

MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y ÁCIDO AMINOMETIL FOSFÓNICO (AMPA) EN AGUA Y ORINA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método cuantitativo para la determinación de glifosato y ácido aminometil fosfónico (AMPA) en agua y orina.

La invención tiene aplicación en el campo agroquímico, específicamente en el campo de métodos de detección química de glifosato .

ESTADO DE LA TÉCNICA

La determinación de glifosato y su metabolito ácido aminometil fosfónico (AMPA) en agua, orina y otras matrices es de gran interés para determinar la exposición accidental a estos compuestos debido a su amplio uso en fumigación para el control de cultivos lícitos e ilícitos. La cuantificación de glifosato y AMPA en agua se encuentra estandarizado por *Eaton, A., Clesceri, L., Rice, E., & Greenberg, A. (Eds.). (2012). Standard methods for the examination of water & wastewater. Method 2340-C (pp. 2-44 a 2-46). (22st edition).* Asimismo, existen documentos de patente, tales como CN109212053 B y KR100461702 B1, que describen métodos alternativos para la detección de glifosato en agua utilizando un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Sin embargo la cuantificación de estos analitos en otras matrices como la orina, sangre o suelos, requiere de la implementación de técnicas de extracción y purificación específicas para cada una de ellas así como un proceso de derivatización previo al análisis instrumental.

Algunos investigadores que han establecido técnicas para la determinación de glifosato en matrices diferentes al agua son *K. Zouaoui, S. Dulaurent, J.M. Gaulier, C. Moesch, G. Lachâtre*, en su artículo “*Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication*” (*Forensic Science International, Volume 226, Issues 1–3, 2013, Pages e20-e25, ISSN 0379-0738*) empleando cromatografía líquida masas-masas. Dado que este equipo es muy costoso, pocos laboratorios tienen acceso al mismo, y por tanto se debe trabajar en optimizar el proceso de extracción, purificación y derivatización para

lograr una buena recuperación de glifosato y su metabolito AMPA y una eficiente cuantificación en equipamiento cromatográfico de precio accesible.

Recientemente, *Rendon-von Osten, J.; Dzul-Caamal, R. (2017), en su artículo "Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén" (Campeche, Mexico. Int. J. Environ. Res. Public Health 2017, 14, 595)* presentan una técnica para determinar residuos de glifosato en varias matrices incluyendo orina por medio de la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), por otra parte *Dawei Chen, Hong Miao, Yunfeng Zhao, Yongning Wu (2019), en su artículo "A simple liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in human urine using cold-induced phase separation and hydrophilic pipette tip solid-phase extraction" (Journal of Chromatography A, Volume 1587, 2019, Pages 73-78)*, presentaron un método que emplea cromatografía líquida especializado (de alto costo) y extracción en fase sólida para glifosato y AMPA en orina humana. No obstante, en la literatura a la fecha no se reporta el empleo de un proceso de extracción y purificación en fase sólida específica con bajo uso de solventes, seguido de derivatización y cuantificación de glifosato y AMPA por cromatografía de gases acoplada a masas (de menor costo que los referidos anteriormente) con un buen porcentaje de recuperación de los analitos en orina como matriz.

La presente invención describe un método cuantitativo eficiente para la extracción, derivatización y cuantificación de glifosato y su metabolito AMPA tanto en agua como en orina. Las ventajas técnicas del presente método son: bajo uso de solventes (disminución de impacto ambiental) debido al empleo de cartuchos de bajo volumen de extracción en fase sólida, cuantificación eficiente tanto en orina como en agua de glifosato y AMPA, extracción en fase solida de polaridad específica, uso de equipamiento de menor costo, reducción del tiempo de procesamiento por extraer en fase sólida y alto porcentaje de recuperación de glifosato y AMPA por la especificidad del método implementado tanto para matriz de orina como de agua.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere al desarrollo y estandarización de una metodología cuantitativa para la extracción, purificación, derivatización, y cuantificación eficiente de glifosato y su metabolito AMPA (Ácido aminometil fosfónico) en aguas y orina utilizando cromatografía de gases acoplada a masas.

A continuación se describen los pasos del método de determinación de glifosato en muestras de agua y orina:

Extracción y purificación

La extracción se realiza en fase solida (SPE) con cartuchos de polaridad selectiva específica para estos analitos. Se deben activar los cartuchos de fase sólida justo antes de su uso para evitar que se sequen. La activación de los cartuchos se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Cartuchos Strata (*para muestras de agua y orina*)

Tabla 1

Acondicionamiento:	6mL de metanol
Equilibrar:	6mL Ácido clorhídrico 1N
Cargar:	Muestra acidificada
Eluir:	6mL ácido clorhídrico: metanol 1N
Secar:	1 minutos bajo vacío

- Cartuchos C18 (*solo para muestras de orina*)

Tabla 2

Acondicionamiento:	10mL de metanol
Equilibrar:	10mL Agua tipo 1
Cargar:	Muestra acidificada

Como podemos observar en la tabla anterior, el glifosato y su metabolito AMPA, son extraídos de un volumen medido de la muestra de agua u orina por extracción en fase solida utilizando como solvente ácido clorhídrico: metanol.

