

Quantificação de glifosato não derivatizado e outros pesticidas polares em água de superfície e potável

Usando cromatografia de fase reversa e espectrometria de massas triploquadrupolar

Autores

Jean-Francois Roy,
Jarod N. Grossman, e
Tarun Anumol
Agilent Technologies, Inc.

Resumo

A quantificação precisa de glifosato e outros pesticidas altamente polares em níveis de nanogramas por litro (ng/L) em água de superfície e potável provou ser um desafio, devido a natureza polar desses compostos. Uma metodologia simples mas eficaz envolvendo cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas triploquadrupolar (LC/TQ) é apresentada aqui. O método inclui um preparo de amostra rápido e eficaz sem derivatização, cromatografia de fase reversa robusta e detecção por espectrometria de massas extremamente sensível para análise de rotina.

Principais vantagens

- Limite de detecção do método (MDL) em água potável: 10 ng/L (ppt) para glifosato.
- Sem diluição da amostra; o método pode trabalhar com grandes volumes de injeção de amostras aquosas.
- Fases móveis ácidas comuns de LC/MS; não há necessidade de um sistema de LC/TQ dedicado.

Introdução

O glifosato é um herbicida sintético de amplo espectro, comumente utilizado no setor agrícola e residencial. O glufosinato é produzido naturalmente pelas plantas, mas também é produzido sinteticamente em escala industrial. Ambos são degradados, por bactérias em plantas, solo e água, em ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ácido 3- (metilfosfínico) propiônico (MPPA), respectivamente. A quantificação precisa desses compostos e de outros pesticidas polares (ácido 2-hidroxiethylfosfônico (HEPA), N-acetil glufosinato (NAG), Etefon e Fosetil) em níveis de sub- $\mu\text{g/L}$ em água de superfície e potável provou ser difícil, com dois principais desafios a serem superados.

O primeiro desafio surge da natureza polar desses pesticidas (Figura 1), devido à complicação no preparo de amostras, bem como sua retenção em uma coluna cromatográfica de fase reversa clássica. Muitas abordagens foram propostas e desenvolvidas ao longo dos anos, com o alinhamento dessas duas etapas cruciais para a quantificação precisa, o preparo da amostra e a cromatografia.¹ No entanto, a maioria das metodologias existentes são demoradas e de baixa produtividade, exigindo um preparo de amostras exaustivo ou um analista capacitado para trabalhar com elas em um ambiente de rotina.

Outro desafio é relacionado à afinidade de pesticidas altamente polares por metais em nível de traços presentes na trajetória de fluxo de HPLC, resultando em picos com cauda.² O metal em nível de traços pode ser encontrado em diversos componentes na trajetória de fluxo (fases móveis, recipientes de vidro, tubulação de aço inoxidável (SST) etc.), e são difíceis de remover completamente. Mais uma vez, múltiplos métodos foram utilizados para controlar os metais em nível de traços nos sistemas de HPLC (passivação, quelação, uso de fases móveis com pH alto etc.), resultando em diferentes níveis de sucesso.

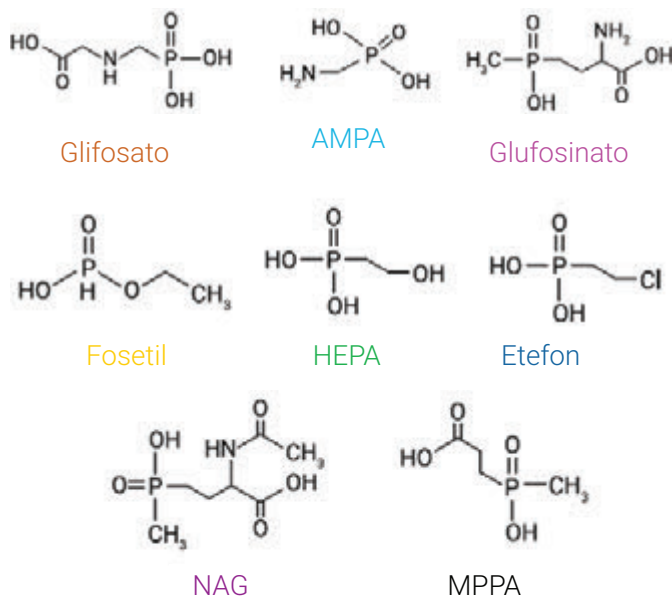


Figura 1. Estrutura dos analitos.

