestabilidad química y el no presentar ningún grupo cromóforo) se hace necesaria una derivatización química de las mismas como paso previa a su determinación cromatográfica. Con ello se mejoraría la sensibilidad y selectividad de la determinación que será de gran ayuda para determinar estos compuestos en las muestras en la que se encuentran a niveles traza.

Todo ello implica:

(1) desarrollar un método simple, relativamente rápido y sensible para la derivatización

(2) utilizar un reactivo de derivatización que proporcione un rendimiento elevado y una cinética rápida para las diferentes aminas.

(3) Realizar la optimización del proceso de derivatización.

(4) Aplicar el método optimizado a la determinación de aminas alifáticas en muestras de particulado atmosférico PM_{10} de un entorno urbano, realizando la extracción previa de los analitos.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

3. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

La cuantificación de aminas a bajos niveles de concentración en el aire (pptv) requiere una cantidad de muestra suficiente y/o detectores altamente sensibles [Chen et al. 2014]. Las aminas alifáticas de bajo peso molecular objeto de estudio (EtA, MA, DMA, EA, DEA) son mayoritarias en la atmósfera, debido a que son emitidas por una gran cantidad de fuentes tanto antropogénicas como naturales. A continuación se presenta una revisión centrada en el muestreo y determinación de estas aminas en el aire.

3.1. MUESTREO DE AMINAS ALFÁTICAS EN AIRE

Como se ha comentado anteriormente estas aminas alifáticas presentan presiones de vapor elevadas, por lo que se encuentran en la atmósfera entre las fases gas y particulada. Para la determinación de aminas en el aire se emplean diferentes procedimientos basados en la adsorción, absorción, retención en filtros, membranas o impactadores. El muestreo puede ser activo con la utilización de una bomba que fuerza el paso de aire a través del soporte de retención (tubos denuder) o de forma pasiva mediante un proceso de difusión del contaminante a través del medio de retención (tubos pasivos).

A pesar de que las aminas alifáticas de cadena corta tienen valores de presión de vapor altos, sí se han identificado en el particulado atmosférico con más frecuencia y en mayores niveles de concentración en áreas en las que existe una gran influencia oceánica (el aerosol marino es una de las fuentes más importantes de los analitos objeto de estudio) [Ge et al., 2011]. Las concentraciones de aminas son más altas en las zonas rurales que en los ambientes urbanos, lo que sugiere que las aminas se originan principalmente de la actividad agrícola y de las operaciones ganaderas.

Por otra parte, tienen una alta solubilidad en agua, que hace que estos compuestos se disuelvan en la fase líquida del aerosol, en el agua de lluvia, niebla o nieve [Cornell et al., 2003]. Además, aunque en menor concentración, también hay aminas de mayor peso molecular, cuya presencia en el material particulado atmosférico es de mayor relevancia [Poste et al., 2014]. Para las aminas aromáticas, las concentraciones ambientales dependen en gran medida de los lugares de muestreo, ya que la mayoría de ellos están vinculados a emisiones industriales específicas. Sin embargo, una de las importantes aminas aromáticas, la anilina, era más ubicua y estaba claramente relacionada con las actividades de fumar en interiores y la mala ventilación [Ge et al., 2011].

En los sistemas de muestreo basados en la absorción, las aminas se recogen en un líquido o en una disolución donde se hace burbujear el aire que las contiene. La retención del contaminante se consigue mediante reacción con el reactivo de la disolución; los más utilizados son EtOH, MeOH o H_2O [Zhanga et al., 2012].

En los sistemas de adsorción, las moléculas de gas se retienen por atracciones intermoleculares en la superficie del sólido adsorbente. En condiciones de equilibrio y a temperatura constante el volumen de gas adsorbido es proporcional a la presión parcial del gas y al área de la superficie. El adsorbente más utilizado para aminas es el gel de sílice y el Tenax® (óxido de p-fenileno), mientras otros adsorbentes menos utilizados son el carbón activado, la amberlita XAD-4 (copolímero hidrófobo de resina de estireno-divinilbenceno), lana de vidrio tratada con ácido fosfórico y Porasil A® (base de sílice) Pueden usarse de manera individual o en combinaciones de ellos [Szulejko et al., 2014].

Los equipos de muestreo basados en la retención en filtros se clasifican según el volumen de aire aspirado, siendo estos de alto y bajo volumen (30 m^3/h - 2,3 m^3/h, respectivamente). El mecanismo por el cual las partículas quedan retenidas en el filtro varía según el tamaño de la partícula y el flujo de aspiración pudiendo ser: impacto, sedimentación, difusión o atracción electrostática. El principal problema del muestreo basado en la filtración son los errores asociados a la pérdida de semivolátiles del filtro, contaminación de las partículas durante el transporte y almacenamiento y alteración de la composición química provocada por reacciones del material particulado con gases atmosféricos durante el muestreo [Blanco Heras; 2009].

3.2. DETERMINACIÓN DE AMINAS ALIFÁTICAS EN AIRE

Las etapas posteriores al muestreo suelen incluir etapas de extracción, preconcentración y derivatización como paso previo a la determinación final que se lleva a cabo generalmente con cromatografía de gases o de líquidos, aunque también hay algunos métodos que hacen uso de otras técnicas como la cromatografía de fluidos supercríticos, la cromatografía iónica y la electroforesis capilar [Szulejko y Kim, 2014].

En cromatografía de gases, las aminas se derivatizan para mejorar la resolución formando derivados menos polares y por tanto más adecuados para este tipo de cromatografía. Las aminas son difíciles de analizar con GC debido a su carácter básico y además, el grupo amino introduce un dipolo en la molécula siendo el responsable de una fuerte interacción con grupos silanol y puentes de siloxano en la estructura de la fase estacionaria de la columna capilar.

Esto a menudo da lugar a efectos de adsorción no lineales y puede ser detectado en el cromatograma por la aparición de picos con grandes colas. La mejor manera de evitar la interacción del dipolo fuerte es derivatizar la amina. La derivatización de aminas puede emplearse no sólo para reducir la polaridad sino también para mejorar la volatilidad, selectividad, sensibilidad y separación de estas aminas.

La elección de un reactivo derivatizante se basa en el grupo funcional que requiere derivatización, la presencia de otros grupos funcionales en la molécula y la razón para realizar la derivatización. Así, se han utilizado varios agentes derivatizantes tales como cloroformiatos, trifluoroacetato de 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofluorobenceno y cloruro de bencenosulfonilo [Sacher et al., 1997].

Por su parte, en cromatografía de líquidos la derivatización suele estar más relacionada con la detección de los compuestos mediante espectrometría de masas o permitiendo el uso de detectores de UV y fluorescencia. Las aminas alifáticas debido a su alta volatilidad y polaridad, inestabilidad química y al no presentar ningún grupo cromóforo, no podrían ser analizadas directamente con un detector UV o de fluorescencia. Por eso es necesario derivatizar las aminas con un compuesto que presente grupos absorbentes.

Esta técnica puede proporcionar una detección altamente sensible y selectiva de estas aminas por unión a un cromóforo o fluoróforo originando productos con fuerte absorción UV y/o emisión de fluorescencia y también puede mejorar la retención reduciendo la polaridad de estos compuestos. No obstante, los reactivos de derivatización son adecuados para aminas primarias y secundarias, pero no para aminas terciarias debido a la ausencia de un átomo de hidrógeno reemplazable. En la actualidad, existe un gran número de agentes derivatizantes.

El o-ftalaldehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol y en medio básico da un producto fluorescente con un máximo de excitación a 340 nm y una región de emisión entre 400-500 nm). Este método ofrece dos grandes ventajas, que son la obtención de derivados estables y la eliminación de interferencia de aminoácidos .

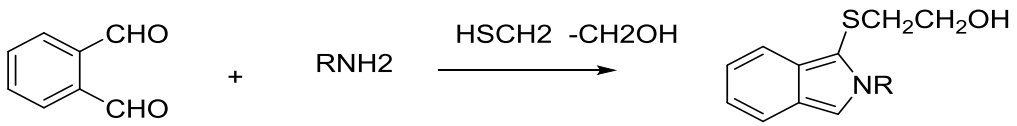


Figura 6. Reacción de derivatización de OPA con una amina primaria.

El cloruro de dansilo (DNSCl) carece de selectividad, por eso una gran variedad de aminoácidos, péptidos pequeños y aminas biogénicas dan lugar a derivados y por tanto crea ruido de fondo en las separaciones cromatográficas siendo necesaria la purificación en columna para eliminar las interferencias causadas por l subproductos de derivatización. Los derivados no son muy estables lo que provoca que el método sea inadecuado para el análisis de grandes números de muestras [12-13].

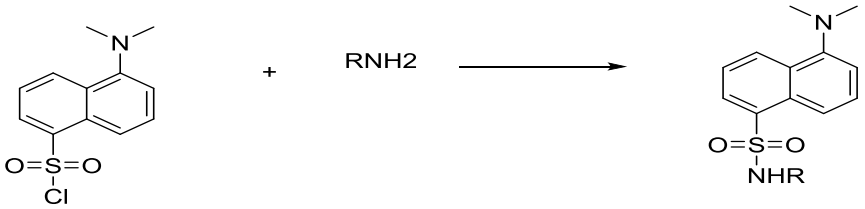


Figura 7. Reacción de derivatización de DNSCl con una amina primaria.

El agente derivatizante 1-(1H-imidazol-1-il)-2-(2-fenil-1H-fenantro [9,10] imidazol-1-yl) etanona (IPPIE) proporciona límites de detección mucho más bajos que otros reactivos, lo cual podría ser atribuido a la mayor conjugación π-π en la estructura de IPPIE [Zhanga et al., 2012].

