
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Facultad de Ciencias Exactas

Tesina – Licenciatura en Química

“Desarrollo de métodos para la derivatización y cuantificación de glufosinato, glifosato y ácido aminometilfosfónico”

Brenda Belén Sliz

La Plata – Argentina

Año 2017

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA), para obtener el grado académico de Licenciada en Química, bajo la dirección del Dr. Leonardo G. Gagliardi y con el asesoramiento experimental de la Lic. Fiorella Menestrina.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesina consiste en explorar alternativas para mejorar los métodos de derivatización y análisis por cromatografía de gases que actualmente se utilizan para la determinación de glifosato, su principal producto de degradación, ácido aminometilfosfónico, y un sustituto químico actualmente disponible en el mercado, glufosinato.

Los objetivos específicos son:

- a) Evaluar comparativamente el uso de nuevas columnas cromatográficas, respecto a las que se utilizan actualmente, buscando lograr mejores prestaciones analíticas (selectividad, eficiencia, tiempo de análisis, simetría de pico, señal, etc).
- b) Optimizar las condiciones cromatográficas con la columna elegida en el CG-MS.
- c) Evaluar métodos alternativos de derivatización de los compuestos de interés. Se evaluarán distintos alcoholes fluorados y la posibilidad de asistir la derivatización con el microondas.
- d) Seleccionar el método de derivatización que demuestre resultados promisorios y optimizar las condiciones de reacción (temperatura, tiempo de reacción, potencia del microondas).

Índice

1. Objetivos	3
2. Introducción.....	6
2.1 Glufosinato, glifosato y ácido aminometilfosfónico en el medio ambiente	7
2.2 Técnicas para la determinación de glufosinato, glifosato y AMPA.....	7
2.3 Cromatografía gas-líquido	9
2.3.1 Principios	9
2.3.2 Detectores	11
2.3.2.1 Detector FID	11
2.3.2.2 Detector MS.....	13
2.3.3 Fases estacionarias.....	17
3. Experimental	19
3.1 Materiales	20
3.2 Equipos.....	20
3.3 Reactivos.....	20
3.4 Métodos.....	21
3.4.1 Preparación de los patrones	21
3.4.2 Derivatización	21
3.4.3 Elección de columna.....	22
3.4.3.1 Comparación de la performance cromatográfica obtenida con la columna capilar HP-5 y la carbowax-20M.	22
3.4.3.2 Optimización de las condiciones cromatográficas en CG-MS empleando una columna capilar de carbowax-20M.....	25
3.4.3.3 Construcción de una columna capilar compatible con CG-MS.....	25
3.4.4 Optimización de las condiciones cromatográficas en CG-MS empleando la columna capilar construida.....	27
3.4.5 Evaluación de la columna construida	28

3.4.6	Alternativas en la derivatización	29
3.4.6.1	Comparación del rendimiento de derivatización empleando distintos alcoholes	29
3.4.6.2	Evaluación de un método alternativo de calentamiento	32
4.	Resultados y discusión	35
4.1	Elección de columna	36
4.1.1	Comparación de la performance obtenida con columnas HP-5 y Carbowax-20M en CG-FID	36
4.1.1	Optimización de las condiciones cromatográficas con columna capilar de Carbowax-20M	37
4.1.2	Optimización de las condiciones cromatográficas con columna capilar tipo HP-5 construida	42
4.1.3	Evaluación de la columna tipo HP-5 construida	47
4.2	Alternativas en la derivatización	50
4.2.1	Evaluación de la derivatización empleando distintos alcoholes	50
4.2.1.1	Derivatización con 1,1-dihidroperfluorobutanol	50
4.2.1.2	Derivatización con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro,2-propanol	52
4.2.2	Estudio de la derivatización asistida térmicamente en un horno de microondas	54
5.	Conclusiones	59
6.	Referencias	62

Introducción

2.1 Glufosinato, glifosato y ácido aminometilfosfónico en el medio ambiente

En la actualidad, el uso de herbicidas como parte del método conocido como “siembra directa” se ha impuesto por sobre los métodos clásicos de siembra ya que estos permiten abreviar etapas, y reducir costos. El crecimiento de hierbas junto con los cultivos, interfiere con esta modalidad de producción agrícola y repercute sobre sus rindes. Sin embargo, el tratamiento de las cosechas con plaguicidas químicos implica impacto muy importante sobre los ecosistemas y microecosistemas donde se aplican, pero además supone un riesgo de contaminación extensiva, al producto agrícola y su cadena de consumo, a los acuíferos, a las cuencas fluviales de drenaje natural y a sus destinos geográficos y biota. Debido al impacto ambiental de los pesticidas de uso agrícola, las regulaciones sobre la producción, transporte, uso y descarga de este tipo de sustancias se han incrementado de forma considerable, por lo que continua resultando esencial el desarrollo de métodos de análisis que permitan la determinación multiresidual a los niveles establecidos por la legislación [1]. Entre los herbicidas utilizados, glifosato y glufosinato son dos de los más importantes, los cuales son no selectivos para el control de gramíneas y malas hierbas con hojas de gran tamaño. Los herbicidas fosforados poseen estructuras químicas similares a la de los aminoácidos, e interfieren con la síntesis intracelular de los mismos en el interior de la planta [2,3]. En la naturaleza, el glifosato, el más utilizado de estos herbicidas, se descompone principalmente en ácido aminometilfosfónico (AMPA) por microorganismos en el suelo y por procesos metabólicos en las plantas [4] Por este motivo, AMPA forma parte junto con glifosato y glufosinato, del grupo de compuestos con los que se desarrolla este trabajo.

2.2 Técnicas para la determinación de glufosinato, glifosato y AMPA

Para la determinación de glifosato, glufosinato y AMPA se han utilizado distintas técnicas, entre las que se incluyen la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) [5] y electroforesis capilar (CE) [3,6]. La cromatografía de gases es la técnica de elección siempre que sea posible, debido a su alta selectividad, sensibilidad, robustez y bajo costo operativo [7]. Sin embargo, la baja volatilidad de las moléculas de glifosato, glufosinato y

AMPA hace necesario el uso de técnicas de derivatización. Estas consisten en modificar químicamente a las moléculas de analito a fin de convertirlas en especies químicas que puedan ser analizadas con el instrumento disponible. En este caso, para poder analizar estos compuestos por CG se deben modificar los grupos –OH y –NH para aumentar la volatilidad de estos compuestos. Como agentes derivatizantes se han utilizado ácido acético y trimetil ortoacetato (TMOA) [8,9], Isopropilcloroformiato y diazometano [2], N-metil-N-(tert-butilidimetilsilil)trifluoroacetamida [10,11]. Deyrup encontró que una mezcla de alcohol fluorado tal como trifluoroetanol (TFE) con un anhídrido perfluorado tal como anhídrido trifluoroacético (TFAA) era una manera posible de derivatizar Glifosato y su principal metabolito AMPA [12]. Stalikas [13] esta reacción para glifosato, AMPA y glufosinato utilizando condiciones anhidras, una relación de TFE-TFAA de 1:2 y calentamiento a 95 °C durante 30 minutos, lo cual extiende el tiempo total requerido para su análisis (ver Figura 1). En este trabajo se ensayarán varios alcoholes fluorados para optimizar la detectabilidad y la separación del glifosato, glufosinato y AMPA.

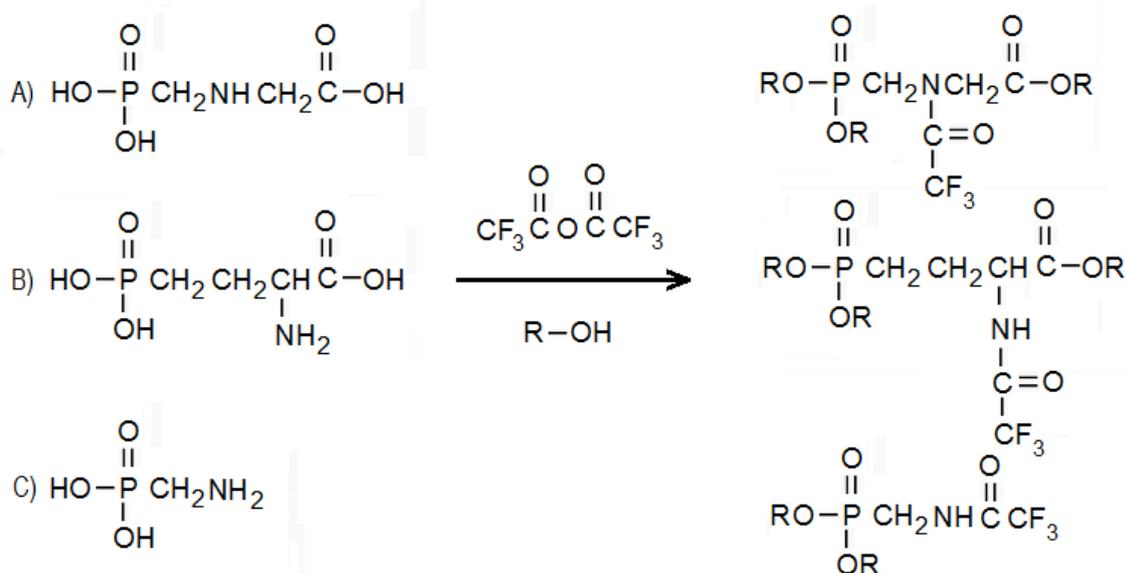


Figura 1. Reacción de derivatización utilizando anhídrido trifluoroacético y trifluoroetanol para A) Glifosato; B) Glufosinato C) AMPA

2.3 Cromatografía gas-líquido

2.3.1 Principios

La cromatografía gaseosa (CG) se ha convertido en la principal técnica para la separación y el análisis de compuestos volátiles. Con ella se han analizado gases, líquidos y sólidos, siendo estos últimos usualmente disueltos en solventes volátiles. Las virtudes de dicha técnica incluyen las elevadas eficiencias que se logran en la resolución de mezclas complejas, los tiempos cortos de análisis, la gran “sensibilidad” (detecta fácilmente concentraciones en el orden de las partes por millón o PPM y en ocasiones alcanza órdenes de $\sim 10^{-3}$ PPM que en inglés se conoce como parts per billion o PPB), el requerimiento de pequeñas cantidades de muestras y el bajo costo [14].

