



## Introduzione

Il glifosate è l'erbicida non selettivo, più diffuso al mondo.

Trova il principale impiego nelle operazioni di diserbo prima della semina poiché la sua azione fitotossica è efficace su qualsiasi specie vegetale ad eccezione di quelle modificate geneticamente per esserne resistenti.

Il suo uso ha conosciuto un grande impulso per:

- associazione a cultivar transgeniche
- penetrazione molto bassa nel suolo - limitata ad una profondità di circa 20 centimetri
- facile degradazione - attaccato e distrutto dai batteri presenti nel suolo ha tempi di carenza molto brevi e si degrada completamente anche in condizioni di bassa temperatura, ha un'emivita media nel suolo di circa 60 giorni e di pochi giorni in acqua
- bassa tossicità per i mammiferi e per l'uomo.

Studi recenti, anche se spesso contestati, hanno indicato che il glifosate potenzialmente può danneggiare agricoltura ed ecosistema, tra le conseguenze derivanti dal suo largo impiego:

- la diminuzione della biodiversità
- l'indebolimento alla resistenza alle malattie delle specie naturali

in particolare quest'ultimo effetto innesca un aumento dell'impiego di fungicidi, insetticidi, fertilizzanti oltre che semi modificati geneticamente.

## Derivatizzazione automatizzata, clean-up e determinazione LC-MS/MS di glifosate e del suo principale metabolita acido aminometilfosfonico (AMPA).

Il sempre maggior uso sia a livello professionale che hobbistico, ha portato ad un aumento della domanda per una determinazione affidabile e sensibile del glifosate, sia su prodotti agricoli che su campioni di suolo e acqua. Sulla base di tali premesse Gerstel ha sviluppato un metodo che migliora la sensibilità e massimizza l'automazione per una maggiore produttività.



## Strumentazione

- Sistema HPLC 1290 UHPLC, Agilent Campionatore Gerstel MPS
- Stazione di clean-up on-line ad alta pressione GERSTEL SPE<sup>xos</sup>
- Spettrometro di massa a triplo quadrupolo Agilent

## Metodo di analisi

Il metodo combina:

- derivatizzazione con 9-fluorenylmethyl cloroformiato FMOC-Cl
- clean-up con sistema SPE on-line ad alta pressione (GERSTEL SPE<sup>xos</sup>) posizionato tra campionatore e HPLC
- iniezione diretta in LC-MS/MS.

La preparazione del campione è ultimata in soli 20 minuti e viene effettuata contemporaneamente alla corsa HPLC del precedente campione. La sovrapposizione dei tempi di preparazione e di analisi garantisce elevata produttività.

## Preparazione del campione

Si portano ad esempio 4 matrici differenti: frumento, miele, foglie di tè e campioni di suolo