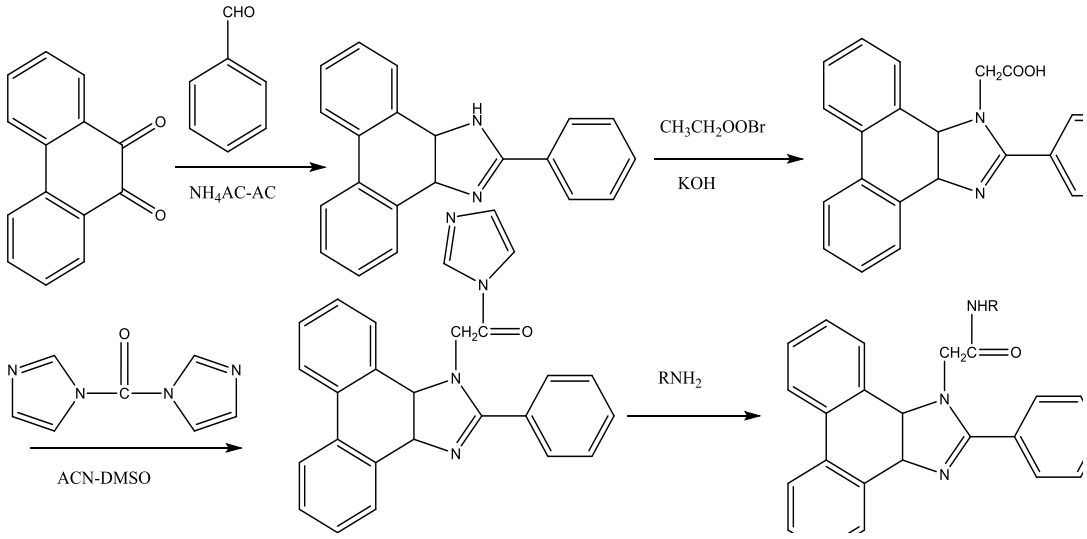


Figura 8. Reacción de derivatización de IPPIE con amina primaria [Chen et al. 2014]

Los cloroformiatos [Szulejko y Kim, 2014] también son muy utilizados. Entre los que destaca el cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC) [Iqbal et al., 2014; Herráez-Hernández et al., 2006, Fernández-Amado, 2017]. Este último agente derivatizante es uno de los más utilizados debido a su versatilidad (tiene capacidad para derivatizar aminas primarias, secundarias y terciarias y es válido tanto para detección por UV como

por fluorescencia) y también a la rápida cinética de su reacción, al menos con aminas primarias y secundarias [Szulejko y Kim, 2014; Iqbal et al., 2014]. La reacción de derivatización de una amina con FMOC se realiza mediante un intermedio tetraédrico (amonio cuaternario) originándose un carbamato por la desprotonación de las aminas primarias y secundarias (muy rápida en condiciones básicas).

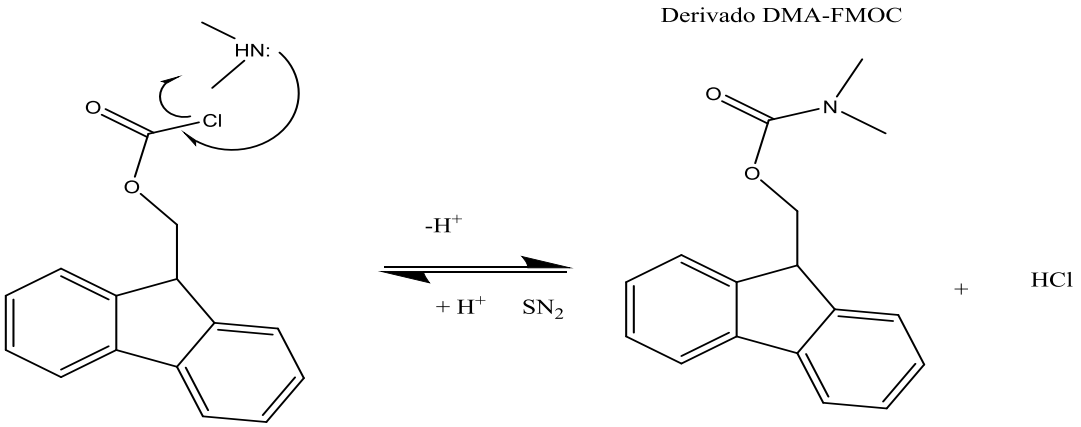


Figura 9. Reacción de derivatización de FMOC con una amina secundaria [Asif Iqbal et al., 2014]

El FMOC es muy utilizado como agente de derivatización para aminas ya que sus productos derivados son muy polarizables, tienen propiedades cromóforas y en el caso de que se detenga la reacción de derivatización con glicina, el derivado es estable durante 5 dias.

La derivatización con N-acetil-l-cisteína naftaleno-2,3-dicarboxaldehído (NDA) es un método estándar para el análisis de aminas primarias a concentraciones muy bajas. El NDA reacciona con aminas primarias en presencia de cianuro (CN), que actúa como un nucleófilo, para formar derivados de aminas intensamente fluorescentes (CBI). Los derivados de CBI, en comparación con los de OPA, exhiben una estabilidad química mejorada, excitación máxima en la región visible y un aumento de la eficiencia de fluorescencia. El principal problema es que el mecanismo de formación de los derivados de CBI no se conoce por completo, por lo que actualmente no existen unas condiciones experimentales [Wang et al., 2016].

El empleo de la agitación, el calor o ultrasonidos acelera la cinética de reacción. Una vez se ha formado el derivado puede Las reacciones de derivatización se acompañan de posteriores etapas de concentración del derivado obtenido o incluso en una única etapa de derivatización/concentración. Para ello se hace uso de la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SMPE) con la utilización de fibras de

diferente naturaleza o la in-tube microextracción en fase sólida (IT-MSPD). [16, 18-19, 22-23]. La MSPD asistida por ultrasonidos propuesta garantiza un tratamiento previo cómodo y rápido (<10 min) y un análisis más preciso que los métodos convencionales por simplificar el procedimiento y reducir la pérdida de analitos volátiles [Chen et al. 2014].

Después de un tratamiento adecuado de la muestra, la cuantificación de aminas se puede completar por una amplia variedad de sistemas de detección basadas MS, MS/MS. La principal ventaja es la exactitud, pero no es una técnica tan universal y su funcionamiento requiere personal altamente capacitado.

La electroforesis capilar (CE) permite la determinación de alquilaminas de bajo peso molecular incluyendo aminas terciarias sin derivatización. Sin embargo, ciertas aminas son a menudo co-eluidas como un único pico (por ejemplo, dietilamina y trimetilamina) o poseen interferencias por otros cationes abundantes presentes en las partículas de aerosol (por ejemplo, NH^{+4} y K^{+}) debido a la baja eficiencia de separación y resolución de IC.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. EQUIPOS, INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

- Sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q™.
- Sistema de filtración de aguas suministrado por Supelco Inc.(Bellefonte,PA).
- Filtros de nylon de 45µm (Sartorius stedim; biotech; Goettingen, Alemania).
- Filtros PTFE-HP de 0.5µm, hidrofílico (ADVANTEC).
- Filtros PTFE de (ADVANTEC, MFS. Inc; DUBLÍN).
- Filtros Millex-HV de PVDF Millipore.
- Filtros ACRODISC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).
- Micropipetas de 20, 100, 1000, 5000 µL (Eppendorf Research).
- Baño de ultrasonidos Selecta (Drogallega).
- Balanza analítica Sartorius Genius, situada en una sala de balanza acondicionada (50 ± 5% humedad relativa y 21± 1ºC de temperartura.
- Un sistema HPLC Waters e2695 Separations Module Instrument Specification equipado Detector UV 2998 PDA y un detector 2475 FLR, Cienytech (Alliance).
- Columna de fase inversa Simmetry C18 (4,6 x 75mm, 3,5µm) de Waters, Europa, Dublín.
- Rotavapor Buchi R-200.
- pH-metro Thermo Orion-model 210 (Drogallega).
- Jeringas Omnifix-F 1mL (Braun).
- Material de vidrio de uso común en un laboratorio: viales ámbar de 1,1 mL de Fisherbrand, matraces aforados, vasos de precipitados, Pipetas Pasteur ...
- Agua ultrapura de 18,2 MΩ.cm^{-1} a 25 ºC.
- Acetonitrilo supragradiente grado HPLC (Scharlau).
- Metanol supragradiente grado HPLC (Scharlau).
- N-hexano para síntesis (Scharlau).
- Patrones de las aminas: metilamina (40% en agua), clorhidruros de dimetilamina (99%), trimetilamina (grado material de referencia analítica), etilamina (98%), dietilamina (99%) y etanolamina (≥99%).Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU):
- 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) sólido (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido bórico (99,99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).
- NaOH (99,999%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).
- EPIS: guantes, gafas y mascara de seguridad Drager X- Plore

4.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES

A partir de los productos comerciales se preparan las disoluciones individuales y la mezcla de las aminas (EtA, MA, DMA, EA y DEA) disolviéndolos en agua a una concentración de 70-75 µg/mL, según la amina. A partir de ellas se preparan las disoluciones de trabajo de 5 µg/mL que se utilizan para los estudios de optimización del procedimiento. Para la preparación de las disoluciones concentradas de las aminas se utiliza la máscara de seguridad Drager para vapores orgánicos, amoníaco etc. Las disoluciones patrón de aminas se conservan en la nevera a una temperatura de 4,5 ºC y se preparan nuevas cada 4 días porque se observa que hay una pérdida de señal para todas las aminas, especialmente para la etanolamina.

Se prepara una disolución madre de FMOC 10 mM a partir del producto sólido que se disuelve en 10 mL de ACN y que se conserva en la nevera durante 2 meses. A partir de la cual se preparan las disoluciones de trabajo de 1mM, en acetonitrilo cada 2 días. A partir de esta disolución, diariamente se preparan el resto de disoluciones de FMOC más diluidas que se utilizan durante la optimización del proceso de derivatización. Todas las disoluciones se conservan en la nevera a 4,5ºC.

El tampón borato se prepara disolviendo ácido bórico en agua. Se preparan disoluciones tampón borato de diferente concentración y pH que se emplean en la optimización del proceso de derivatización. La disolución del tampón borato se mantiene sin degradarse en la nevera a 4,5 ºC durante todo el tiempo de trabajo (4 meses).

Se prepara además una disolución de NaOH 1 M (preparada a partir del producto sólido) que se utiliza para el ajuste del pH del medio en la reacción de derivatización.

4.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El sistema cromatográfico empleado es un cromatógrafo de líquidos Waters e2695 equipado con dos detectores en serie: primero, un detector UV 2998 PDA (detector de fotodiodos) que recoge los datos a en un rango entre 210 nm - 410 nm, y a continuación un detector 2475 FLR (detector de fluorescencia) que opera a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) = 265nm y la longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 315 nm. Todo el equipo de HPLC está controlado por el software Empower 3.0. La separación tiene lugar en una columna C18 a una temperatura de 30ºC. Se utiliza una elución en gradiente binario de dos disolventes: ACN y H_2O que se describe en la siguiente tabla 5 y un volumen de inyección de 20 µL [Fernández-Amado, 2017].

Tabla 5. Condiciones cromatográficas.

Etapas	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%ACN	%H_2O
1	0.0	0.5	45	55
2	1.0	0.7	55	45
3	4.5	1.0	70	30
4	6.0	1.0	100	-
5	11	0.5	45	55

Además se utiliza el MeOH que no interviene en la elución para la limpieza de la jeringa de inyección entre inyecciones.

