



GENERALITAT  
VALENCIANA

**IVACE**  
INSTITUTO VALENCIANO DE  
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL

 **UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Europeo de  
Desarrollo Regional  
*Una manera de hacer Europa*



**INESCOP**

**REDIT** INNOVATION NETWORK

<b>EXPEDIENTE</b>	IMDEEA/2018/81
<b>ACRÓNIMO</b>	AINOCBABY II
<b>PROGRAMA</b>	Proyectos de I+D de carácter no económico realizados en cooperación con empresas
<b>TÍTULO DEL PROYECTO</b>	Alternativas técnicamente viables para la eliminación de ftalatos tóxicos y MBT en calzado de niño (FASE II)

**Entregable E.2.1**  
**INFORME SOBRE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA MIGRACIÓN  
DE FTALATOS Y MBT.**

## ÍNDICE

1. Descripción del entregable .....	3
2. Trabajo realizado .....	3
3. Resultados obtenidos .....	3

## 1. Descripción del entregable

En este informe se incluye una descripción de la metodología desarrollada para el análisis de MBT y plastificantes de tipo ftalato simulando la exposición real cuando el calzado es utilizado según su uso habitual o en el caso de los bebés como juguete o artículos de puericultura, introduciéndoselo en la boca. Por otro lado, se describen las condiciones óptimas de máxima liberación de ftalatos y el método de análisis mediante desorción térmica.

## 2. Trabajo realizado

Se han realizado matrices de experimentos para establecer las condiciones óptimas de extracción y análisis de MBT y ftalatos simulando las condiciones de exposición real a materiales de calzado. En lo que respecta a los ftalatos también se han realizado matrices de experimentos para optimizar las condiciones de extracción de ftalatos en medio solvente y de desorción térmica para su cuantificación independientemente de la matriz polimérica.

## 3. Resultados obtenidos

### 3.1. Metodología de determinación del contenido en 2-Mercaptobenzotiazol (MBT) en artículos de caucho para calzado

#### 1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma específica un método de ensayo para la determinación del contenido en 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) en artículos de caucho para calzado simulando la exposición real cuando el calzado es utilizado según su uso habitual o en el caso de los bebés como juguete o artículos de puericultura.

#### 2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se extrae la muestra caucho mediante una solución de sudor o saliva artificial. El extracto filtrado se analiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector ultravioleta (UV).

#### 3 REACTIVOS

- 3.1 MBT (2-Mercaptobenzotiazol) mínimo 97%.
- 3.2 Solución madre de MBT, 500mg/l en acetonitrilo.
- 3.3 Saliva artificial a pH 6,8, con la siguiente composición:



Compuesto	Fórmula	mg/L
Cloruro de magnesio	MgCl <sub>2</sub>	166,7
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub>	147,0
Hidrógeno fosfato de dipotasio	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	753,1
Carbonato de potasio	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	525,2
Cloruro de sodio	NaCl	327,3
Cloruro de potasio	KCl	745,5

3.4 Sudor artificial a pH 6,5, con la siguiente composición:

Compuesto	Fórmula	mg/L
Urea	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	1000
Cloruro de sodio	NaCl	5000
Ácido láctico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1000

3.5 Agua, de grado HPLC.

#### 4 APARATOS Y MATERIALES

Se emplea material de laboratorio habitual y en concreto, el siguiente:

- 4.1 Balanza analítica, con una apreciación de 0,1 mg.
- 4.2 Sistema HPLC, con detector UV
- 4.3 Columna de separación, con fase estacionaria C18 con la precolumna correspondiente.
- 4.4 Baño de agua con agitación
- 4.5. Estufa
- 4.6 Filtro de membrana, teflón de 0,2 µm.

#### 5 PROCEDIMIENTO OPERATORIO

##### 5.1 Preparación de muestras

Se trocean las muestras a estudio con un tamaño de 3-5 mm<sup>2</sup>.