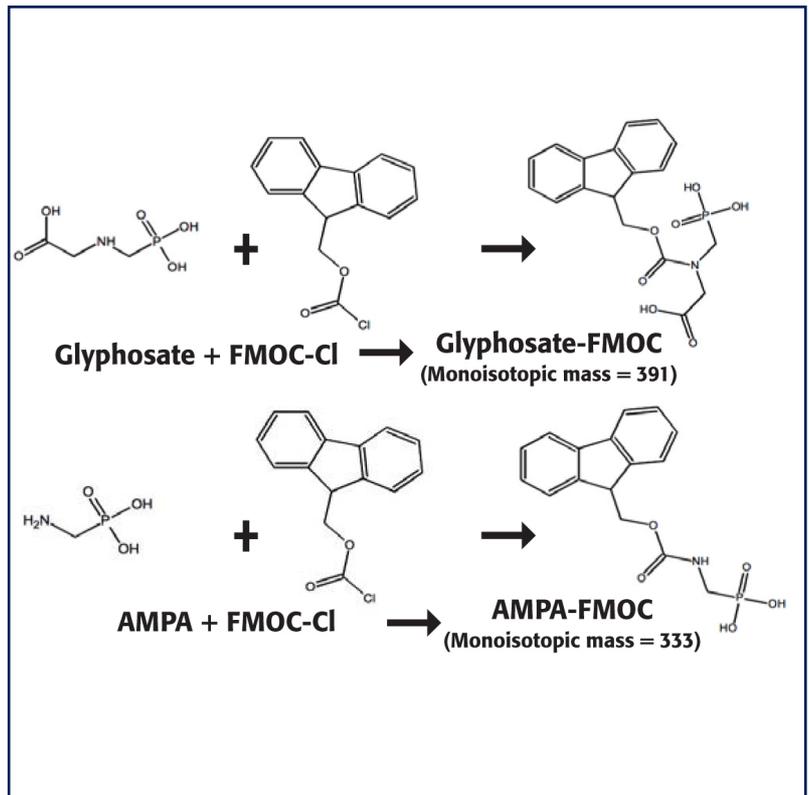
## Estrazione

- ➔ Campioni di frumento sono estratti con acqua acidificata, neutralizzati e diluiti con acqua.
- ➔ Campioni di miele sono sciolti a 60°C e diluiti con acqua.
- ➔ Campioni di foglie di tè sono estratti con acqua acidificata, neutralizzati e diluiti con acqua.
- ➔ Campioni di suolo sono estratti con acqua.

## Derivatizzazione

Le diverse matrici estratte sono posizionate sul campionatore MPS.

L'automazione del metodo include l'aggiunta di un'aliquota di derivatizzante effettuata direttamente dal campionatore.

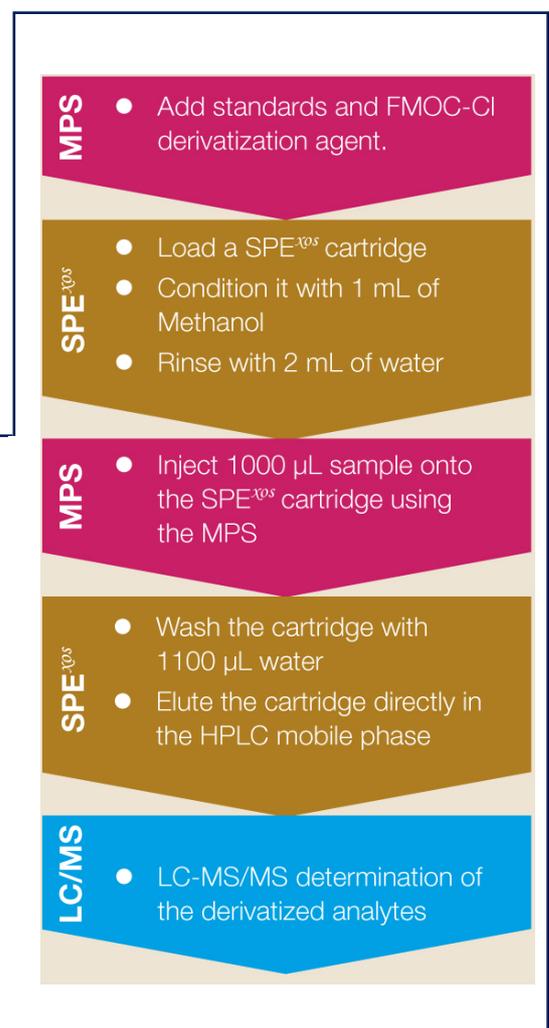
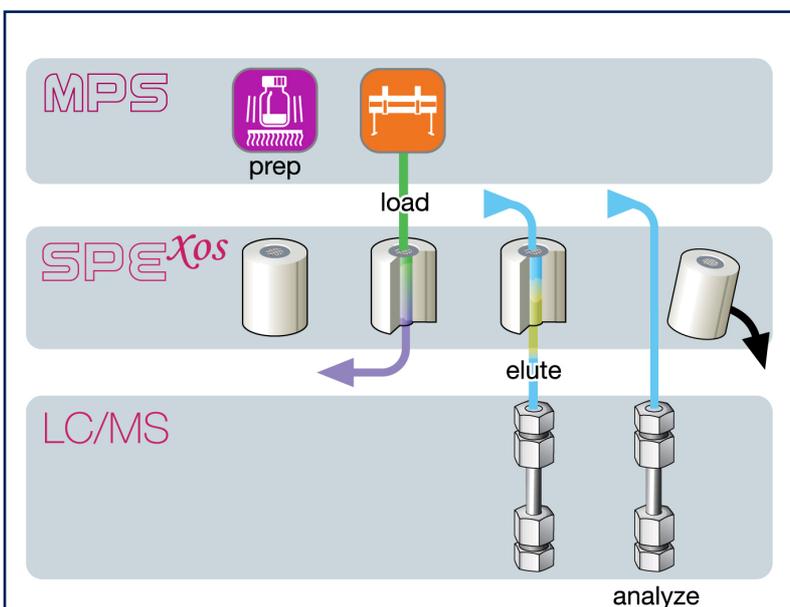


## Clean-up e introduzione on-line del campione

Le fasi della purificazione includono l'esecuzione in automatico di:

- caricamento della cartuccia SPE<sup>XOS</sup> on-line
- condizionamento della cartuccia
- risciacquo della cartuccia
- aggiunta derivatizzante al campione
- caricamento sulla cartuccia del campione derivatizzato
- lavaggio
- iniezione dell'eluato nel sistema HPLC.