Uma metodologia simples e eficaz que supera esses dois desafios é apresentada neste trabalho, abrangendo um preparo rápido da amostra, cromatografia de fase reversa robusta e detecção de espectrometria de massas sensível para análise de rotina.

Parte experimental

Produtos químicos e reagentes

- **Glifosato:** Sigma-Aldrich (part number 45521-250MG)
- **AMPA:** Sigma-Aldrich (part number 324817-250MG)
- **Glufosinato de amônio:** Sigma-Aldrich (part number 45520-100MG)
- **Fosetil alumínio:** Toronto Research Chemicals Inc. (part number F727450)
- **HEPA:** Toronto Research Chemicals Inc. (part number H939650)
- **Etefon:** Toronto Research Chemicals Inc. (part number C366175)
- **NAG:** Toronto Research Chemicals Inc. (part number A178235)

- **MPPA:** Sigma-Aldrich (part number 31264-100MG)
- **Ácido fórmico:** Agilent Technologies (part number G2453-85060)
- **Metanol:** Agilent Technologies (part number 5191-4497)
- **Aditivo desativador do InfinityLab Agilent:** (Agilent Technologies part number 5191-4506)

Preparo de amostras

- Amostras de água de superfície foram coletadas em tubos de polipropileno (PP) de 15 mL. Os tubos foram então centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos. Foram coletados aproximadamente 1,5 mL de cada sobrenadante em seringas plásticas com filtros de polietersulfona (PES) de 0,2 μm Agilent (part number 5190-5096) e filtrados em um tubo de PP de 1,5 mL.
- Amostras de água potável foram coletadas diretamente em seringas plásticas com filtros PES de 0,2 μm Agilent (part number 5190-5096) e filtradas em um tubo de PP de 1,5 mL.

Em seguida, 999 µL de cada filtrado foram pipetados para um frasco de HPLC de 2 mL e acidificados com 1 µL de ácido fórmico concentrado, até atingir uma concentração final de 0,1% de ácido fórmico. Cada frasco foi então lacrado e brevemente agitado no vórtex.

Preparo do padrão

Soluções estoque individuais de AMPA, glifosato, glufosinato, MPPA, HEPA, NAG, Fosetil e Etefon foram preparadas em tubos de polipropileno de 15 mL através da diluição de 10 mg de cada padrão em 10 mL de água ultrapura (Tipo 1).

Tabela 1. Preparo de calibrantes de matriz combinada seguindo diluições em série.

Nível do calibrante	Concentração de pesticidas (µg/L)
13	10
12	5
11	2,5
10	1
9	0,75
8	0,5
7	0,25
6	0,1
5	0,075
4	0,05
3	0,025
2	0,01
1	0,005

As curvas de calibração foram equiparadas com a matriz usando água de superfície acidificada ou água potável acidificada (0,1% de ácido fórmico). A matriz de branco foi preparada em volumes suficientes, conforme descrito na seção de preparo de amostras. Esta matriz de branco também foi usada para preparar uma solução estoque de pesticida comum (1.000 µg/L) em um tubo de PP de 1,5 mL, misturando 1 µL de cada um dos oito estoques de pesticidas individuais com 992 µL da matriz de branco. Foi preparado um estoque extra comum de

100 µg/L na mesma matriz em branco, e 13 calibrantes variando de 0,005 a 10 µg/L foram preparados através de diluição em série. Os laboratórios podem reduzir os pontos de calibração com base em seus requisitos individuais de garantia de qualidade/controlado de qualidade.

Tabela 2. Condições do UHPLC.

Parâmetros do método do UHPLC			
Tempo de corrida	8 min		
Tempo de reequilíbrio	12 min		
Coluna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2,1 × 150 mm, 2,7 µm (p/n 693775-942)		
Fase móvel A	Ácido fórmico 0,1% + aditivo desativador do InfinityLab Agilent 5 µM em água ultrapura		
Fase móvel B	0,1% de ácido fórmico em metanol		
Volume de injeção	25 µL		
Lavagem da agulha	Ácido fórmico 0,1% em metanol na porta de limpeza por 3 segundos		
Temperatura do multisampler	4°C		
Temperatura da coluna	40°C		
Vazão	0,35 mL/min		
Gradiente	Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
	0	99,9	0,1
	1,5	99,9	0,1
	2	80	20
	4	60	40
	4,1	0	100
	8	0	100

Tabela 3. Parâmetro de espectrometria de massas.

LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6470A				
Modo de aquisição	MRM dinâmico (dMRM)			
Fonte de ionização	Agilent Jet Stream ESI			
Polaridade	Positivo (+) ou Negativo (-)			
Voltagem do capilar	3.000 V (+), 3.500 V (-)			
Fluxo do gás de secagem	11 L/min			
Temperatura do gás de secagem	220°C			
Pressão do nebulizador	30 psi			
Temperatura do do Sheath Gas	300°C			
Fluxo do Sheath Gas	11 L/min			
Voltagem do nozzle	1.500 V (+), 800 (-)			
Resolução Q1 e Q2	Unitário (0,7 amu), otimizado pelo Autotune			
Delta EMV	0 V			
Transições MRM	Composto	Quantificador	Qualificador 1	Qualificador 2
	AMPA	112 → 30 (+)	110 → 79 (-)	110 → 63 (-)
	Glufosinato	182 → 56 (+)	182 → 136 (+)	
	Glifosato	170 → 88 (+)	170 → 60 (+)	170 → 42 (+)
	HEPA	125 → 79 (-)	127 → 81 (+)	127 → 109 (+)
	MPPA	153 → 79 (+)	153 → 135 (+)	
	NAG	224 → 56 (+)	224 → 164 (+)	224 → 136 (+)
	Etefon	145 → 63 (+)	145 → 91 (+)	143 → 107 (-)
	Fosetil	109 → 81 (-)	111 → 83 (+)	111 → 65 (+)

Resultados e discussão

Os químicos analíticos precisam que os três pilares, de preparo de amostras, cromatografia e espectrometria de massas, estejam perfeitamente alinhados para atingir níveis de detecção muito baixos. Esse alinhamento sempre foi um desafio para os pesticidas polares como o glifosato. Diversas abordagens foram propostas ao longo dos anos, mas a metodologia apresentada nesta nota de aplicação apresenta uma combinação favorável entre esses três pilares.

Primeiramente, usando este método, os materiais de partida de natureza aquosa não são ou são minimamente diluídos, permitindo alcançar limites de detecção mais baixos. Evitar tratamentos longos e com grandes volumes de matérias-primas ajuda a reduzir os custos de mão de obra e de consumíveis, ao mesmo tempo que aumenta a taxa de produtividade. A derivatização também não é necessária, proporcionando a redução do uso de solventes ambientalmente perigosos, economia de tempo e facilidade durante a implementação.

Em segundo lugar, a natureza aquosa das matrizes é uma combinação perfeita

com a coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, que foi desenvolvida usando uma fase ligada quimicamente. Esta fase foi criada aplicando uma carga positiva à superfície da sílica e funcionalizando a partícula com uma fase ligada C18, oferecendo a capacidade de retenção para moléculas ionizáveis altamente polares. O resultado é uma coluna totalmente compatível com as condições da fase móvel aquosa e com as amostras. Além disso, esta compatibilidade permite a injeção de grandes volumes de amostras aquosas sem sacrificar o formato do pico. O uso de uma das condições mais comuns de LC/MS (ácido fórmico 0,1%) também facilita a transição de uma aplicação para outra em um mesmo sistema de LC/MS sem a necessidade de sistemas dedicados ou lavagens e condicionamento demorados. É importante ressaltar que essas condições também permitem o uso de transições no modo positivo para a maioria dos pesticidas, aumentando a sensibilidade.

Terceiro, a presença potencial de metais em nível de traços na trajetória de fluxo do UHPLC é prejudicial ao formato do pico para compostos contendo fosfonato, e isso é abordado de duas formas:

- A incorporação de 5 µM de aditivo desativador do InfinityLab (Figura 3) no sistema da fase móvel para fornecer traços constantes de quelante para remoção do metal, que não prejudica a ionização no modo positivo ou negativo e não se acumula na trajetória dos íons do espectrômetro de massas.

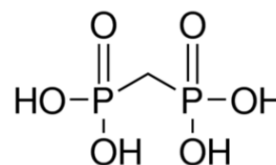


Figura 3. Estrutura do componente principal do aditivo desativador do InfinityLab Agilent.

