

Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato por UHPLC-MS/MS

Luisina Demonte

PRINARC (Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Ciencias Exactas, Química

INTRODUCCIÓN

El glifosato junto a otros herbicidas relacionados, como glufosinato, se utilizan exhaustivamente en Argentina asociados a la enorme proliferación de la agricultura basada en OGM. A pesar del intenso uso de estos plaguicidas, sus residuos son poco evaluados, con consecuencias ambientales y en la salud pública. Para ello se necesita contar con metodologías analíticas confiables, simples y sensibles. Estos analitos son considerados analíticamente dificultosos, debido a que su alta polaridad complica su extracción de las matrices y su tratamiento en los sistemas de cromatografía líquida. Se han propuesto numerosas metodologías aunque hasta el día de hoy continúan siendo un desafío para la química analítica de residuos (Ibañez, 2005).

El método de análisis elegido actualmente para analitos polares, debido a su alta selectividad y sensibilidad, es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS). Sin embargo, cuando se utiliza esta técnica, la derivatización de los analitos es necesaria para permitir el análisis por fases reversas. 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl) es el reactivo de derivatización pre-columna más utilizado en combinación con LC-MS/MS (Hanke, 2008).

En este trabajo se presenta un método simplificado para la cuantificación de glifosato, su principal metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glufosinato de amonio a nivel de trazas (ppb) en muestras ambientales, basado en la derivatización con FMOC y análisis por UHPLC-MS/MS. El método implica una etapa de reacción durante dos horas (por razones operativas se indica alternativamente emplear una noche) seguido por partición L-L con diclorometano, sin concentración de la muestra.

El método desarrollado se aplicó al análisis muestras de aguas superficiales y subterráneas de la región litoral de Argentina (Santa Fe y Entre Ríos) aportando datos relevantes no conocidos anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Método de análisis

La metodología optimizada consta de 3 etapas: pre-tratamiento de la muestra, derivatización y limpieza.

Durante la etapa de desarrollo de la metodología fueron optimizados los siguientes parámetros: cantidad de muestra, reactivos, tiempo de reacción, pH, limpieza mediante SPE y partición L-L.

La metodología adoptada se describe a continuación:

Pre-tratamiento de la muestra: La muestra previamente filtrada y homogeneizada se coloca en tubos de centrifuga de Teflon, se adiciona ácido clorhídrico hasta pH 1 y se agita, se adicionan los analitos (glifosato y AMPA) marcados isotópicamente, y luego se añade hidróxido de potasio para neutralizar, pH 6–7.

La presencia de cationes multivalentes en matrices ambientales, especialmente en muestras de aguas subterráneas, pueden disminuir la eficacia del método formando complejos con los analitos. El ácido clorhídrico es utilizado para eliminar las posibles interacciones de los analitos con los componentes de la matriz.

PROYECTO: Métodos analíticos avanzados para la determinación de residuos de plaguicidas en la cadena frutihortícola de Santa Fe. Aplicaciones a la mejora de la sostenibilidad de la producción y a la calidad e inocuidad de los alimentos” Director: María Rosa Repetti. Programa de I+D Orientado a Problemas Sociales y Productivos. UNL. Convocatoria 2014. Resol. 223/15. Director del autor: María Rosa Repetti.

Etapa de derivatización: Esta etapa comienza con la adición de buffer borato para lograr pH 9 en el cual se desarrolla la reacción de derivatización, seguido el reactivo derivatizante, FMOC-Cl y por último acetonitrilo. Se deja reaccionar dos horas a temperatura ambiente.

Etapa de limpieza: Esta etapa consiste en una partición líquido-líquido, para lo cual se adiciona diclorometano a las muestras ya derivatizadas y se agita vigorosamente. Se toma una alícuota de la fase acuosa y se filtra con filtros de jeringa de 0,2 µm. Luego de este paso de limpieza, las muestras están en condiciones de ser inyectadas en el equipo UHPLC-MS/MS empleado.

Sistema instrumental

El análisis LC-MS/MS se realizó utilizando un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (ACQUITY UPLC™, Waters, Milford, MA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masa triple cuadrupolo (TQD, Waters Micromass, UK) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) capaz de operar en modo positivo y negativo.

Se estudiaron alternativas para mejorar la identificación, confirmación y sensibilidad de los analitos. Para la separación de los analitos se hicieron ensayos con dos columnas diferentes de C18 Acquity UPLC® HSS C18 (tamaño de partícula 1,7 µm, 2,1 x 100 mm) y Acquity UPLC BEH® C18 (tamaño de partícula 1,7 µm, 2,1 x 50 mm); se ensayaron dos fases móviles que consistieron en H₂O:ACN (98:2, A1) y acetonitrilo (B1) y H₂O:MeOH (NH₄Ac 5 mM, A1) y metanol (B1) utilizando ácido fórmico y formiato de amonio como modificadores; y se comparó ESI en modo positivo y negativo. La velocidad de flujo fue de 0,35 mL/min y la temperatura de la columna fue 40°C.

Con la columna Acquity UPLC® HSS C18 y la fase móvil H₂O:ACN (98:2 + 0,1% ácido fórmico, A1) y acetonitrilo (+ 0,1% ácido fórmico, B1) se obtuvieron picos cromatográficos más estrechos, mejor resueltos y más simétricos.