La cromatografía gas-líquido (CGL) es un método de separación en el cual los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: una estacionaria de constituida por un líquido inmovilizadas sobre un sólido inerte de gran superficie específica y un gas (fase móvil) que fluye a través de la columna. En este trabajo trabajaremos en CGL basado en columnas capilares. En la *Figura 2* se muestra un esquema de un típico CG. El primer paso del proceso de cromatografía de gases es suministrar uno o varios gases de alta pureza en el cromatógrafo de gases. El gas portador circulará de manera continua a través del inyector, columna y detector. Al introducir muestra en el inyector, ésta se calienta y se volatiliza. Los solutos vaporizados viajan con el gas portador y se introducen en la columna la cual se encuentra en un horno que permite controlar la temperatura. Los distintos componentes de la muestra quedan sometidos a una serie de procesos de partición continuos entre el gas portador que fluye y la fase estacionaria, el cual depende de sus solubilidades a la temperatura dada. Los analitos se separan entre sí en base a sus presiones de vapor y sus afinidades relativas por la fase estacionaria: aquellos solutos que sean menos afines a la fase estacionaria (FE) estarán mayormente en la fase móvil (FM) y en promedio viajarán más rápido a través de la columna que aquellos que se otros más afines a la FE; entonces los solutos eluirán en orden de coeficiente de distribución creciente, K [15]. Éste se define como:

$$K = \frac{k' \cdot V_m}{V_s} \quad (1)$$

$$\frac{V_m}{V_s} = \beta \quad (2)$$

donde β es la relación de fases o cociente entre el volumen de la fase móvil (V_m) y el volumen de la fase estacionaria (V_s) y k' es el coeficiente de retención que viene dado por las ecuaciones 3 y 4:

$$k' = \frac{\text{tiempo de permanencia del soluto en la fase móvil}}{\text{tiempo de permanencia del soluto en la fase estacionaria}} \quad (3)$$

$$k' = \frac{t_r - t_M}{t_M} = \frac{V_r - V_M}{V_M} \quad (4)$$

donde t_M : tiempo muerto o el tiempo requerido para que una especie no retenida viaje con la fase móvil desde el inyector hasta el detector.

V_M : volumen muerto o volumen de fase móvil que se requiere para eluir una especie no retenida o, lo que es equivalente, el volumen de fase móvil que circula en un tiempo t_M .

t_r : tiempo de retención o el tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el componente alcanza el detector.

V_r : volumen de retención o volumen de fase móvil que se requiere para eluir un soluto de la columna cromatográfica o, lo que es equivalente, el volumen de fase móvil que circula en un tiempo t_r .

A medida que los solutos van eluyendo, se introducen en el detector, y allí generan una señal eléctrica proporcional a la cantidad (o a la concentración) de analito. La señal eléctrica se va registrando de manera continua y se representa gráficamente en función del tiempo transcurrido desde el momento de la inyección para generar un cromatograma.

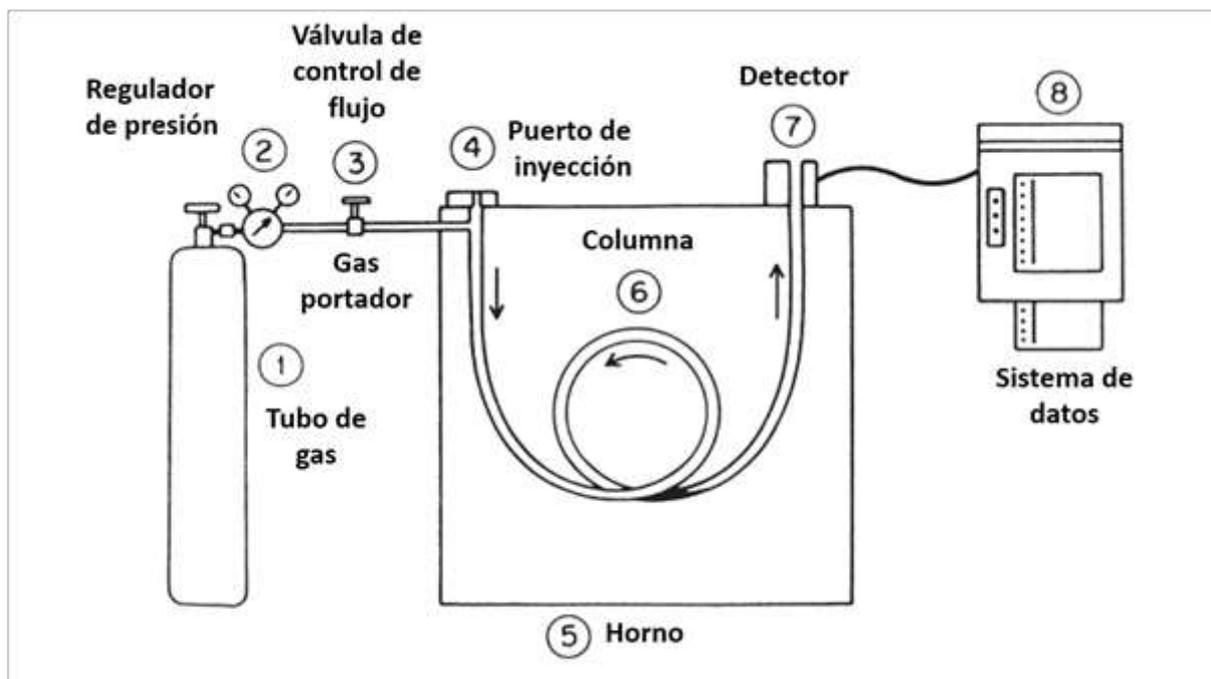


Figura 2: Diagrama de un típico cromatógrafo gaseoso.

2.3.2 Detectores

En el presente trabajo se hizo uso de un CG con detector de ionización de llama (FID por sus siglas en inglés) y un CG acoplado a un espectrómetro de masas (MS).

2.3.2.1 Detector FID

El FID es el detector más utilizado en CG. En éste el gas que eluye de la columna se quema en una pequeña llama de hidrógeno y oxígeno. Las combustiones generan cantidades de iones que dependen de la naturaleza de las moléculas que reaccionan. Entonces, aplicando una diferencia de potencial entre el pico donde sale la mezcla de gases (jet) y un anillo que se coloca por encima de la llama se colectan estos iones generando una cantidad de corriente. Cuando se “quema” solo hidrógeno el caudal de iones y la corriente es una determinada, y cuando se “quema” hidrógeno y analitos la cantidad de iones generados es mayor. Esta corriente constituye la señal continua, que se adquiere y se grafica en función del tiempo para obtener el correspondiente cromatograma. Un diseño típico de FID se muestra en la *Figura 3*. El electrodo colector está polarizado alrededor de +300 V con relación a la punta de la llama y la corriente recogida es ampliada por un circuito de alta impedancia. Dado que en el proceso de combustión se produce agua, el detector debe ser calentado a temperaturas de al menos 125 ° C para

evitar la condensación de ésta. Además, se debe evitar que se depositen especies de alto punto de ebullición, por lo cual, en la mayoría de los FID se utilizan a temperaturas de 250 °C o más.

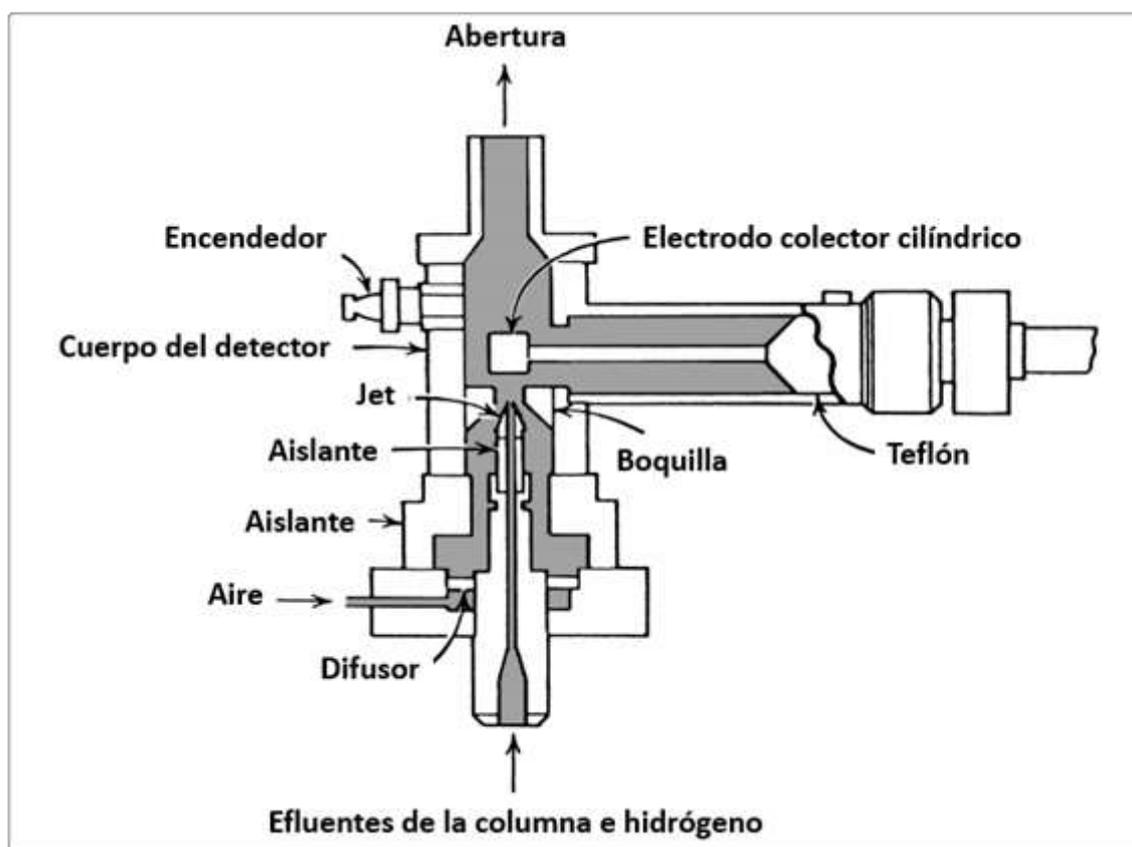


Figura 3. Esquema de un FID

El FID responde a cualquier compuesto que arda en la flama de hidrógeno y oxígeno, lo que lo convierte en un detector universal. La señal es aproximadamente proporcional al contenido de carbono, dando lugar a la llamada regla de igualdad por carbono, un factor de respuesta constante que puede deberse a la conversión de cada átomo de carbono en una carga durante el proceso de combustión en el FID [16]. Por lo tanto, todos los hidrocarburos deben presentar la misma respuesta por átomo de carbono. Sin embargo, cuando hay heteroátomos tales como oxígeno o nitrógeno, el factor disminuye. Los compuestos que no contienen carbono orgánico no son detectados.

Como ventajas presenta buena sensibilidad, un amplio intervalo lineal, extremada simplicidad, robustez y adaptabilidad a todo tipo de columna [14].



Figura 5. Fotografía del CG-MS Shimadzu QP Ultra empleado en el presente trabajo.