##### 5.2 Preparación de la solución analítica

Si el material está destinado a cualquier tipo de calzado:

Se pesa (1 ± 0,01) g de muestra en un matraz erlenmeyer de 100 ml. Se pipetea 20 ml de sudor artificial (3.4) y se añaden a la muestra. Se extrae la muestra a 37 °C en un baño de agua con agitación a 75 rpm (4.4) durante 4 h ± 5 min.

Tras la extracción, se filtra parte del extracto con filtro de membrana (4.6) a un vial adecuado. El filtrado se analiza mediante HPLC (4.2) y se cuantifica el MBT detectado.

Si el material está destinado a calzado de bebé:

Se pesa (1 ± 0,01) g de muestra en un matraz erlenmeyer de 100 ml. Se pipetea 20 ml de saliva artificial (3.3) y se añaden a la muestra. Se extrae la muestra a 40 °C en una estufa (4.5) sin agitación durante 4 h ± 5 min.

Tras la extracción, se filtra parte del extracto con filtro de membrana (4.6) a un vial adecuado. El filtrado se analiza mediante HPLC (4.2) y se cuantifica el MBT detectado.

### 5.3 Condiciones cromatográficas

Columna de separación	columna fase estacionaria (C18 de sílica gel 250/4,6 mm 120 Å, 5 µm), con precolumna.
Caudal	1 ml/min
Fase móvil	A: Agua; B: Acetonitrilo
Gradiente	1) Isocrático 40 % B durante 3 minutos; 2) Lineal hasta 95 % B en 15 minutos; 3) Isocrático 95 % B durante 5 minutos; 4) Lineal hasta 40 % B en 5 minutos.
Horno de columna	30 °C
Detección UV	240 nm y 320 nm.
Volumen de inyección	20 µl

### 5.4 Calibrado

El calibrado se realiza utilizando un patrón externo de MBT. Se preparan diluciones adecuadas (en saliva (3.3) o sudor artificial (3.4)) de la solución madre de MBT (3.2).

Se prepara una solución madre intermedia de 100 ppm de MBT (en saliva (3.3) o sudor artificial (3.4)). A partir de esta solución de MBT, se prepara el calibrado que debe realizarse con al menos 6 niveles de concentración.

El calibrado se realiza trazando un gráfico del área del pico del MBT con respecto a su concentración.

## 6 CÁLCULO

Se calcula la concentración de MBT detectado en miligramos por kilogramo (mg/kg) de muestra, mediante la ecuación

$$w_i = \frac{\rho * V * F * 1000}{m * 1000}$$

Donde:

$w_i$

es la fracción de masa de MBT, expresada en miligramos por kilogramo (mg/kg) de muestra;

$\rho$  es la concentración de masa de MBT obtenida a partir del calibrado, expresada en microgramos por mililitro (µg/ml) ;

$V$  es el volumen expresado en mililitros (ml);

$F$  es el factor de dilución

$m$  es la cantidad de muestra expresada en (g).

### 3.2. Análisis de ftalatos mediante desorción térmica

Este método está diseñado para determinar de forma cualitativa y cuantitativa la presencia de ftalatos en los materiales de calzado utilizando la desorción térmica.

La muestra es introducida directamente en el pirolizador, donde se extrae térmicamente la cantidad de ftalatos presentes en la muestra quedando éstos atrapados en una trampa específica. Posteriormente, los ftalatos se desorben y se introducirán en el sistema de cromatografía de gases mediante una línea de transferencia con control de temperatura.

Esta técnica nos aporta una rápida cuantificación de ftalatos presentes en la muestra, empleando una cantidad mínima de la misma. Usando este método, además de no verse influenciada la liberación de los ftalatos por la naturaleza de la muestra se permite la eliminación del uso de disolventes, reduciendo la acumulación de residuos.

El método desarrollado emplea el siguiente instrumental:

- Balanza, con una resolución de 1 mg.
- Pirolizador con accesorio de desorción térmica (Pyr-TD)
- Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS).