Se seleccionó ESI en modo positivo ya que se obtuvo mayor sensibilidad. Las condiciones de operación fueron optimizadas mediante métodos estadísticos (diseño factorial fraccionado). En la Tabla 1 se muestran las condiciones de operación de la fuente de ionización.

Tabla 1. Condiciones de operación de la fuente de ionización.

PARÁMETROS FUENTE DE IONIZACIÓN	
Temperatura de la fuente	140 °C
Temperatura de desolvatación	500 °C
Caudal de gas de desolvatación	600 L/h
Caudal de gas de cono	15 L/h
Voltaje de capilar	1 kV
Voltaje de extractor	1 V

La sintonía de los compuestos, es decir la selección de las condiciones del voltaje del cono para generar el ion precursor y las energías de colisión para obtener cada fragmento específico como así también los iones seleccionados se realizó empleando ensayos de infusión y datos bibliográficos (Ibañez, 2005). En la celda de colisión se utilizó Argón para producir los fragmentos de iones respectivos y la adquisición se realizó en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring).

El ion precursor, los iones fragmento para cada compuesto específico, junto con sus respectivos voltajes de cono y energías de colisión se muestran en la Tabla 2.

El dwell (tiempo en segundos que dura cada escaneo) seleccionado fue 0,05 seg para todos los compuestos.

Tabla 2. Ion molecular, valores de m/z de los fragmentos, voltajes de cono y energías de colisión para cada compuesto específico.

Analito	Ion molecular m/z	Producto 1 m/z	Producto 2 m/z
	(Cono)	(CE)	(CE)
Glifosato-FMOC	392.0	88.1	214.1
	(20V)	(30V)	(10V)
AMPA-FMOC	334.0	112.1	179.1
	(20V)	(15V)	(20V)
Glufosinato-FMOC	404.0	136.1	208.2
	(30V)	(25V)	(10V)
GLY 1,2- ¹³ C ¹⁵ N-FMOC	395.0	91.1	217.1
	(20V)	(30V)	(10V)
AMPA ¹³ C ¹⁵ N-FMOC	336.0	114.1	181.1
	(20V)	(15V)	(20V)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método desarrollado fue validado siguiendo las directrices de la guía SANCO/12571/2013; obteniendo parámetros de desempeño satisfactorios.

Durante este trabajo se determinó la repetitividad y la precisión mediante ensayos de recuperación fortificando muestras blanco con estándar en dos niveles de concentración (1 y 100 µg/L). Los resultados de los porcentajes de recuperación junto a los porcentajes de Desviación Estándar Relativa (DER) y Límites de Detección y Cuantificación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de validación de la metodología optimizada.

Analito	% Recuperación		% DER		LD µg/L	LC µg/L
	1 µg/L	100 µg/L	1 µg/L	100 µg/L		
Glifosato	73-80	96-124	3	8	0,2	0,6
AMPA	80-90	83-118	5	10	0,1	0,2
Glufosinato	77-82	71-115	3	13	0,02	0,1

Las curvas de calibración para cada compuesto se realizaron en 6 niveles de concentración con una única determinación. Los niveles de concentración seleccionados fueron 0,1; 0,5; 1; 10; 100 y 500 µg/L, cada uno de los cuales se inyectó por triplicado.

Para evaluar el efecto matriz se desarrollaron las curvas de calibrado en distintos patrones de aguas. En solvente, que es la fase móvil empleada (H₂O: ACN), en agua grado UHPLC, en agua subterránea y en agua superficial.

Análisis de herbicidas glifosato, AMPA y glufosinato en agua con el método validado

La metodología desarrollada, pudo aplicarse para analizar muestras reales de agua (n=220) de varias regiones de Santa Fe y Entre Ríos.

Se analizaron muestras de agua superficial (ríos, arroyos, canales) y agua subterránea, permitiendo la evaluación del impacto generado por el uso de estos herbicidas en zonas

agrícolas con manejo intensivo. En la Tabla 4 se presenta un resumen de los niveles de concentración obtenidos para los distintos analitos, estando expresados los resultados como % del total de las muestras analizadas.

Tabla 4. Niveles de concentración de glifosato, AMPA y glufosinato

Analito	ND	LD-LC	LC-100 µg/L	100-900 µg/L	> 900 µg/L
Glifosato	3	4	81	7	5
AMPA	1	-	90	8	1
Glufosinato	65	14	21	-	-

CONCLUSIONES

La optimización de las condiciones de derivatización, tratamiento de muestra y el empleo de UHPLC–MS/MS permitió alcanzar límites de detección del orden de sub-ppb, permitiendo cumplir con las normativas vigentes (100 µg/L es el LMR de la Unión Europea para agua potable y 900 µg/L es el límite establecido en la Provincia de Santa Fe para aguas que van a ser potabilizadas).

Comparativamente con otros enfoques existentes, el procedimiento desarrollado tiene ventajas, tales como, preparación sencilla de muestras y rápido análisis cromatográfico. La aplicación de la metodología a muestras de Santa Fe y Entre Ríos demostró el impacto que tiene el empleo de este herbicida en el ambiente, debido a que el 97% de las muestras de agua analizadas contienen residuos de glifosato y el 99% contiene residuos de AMPA.

BIBLIOGRAFÍA

- Hanke I., Singer H., Hollender J.,** 2008. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal Bioanal Chem*, 391, 2265–2276.
- Ibáñez M., Pozo O.J., Sancho J.V., López F.J., Hernández F.,** 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1081, 145–155.