En la ionización por impacto electrónico (EI) los electrones se emiten a partir de un filamento caliente (generalmente de tungsteno) y se aceleran a través de la fuente mediante el uso de un potencial apropiado (5-100 V) para lograr la energía de electrones requerida (suficiente para ionizar la molécula). El analito se introduce en la fuente de iones del espectrómetro de masas, donde es impactado por el haz de electrones ionizantes que conduce a la formación de un radical catión de analito (Figura 6)



Figura 6. Ionización por impacto electrónico

Este proceso es una forma de ionización fuerte y, como consecuencia, la molécula madre se deshace frecuentemente produciendo una variedad de fragmentos con una cantidad relativamente pequeña del ión precursor que queda. En algunas circunstancias, si la molécula es suficientemente lábil, no se observará ningún ion precursor en el espectro resultante. El grado de fragmentación depende de la magnitud del primer potencial de ionización de la molécula de analito, de la energía de los electrones impactantes, de la capacidad de los iones para estabilizar una carga y de su área de sección transversal de ionización.

Generalmente se utiliza energía electrónica de 70 electrón-voltios (eV), que como se mencionó anteriormente, crea cationes altamente energéticos que tienden a fragmentarse ampliamente para producir espectros detallados y reproducibles que son útiles para la búsqueda de bibliotecas y la interpretación espectral para elucidar la estructura del analito. Todas las moléculas de fase gaseosa que son impactadas por un ionizador se ionizarán mediante la eliminación de un solo electrón para formar un catión radical de alta energía.

Los iones formados en la cámara de ionización se extraen de ésta por medio de una serie de electrodos, que permiten colimar (enfocar) y acelerar el haz iónico, y dirigirlo a un analizador de masas. La función del analizador es separar los iones de acuerdo con su relación m/z . Existen varios tipos de analizadores de masas que se usan en los equipos GC-MS. Entre los más frecuentes figuran cuadrupolo (Q) y trampa de iones (IT, Ion Trap, por sus siglas en inglés); también, hoy en día, es frecuente el uso de los analizadores de tiempo de vuelo (TOF, Time-of-Flight, por sus siglas en inglés) y, últimamente, los analizadores de resonancia ion-ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR, Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés); sin embargo, el uso de analizadores de masas de deflexión magnética como detectores GC es mucho menos frecuente [17–20]

El cuadrupolo es uno de los más ampliamente utilizados, en éste, los iones, provenientes de la cámara de ionización ingresan al espacio entre las cuatro barras metálicas que conforman el cuadrupolo, donde los iones de diferentes masas (m/z) se separan con la ayuda del campo eléctrico aplicado, en un espacio confinado por cuatro barras metálicas paralelas, a las cuales se aplican las corrientes directa (DC) y alterna (radiofrecuencia, RF). Mientras atraviesan el campo eléctrico (combinación de corrientes directa y alterna), entre las barras, los iones en un espacio tridimensional, a lo largo de un eje central, adquieren una trayectoria oscilatoria muy compleja. Debido a que cada ion posee la frecuencia propia que depende de su masa, solo aquellos iones cuya frecuencia es resonante (coincidente) con la del cuadrupolo, podrán atravesarlo, ya que en este caso no experimentarán la deflexión por el campo. Esto sucede únicamente bajo una combinación determinada de valores de potenciales fijo (U) y alterno (V) y la frecuencia (ω) de RF. Cuando los iones con la masa específica (m/z) entran “en resonancia” (iones

resonantes) alcanzan a conservar su trayectoria estable (recta, sin deflexión) y a cruzar el espacio cuadrupolar sin sucumbir, por choques, con las barras metálicas. Al salir del analizador, la corriente eléctrica (corriente iónica parcial) de estos iones se mide, por lo general, en un electromultiplicador. Ésta, después de amplificada y digitalizada, se convierte en una señal gráfica, i.e., en la intensidad o abundancia del ion-fragmento en un espectro de masas.

En el modo de exploración completa (TIC, Total Ion Chromatography, por sus siglas en inglés) se monitorizará una serie de masas conocidas como relación masa/carga (m/z). La determinación de qué rango de dependerá de lo que se pueda anticipar que esté presente en la muestra. No se debe establecer una exploración con una relación m/z demasiado bajos ya que se puede detectar aire (encontrado como m/z 28 debido al nitrógeno), dióxido de carbono (m/z 44) u otra posible interferencia. Además, si se utiliza un rango de exploración grande, la sensibilidad del instrumento disminuye debido a que realiza menos exploraciones por segundo, ya que cada exploración tendrá que detectar una amplia gama de fragmentos de masa. El TIC es útil para determinar compuestos desconocidos en una muestra.

El otro modo es el de monitorización de iones seleccionada (SIM por sus siglas en inglés) en el cual se introducen ciertos fragmentos de iones en el método del instrumento y sólo esos fragmentos son detectados por el espectrómetro de masas. Las ventajas de este modo son que el límite de detección es menor puesto que el instrumento sólo está mirando un pequeño número de fragmentos (por ejemplo, tres fragmentos) durante cada exploración. Se pueden realizar más escaneos cada segundo. Dado que sólo unos pocos fragmentos de masa de interés están siendo monitoreados, las interferencias de la matriz son típicamente más bajas. Para confirmar adicionalmente la probabilidad de un resultado potencialmente positivo, es relativamente importante asegurarse de que las proporciones de iones de los diversos fragmentos de masa son comparables a un estándar de referencia conocido.

La ventaja que presenta el TIC es que proporciona más información que SIM cuando se trata de confirmar o resolver compuestos en una muestra. Durante el desarrollo del método de instrumento puede ser común analizar primero las soluciones de prueba en

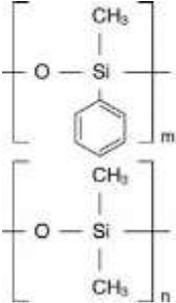
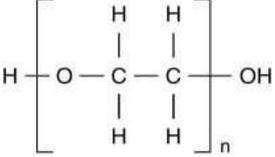
modo de exploración completa para determinar el tiempo de retención y el espectro de masa del compuesto antes de pasar a un método de instrumento SIM.

2.3.3 Fases estacionarias

Una fase estacionaria ideal para CGL (normalmente y en adelante CG) debe generar una interacción diferencial o selectiva con los componentes a separar. Debe ser térmica y químicamente estable. Su punto de fusión debe ser menor que la temperatura ambiente, para que permanezca en estado líquido y no se produzca transición de fase y modificación de la superficie cada vez que se calienta y enfría la columna. La presión de vapor de la fase estacionaria a la máxima temperatura de trabajo debe ser pequeña (menor a 0.1 torr) para que esta no se pierda reduciéndose la vida útil de la misma, pero además para que este “sangrado” no genere una señal de fondo importante en el detector, lo cual implica un mayor ruido de fondo y una pérdida de “sensibilidad” en relación al límite de detección [21].

La FE se selecciona tal que posea una polaridad similar a la de los solutos, pero se debe tener en cuenta que las fases polares suelen exhibir menores eficiencias y temperaturas máximas de operación más bajas mientras que las FE no polares que en su mayoría son en base a siliconas o más propiamente polisiloxanos, son en general más robustas: resisten trazas de oxígeno y agua en el gas portador y por tanto son más resistentes a la oxidación e hidrólisis, son más inertes, y presentan menos sangrado. Por este motivo, se prefiere emplear la columna menos polar que provea la separación buscada. Los polisiloxanos son muy utilizados porque poseen excelente estabilidad química y térmica, altas difusividades de solutos, y un amplio rango de polaridades según los grupos funcionales que se incorporen [21]. Las fases estacionarias empleadas en el presente trabajo se describen en la Tabla 1 [22]:

Tabla 1: Características de las fases estacionarias HP5 y Carbowax.

Nombre comercial	Composición y estructura	Polaridad	Intervalo de temperatura (°C)	Aplicaciones
<p>HP5</p>	<p>- fenilo al 5% - dimetilpolisiloxano al 95%</p> 	<p>No polar</p>	<p>-60 a 340/350</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Compuestos semi-volátiles •Alcaloides •Fármacos •Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) •Compuestos halogenados •Pesticidas y herbicidas
<p>HP-20 (Carbowax 20M)</p>	<p>- polietilenglicol</p> 	<p>Polar</p>	<p>40 a 250/260</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Alcoholes •Ácidos orgánicos libres •Disolventes •Aceites esenciales •Aromas y fragancias

Experimental

3.1 Materiales

- Columna capilar Hewlett Packard HP-5, L= 30 m, $d_f= 0.25 \mu\text{m}$, $i_d= 0.32\text{mm}$
- Columna capilar Hewlett Packard HP-20, L= 30 m, $d_f= 0.25 \mu\text{m}$, $i_d= 0.25\text{mm}$
- Capilar de sílice de alta pureza
- Fase estacionaria SE-54 Wilkens (5% fenilo, 95% dimetilpolisiloxano)
- Micro jeringa Agilent con punta biselada para inyección en CG de 10 μL
- Matraces de 25.00 y 10.00 mL
- Pipetas automáticas de 2-1000 μL
- Viales de vidrio Agilent silanizados con tapa crimp de 2 mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL (de polipropileno)
- Frascos de vidrio de 15 cm^3

3.2 Equipos

- GC-FID HP-6890 conectado a un adquisidor de señal operando mediante el programa Data apex
- GC-MS Shimadzu QP 2010 Ultra
- Horno de GC modificado empleado en las derivatizaciones y en la construcción de columnas capilares.
- Estufa de vacío
- Horno de microondas CEM Mars X
- Balanza analítica
- Sonicador ultrasónico
- Vortex-Genie2
- Purificador de agua MilliQ

3.3 Reactivos

- Glifosato 95.1%
- Glufosinato de amonio 97%
- Ácido aminometil fosfónico 99%
- Anhídrido trifluoroacético

- Alcoholes: trifluoroetanol; 1,1-dihidroperfluorobutanol; 1,1,1,3,3,3-hexafluor,2-propanol.
- Solventes: metanol, isopropanol, acetona, acetato de etilo, diclorometano
- Caracterización de columnas capilares: 1-octanol, 2,4-pentanodiol, 2-propanona, ácido 2-etilhexanoico, piridina, benceno, tolueno.

3.4 Métodos

3.4.1 Preparación de los patrones

La derivatización con TFAA y TFE requiere condiciones anhidras para obtener grandes rendimientos. Debido a que la cantidad de patrones a pesar es muy pequeña, se partió de una solución patrón de 100 mg/L conteniendo glifosato, glufosinato de amonio y AMPA en agua ultrapura, la cual fue conservada en recipientes de plástico debido a que se ha encontrado que estos analitos se adsorben sobre el vidrio [13]. Se tomaron volúmenes de la misma y se llevaron a sequedad en un horno de vacío a 60 °C durante una hora. Para la derivatización con alcoholes y anhídrido trifluoroacético, utilizando el horno convencional, se emplearon viales de vidrio silanizados, mientras que en el caso del método de derivatización empleando el horno microondas, se utilizaron tubos Eppendorf.