4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN

Se estudian y optimizan factores tales como las concentraciones del reactivo de derivatización, FMOC (0,03 mM – 1,12 mM); de la disolución tampón de borato (0,05 M - 0,22 M), pH del medio de derivatización (8,5 a 12), tiempo de reacción (5-30 minutos) y la relación entre los volúmenes de reactivos.

Se realiza un diseño composicional dirigido, centrado y ortogonal 2^3 + star, con 16 experiencias (n=3), no randomizadas y seis grados de libertad para la optimización de las variables que resultan más significativas como son [FMOC], [tampón-borato] y el pH.

Se realizan los ensayos de estabilidad del derivado así como de las disoluciones de los reactivos empleados.

Para validar el método optimizado se evalúa el rango lineal, la precisión y los límites de detección y cuantificación para las 5 aminas bajo estudio. Para la realización de la recta de calibrado, se inyectan los patrones de las mezclas de aminas bajo las condiciones optimizadas.

4.5. MUESTREO DE PM10

Las muestras fueron tomadas en una estación fija de la ciudad de A Coruña, donde se emplea un equipo automático de alto volumen DIGITEL DHA-80 que cumple los requisitos de la Norma UNE-EN 12341 para el muestreo de PM_{10} (figura 10). El caudal de aspiración durante el muestreo ha sido de 30 m^3/h. El funcionamiento del equipo es el siguiente: el aire penetra por el cabezal de corte (PM_{10}) por efecto de la aspiración de una bomba, y atraviesa el filtro para ser finalmente expulsado por el extremo opuesto del equipo. Las partículas de diámetro seleccionado son retenidas sobre el filtro. El equipo cuenta con un sensor para la medida del caudal de aspiración y un programador

para el control de tiempo de muestreo. Además dispone de un cambio automático de filtros con una autonomía para 15 filtros. El tiempo de muestreo es de 24 horas, desde las 0 hasta las 24 horas (UTC).

Figura 10. Fotografía del equipo de muestreo DIGITEL DHA-80, de un filtro en blanco y de un filtro muestreado.

Para el muestreo se han empleado filtros de fibra de cuarzo Munktell MK360 de 150 mm de diámetro. Los filtros se manejan con pinzas de teflón y antes de su uso se comprueba, visualmente y empleando una lámpara de luz visible que no presentan defecto alguno, tales como orificios o pérdidas de material que ocasionarían errores en la recolección de la muestra. El Instituto Universitario de Medio Ambiente está acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) para la realización de ensayos medioambientales: toma de muestra y determinación de PM_{10}.

Los filtros en blanco y los filtros con muestra PM10 se acondicionan, como mínimo 48 horas, antes de la pesada en una sala de balanzas acondicionada a 20 ± 1ºC de temperatura y 50 ± 5% humedad relativa. Se dispone de unos filtros control de referencia y si las masas de los filtros blancos de referencia han cambiado menos de 500 µg desde la última sesión de pesada, su masa media se registra y se procede a la pesada de los filtros con la muestra. En caso contrario, no se pesan filtros con las muestras, hasta que la diferencia de pesada de los filtros blancos de referencia sea menor de los 500 µg.

Los filtros que se usan en el muestreo se pesan dos veces con un intervalo de al menos 12 h, para confirmar que el peso del filtro es estable. Posteriormente se toma la media de las dos medidas como peso del filtro en blanco. Después del muestreo los filtros, con materia particulada PM_{10}, se mantienen en la sala de balanzas durante un mínimo de

48 h antes de la primera pesada y después en un intervalo mínimo de 12 h se realiza una segunda pesada. La masa del filtro PM_{10} se toma como la media de las dos pesadas.

Los filtros de muestreo se guardan congelados hasta el momento del análisis. El pretratamiento de las muestras es muy sencillo, se toman 10 sacabocados (ø= 0,5 cm) y, se introducen en el vial ámbar donde se añade 1mL del disolvente de extracción ensayado (MeOH, ACN y H_2O) de tal forma que la alícuota de filtro queda sumergida en su totalidad. La extracción se realiza durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos. También se realiza un blanco de filtro con el mismo número de sacabocados aplicando el mismo procedimiento.

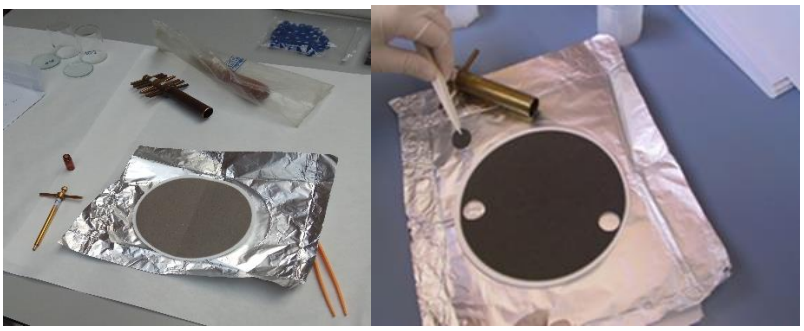


Figura 11. Toma de la alícuota de las muestras con los sacabocados.

Un paso previo a la inyección cromatográfica es la filtración del extracto obtenido para eliminar las partículas en suspensión y que pudieran entrar en las conducciones del cromatógrafo. Se prueban filtros de diferente naturaleza: PVDF, PTFE, PTFE-HP y Acrodisc. También se realizan ensayos sobre la conveniencia o no de derivatizar primero el extracto antes de su filtración o realizar primero la filtración y sobre el extracto filtrado derivatizar las aminas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ENSAYOS PREVIOS

Las aminas bajo estudio son aminas alifáticas de cadena corta: etanolamina, metilamina, etilamina, dimetilamina y dietilamina. Inicialmente se valoró la introducción de la trimetilamina en el estudio porque el FMOC también es capaz de derivatizarla. Sin embargo, al ser una amina terciaria no dispone de un hidrógeno para ser arrancado y ser derivatizada, por lo que sus condiciones de derivatización son diferentes a las del resto, incluyendo entre otras cosas un tiempo de reacción más largo. Por este motivo se descartó la TMA en el método final.

La selección del reactivo de derivatización (FMOC) se debe a la experiencia previa en el grupo y la disponibilidad del reactivo. Todo ello unido a la rapidez de la reacción que se realiza a temperatura ambiente y a la alta sensibilidad (factor de respuesta) de los derivados de las aminas. El grupo de investigación QANAP tiene experiencia en el tema [Prieto-Blanco et al. 2008 y 2009] y esta experiencia es el punto de partida del trabajo que se presenta (tabla 2). El tiempo de derivatización es de 5 minutos ya que se ha visto que los tiempos superiores no mejoran la señal [Fernández-Amado, 2017].

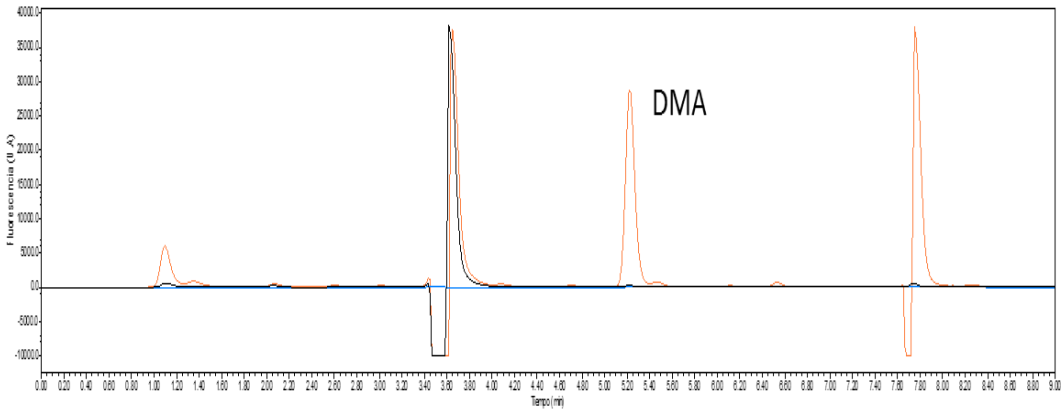
Tabla 6. Condiciones de derivatización iniciales

[FMOC] (mM)	[TAMPÓN] (M)	pH	Tiempo derivatización(min)
0,3	0,05	11,45	5

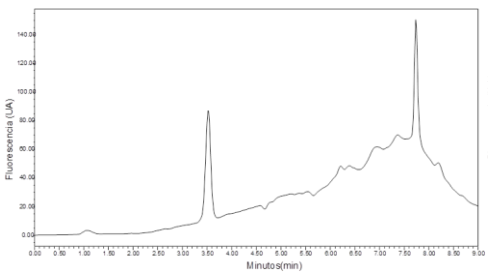
Se comienza el estudio con una única amina, la DMA, por ser una de las más habituales en el aire. Los ensayos se realizan para una concentración de 500 µg/L y paralelamente se realizan los ensayos de blancos de reactivos (ACN) y de procedimiento (los mismos volúmenes de todos los reactivos pero sin la amina.

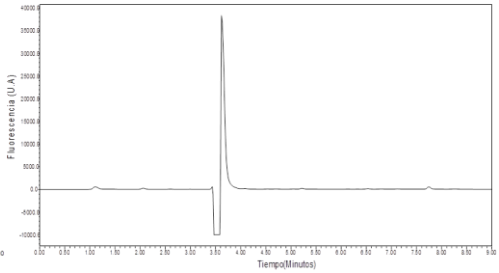
Uno de los problemas en la derivatización con FMOC es la formación de múltiples subproductos que pueden interferir en la separación. Uno de ellos es el FMOC-OH, debido a que estamos en un medio acuoso, es un compuesto polar por lo que su elución será rápida.

A continuación se indica los cromatogramas obtenidos para estas condiciones, observando el derivado de la DMA (figura 12) a un tiempo de retención de 5,4 minutos y los picos de los productos de degradación del FMOC. Se observan que las señales de los blancos tanto de acetonitrilo (fase móvil) como del resto de reactivos empleados en la derivatización es despreciable.



(a)





(b) (c)

Figura 12. Cromatograma: (a) derivado de DMA e (b) ACN (c) blanco de derivatización. [FMOC]=0,03 mM; [TAMPÓN]=0,05 M y pH=11,45 en las condiciones de derivatización iniciales.

EL FMOC se debe añadir en exceso para garantizar la derivatización de toda la amina con mayor rapidez. El principal inconveniente es que el exceso de reactivo se degrada dando lugar a diferentes productos de hidrólisis (figura 13) que pueden interferir en la determinación de las aminas.