- A remoção da maior parte do SST na trajetória de fluxo desde o ponto de entrada da amostra até o espectrômetro de massas. A tubulação com revestimento PEEK (part number G5667-81005) foi usada para substituir o tubo SST padrão entre a válvula de injeção do multisampler e a entrada da coluna. Essa tubulação foi conectada à válvula de injeção e à coluna com conexões Agilent Quick Turn (part number 5067-5966), que utilizam anilhas poliméricas.

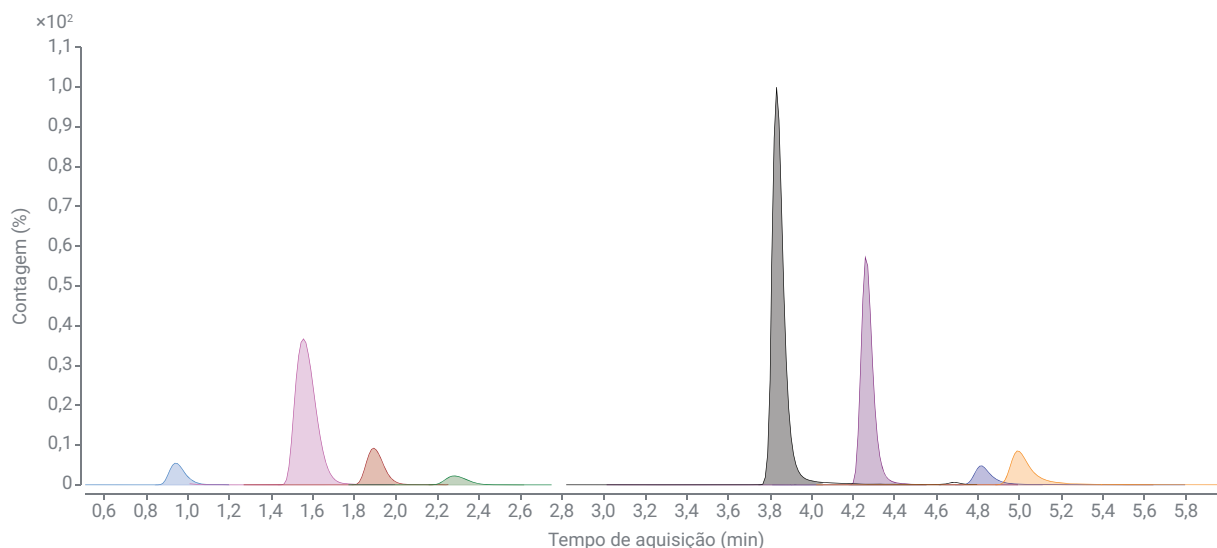


Figura 2. Cromatograma típico para os oito pesticidas a 10 µg/L. Os tempos de retenção foram os seguintes: AMPA = 0,95 minuto, Glufosinato = 1,6 minuto, Glifosato = 1,9 minuto, HEPA = 2,3 minutos, MPPA = 3,8 minutos, NAG = 4,3 minutos, Etefon = 4,8 minutos, Fosetil = 5,0 minutos.

Por último, o LC/MS triplo quadrupolo 6470 permite a aquisição de sinais de polaridade positiva e negativa para o mesmo composto, na mesma janela de MRM dinâmico. Dependendo da matriz, um determinado composto pode apresentar melhor sensibilidade (sinal mais alto ou ruído mais baixo) tanto na

polaridade positiva quanto na negativa, tornando este um método versátil para quantificação. O 6470 é muito sensível, e também fornece áreas de pico altamente reprodutíveis, mesmo em faixas baixas, de ng/L (ppt), como pode ser visto nos cálculos do Limite de detecção do método (MDL) para glifosato.

Os destaques dos resultados obtidos usando água potável da rede municipal de Montreal, Canadá e água de superfície coletada do rio St.Lawrence (Montreal, Canadá) são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da calibração (cada calibrante foi injetado em triplicata).