3.4.2 Derivatización

Cada derivatización se realizó agregando a cada vial de vidrio silanizado conteniendo los 3 analitos preparados según 3.4.1.: 60 µL de TFAA y 30 µL de TFE. Posteriormente se tapó, se sonicó durante 5 minutos, para luego ser introducido en un horno a 95 °C durante 30 minutos. Una vez enfriado cada vial, se lo destapa y se evapora el solvente y se seca haciendo circular corriente nitrógeno durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agrega un volumen medido de acetato de etilo puro con la cantidad requerida de estándar interno. Para redissolver los derivados, se tapó y se sonicó durante 5 minutos y se reservó para inyectar en CG.

3.4.3 Elección de columna

3.4.3.1 Comparación de la performance cromatográfica obtenida con la columna capilar HP-5 y la carbowax-20M.

Al inicio del presente trabajo no se contaba con los analitos AMPA y glufosinato, por lo cual el estudio para la evaluación de una columna alternativa se realizó empleando solamente el principal analito del estudio: glifosato. Para ello se compararon las eficiencias y las simetrías de pico obtenidos cuando se analiza empleando 0.0005 g de glifosato derivatizado con 200 μ L de TFAA y 100 μ L de TFE en el CG-FID, tanto con columna HP5 (30 m x 0.25 μ m x 0.32mm) como con HP-20 (30 m x 0.25 μ m x 0.25mm) en idénticas condiciones cromatográficas.

La identificación de los picos se realizó inyectando soluciones con concentraciones crecientes de glifosato derivatizado con una mezcla de 60 μ L de TFA y 30 μ L de TFE contrastando con un blanco de reactivos.

La eficiencia, se trató en término de número de platos (N) por metro, donde N puede calcularse a partir de la ecuación 5, suponiendo que los picos presentan una forma gaussiana.

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w_b}\right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{0,5}}\right)^2 \quad (5)$$

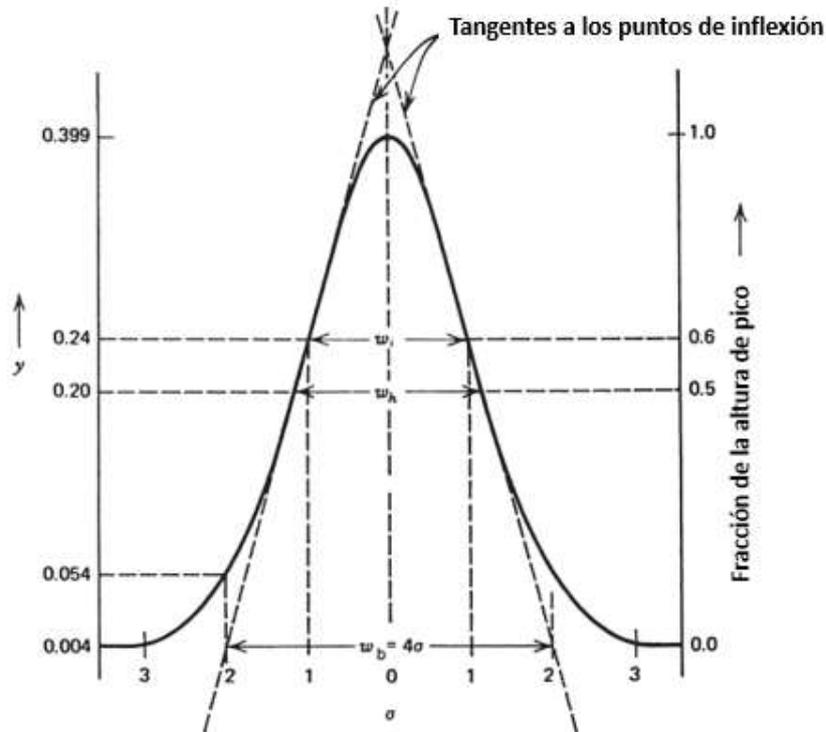


Figura 7. Una distribución normal. El punto de inflexión se produce a 0.607 de la altura del pico, donde $w_i = 2 \sigma$. La cantidad w_h es el ancho a 0.500 de la altura del pico (altura media) y corresponde a 2.354σ . La cantidad w_b es el ancho de la base y corresponde a 4σ como se indica.

La Figura 7 muestra las mediciones necesarias para realizar este cálculo. Diferentes expresiones dadas surgen porque el cálculo de σ puede hacerse en función del ancho de pico medido a diferentes alturas. En la base del pico se considera que su ancho, w_b es 4σ , por lo que la relación numérica es 16, a media altura, w_h o $w_{0.5}$ el ancho es $2,354 \sigma$ y la relación es 5,54. Independientemente de los símbolos utilizados, tanto el numerador como el denominador deben darse en las mismas unidades, y, por lo tanto, N es formalmente adimensional e informalmente su unidad sería “platos teóricos”. Típicamente, tanto el tiempo de retención como la anchura del pico se miden como tiempos en cromatograma. Alternativamente, ambos podrían estar en unidades de volumen o unidades de tiempo. Independientemente de la forma en que se haga el cálculo un valor grande de N indica una columna eficiente, lo cual es altamente deseable.

Según la teoría de Martin y Synge que describe el proceso cromatográfico, los picos presentan idealmente perfiles gaussianos perfectamente simétricos alrededor de la media. En la práctica, siempre existe un grado de asimetría. La asimetría de los picos en

cromatografía puede tener varios orígenes, entre los cuales están la entalpía del fenómeno de retención de los analitos, la existencia de un número insuficiente de sitios muy retentivos en el soporte o en la fase estacionaria tal como silanoles, o isothermas de adsorción no lineales para el sistema [15]. Es decir, la presencia de picos no simétricos indican que algún tipo de interacción no deseable tiene lugar durante el proceso cromatográfico. Los picos asimétricos pueden clasificarse como coleados o fronteados, dependiendo de la ubicación de la asimetría (ver Figura 9). Se define el factor de asimetría (TF por sus siglas en inglés) como:

$$TF = \frac{a}{b} \quad (6)$$

donde tanto a como b se miden al 10% de la altura del pico como se muestra en la Figura 8. Visto desde la ecuación 6, un pico con coleo tendrá un TF mayor que uno y un pico con frenteo tendrá un TF menor que uno. Un pico tipo doblete, como el pico “e” en la Figura 9 puede representar un par de solutos que no están adecuadamente separados; cuando éste no es el caso puede atribuirse el fenómeno a un procedimiento de inyección defectuoso, a una sobrecarga de columna por volumen excesivo, a columnas degradadas o contaminadas que presenten zonas alternativas de retención, etc [14].

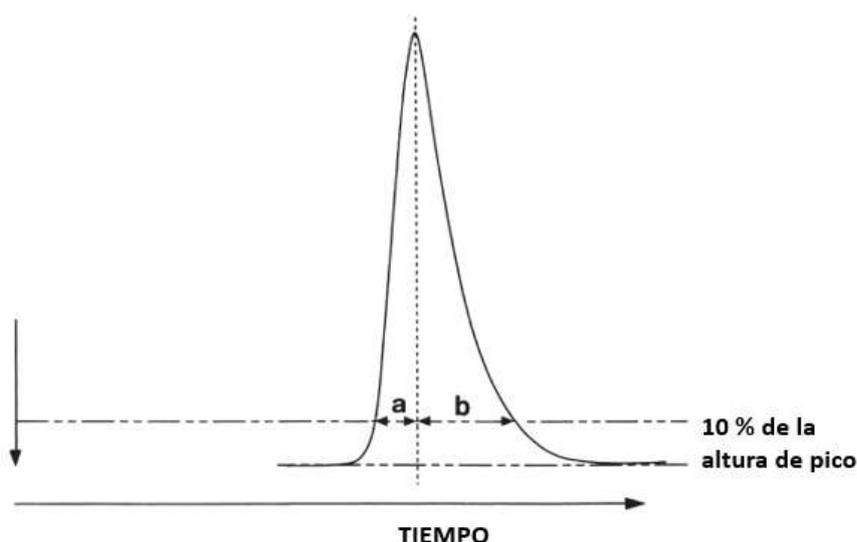


Figura 8. Figura empleada para definir el factor de asimetría o “tailing factor”.

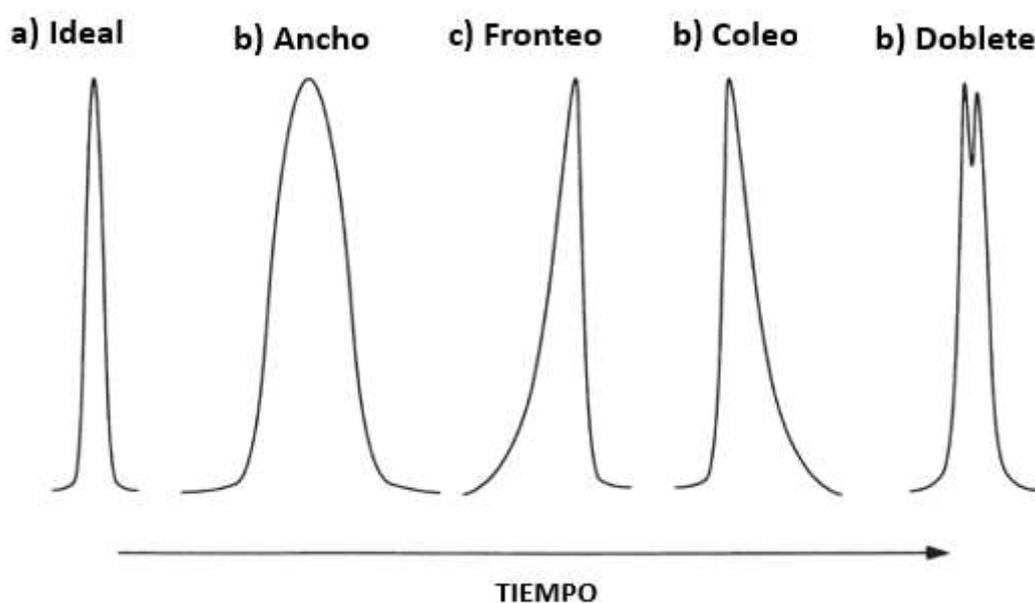


Figura 9. Formas de los picos: (a) ideal, (b) ancho, (c) fronteo, (d) coleo y (d) doblete.

3.4.3.2 Optimización de las condiciones cromatográficas en CG-MS empleando una columna capilar de carbowax-20M.

En esta etapa del trabajo se contaba con AMPA y glufosinato de amonio, por lo cual se procedió a buscar condiciones cromatográficas que proveyeran una buena separación de los analitos en un tiempo de análisis mínimo. Para ello se probaron distintos programas de temperatura con detección en modo TIC a fin de poder identificar los analitos según sus espectros de masas. Una vez optimizada la separación, se establece el método de detección SIM programada en el tiempo.