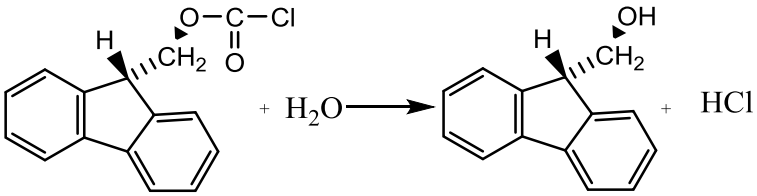


Figura 13. Formación del derivado FMOC-OH

Se comienza el estudio de optimización de una manera univariante, modificando una de las variables y fijando el resto. A continuación se ensayan dos concentraciones distintas de FMOC (0,3 mM y 1 mM), manteniendo constante el resto de las variables (figura 14).

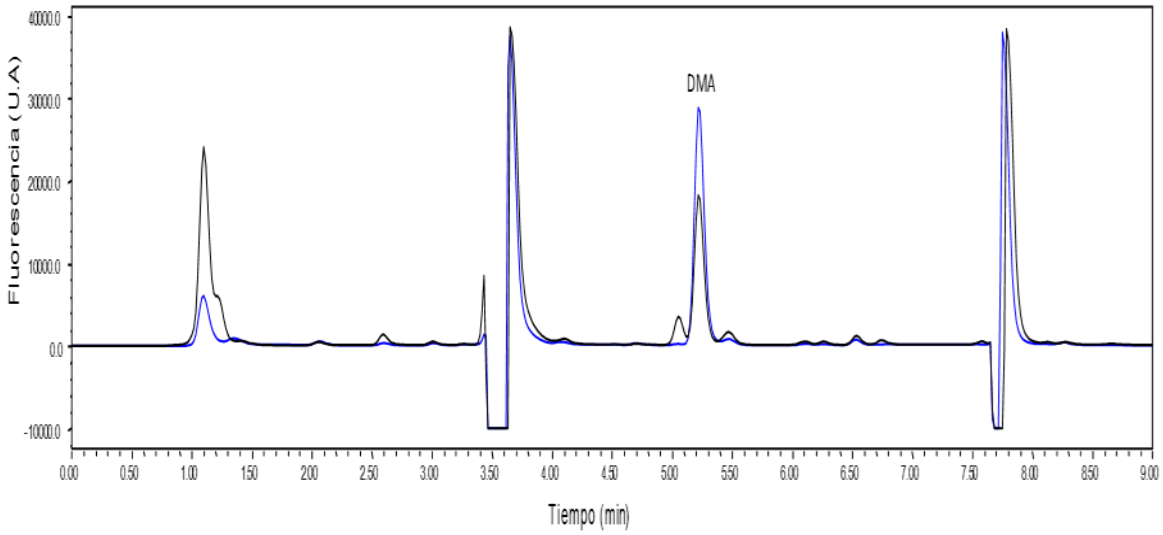


Figura 14. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función de la [FMOC]: — [0,3mM] — [1mM]; [tampón]=0,05 M y pH=11,45

Se observa que la señal de DMA es superior para una [FMOC]= 0,3 mM, por lo que ésta se mantendrá fija en el siguiente experimento. Una vez establecida la concentración de FMOC, se prueba a variar la relación de volúmenes de FMOC, entre 150 µL y 300 µL. Se observa que cuando la relación entre los volúmenes (amina-FMOC-borato) de 1:1:1 en lugar de 1:2:1, el pico correspondiente a la DMA es más intenso y más estrecho, por lo tanto, será el volumen que utilizaremos para la primera parte del estudio (figura 15).

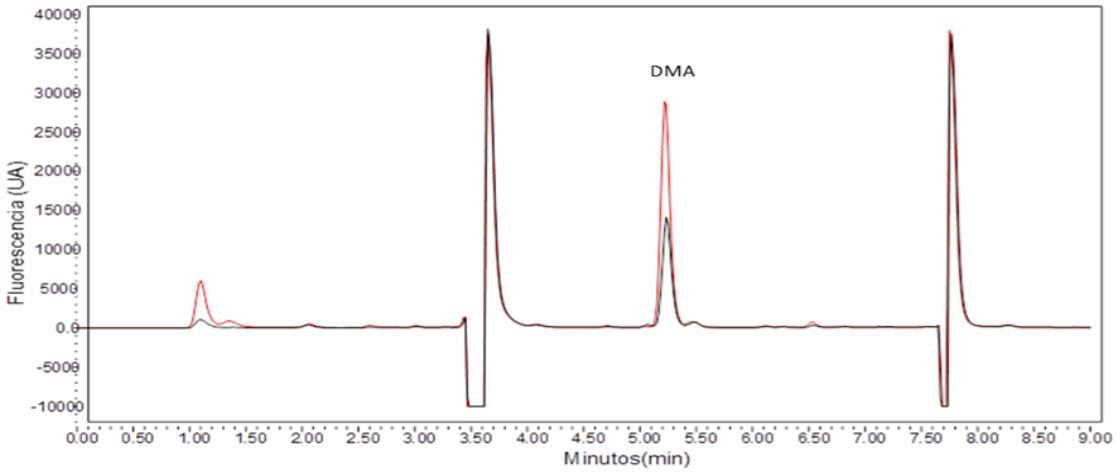


Figura 15. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función del volumen del mismo (relación amina-FMOC-borato): — 1:1:1 — 1:2:1.[FMOC]= 0,3 mM; [borato]=0,05 M y pH=11,45

Otra de las variables a estudiar será el efecto que tiene el pH del medio, y para eso se realiza una derivatización manteniendo constante la [FMOC] = 0,3 mM y la [tampón] = 0,05 M pero variando el pH entre 10,2 y 11,45. Se observa que cuando se varía el pH a

10,2, en lugar de 11,45, la cantidad de subproductos de reacción que forman es mucho mayor y la intensidad de la señal de DMA es menor (figura 16).

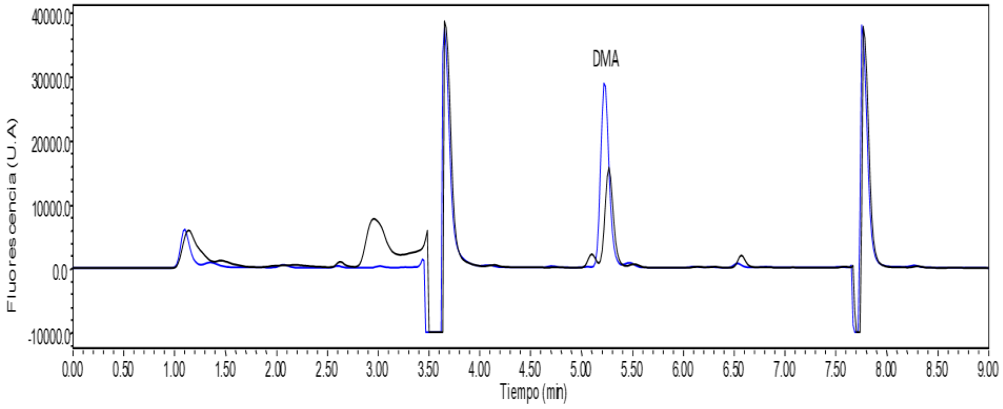


Figura 16. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función del pH: — 11,45 — 10,2. [FMOC]= 0,3 mM; [borato]=0,05 M, ratio 1:1:1

La última variable es la [tampón], y para estudiarla se modificará entre 0,05M y 0,2M (figura 17). Cuando se realiza la derivatización de la mezcla de aminas, la producción de ácido clorhídrico (HCl) puede ser uno de los factores clave en el proceso de derivatización de FMOC-aminas. El HCl sólo se produce en la reacción de derivatización de aminas primarias y secundarias (ver figura 9).

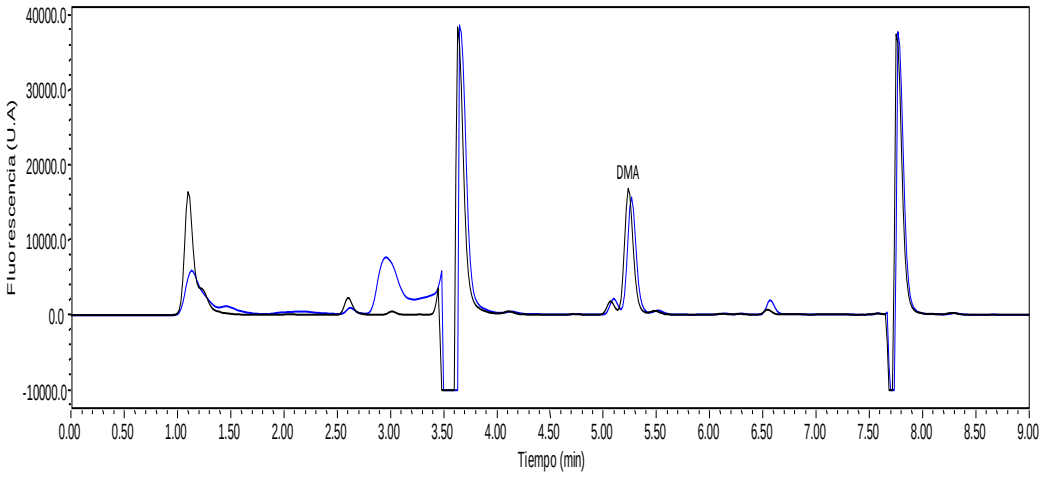


Figura 17. Cromatograma de la variación de la señal del derivado de DMA en función de la [borato]=: — 0,05M — 0,2M. [FMOC]: 0,3 mM; ratio 1:1:1; pH=11,45

Se observa que la señal más intensa para la DMA, se produce en las condiciones de partida (150 µL DMA +150µL FMOC 0,3mM+ 150 µL tampón 0,05M pH=11.45) y que la cantidad de productos de degradación también es menor. En estas condiciones se inyectan los derivados de todas las aminas, de manera individual, para conocer el tiempo de retención de cada una y posteriormente se inyecta el derivado de la mezcla (figura 18).