Tutte le fasi sono sincronizzate e automatizzate in modo che la derivatizzazione e il clean-up del nuovo campione siano completate in 20 minuti, ossia nel tempo di analisi HPLC MS/MS del campione precedente.



## Risultati

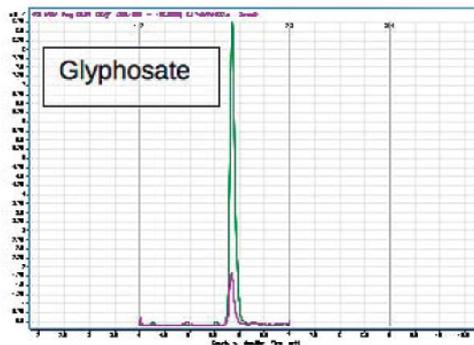
Di seguito si riportano il limite di quantificazione (LOQ) e il limite di rilevazione (LOD) di glifosate e AMPA in campioni di: frumento, acqua, foglie di tè, e campioni di miele.

Si indica inoltre il livello massimo di residui (LMR) consentito in UE e in US.

Campione	LOQ	LOD	LMR UE	LMR US
FRUMENTO	<1,0 µg / kg	<0,3 µg / kg	10 mg / kg	30 mg / kg
ACQUA	<10,0 ng / L	<3,0 ng / L	100 ng / L	700 ng / L
FOGLIE DI TE'	<1,0 µg / kg	<0,3 µg / kg	2 mg / kg	1 mg / kg
MIELE	<1,0 µg / kg	<0,3 µg / kg	0,05 mg / kg	

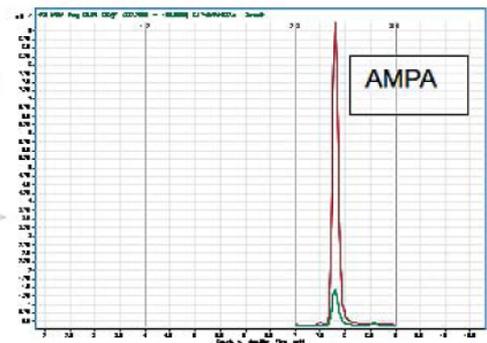
Cromatogrammi relativi all'estrazione di un campione di frumento con aggiunta di std  
 Glifosate concentrazione di 0,01 mg / kg (traccia rossa)  
 Glifosate concentrazione di 0,1 mg / kg (traccia verde).

Transizioni di massa per  
 glifosate:  
 390 -> 168 e  
 390 -> 150;

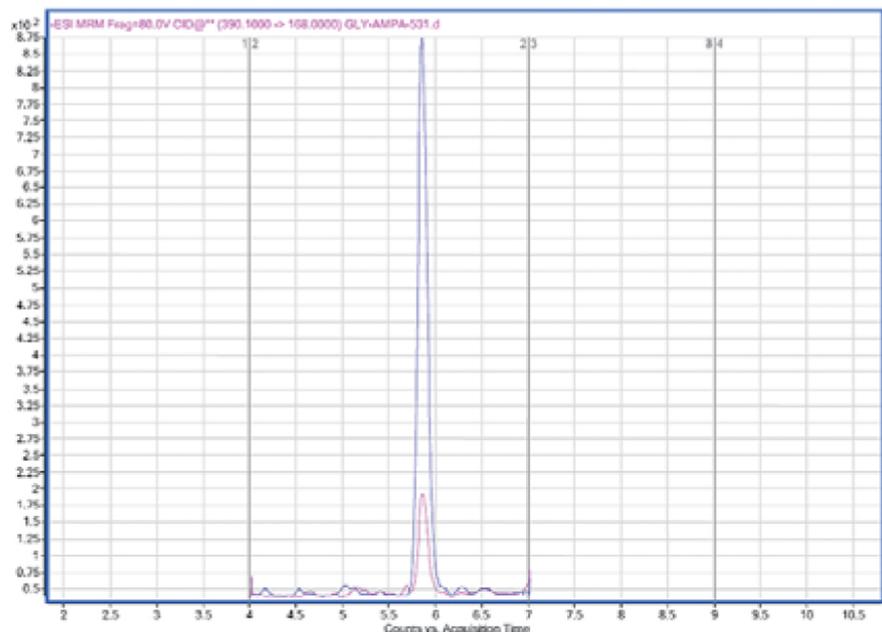


AMPA concentrazione 0,01 mg / kg (Traccia verde)  
 AMPA concentrazione 0,1 mg /kg (traccia rossa).