3.4.3.3 Construcción de una columna capilar compatible con CG-MS

En los sistemas GC-MS no es posible aprovechar al máximo la eficiencia de la columna disminuyendo el caudal hasta valores cercanos al óptimo de Van Deemter ya que la cámara de vacío del espectrómetro de masas produce succión lo cual limita la presión mínima que se puede utilizar. La columna HP-5 que disponíamos en nuestro laboratorio es de diámetro interno de 320 μm , motivo por el cual se optó por la construcción de una columna capilar con la misma fase estacionaria pero en capilar de 250 μm .

Las columnas capilares pueden recubrirse con la fase estacionaria deseada mediante dos métodos: estático o dinámico [23–25]. Éste último consiste en introducir un volumen

discreto de solución de dicha fase estacionaria en un solvente volátil que es empujado a lo largo de la columna por un gas inerte, como nitrógeno, cubriendo las paredes con una capa de solución, y finalmente la solución que mojó las paredes del capilar es evaporado utilizando una corriente de gas para dejar depositada la película de fase estacionaria líquida depositada. Este método tiene la ventaja de ser rápido, pero no permite conocer el espesor de film de la fase estacionaria depositada.

Por otro lado, el método estático permite conocer la relación de fases y el espesor depositado con exactitud, lo que constituye una gran ventaja y, por lo tanto, éste es el método escogido. En este método, la columna se llena con solución de fase estacionaria a concentración conocida preparada en un solvente volátil, se sella uno de los extremos y se evapora el solvente calentando hasta una temperatura cercana a su temperatura de ebullición. La evaporación de los primeros centímetros produce concentración de fase estacionaria hasta generar sobresaturación y precipitación o depósito sobre las paredes. Esa zona sobresaturada avanza a lo largo de la columna sin acumular más ni perder, por lo tanto excepto los primeros centímetros, en el resto de la columna se va depositando en las paredes la misma cantidad contenida en el lumen del capilar, lo cual constituye el fundamento del cálculo del espesor de film y la relación de fases.

La relación de fases puede hallarse a cualquier temperatura mediante la ecuación 7:

$$\beta(T) = \frac{\rho_L(T)}{C_0} \cdot e^{[\alpha_{Si} \cdot (T - T_0)] - 1} \quad (7)$$

Aquí α_{Si} es el coeficiente de expansión térmico de la sílice y puede considerarse aproximadamente invariante con la temperatura, $\alpha_{Si} = 1.96 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$; $\rho_L(T)$ es la densidad de la fase estacionaria a la temperatura en cuestión; y C_0 es la concentración de la solución empleada para llenar el capilar a la temperatura T_0 (temperatura ambiente).

Se pueden estimar valores muy precisos de β si las densidades se conocen con exactitud y se extreman los cuidados en la preparación de la solución. Esto requiere de mediciones muy rigurosas de densidad de la fase estacionaria empleada a las temperaturas cromatográficas.

El espesor de la película depositada se calcula con la ecuación 8:

$$d_f = d_c / [4 \cdot (\beta + 1)] \quad (8)$$

donde d_c y d_f representan el diámetro interno capilar y el espesor de la película depositada, respectivamente, y β es la relación de fases. Estas ecuaciones fueron desarrolladas

por González [26].

El procedimiento se inició preparando 10.00 mL de una solución de la fase estacionaria SE-54 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) de $C_{FE} = 3.2 \times 10^{-3}$ g /ml de diclorometano. Bajo la suposición de que ρ_L vale aproximadamente 1, $\beta \approx (\rho_L / C_{FE}) - 1 = 311.5$, el espesor de film que se esperaba obtener es de 0,2 μm .

Esta solución se introdujo en un capilar de 27 m de largo y 250 μm de la forma que se explicó antes y luego de rebalsarlo y sellar un extremo, comenzó a ingresar en un equipo de CG modificado con un rotor conectado a una polea en el interior del horno, a la cual se fija la columna y la hace ingresar lentamente. El horno se configuró a una temperatura de 60 °C para que la evaporación del diclorometano sea suficientemente lenta como para evitar la formación y colapso de burbujas que produjeran expulsiones locales de la solución y un depósito irregular de la fase, que arrojaría un cubrimiento heterogéneo y baja eficiencia de la columna [27]. Luego de la evaporación del solvente se eliminó una porción de cada extremo de la columna y se aplicaron calentamientos adicionales en rampas de temperatura hasta alcanzar los 270 °C, para acondicionar la columna y eliminar reactivos en exceso y contaminantes.

El programa de calentamiento consistió en un acondicionamiento durante 5 minutos a 50 °C, luego una rampa de aumento de 5 °C/ minuto hasta alcanzar los 120 °C, y esta temperatura permaneció fija durante 360 minutos. Finalmente se la calentó a una temperatura de 270 °C (la máxima temperatura a usar en los métodos cromatográficos en el CG-MS).

3.4.4 Optimización de las condiciones cromatográficas en CG-MS empleando la columna capilar construida.

Se inició el experimento empleando condiciones cromatográficas y detección TIC utilizando como referencia las condiciones reportadas por Borjesson [28]. Se tuvo la precaución de no utilizar lana de vidrio en el inserto para evitar la adsorción de los analitos. Se inyectaron 3.8 μL de solución con los analitos, que corresponde a 2 mg/L de glifosato, glufosinato y AMPA, empleando el programa de temperatura 70 °C durante 2 minutos y una rampa de 30 °C/minuto hasta 270 °C y en base a los tiempos de retención obtenidos, se configuró un método de detección SIM programado en el tiempo.

Posteriormente se realizó un análisis cromatográfico sin inyección, empleando el mismo programa de temperatura y el modo SIM programado en el tiempo, a fin de comprobar ausencia de picos fantasmas.

Finalmente se inyectó una mezcla de hidrocarburos en el modo aguja mojada (AM) y con split, y se seleccionó uno de ellos como estándar interno (IS por sus siglas en inglés) para corregir la variabilidad debido a la inyección manual. Se preparó una solución del mismo a concentración conocida en acetato de etilo, que es el solvente en que se redisolventarán los analitos luego haber evaporado el exceso de reactivos al final de cada derivatización.

3.4.5 Evaluación de la columna construida

Uno de los factores que se estudia al momento de evaluar una columna es la presencia de sitios de adsorción con distinta afinidad, por fallas en el recubrimiento o inadecuada desactivación, que para capilares de sílice fundida se adjudica a los grupos silanoles (libres, geminales, o vecinales) o menos frecuentemente a iones metálicos en la superficie capilar de sílice, por ejemplo Fe^{+3} y Al^{+3} , que son ácidos de Lewis (electrófilos) y adsorben bases de Lewis (donores de electrones) como cetonas y aminas, y especies con electrones π .

Para caracterizar la presencia de estos sitios se utilizan mezclas de compuestos en donde estos fenómenos son muy exacerbados y evidencian claramente los efectos que producen asimetrías y pérdidas de eficiencia, a la vez que se incluyen otros que, por el contrario, no presentan estos fenómenos y permiten medir la eficiencia máxima. Estas “mezclas para test de columna” son utilizadas tanto por fabricantes de columnas comerciales como por los laboratorios para evaluar las características de una columna nueva o bien para estudiar su situación o degradación por el uso. Existen diferentes tipos de pruebas, algunas generales y otras específicas para determinado tipo de columnas.

Los componentes de la mezcla que se describen a continuación permiten evidenciar la presencia o no de sitios de adsorción a partir de la observación del pico: la adsorción puede evidenciarse por la presencia de picos ensanchados de forma gaussiana, picos con asimetría de área aproximadamente correcta, picos simétricos con áreas reducidas, o por picos asimétricos de área correcta con tiempos de retención incrementados [25]:

- Alcoholes: Si solamente interaccionan con la fase estacionaria, sus picos deberían ser simétricos. De otra manera, son indicadores de actividad por silanoles u otros grupos capaces de interaccionar mediante puentes de hidrógeno. Los dioles son aún más sensibles, especialmente para la actividad producida por silanoles.

- Ácidos y bases: Miden las características de la actividad de acuerdo al pH (nucleofílicas, electrofílicas). También son indicadores de fenómenos de adsorción.

Las sustancias utilizadas en este trabajo se listan a continuación, junto con la función que cumplen:

Tabla 2. *Sustancias empleadas para la caracterización de la columna.*

Grupo	Sustancia	Evaluación
Cetonas	2-pentanona	Actividad asociada con ácidos de Lewis
Alcoholes	1-octanol	Silanoles, puentes de hidrógeno
Dioles	2,4-pentanodiol	Silanoles, más sensible
Ácidos	Ácido 2-etilhexanoico	Adsorción irreversible
Aromáticos	Benceno	Carácter ácido-base
	Tolueno	
	piridina	

Las sustancias de prueba se inyectaron en el modo aguja mojada (AM) y split, en condiciones isotérmicas y con detección TIC.

3.4.6 Alternativas en la derivatización

3.4.6.1 Comparación del rendimiento de derivatización empleando distintos alcoholes

Se probó derivatizar glifosato, AMPA y glufosinato de la misma forma que antes pero empleando los alcoholes 1,1-dihidroperfluorobutanol (DHPFB) y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro,2-propanol (HF2P) en lugar de TFE.