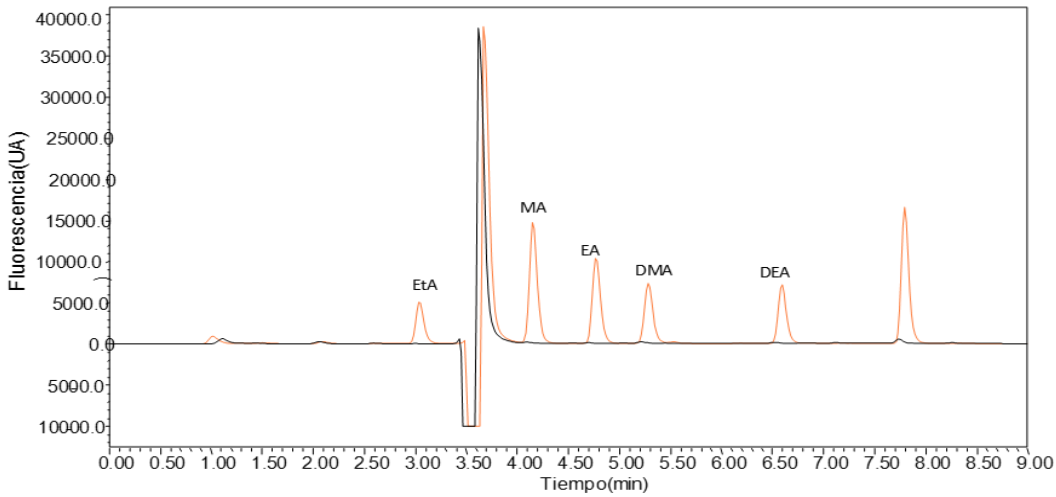


Figura 18. Cromatograma de los derivados de las cinco aminas (—) y del blanco de derivatización (—). Condiciones de derivatización: 150 µL DMA +150 µL FMOC 0,3 mM+ 150 µL+ borato 0,05M pH=11,45

Las 5 aminas se separan en un tiempo de 7 minutos, aunque como se ha indicado en la parte experimental el cromatograma dura 15 minutos (11 de elución y 4 de estabilización del equipo para la siguiente inyección, presión=60 psi). El derivado de la etanolamina, por la elevada polaridad que le confiere el grupo hidroxilo, eluye en primer lugar seguido del derivado de la MA, EA, DMA y finalmente, DEA que es la más apolar.

Se observa que los tiempos no se ven afectados por la presencia de otras aminas pero sí la intensidad de las señales de las aminas en relación con los patrones individuales. Esto ya ha sido descrito por otros autores posiblemente debido a la cantidad insuficiente de FMOC [Iqbal et al., 2014]. Además, para comprobar la estabilidad de los derivados, éstos se inyectaron inmediatamente después de la derivatización, al cabo de 24 horas y después de 13 días (figuras 19 y 20).

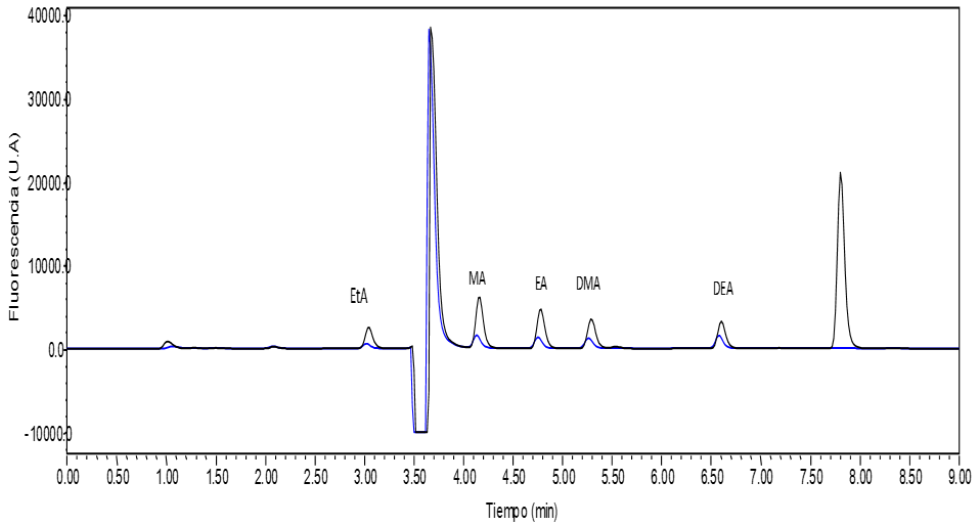
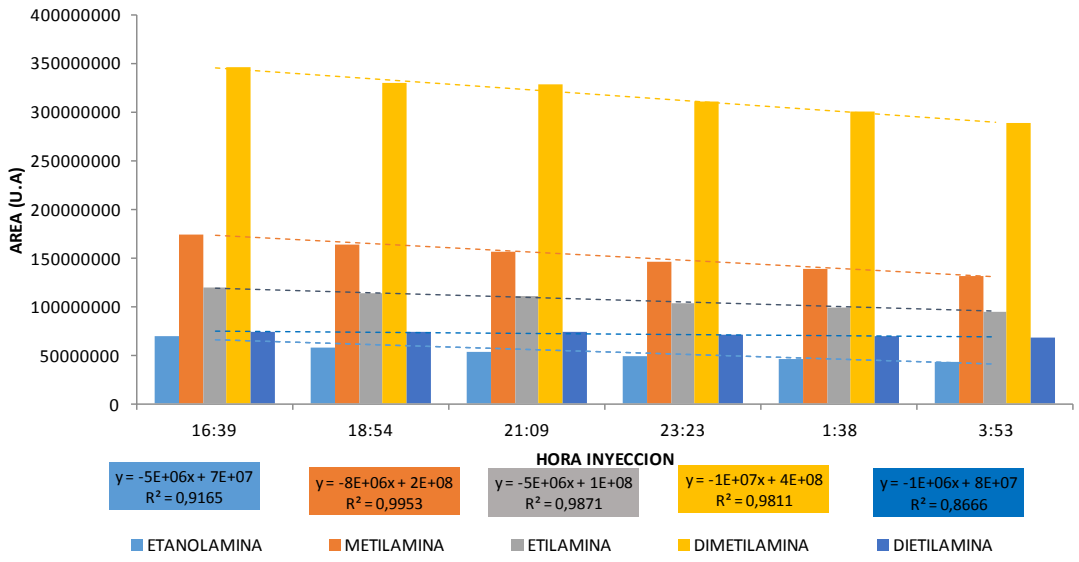


Figura 19. Cromatograma de los derivados de las aminas [200 µg/L]: — 0 min — 13 días (nevera a 4,5ºC)

(a)



(b)

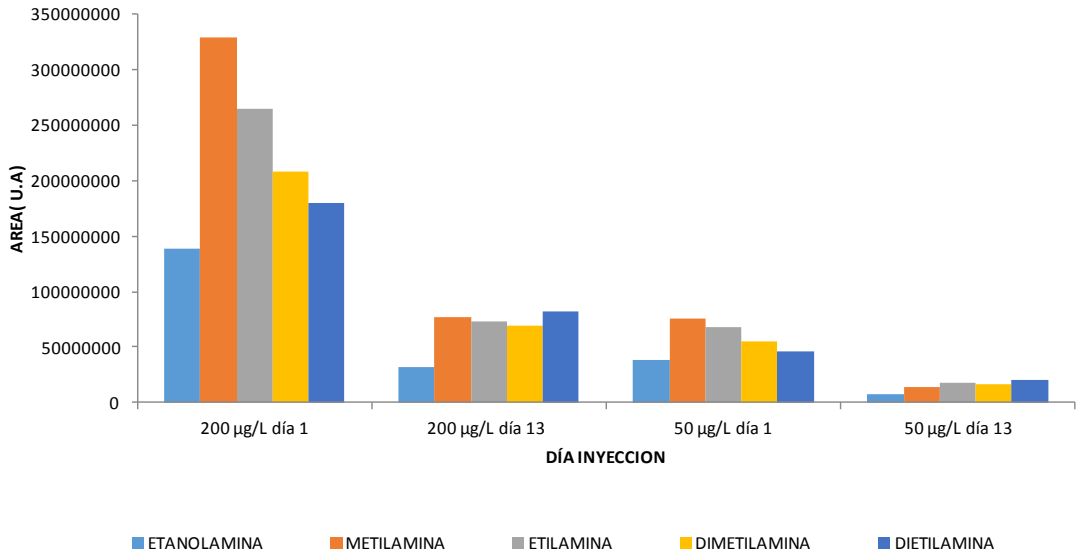


Figura 20. Pérdida de señal de los derivados de las aminas según el período de conservación: (a) [100 µg/L]: 0 min -15 horas y (b) [200 µg/L]: 0 min -13 días (conservados en nevera a 4,5ºC)

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que la pérdida de señal es independiente de la concentración de amina, y que los derivados permanece estable en un período de 15 horas a 4,5ºC (con una pérdida promedio ~ 6 % para el conjunto de aminas, con la excepción de la EtA que en las 3 primeras horas su señal disminuye un 16%). Hay autores que salvan este inconveniente parando la rección con glicina [García Gorostizu, 2001].

También se estudió la estabilidad de las disoluciones de trabajo de las aminas conservadas en la nevera a 4,5ºC. Se observó que a partir de una semana la señal disminuye por lo que es necesario preparar estas disoluciones de trabajo semanalmente.

5.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACIÓN. DISEÑO DE EXPERIENCIAS

Por optimización de un método se entiende la búsqueda de los valores de las variables que producen el mejor resultado en un proceso de determinación analítica. Para conseguir dicha optimización se utilizan los diseños de experiencias que se definen como un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta recibe la influencia de otras variables y estos se utilizan para obtener las condiciones óptimas de un método a través del estudio de la superficie de respuesta. Hay diferentes tipos de optimización:

- Optimización clásica o univariante: en la cual se fijan los valores de todas las variables excepto la que se quiere optimizar. Los principales inconvenientes son la cantidad de experimentos que se necesita para determinar el óptimo y que no siempre disponemos de suficiente información como para afirmar que las variables que son independientes entre ellas. Si las variables son dependientes, la técnica no puede utilizarse, puesto que no será cierto que una de ellas permanece constante mientras modificamos los valores de la otra.
- Optimización factorial o multivariante: es un conjunto de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente conjuntos de datos multivariantes: hay varias variables medidas para cada caso y permite estudiar todas las variables, interaccionen entre si o no.

La principal ventaja del diseño multivariante frente al univariante es que proporciona la misma precisión realizando un menor número de experimentos y mide la interacción entre las diferentes variables del sistema.

Una superficie de respuesta es la representación gráfica de la respuesta en función de una o más variables e indica los valores óptimos para cada variable del sistema, es decir, si tenemos una variable respuesta influenciada por las variables x1 y x2, se obtiene y=f(x1,x2)+e, donde f(x1,x2) es la superficie de respuesta representada y ``e´´ el error en la respuesta. Para ayudar a visualizar la forma de una superficie de respuesta, con frecuencia se representan los contornos de la superficie de respuesta, donde cada contorno corresponde a una altura particular de la superficie de respuesta.

Cuando un sistema es poco conocido, resulta muy difícil decidir cuáles son las variables que debemos considerar a la hora de optimizarlo debido a que algunas de esas variables pueden resultar evidentes, pero no se puede descartar que otras variables menos aparentes no tengan influencia en la superficie de respuesta.