Composto	Tipo de curva	Água potável			Água do rio		
		Faixa de linearidade (ng/L)	Número de níveis de calibração	R²	Faixa de linearidade (ng/L)	Número de níveis de calibração	R²
AMPA	Linear	100 a 10.000	8	0,9993	100 a 10.000	8	0,9993
Glufosinato	Quadrático	25 a 10.000	11	0,9998	25 a 10.000	11	0,9998
Glifosato	Linear	25 a 10.000	11	0,9995	25 a 10.000	11	0,9997
HEPA	Linear	50 a 10.000	10	0,9995	50 a 10.000	10	0,9994
MPPA	Linear	50 a 10.000	10	0,9991	50 a 10.000	10	0,9986
NAG	Linear	10 a 10.000	12	0,9986	10 a 10.000	12	0,9984
Etefon	Linear	25 a 10.000	11	0,9990	25 a 10.000	10	0,9989
Fosetil	Linear	10 a 10.000	12	0,9996	10 a 10.000	11	0,9996

Curvas de calibração e faixa de linearidade

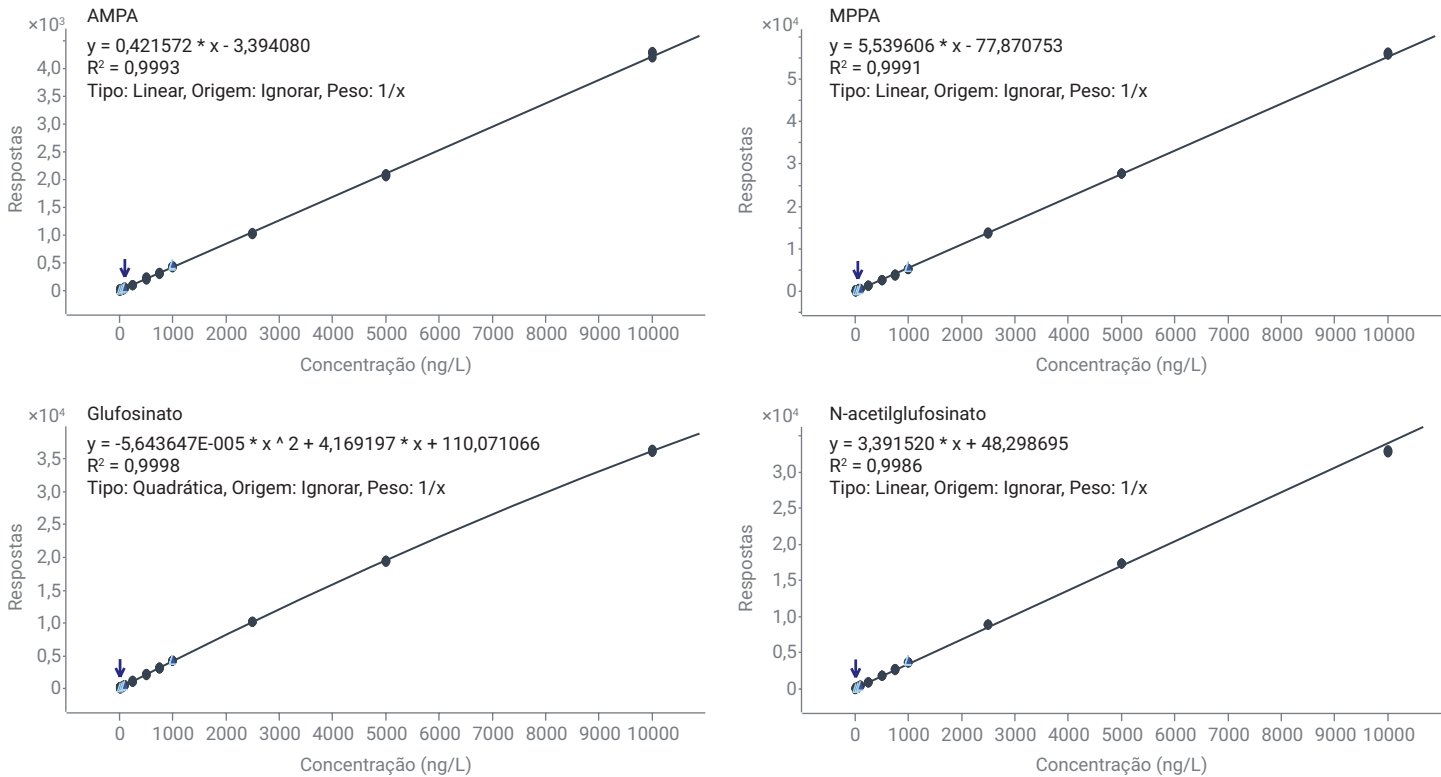


Figura 4. Curvas de calibração típicas para cada pesticida (continua na próxima página).