Dichas reacciones se esperaba que procedan de la siguiente forma:

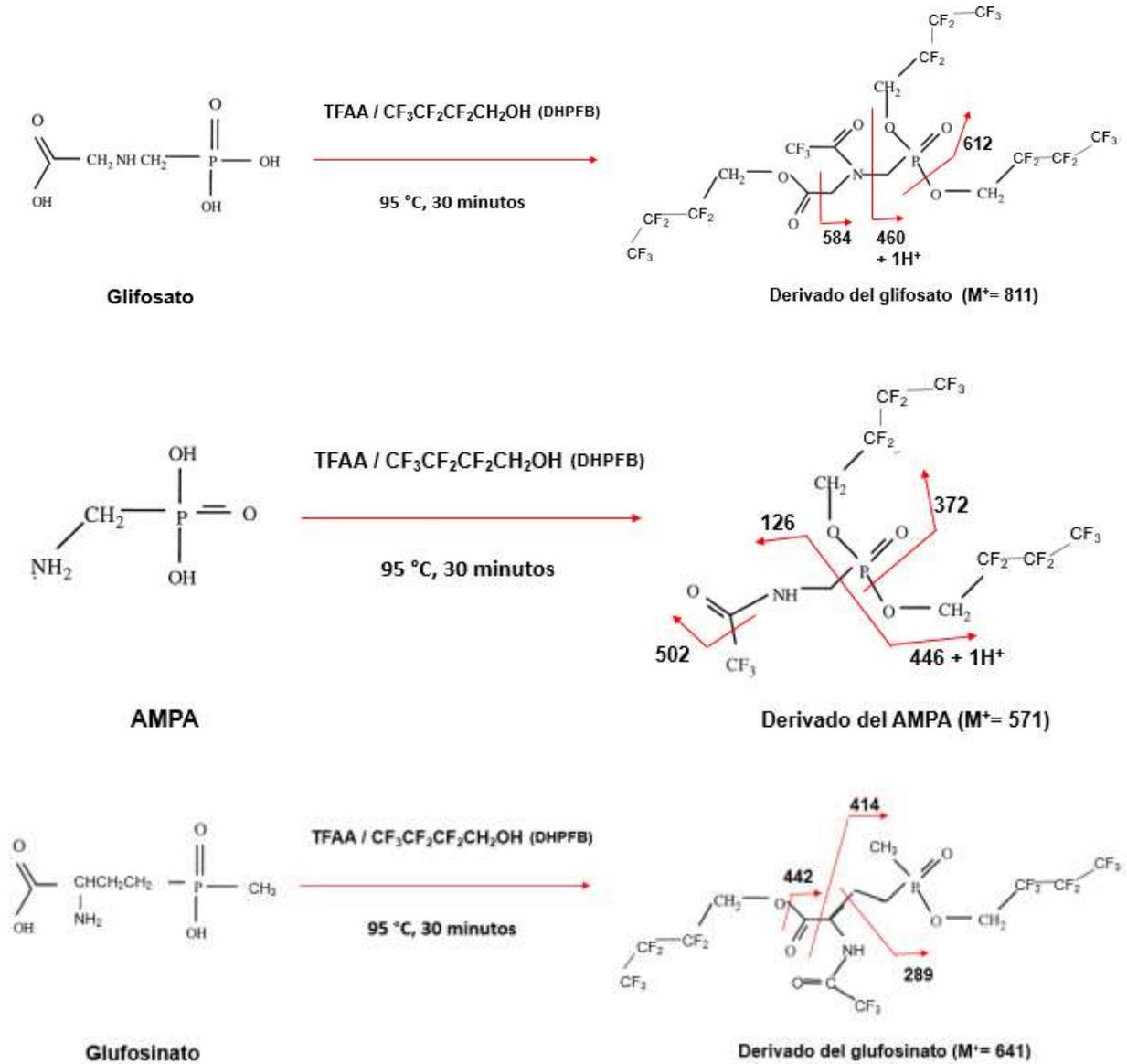


Figura 10: Derivatización de glifosato, AMPA y glufosinato con TFAA y 1,1-dihidroperefluorobutanol.

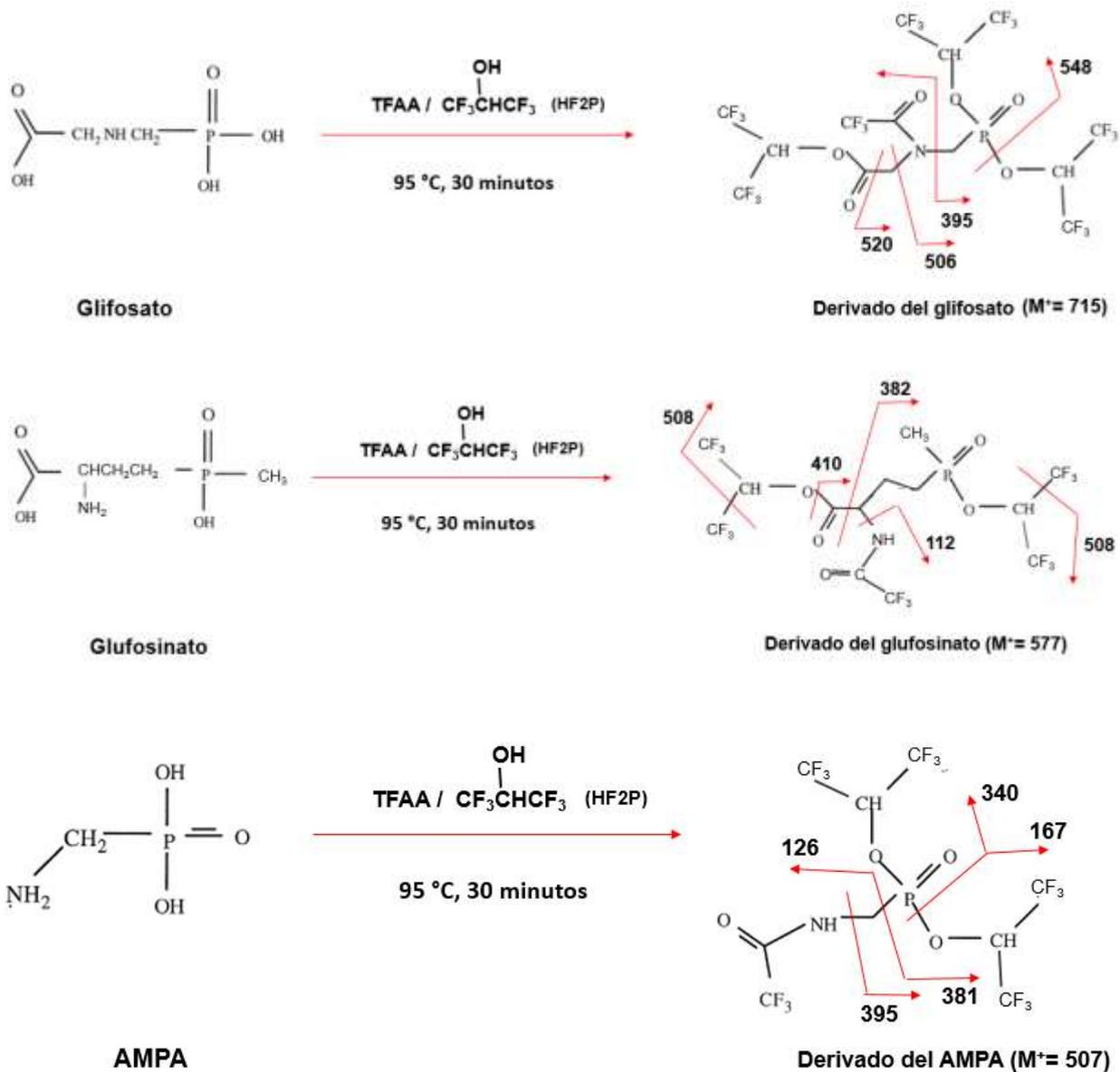


Figura 11. Derivatización de glifosato, AMPA y glufosinato con TFAA y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro,2-propanol.

En base a la estructura de cada analito derivatizado con cada uno de los alcoholes, puede proponerse que los posibles fragmentos cuya señal se debe encontrar en sus espectros de masas, los cuales se describen en la Tabla 3:

Tabla 3. Fragmentos propuestos para los derivados de glifosato, AMPA y glufosinato con TFAA y los alcoholes propuestos.

Derivatización	AMPA	Glifosato	Glufosinato
TFAA y 1,1-dihidroperfluorobutanol	126(BP),372, 446, 502, 571(M ⁺)	460, 584, 612, 811(M ⁺)	289, 414, 442, 641(M ⁺)
TFAA y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro, 2-propanol	126, 167, 312, 381, 507(M ⁺)	209, 506, 520, 715(M ⁺)	112, 382, 410, 508, 577(M ⁺)

Las soluciones se analizaron en el CG-MS con detección TIC, para poder identificar a los compuestos de interés a partir de coincidencias entre los espectros de masas y los fragmentos propuestos.

Una vez que se determinó el tiempo de retención de cada analito se configuró un método de detección SIM programado en el tiempo, se volvieron a analizar las soluciones y se calculó el cociente entre la altura de cada analito y la altura del estándar interno. Los valores obtenidos se compararon con aquellos correspondientes a la derivatización con TFAA y TFE.

3.4.6.2 Evaluación de un método alternativo de calentamiento

Se evaluó la posibilidad de derivatizar los analitos con TFAA y TFE con el mismo procedimiento anterior pero llevando a cabo la reacción dentro de un horno de microondas, con el fin de disminuir el tiempo de derivatización.

Inicialmente se probó derivatizar dentro de un vial con tapa a rosca de teflón. Se ajustó la potencia en 992 W y el tiempo en 1.5 minutos. Luego de evaporar y resuspender se obtuvo una solución correspondiente a 10 mg/L de los analitos. Se realizó un análisis de dicha solución por CG-MS con detección SIM programada en el tiempo y con el método cromatográfico optimizado. Luego se realizó una corrida con detección TIC para corroborar mediante los espectros de masas que los picos obtenidos con detección SIM corresponden a los analitos.

En otro experimento se derivatizó durante 8 minutos a distintas potencias (504 W, 552 W, 600 W, 664 W, 720 W y 800 W). Para ello, se colocaron 20 μL de la solución acuosa de 100 mg/L de AMPA, glifosato y glufosinato en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se llevaron a sequedad en una estufa de vacío a 60 °C durante 1 hora. A cada tubo se le agregó 60 μL de TFAA y 30 μL de TFE, se lo tapó y se lo sonicó durante 5 minutos; posteriormente se lo introdujo en un frasco de vidrio color caramelo de 15 cm^3 , se le quitó la tapa Eppendorf y se selló el frasco con su tapa a rosca como puede observarse en la Figura 12, interponiendo un disco de teflón entre la solución y el polímero de sellado que trae la tapa.



Figura 12. *Fotografía del sistema empleado para la derivatización en el equipo de extracción asistida por microondas.*

Se pesó el frasco cerrado en la balanza analítica para poder controlar luego si hubo fuga de componentes, y se lo introdujo en una posición determinada del rotor del horno microondas. Luego de transcurrido el tiempo de reacción se lo dejó enfriar para ser pesado nuevamente y comprobar que no se hayan producido fugas. Finalmente se evaporaron bajo capana los reactivos en exceso haciendo pasar una corriente de nitrógeno gaseoso durante 15 minutos. Se resuspendió por agregado de 200 μL de acetato de etilo con el estándar interno y 5 minutos de sonicación, y se procedió a analizar en CG-MS con el método establecido anteriormente.

Con el fin de comparar los rendimientos de reacción obtenidos, a cada potencia empleada, se realizó una derivatización por duplicado con el obtenido con un horno convencional a 95 °C durante 30 minutos, utilizando igual cantidad de reactivos pero en los

viales silanizados empleando tapas de encapsulado (crimpeables). Las soluciones resultantes fueron analizadas por CG-MS bajo las mismas condiciones, y para ambos métodos. La comparación se llevó a cabo con las alturas relativas a la altura del estándar interno obtenida en el mismo cromatograma.