Como son cinco aminas, y cada amina posee una reactividad diferente debido al número de sustituyentes, hay que llegar a un acuerdo en las variables a optimizar porque sino el número de experiencias sería inviable. Por estudios previos se conoce que cuando se utiliza 150 µL de cada reactivo la intensidad de la respuesta es mayor y se producen menos productos de degradación. Además, diferentes estudios [Iqbal et al., 2014; C. Cháfer-Pericás et al., 2005] Indican que las variables que resultan más significativas para el método son [FMOC], pH y [tampón]. Así, se realizó un diseño composicional dirigido, centrado y ortogonal 2^3 + star, con 16 experiencias triplicadas (N=3), no randomizadas y seis grados de libertad (tabla 7).

Tabla 7. Diseño del composicional

Ensayo	[FMOC] (mM)	Volumen FMOC (µL)	Tiempo (min)	[Tampon] (M)	Volumen Tampon(µL)	pH
1	0,575	150	5	0,125	150	10,5
2	0,15	150	5	0,05	150	9
3	0,15	150	5	0,05	150	12
4	1	150	5	0,05	150	9
5	1	150	5	0,05	150	12
6	0,15	150	5	0,2	150	9
7	0,15	150	5	0,2	150	12
8	1	150	5	0,2	150	9
9	1	150	5	0,2	150	12
10	0,575	150	5	0,125	150	8,6
11	0,575	150	5	0,125	150	12,4
12	0,028	150	5	0,125	150	10,5
13	1,12	150	5	0,125	150	10,5
14	0,575	150	5	0,028	150	10,5
15	0,575	150	5	0,22	150	10,5
16	0,575	150	5	0,125	150	10,5

Los resultados se obtienen con el estudio de las superficies de respuesta donde se busca el máximo dentro del intervalo establecido para las variables. Para obtener el valor del óptimo se utiliza el contorno de las superficies de respuesta [Moscoso Pérez, C. (2003); Montgomeri, D. C. (2003).]. A modo de ejemplo, en la siguiente figura 21 se muestran algunas de las superficies de respuesta para las diferentes aminas.

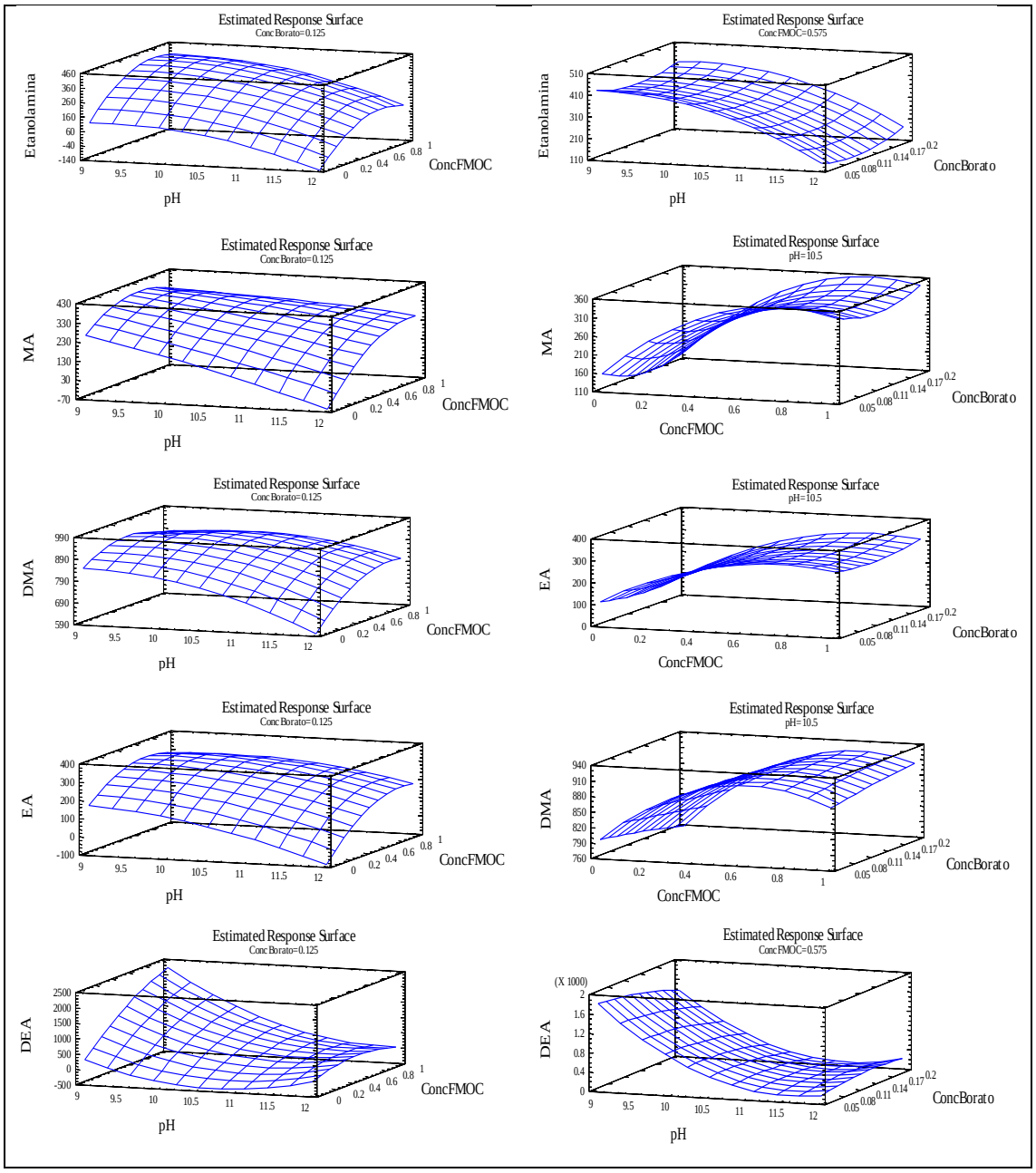


Figura 21.Gráficas de superficie de respuesta del diseño composicional

Como hay que llegar a un compromiso entre los óptimos alcanzados para las diferentes aminas en la tabla 8 se indican las condiciones óptimas de compromiso seleccionadas.

Tabla 8. Condiciones finales de derivatización optimizadas

[FMOC] (mM)	Volumen FMOC (µL)	Tiempo (min)	[Tampón] (M)	Volumen Tampón (µL)	pH
0,575	150	5	0,05	150	10,5

Finalmente se han calculado los parámetros cromatográfico: factor de retención, k, fue calculado de acuerdo a: $k=(t_R-t_0)/t_0$, donde t_R es el tiempo de retención de las aminas y t_0 es el tiempo de elución del primer pico (tiempo muerto).

El número de platos teóricos, mide la capacidad de la columna para separar los componentes, y se calcula: $N= 16(t_R/W)^2$, donde W es la anchura del pico. El factor de resolución, es el parámetro que expresa el grado de separación que se puede obtener en un sistema cromatográfico para dos componentes dados, y se calcula: $Rs = 2*(R_2-R_1)/(w_1 +w_2)$, donde Res el tiempo de retención y w es la anchura del pico (tabla 9) [Xiao et al., 2009].

Tabla 9. Parámetros cromatográficos del método optimizado

	EtA	MA	EA	DMA	DEA
t_R(min)	3,09	4,21	4,83	5,35	6,71
t_0(min)	1,10				
k	1,81	2,83	3,39	3,86	5,10
W	0,29	0,27	0,31	0,2	0,25
$N = 16(t_R/W)^2$	1822	3897	3887	11453	11536
$Rs = 2x(t_{R2}-t_{R1})/(w_1+w_2)$	3,996	2,13	2,04	6,05	2,21

Se compara el método de análisis de partida del que arrancó este trabajo con el método finalmente optimizado (figura 22), observando que se ha mejorado la señal de los derivados de las aminas, principalmente para la DMA, mejorando por lo tanto la sensibilidad del método.

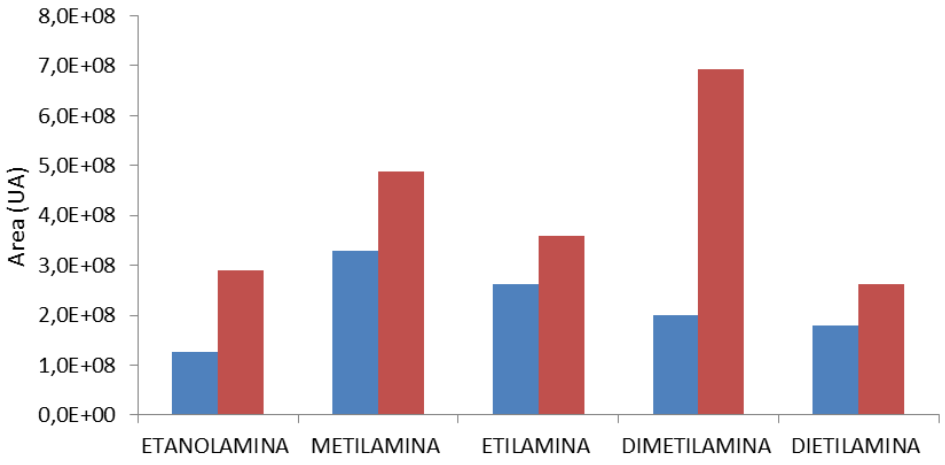


Figura 22. Comparación de la señal en las condiciones iniciales de partida (azul) y condicionales finales optimizadas en este trabajo (rojo)

5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para validar el método optimizado se han evaluado los rangos lineales, la precisión y los límites de detección y cuantificación para las 5 aminas bajo estudio.

En la determinación de rangos lineales se preparan curvas de calibración con 8 puntos, donde la concentración varía entre 0 y 300 µg/L (n=3), en la figura 23 se indican las curvas obtenidas y el coeficiente de correlación, que ha sido satisfactorio en todos los ajustes (R^2 > 0,998).