#### 1 Toma de muestras.

La muestra consta de un único material obtenido del calzado, como por ejemplo cuero, textil, material recubierto u otro tipo de material polimérico. La cantidad que se utiliza de la misma está comprendida entre 1 y 2 mg.

#### 2 Patrones y calibrado.

Patrones de ftalatos

#### 3 Condiciones de medida.

##### 3.1 Programa de desorción térmica.

1. Atmósfera de helio con una velocidad de flujo de 25 ml/min.
2. Temperatura de la interfase: 325 °C.
3. Tiempo de absorción: 3 minutos.
4. Velocidad nominal de calefacción: 20 °C/ms.
5. Tiempo de pirolizado: 20 s.
6. Temperatura nominal de pirólisis: 350 °C.
7. Cantidad de muestra tomada: 2 mg.

### 3.2 Condiciones cromatográficas.

Columna capilar:	HP-1MS; longitud 30 m; 0,250 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película.
Gas portador:	Helio.
Caudal:	1 ml/min.
Temperatura del inyector:	320 °C, modo split.
Volumen de inyección:	1,0 µl
Programa de temperatura:	50 °C durante 1 min. Hasta 200 °C a 40 °C/min. Isotherma 1 min. Hasta 300 °C a 6 °C/min. Isotherma 5 min.
Detector MS	SCAN en un rango de masas 50-500 m/z SIM con los iones 149 – 194 – 206 – 212 – 223 – 249 – 251 – 279 – 293 – 307

### 3.3. Análisis de ftalatos mediante extracción en medio solvente por microondas

Mediante la realización de un diseño de experimentos de 3 niveles, con 3 factores: 3<sup>4</sup>, las condiciones óptimas para la extracción de los ftalatos son:

	Condiciones óptimas
Potencia	700
tiempo extracción en el máximo (min)	20
Volumen extractante (ml)	20
Metanol (ml)	1

### 3.4. Metodología para el estudio de la migración de ftalatos en calzado

#### 1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma especifica un método de ensayo para la determinación del contenido en di-etil hexil ftalato en artículos de calzado simulando la exposición real cuando el calzado es utilizado según su uso habitual o en el caso de los bebés como juguete o artículos de puericultura.

#### 2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se extrae la muestra mediante una solución de sudor. El extracto filtrado se analiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de espectrometría de masa (MS).

#### 3 REACTIVOS

3.1 DEHP mínimo 99%.

3.2 Sudor ácido a pH 5,5, con la siguiente composición:

Compuesto	Fórmula	mg/L
L-histidina monoclóhidrato monohidrato	$C_6H_{10}ClN_3O_2 \cdot H_2O$	500
Cloruro de sodio	NaCl	5000
Hidrógeno fosfato de dipotasio	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	2200

#### 4 APARATOS Y MATERIALES

Se emplea material de laboratorio habitual y en concreto, el siguiente:

- 4.1 Balanza analítica, con una apreciación de 0,1 mg.
- 4.2 Sistema HPLC, con detector de espectrometría de masas
- 4.3 Columna de separación, con fase estacionaria C18 con la precolumna correspondiente.
- 4.4 Baño de agua con agitación
- 4.5 Estufa
- 4.6 Filtro de membrana, teflón de 0,2  $\mu$ m.

#### 5 PROCEDIMIENTO OPERATORIO

##### 5.1 Preparación de muestras

Se trocean las muestras a estudio con un tamaño de 10 cm<sup>2</sup>.

##### 5.2 Preparación de la solución analítica

Si el material está destinado a cualquier tipo de calzado:

Se pesa la superficie de 10 cm<sup>2</sup> de muestra en un matraz erlenmeyer de 100 ml. Se pipetea 20 ml de sudor artificial (3.2) y se añaden a la muestra. Se extrae la muestra a 37 °C en un baño de agua con agitación a 75 rpm (4.4) durante 24 h  $\pm$  5 min.

Tras la extracción, se filtra parte del extracto con filtro de membrana (4.6) a un vial adecuado.

El filtrado se analiza mediante HPLC (4.2) y se cuantifica el DEHP detectado.