Se incluyó un experimento de derivatización a temperatura ambiente (potencia cero) y empleando solo 5 minutos de sonicación.

Por último se hizo un experimento para evaluar si la radiación dentro del horno es homogénea. Para ello se colocaron 4 recipientes llenos con 375 mL de agua en 4 posiciones fijas del horno de microondas, fuera del rotor, tal como se indica en la Figura 13:

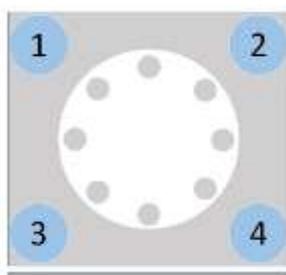


Figura 13. Arreglo de 4 recipientes con agua dentro del horno microondas.

El experimento consistió en medir la temperatura que adquiriría cada recipiente luego de ser sometidos a radiación microondas con una potencia de 1600W durante lapsos de tiempo determinados. Se ensayaron distintos tiempos cuidando de que el agua no entre en ebullición. Para cada uno de ellos se renovó el agua.

Resultados y discusión

4.1 Elección de columna

4.1.1 Comparación de la performance obtenida con columnas HP-5 y Carbowax-20M en CG-FID

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

- GC: Temperatura del detector: 250 °C, temperatura de inyección: 250.00 °C, modo de inyección: splitless, tiempo de muestreo: 0.75 min, volumen de inyección: 1.4 µL, presión constante: 8.0 kPa, flujo en la columna: 1.00 mL/min, gas portador: N₂, programa de temperatura: 70°C (2 minutos) y rampa de 10 °C/minuto hasta 200 °C. Tiempo total máximo: 15 min.

Como puede apreciarse en los cromatogramas de la Figura 14 y en los datos proporcionados en la Tabla 4, se obtuvo mayor eficiencia y mejor simetría en el pico de glifosato con la columna de Carbowax-20M. Por este motivo es que se procedió a trabajar con esta columna.

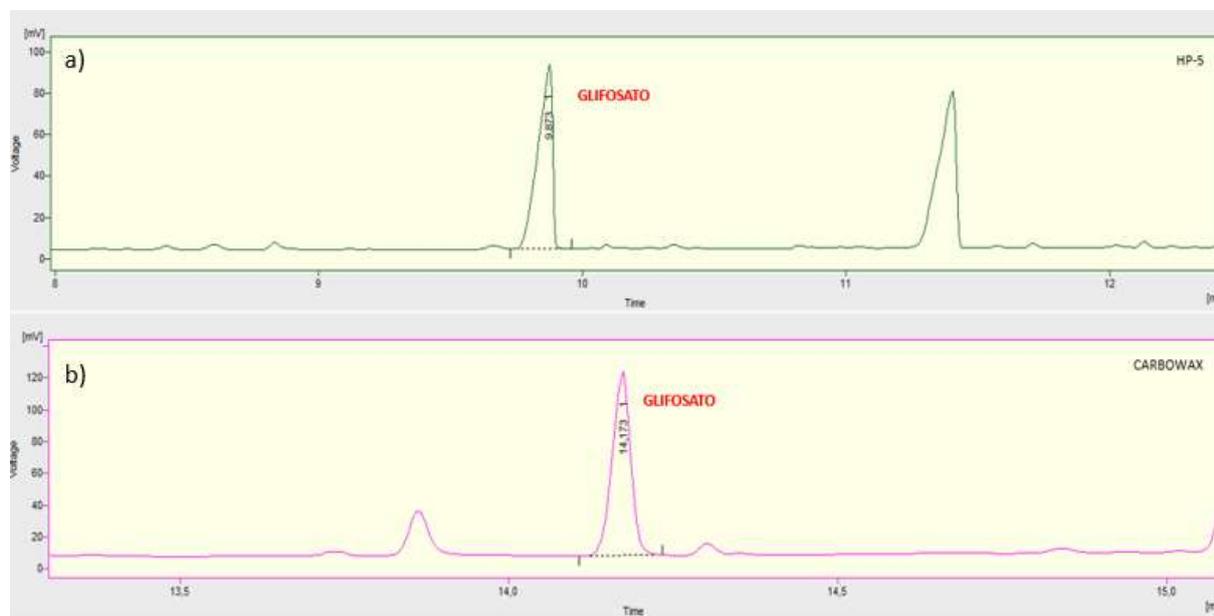


Figura 14: Cromatogramas obtenidos con las columnas capilares $L_T=30\text{m}$, $I.D.: 250\mu\text{m}$ (Ver Tabla 3): a) HP-5 y b) Carbowax-20M. Muestra: 0.0005 g de glifosato derivatizado. Condiciones: $T_{\text{detector}}=250\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{iny}}=250\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{modo}_{\text{iny}}=\text{splitless}$, $t_{\text{sampling}}=0.75\text{ min}$, $F=1\text{ mL/min}$, $V_{\text{iny}}=1.4\mu\text{L}$, programa de temperatura= 70 °C durante 2 minutos, rampa 10 °C/min hasta 200 °C.

Tabla 4. Comparación de la eficiencia obtenida para el glifosato con las columnas capilares HP-5 y Carbowax 20M.

Columna	Carbowax 20M	HP5
	30 m x 250 μ m x 0.25 mm	30 m x 320 μ m x 0.25 mm
Flujo (mL/min)	1	1
Programa del horno	70°C 2 min 10°C/min hasta 200°C	70°C 2 min 10°C/min hasta 200°C
Volumen de inyección (μ L)	1.4	1.4
Modo de inyección	Splitless $t_{\text{samp}} = 0.75$ min	Splitless $t_{\text{samp}} = 0.75$ min
Tiempo de retención (min)	14.167	9.873
Área (mV.s)	224.6776	340.6819
Altura (mV)	119.611	91.748
$W_{0.5}$ (min)	0.040	0.067
Asimetría	0.800	0.214
Eficiencia/m	23165	3781

4.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas con columna capilar de Carbowax-20M

Para este experimento se inyectó en cada corrida 4.8 μ L de una solución de los analitos derivatizados y resuspendidos correspondientes a una concentración aproximada de 300 mg/L de glifosato, AMPA y glufosinato. se empleó el CG-MS bajo las siguientes condiciones fijas:

- MS: Temperatura de la fuente de iones: 210.00 °C, temperatura de interfase: 210.00 °C, tiempo de corte de solvente: 3 min, ganancia del detector: 1.04 kV. Modo de detección: TIC ($50 < m/z < 550$).

- GC: Temperatura de inyección: 250.00 °C, modo de inyección: splitless, tiempo de muestreo: 0.75 min, Presión constante: 8.0 kPa, flujo en la columna: 1.00 mL/min, gas portador: H₂.

Se probaron programas de temperatura que iniciaban isotérmicamente a 70 °C durante 2 minutos y luego con rampas de 5, 10, 15, 20, 25 y 35 °C/min hasta 240 ° y doble rampa: 35 °C/min hasta 221 °C, luego rampa de 45 °C/min hasta 240 °C. También se probó iniciando la corrida a 80 y 90 °C con una rampa de 35 °C/min hasta 240 °C. Algunos pasos de esta optimización se muestran en la Figura 15.

La identificación de los analitos se inició extrayendo y amplificando del cromatograma TIC las señales de fragmentos característicos de los mismos: m/z 126 y 246 (AMPA), 113 y 411 (glifosato) y 152, 189 y 314 (glufosinato). Este procedimiento se muestra en la Figura 16. Una vez ubicados los picos en el cromatograma se analizaron los espectros de masas para confirmar su identidad, se verificó la presencia de muchos otros fragmentos característicos, incluso se ha detectado el ion molecular del glifosato y del AMPA (ver Tabla 5).

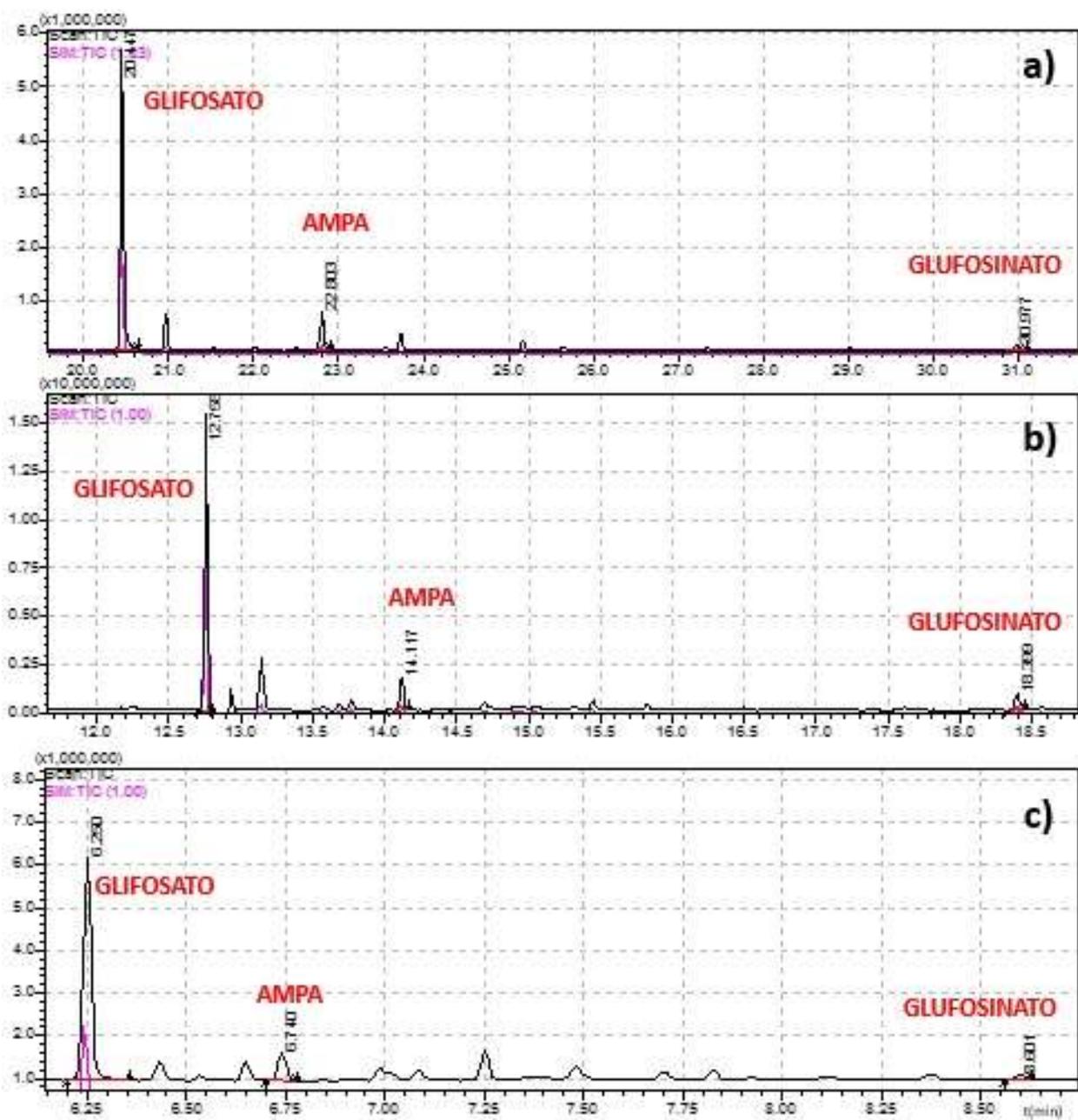


Figura 15. Cromatogramas correspondientes a la optimización del programa de temperatura: a) 2 minutos a 70°C y rampa de 5°C/min hasta 240°C, tiempo de análisis= 31 min., b) 2 minutos a 70°C y rampa de 10°C/min hasta 240°C, tiempo de análisis= 18.5 min. c) 2 minutos a 70°C y rampa de 35°C/min hasta 221 °C y rampa de 45 °C/min hasta 240°C, tiempo de análisis= 9 min.