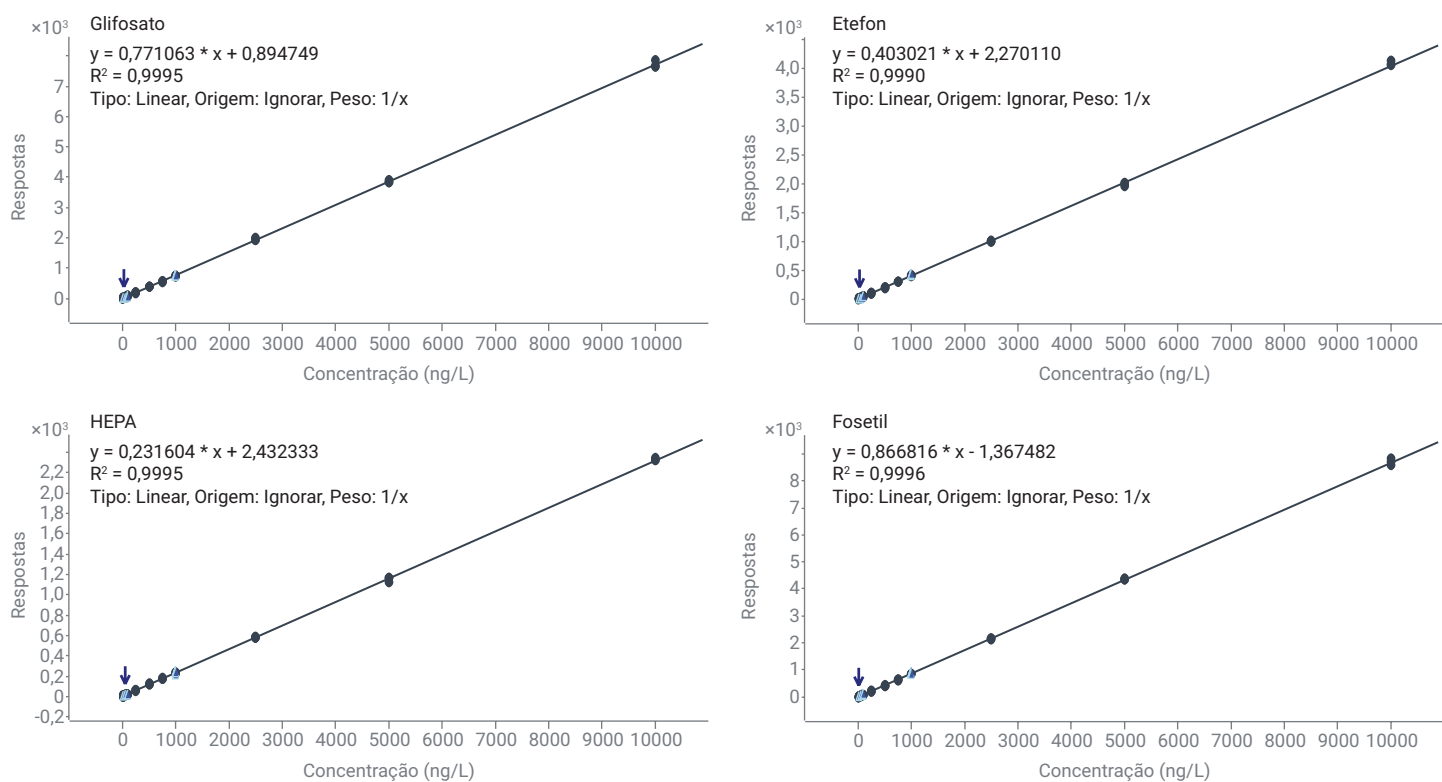


Figura 4. Curvas de calibração típicas para cada pesticida (continuação da página anterior).

Exatidão e cromatogramas no limite da quantificação

Tabela 5. Resultados da calibração (cada calibrante foi injetado em triplicata).