En el caso de la muestra de agua, se deben tomar 200 mL de agua y ajustar el pH igual o menor a 2 con ácido clorhídrico (HCl) 1N adicionando 1 mL de solución.

Posteriormente, se debe pasar la muestra por los cartuchos de extracción en fase sólida, Cartuchos Strata únicamente por tratarse de muestras de agua como se especifica en la tabla 1, eluir según lo indicado en la tabla 1 y evaporar a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno.

Para muestras de orina tomar 20 mL de muestra y acidificar a pH 2 adicionando de 2 a 2,5 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1N. Se procede a cargar la muestra en los cartuchos C18 conectados en línea con los cartuchos Strata evitando que cualquiera de los dos se seque. Al finalizar la carga de la muestra evaporar a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno.

Derivatización

Para evitar la pérdida de analitos, se realiza una derivatización química obteniendo compuestos más estables e introduciendo en la molécula grupos funcionales que pueden ser detectados mediante espectrometría de masas.

El proceso de derivatización se realiza adicionando 800 µL de Anhídrido trifluoroacético (TFAA) y 400 µL de Trifluoroetanol (TFE) a la muestra seca que se encuentra en un vial. Se cierra el vial usado y se calienta a 100 °C durante 2 horas. Llevar el producto a temperatura ambiente y evaporar a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno y disolver lo obtenido en 2 mL de acetato de etilo antes del análisis.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El derivatizado es inyectado en el cromatógrafo de gases acoplado a masas para su análisis. El análisis por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas se lleva a cabo en modo de detección SIM; la identificación de compuestos cualitativamente es basada en el tiempo de retención, y abundancia relativa de dos masas características. El método emplea la técnica de estándar externo bajo las siguientes condiciones:

Tabla 3: Cromatografía de gases

Columna capilar:	RXI 5MS (3m,0.25mm, 0.25 µm) o equivalente
Velocidad lineal:	30,7 cm/S
Volumen de inyección:	2,0 µL
Modo de inyección:	Splitless
Temperatura del horno:	90 °C
Temperatura puerto de inyección:	270 °C
Flujo:	0,7 mL/min

Tabla 3: Espectrofotómetro de masas

Modo de detección:	SIM		
Temperatura fuente de iones:	230 °C		
Temperatura interface:	280 °C		
Voltaje del detector:	0,2 kV		
Rampa T°:	Velocidad	T° final	Hora de espera
	-	90	1,5
	30	300	3,5

Como podemos observar en la tabla anterior, para el proceso de extracción, purificación, derivatización y análisis cromatográfico, se ha implementado un método que considera las propiedades fisicoquímicas del glifosato y su metabolito AMPA.

Ejemplo de aplicación del método descrito

- Matriz: Orina humana
- Equipo: Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

- Procedimiento: Activar los cartuchos de fase solida justo antes de su uso evitando que se sequen, de la siguiente manera:

Cartuchos Strata

Acondicionamiento:	6mL de metanol
Equilibrar:	6mL Ácido clorhídrico 1N
Cargar:	Muestra acidificada
Eluir:	6mL Ácido clorhídrico: metanol 1N
Secar:	1 minutos bajo vacío

Cartuchos C18

Acondicionamiento:	10mL de metanol
Equilibrar:	10mL Agua tipo 1
Cargar:	Muestra acidificada

Tomar 20 mL de muestra acidificada a pH igual o menor a 2 adicionando de 2 mL a 2.5 mL de HCl 1 N y se procede a cargar la muestra en los cartuchos C18 conectados en línea con los cartuchos Strata, evitando que cualquiera de los dos se seque. Al finalizar la carga de la muestra evaporar a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno.

Derivatización: Derivatizar adicionando 800 µL de Anhídrido trifluoroacético (TFAA) y 400 µL de Trifluoroetanol (TFE). Cerrar el vial fuertemente y calentar en horno a 100 °C durante 2 h. Llevar a temperatura ambiente, evaporar en atmósfera de nitrógeno y disolver en 2 ml de acetato de etilo antes del análisis.

Condiciones Cromatográficas:

A) Cromatografía de gases

Columna capilar:	RXI 5MS (3m,0.25mm, 0.25 µm) o equivalente
Velocidad lineal:	30.7 cm/S
Volumen de inyección:	2,0 µL
Modo de inyección:	Splitless
Temperatura del horno:	90 °C
Temperatura puerto de inyección:	270 °C
Flujo:	0.7 mL/min

B) Espectrofotómetro de masas

Modo de detección:	SIM		
Temperatura fuente de iones:	230 °C		
Temperatura interfase:	280 °C		
Voltaje del detector:	0,2 kV		
Rampa T°:	Rate	Final T°	Hold time
		90.0	1,5
	30	300.0	3,5

En la implementación de la técnica para esta matriz (orina humana), se obtuvo un porcentaje de recuperación entre 70–130 %

Los límites de cuantificación que normalmente se reportan para esta técnica, es de 2 µg/L en orina, lo que demuestra una baja sensibilidad del método.

Asimismo, cabe resaltar que la técnica descrita es novedosa debido a que el proceso de extracción es continuo, utilizando los cartuchos Strata y C18. Además, el proceso de derivatización es diferente frente a lo establecido en el estado del arte, tanto en el equipo empleado como en los reactivos usados.