Transizioni di massa per AMPA:  
 332 -> 136  
 332 -> 110.

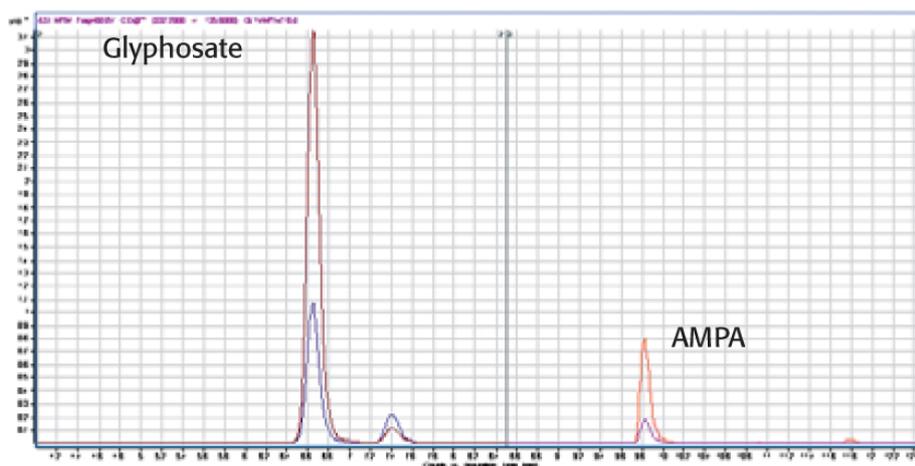


Cromatogrammi relativi  
 all'estrazione di un campione di  
 foglie di tè con aggiunta di std  
 Glifosate in concentrazione di  
 0,01 mg / kg  
 Glifosate in concentrazione di  
 0,1 mg / kg.



Cromatogramma relativo all'estrazione di un campione di suolo campionato a Tenerife. Concentrazione di Glifosate trovato: circa 740 mcg / kg; Concentrazione AMPA: circa 17 mg / kg.

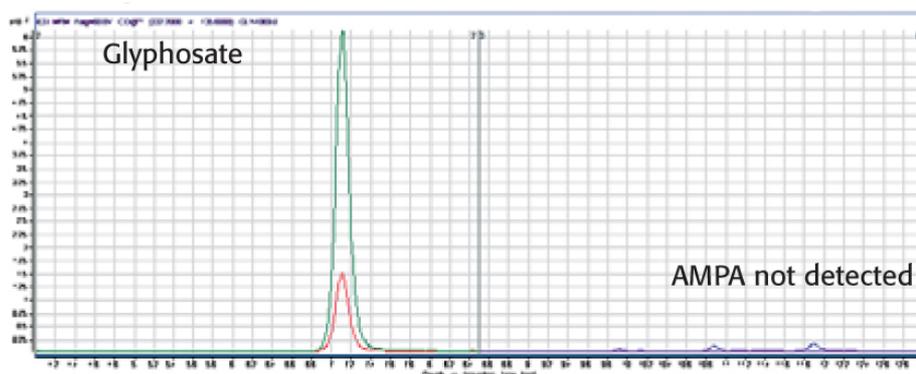
Le due tracce indicate per ogni composto riflettono le due transizioni monitorate per ogni composto.



Cromatogramma relativo all'estrazione di un campione miele "vecchio" di un anno proveniente da zone trattate con glifosate.

La concentrazione di glifosate trovata è di 4 mg / kg, circa 80 volte la concentrazione ammissibile;

La concentrazione di AMPA non è rilevabile.



## Conclusioni

L'analisi di una serie di diluizioni produce un'ottima linearità dell'ordine di 0,999 e bassi limiti di quantificazione (LOQ) di 10 ng / L per entrambi i principi attivi glifosate e AMPA in acqua.

Il recupero di glifosate e AMPA in acqua, frumento e foglie di tè è nell'intervallo tra 90 e 105%.

Il metodo automatizzato garantisce LOQ sotto 1 mg / kg per glifosate e AMPA rispondendo ampiamente alle direttive dell'Unione Europea.