Composto	Água potável		Água do rio	
	LOQ (ng/L)	Exatidão no LOQ (Média de três replicatas)	LOQ (ng/L)	Exatidão no LOQ (Média de três replicatas)
AMPA	100	102,9%	100	87,6%
Glufosinato	25	107,2%	25	85,6%
Glifosato	25	96,8%	25	108,6%
HEPA	50	110,9%	50	105,8%
MPPA	50	120,3%	50	118,9%
NAG	10	82,6%	10	93,4%
Etefon	25	92,5%	50	121,7%
Fosetil	10	108,9%	25	96,6%

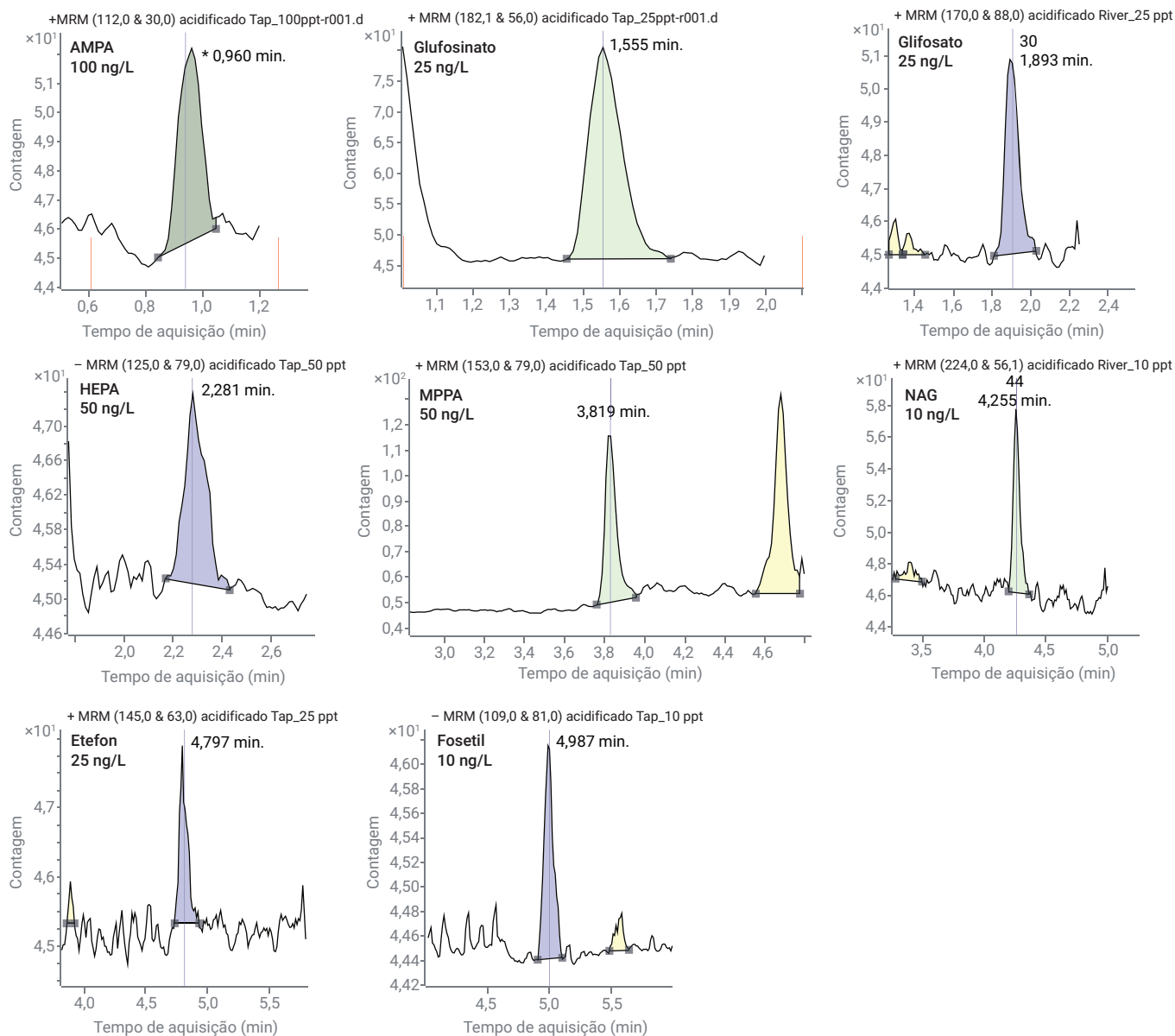


Figura 5. Cromatogramas típicos para cada pesticida em seu respectivo LOQ.