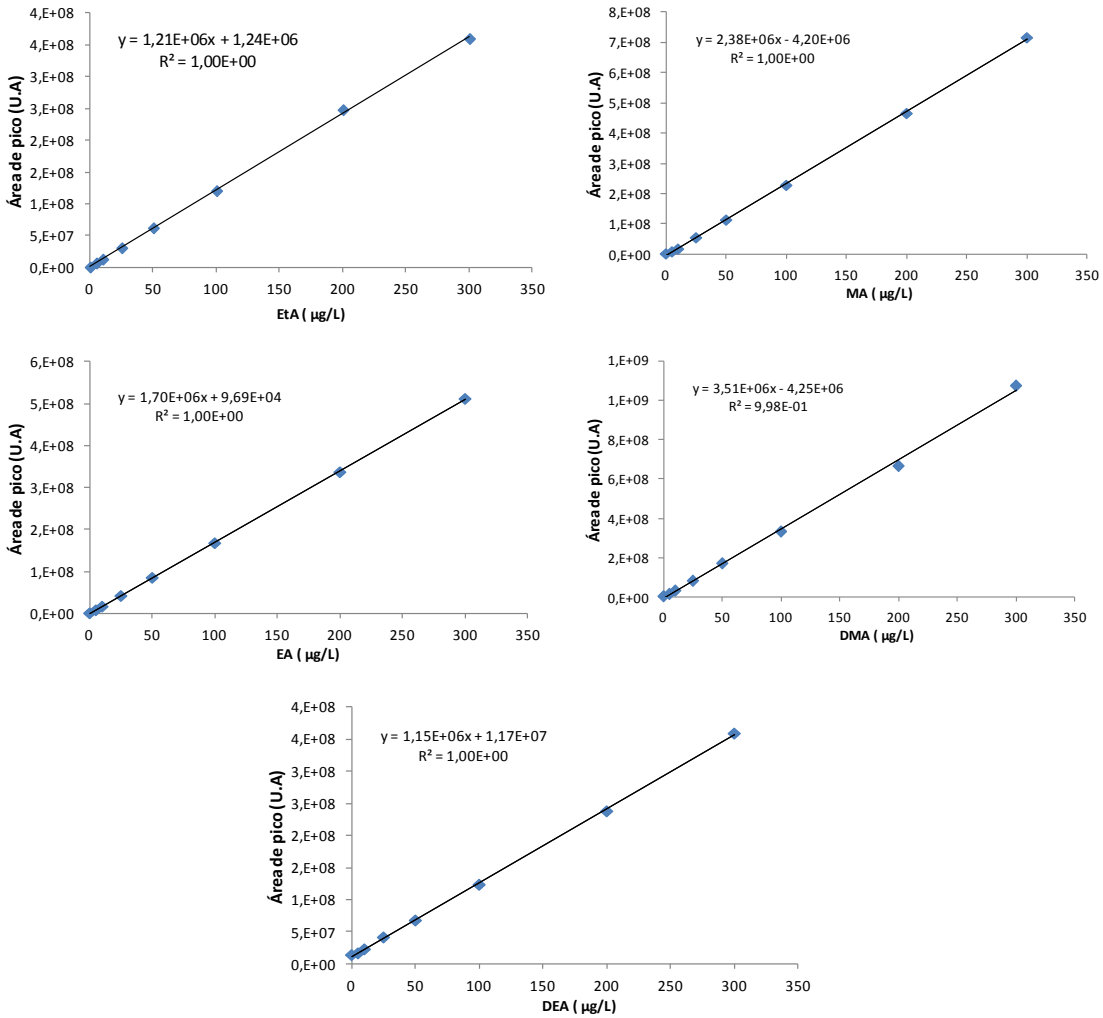


Figura 23. Rectas de calibrado.

Los límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC) instrumentales se han calculado a partir de los parámetros de la recta de calibrado, utilizando las siguientes fórmulas: LDD = $\frac{ordenada\ en\ el\ origen + 3Sa}{pendiente\ de\ la\ curva\ de\ calibrado}$; LDC= $\frac{ordenada\ en\ el\ origen + 10Sa}{pendiente\ de\ la\ curva\ de\ calibrado}$

En la tabla 10 se indican los valores obtenidos que han sido satisfactorios y similares a los encontrados en la bibliografía con LDD instrumentales en un rango de 0,43-12,8 µg/L y LDC instrumentales entre 0,67 – 13,1 µg/L.

Tabla 10. Límites de detección y cuantificación instrumentales

	LDD (µg/L)	LDC (µg/L)
ETANOLAMINA	0,43	0,87
METILAMINA	1,14	2,54
ETILAMINA	0,92	1,98
DIMETILAMINA	1,92	2,49
DIETILAMINA	12,8	18,1

La reproducibilidad y repetibilidad se determina mediante el análisis de la desviación estándar relativa (RSD). Se inyecta un patrón de una mezcla de aminas de 200 µg/L varias veces en el mismo día y durante varios días. La desviación estándar relativa intra-día es inferior al 2% para EtA, MA y EA y al 4,5 % para la DMA y EA. En el estudio inter-días (4 días) la desviación estándar relativa es inferior al 4% para MA, DMA y EA y al 8% para EtA y DEA.

5.4. APLICACIÓN A MUESTRAS

El procedimiento optimizado se aplica para la determinación de aminas en dos muestras de material particulado atmosférico procedente de la ciudad de La Coruña recogidas en marzo de 2014. Se extraen según el procedimiento indicado en la parte experimental [Fernández-Amado, 2017], ensayando los 3 disolventes (MeOH, ACN y H_2O). En el proceso de extracción con MeOH aparecen impurezas que solapan con el pico de la DMA y no permitía su cuantificación, por ello se descartó su uso. Por el contrario, tanto el ACN como el agua dan lugar a extracciones muy similares, pero se decide usar agua por ser un reactivo no tóxico y barato.

Uno de los problemas del análisis de muestras en cromatografía de líquidos es que la disolución que se inyecte debe estar libre de partículas para que no obturen las conducciones del cromatógrafo y puedan producir sobrepresión en el sistema. Por ello los extractos de material particulado atmosférico, al llevar partículas en supensión, deben someterse a un proceso de filtración.

Se eligen 4 filtros (PVDF, PFTE, PTEF-HP, Acrodisc) descritos en la parte experimental. Para saber qué filtro es el más adecuado se hacen dos ensayos a partir de una disolución patrón acuosa de 200 µg/L y con cada uno de los filtros, para comprobar si es más adecuado derivatizar el extracto y filtrar el extracto derivado o filtrar el extracto y derivatizar el filtrado. Los filtros de PVDF y PTFE-HP son de naturaleza hidrofílica y se acondicionan con 2 mL de agua ultrapura. El filtro de teflón (PTFE) es hidrófobo por lo que se acondiciona con 2mL de MeOH para filtrar las fases acuosas. El filtro de Acrodisc es una membrana poliétersulfona hidrofílica y se utiliza sin un acondicionamiento previo. Los resultados obtenidos se indican en la figura 24.

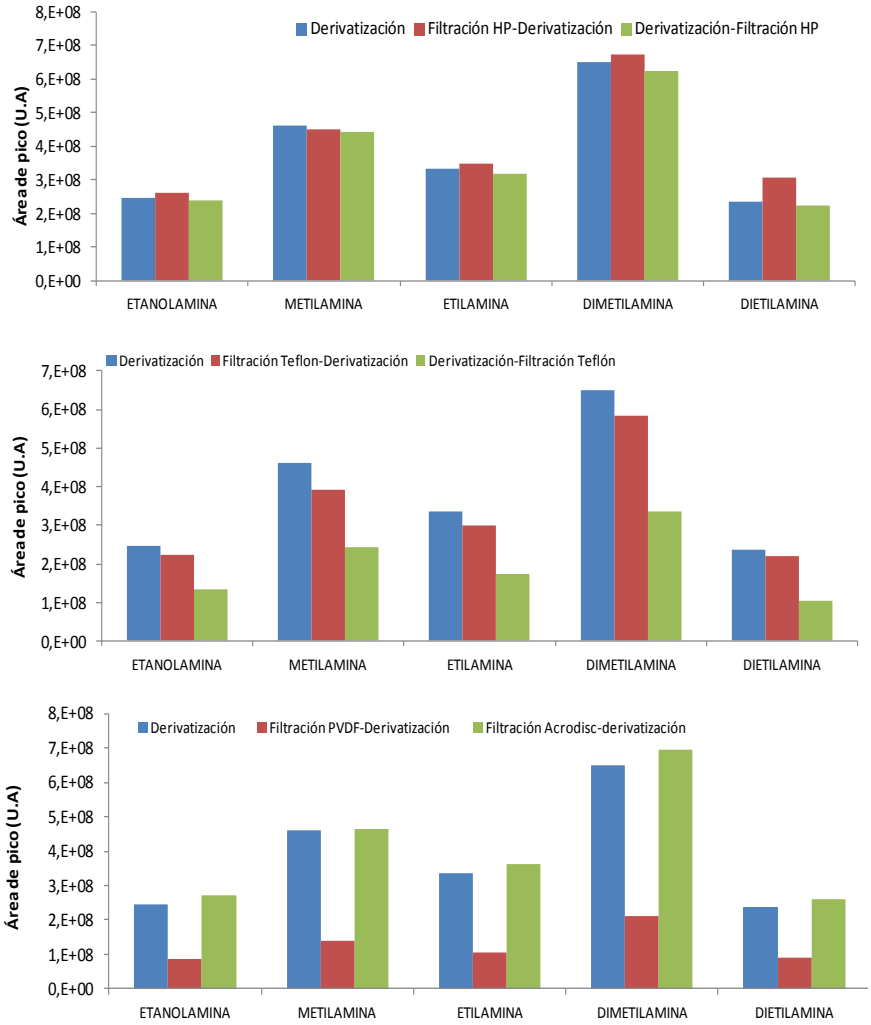


Figura 24. Estudio de recuperación del proceso de filtración del extracto de las muestras de PM10 con filtros PVDF, PFTE, PTEF-HP, Acrodisc

A la vista de los resultados obtenidos se descartan los filtros de PVDF y los de PTFE cuando se filtra el derivado, porque retiene los analitos de interés. Cuando se utilizan los filtros de PTFE para filtrar el extracto antes de derivatizar, se observa un pérdida de ~10% para todos los analitos. Los filtros Acrodisc dan resultados satisfactorios si se filtra

primero el extracto mientras que los de PTFE-HP pueden utilizarse en las dos variantes: filtrar + derivatizar o derivatizar + filtrar y por ello son los que se eligen para el tratamiento de los extractos de las muestras.

Los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) del método se han calculado a partir de las réplicas de los blancos de procedimiento (tabla 11) y los valores obtenidos han sido satisfactorios y similares a los encontrados en la bibliografía.

Tabla 11. Límites de detección y cuantificación del método.

	LDD (ng/m^3)	LDC (ng/m^3)
ETANOLAMINA	0,05	0,10
METILAMINA	0,14	0,31
ETILAMINA	0,11	0,24
DIMETILAMINA	0,24	0,31
DIETILAMINA	1,60	2,26

Según el Real Decreto 39/2017 el valor límite diario de PM_{10} para la protección de la salud humana (valor promedio de 24 horas) es de 50 µg/m^3, que no se podrá superar en más de 35 ocasiones por año. Los valores de material particulado PM_{10} son de 57 y 52 µg/m^3 que superan el valor límite diario, si bien es cierto, que la normativa permite 35 superaciones al año, para indicar si el aire está contaminado o no.