MDL de glifosato

O cálculo do MDL é baseado nas estatísticas de reprodutibilidade para uma série de injeções em replicata, e a concentração é determinada na coluna, onde há 99% de confiança de que a amostra é distinguida do ruído na linha de base, de forma inequívoca e reprodutível, seguindo as diretrizes da EPA.³ O MDL do glifosato foi calculado com a fórmula a seguir, usando quatro calibrantes distintos a 10 ng/L, em quatro dias separados, com quatro colunas diferentes e de quatro lotes diferentes:

$$\text{MDL} = (\text{Concentração na coluna}) \times (\% \text{RSD}/100) \times (\text{estatística } t)$$

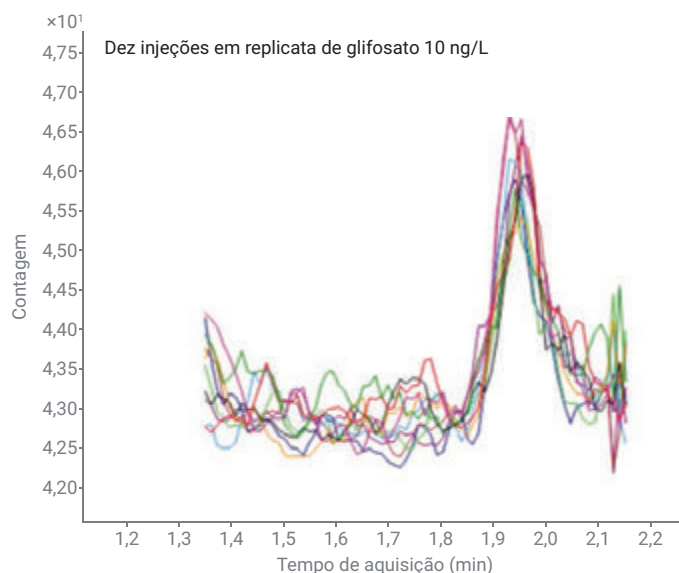


Figura 6. Sobreposição de dez injeções em replicata de um calibrante de glifosato a 10 ng/L.

Tabela 6. Cálculos do MDL para o glifosato.

		Unidades de injeção de entrada do usuário	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4
			Quantidade de amostra de entrada do usuário (Concentração ou quantidade na coluna)			
			10	10	10	10
		Número de replicatas	Resposta de entrada do usuário (sem integração manual)			
Mínimo	Recomendado	Replicata1	13	15	20	11
		Replicata2	19	30	15	12
		Replicata3	15	26	25	10
		Replicata4	17	14	16	15
		Replicata5	16	20	18	11
		Replicata6	16	13	11	15
		Replicata7	29	25	10	12
		Replicata8	23	15	10	11
	Replicata9	14	22	14	7	
	Replicata10	21	17	16	9	
	Parâmetros calculados					
	%RSD (CV)		26,7%	29,7%	30,5%	21,7%
	Valor t crítico (t)		2,821	2,821	2,821	2,821
	MDL (ng/L)		7,5	8,4	8,6	6,1

Conclusão

O fluxo de trabalho apresentado nesta nota de aplicação oferece uma solução Agilent para a análise de glifosato não derivatizado e de sete outros pesticidas polares em água de superfície e potável, com preparo de amostras, cromatografia e espectrometria de massas bem alinhados.

A presença potencial de traços de metal na trajetória de fluxo, responsável pela cauda nos picos de compostos polares, foi minimizada ao inserir o aditivo desativador do InfinityLab Agilent na fase móvel e com o uso de uma tubulação com revestimento PEEK entre o multisampler e a coluna.

A coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 usa um novo empacotamento de fase reversa; é resistente a injeções de grandes volumes de extratos aquosos e oferece boa retenção dos compostos polares em condições ácidas, sem sacrificar o formato do pico.

O LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6470 oferece grande sensibilidade, reprodutibilidade e linearidade, todas adequadas para a análise quantitativa desses analitos desafiadores em água de superfície e potável.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a contribuição fundamental dos colegas da Agilent, Theresa Sosienski, Dorothy Yang, Jordy Hsiao e Anne Mack para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

1. Zweigenbaum, J.; Lucas, D.; Cali, A. Direct Analysis of Glyphosate, AMPA, and Other Polar Pesticides in Food. Nota de aplicação Agilent Technologies, número de publicação 5994-0796EN, **2019**.
2. Hsiao, J. J. *et al.* Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Analytical Chemistry* **2018**, *90*(15), 9457–9464.
3. US EPA, Procedures for Detection and Quantitation – Documents. <https://www.epa.gov/cwa-methods/procedures-detection-and-quantitation-documents>

www.agilent.com/chem

DE44208.613275463

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Impresso nos EUA, 13 de janeiro de 2021
5994-2986PTBR