En las muestras analizadas están presentes en todas las aminas excepto la DEA que solamente aparece en una de ellas. Las aminas que presenta los niveles más altos son la MA (0,1-9,7 ng/m^3) y la DMA (1,6-4,9 ng/m^3) seguidas de la EtA (0,61-3,28 ng/m^3) siendo la DEA la que se encuentra en menor concentración (0,4-1,6 ng/m^3). En la figura 25 se muestra a modo de ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos

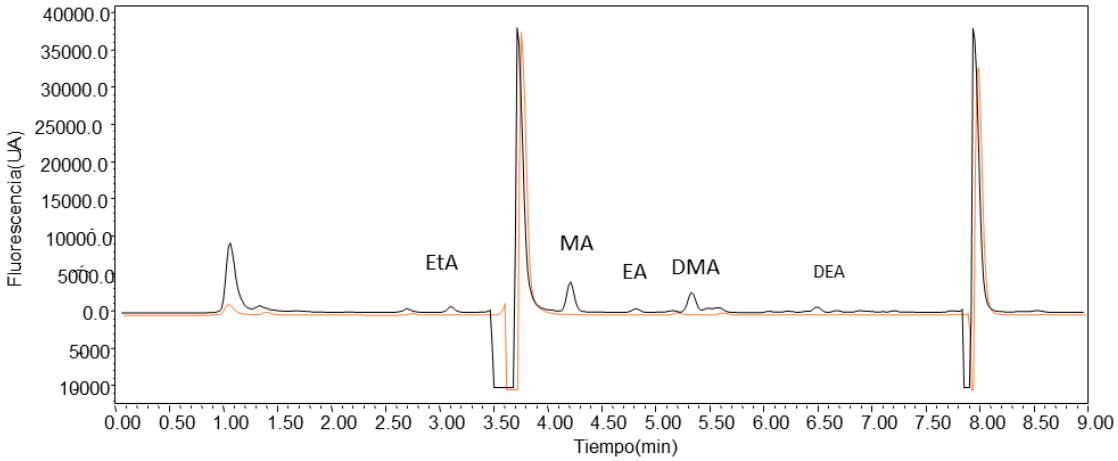


Figura 25. Cromatograma de las aminas presentes en una de las muestras analizadas.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto un método de derivatización de aminas alifáticas primarias y secundarias (EtA, MA, EA, DMA y DEA) empleando FMOC 0,575 mM como agente derivatizante, borato 0,05 M como disolución tampón, ajustando a pH 10,5 con una disolución 1 M de NaOH. La reacción se realiza a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitación ultrasónica.
2. Se consigue la separación cromatográfica de los derivados de las 5 aminas alifáticas en un tiempo de análisis muy corto (7 min) con un gradiente binario acetonitrilo/agua.
3. Se alcanzan límites de detección y cuantificación del proceso de derivatización son satisfactorios (0,43-12,84 μg/L y 0,87-18,10μg/L, respectivamente) con una buena repetibilidad y reproducibilidad.
4. E ACN y el H_2O son disolventes válidos para la extracción de las aminas del material particulado atmosférico PM10. Sin embargo, con la extracción con MeOH se obtienen cromatogramas con picos interferentes próximos a la DMA lo que impide su cuantificación.
5. Los mejores resultados se obtienen con el filtro de PFFE-HP, siendo bastante similares los resultados cuando el extracto se derivatiza antes o después de la filtración.
6. Los límites de detección y del método indican que se podrían detectar concentraciones de aminas en el PM_{10} alrededor de 0,05-1,60 ng/m^3. Las concentraciones de aminas en las muestras están en el rango de 0,1 a 907 ng/m^3.

CONCLUSIONS

1. A derivatization method of primary and secondary aliphatic amines (EtA, MA, EA, DMA and DEA) has been developed using 0.575 mM FMOC as derivatizing agent, 0.05 M borate as buffer solution, adjusting to pH 10.5 with a 1M solution of NaOH. The reaction is performed at room temperature for 5 minutes with ultrasonic stirring.
2. Chromatographic separation of aliphatic 5-amine derivatives is achieved in a very short analysis time (7 min) with a binary acetonitrile / water gradient.
3. Limits of detection and quantification of the derivatization process are satisfactory (0,43-12,84μg/L y 0,87-18,10μg/L, respectively) with good repeatability and reproducibility.
4. ACN and H_2O are valid solvents for the extraction of amines from PM10 atmospheric particulate material. However, when MeOH is employed as extraction solvent, the obtained chromatograms show interfering peaks close to the DMA, which prevents their quantification.
5. The best results are obtained with the PFFE-HP filter, being the results quite similar when the extract is derivatized before or after filtration.
7. Instrumental and method detection limits indicate that concentrations of amines in the PM_{10} may be detected around 0,05-1,60 ng/m^3. The concentrations of amines in samples are included in the range from 0,1 to 9,7 ng/m^3.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Agnes Fekete , Ashok Kumar Malik , Ashwini Kumar & Philippe Schmitt-Kopplin (2010). Amines in the Environment, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 40:2, 102-121

Blanco Heras G. A. Determinación de aniones, cationes y ácidos orgánicos en material particulado atmosférico mediante electroforesis capilar. Tesis Doctoral, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2009).

Cháfer-Pericás C., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with o-phthalaldialdehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate. Talanta 66 (2005) 1139–1145

Chen G., Liu J., Liu M., Li G., Sun Z., Zhang S., Song C., Wang H., Suo Y. You J. Sensitive, accurate and rapid detection of trace aliphatic amines inenvironmental samples with ultrasonic-assisted derivatizationmicroextraction using a new fluorescent reagent for highperformance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1352 (2014) 8–19

Fernández Amado, M. Microextracción en fase sólida in-tube para el análisis de compuestos orgánicos en matrices atmosféricas.Tesis doctoral, Departamento de Química Analítica. Universidade de A Coruña .Fecha de lectura: Abril de 2017.

García Gorostizu I. Documentación para la obtención del diploma de estudios avanzados. A Coruña , Julio 2001.

Ge X., Wexler A. S., Clegg S. L. Atmospheric amines – Part I. A review. Atmospheric Environment, 45 (2011) 524–546.

Huang R.-J., Li W.B., Wang Y.R , Wang Q.Y., Chen X., Zhuang X., Wang X.R., Prévôt A.S.H., Determination of alkylamines in atmospheric aerosol particles: a comparison of gas chromatography–mass spectrometry and ion chromatography approaches. Atmos. Meas. Tech., 7, 2027–2035, 2014

Huang X., Deng C, Zhuang G, Lin J, Xiao M. Quantitative analysis of aliphatic amines in urban aerosols based on online derivatization and high performance liquid chromatography. Environ. Sci.. Processes Impacts, 2016, 18, 796–801

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo [INSHT, 2017], http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/es/

Iqbal M. A., Szulejko J. E., Kim K.-H. Determination of methylamine, dimethylamine, and trimethylamine in air by high-performance liquid chromatography with derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. Analytical Methods, 6 (2014) 5697–5707.

Ruiz-Jimenez, J., Hautala, S. S., Parshintsev, J., Laitinen, T. T , Hartonen, K., Petaja, T., Kulmala, M. & Riekkola, M-L. 2012. Aliphatic and aromatic amines in atmospheric aerosol particles: Comparison of three ionization techniques in liquid chromatography-mass spectrometry and method development. Talanta. 2012, 97, 55-62.

Meseguer-Lloret S., C. Molins-Legua, and P. Campins-Falco, Preconcentration and dansylation of aliphatic amines using C18 solid-phase packings: Application to the screening analysis in environmental water samples. Journal of Chromatography A 978 (2002):59

AsifIqbal, M., Szulejko, J. , Kim, K. H..Determination of methylamine, dimethylamine, and trimethylamine in air by high-performance liquid chromatography with derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. Anal. Methods, 2014, 6, 5697

Montgomeri, D. C. (2003). Diseño y análisis de experimentos. México DF: Limusa.

Moscoso Pérez, C. (2003). Determinación de metales formadores de vapor mediante generación de hidruros acoplada a espectroscopia de absorción y fluorescencia atómica, Universidade da Coruña, A Coruña.

Muller L., Fattore E., and Benfenati E., Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatographymass spectrometry in water samples. Journal of Chromatography A 791 (1997):221

Poste A. E., Grung M., Wright R. F. Amines and amine-related compounds in surface waters: A review of sources, concentrations and aquatic toxicity. Science of the Total Environment, 481 (2014) 274–279.

Prieto-Blanco M. C., Cháfer-Pericás C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatization coupled to liquid chromatography for quantifying residual dimethylamine in cationic polymers. Journal of Chromatography A, 1188 (2008) 118–123.

Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. In-Tube Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography Using a Monolithic Column for the Selective Determination of Residual Ethylenediamine in Industrial Cationic Polymers. Analytical Chemistry, 81(14) (2009) 5827–5832.

Putaud J.-P., Van Dingenen R., Alastuey A., et al. A European aerosol phenomenology – 3: Physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban, and kerbside sites across Europe. Atmospheric Environment, 44 (2010) 1308–1320.

Klevin, D. Química orgánica. Edtitorial Médica Panamericana, 2013, ISBN-10:8498351693.

Santos B, Simonet B. M., Rios A., and M. Valcarcel M. Rapid determination of aliphatic amines in water samples by pressure-assisted monolithic octadecylsilica capillary electrochromatography-mass spectrometry. Electrophoresis 25 (2004):3231

Sacher F., Lenz S., and Brauch H.J., Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride. Journal of Chromatography A 764 (1997):85

Szulejko J. E., Kim K.-H. A review of sampling and pretreatment techniques for the collection of airborne amines. Trends in Analytical Chemistry, 57 (2014) 118–134.

Wang C., Tung S., Lo Y., Huang H., Ko C., Wu C. Sensitivity enhancement in the fluorometric determination of aliphatic amines using naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization followed by vortex-assisted liquid–liquid microextraction. Talanta 152 (2016) 475–481

Xiao S. Yu.P.H. ; A fluorometric high-performance liquid chromatography procedure for simultaneous determination of methylamine and aminoacetone in blood and tissues. Analytical Biochemistry 384 (2009) 20–26

Xinlei Ge , Anthony S. Wexler , Simon L. Clegg. Atmospheric amines e Part I. A review. Atmospheric Environment 45 (2011) 524e546

Youn J.-S., Crosbie, E.; Maudlin, L. C.; Wang, Z.; Sorooshian, A., Dimethylamine as a major alkyl amine species in particles and cloud water: Observations in semi-arid and coastal regions Atmospheric Environment 122 (2015) 250-258.

Zhanga Y. Zhang Y., Mao J., YuP.H., Xiao S. A micro trapping system coupled with a high performance liquid chromatography procedure for methylamine determination in both tissue and cigarette smoke; Analytica Chimica Acta 752 (2012) 106– 111.