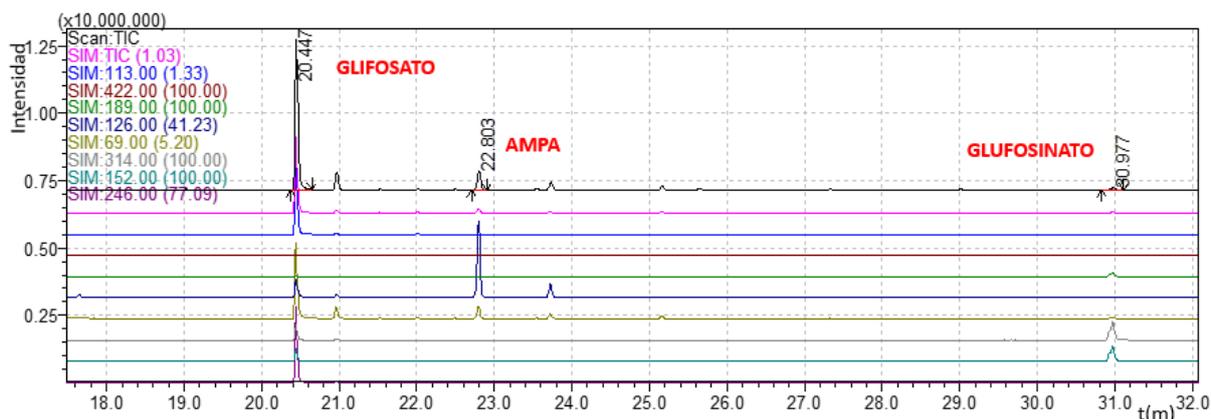


Figura 16. Cromatograma obtenido con programa de temperatura de 70 °C 2 minutos y rampa de 5 °C/min hasta 240 °C. Procedimiento para la identificación de los analitos en el cromatograma TIC: a mayor cantidad de fragmentos característicos de un analito dado en un pico, mayor es la probabilidad de identificar correctamente al mismo. Señales amplificadas para la identificación de: glifosato (69,113), AMPA (69,126,246) y glufosinato (69,152,189,422,314).

Tabla 5: Fragmentos m/z encontrados de los analitos derivatizados con TFAA y TFE.

AMPA	Glufosinato	Glifosato
126(BP), 246, 259, 272, 302, 371(M ⁺)	152, 189, 200, 244, 314(BP), 422	113(BP), 238,372, 411, 511(M ⁺)

El orden de elución en esta columna es primero AMPA, luego glifosato y por último glufosinato.

Posteriormente, en un intento de aumentar la sensibilidad, se probó iniciando el programa de temperatura a 60 °C durante 2 minutos y luego una rampa de 35 °C/min. Se configuró la detección SIM programada en el tiempo que monitoreó el fragmento característico más abundante de cada analito en un intervalo de tiempo determinado por los tiempos de retención de los mismos: glifosato de 6.00 min a 6.70 min monitoreando el fragmento m/z 113, AMPA de 6.70 min a 8.00 min monitoreando el fragmento m/z 126 y glufosinato de 8.00 minutos en adelante monitoreando el fragmento m/z 314. Finalmente se corrió un blanco con detección SIM programada en el tiempo inyectando diclorometano. Inesperadamente se detectaron picos para los tres analitos a los mismos tiempos con similar forma y área apreciable. Lo mismo resultó de posteriores análisis de blancos. Para descartar contaminación de la jeringa se

inició un análisis sin inyección. Los analitos volvieron a ser detectados por lo que se interpretó que estaba ocurriendo un efecto de trampeo de los analitos ya sea en la lana de vidrio del inserto o en la cabeza de la columna y que luego con el gradiente de temperatura es removido y detectado como picos claramente resueltos. Entonces, a continuación se optó por quitar la lana de vidrio del inserto y eliminar los primeros 2 cm de la columna. El fragmento de columna eliminado mostró color oscuro posiblemente carbonizado en el extremo inmediato al inyector. Se conectó la columna, se calentó el horno durante 2 horas a la temperatura máxima de trabajo y se procedió a realizar otra corrida de control, sin inyección. En este primer análisis no se detectaron analitos, por lo que se inyectó una solución con analitos y se corrió con el mismo programa para después correr un blanco y verificar si seguían apareciendo los picos fantasmas. Los analitos no fueron detectados, sin embargo luego de dos inyecciones más de patrones, un control volvió a dar por positivo para los tres picos por lo cual se terminó desestimando el uso de esta columna para este trabajo.

Es posible que el ingreso de gas proveniente del inyector y precalentado temperatura más alta que la temperatura máxima de uso del carbowax produzca una degradación o carbonización, que fue lo que se observó como color oscuro en el tramo cortado, y sea en esa zona de fase estacionaria carbonizada donde se produce el trampeo y sangrado lento hacia el interior de la columna, donde la fase estacionaria no se encuentra degradada. En el primer tramo de columna con fase estacionaria no degradada a la temperatura inicial se produzca un nuevo trampeo de lo que sangra desde la zona degradada, y en el gradiente de temperatura se remueve detectándose como picos. Estos picos, que se trampean en zona degradada, sangran de manera continua, se vuelven a trampear en la columna cuando está fría y que se vuelven a remover con el gradiente de temperatura, son cantidades muy pequeñas que no se llegaban a detectar cuando se evaluaron las columnas empleando detector FID. Posiblemente utilizar un tramo inicial de capilar libre de fase estacionaria solucione el inconveniente, pero esta opción se evaluará en el futuro.

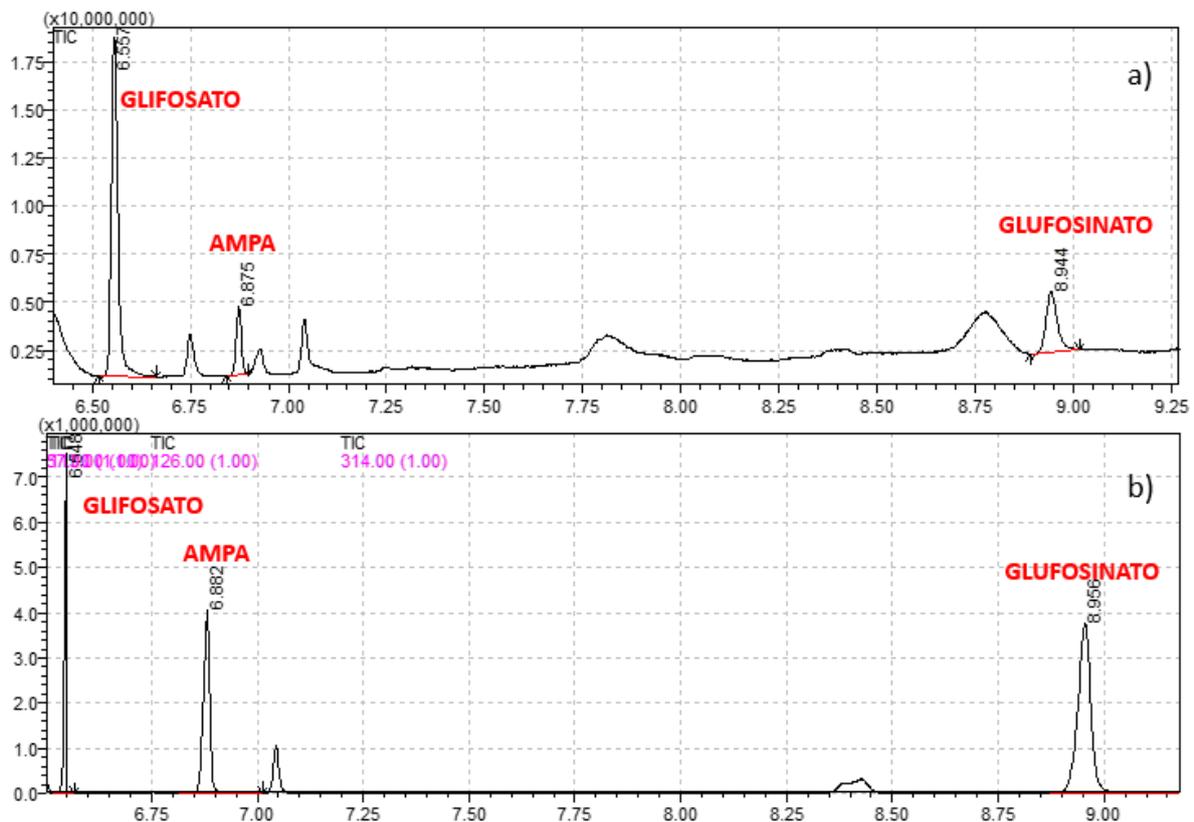


Figura 17. Cromatogramas TIC (a) y SIM programado en el tiempo (b) obtenido con el programa de temperaturas de 60 °C 2 minutos y rampa de 35 °C/min hasta 240 °C. El pico de glifosato saturó en el cromatograma SIM.

4.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas con columna capilar tipo HP-5 construida

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

- MS: Temperatura de la fuente de iones: 210.00 °C, temperatura de interfase: 210.00 °C, tiempo de corte de solvente: 3 min, ganancia del detector: 1.04 kV. Modo de detección: TIC (50<m/z<550, event time de 0.2 segundos).
- GC: Temperatura de inyección: 270.00 °C, modo de inyección: splitless, tiempo de muestreo: 0.5 min, Presión constante: 8.0 kPa, flujo en la columna: 1.00 mL/min, gas portador: H₂, programa de temperatura: 70°C (2 minutos) y rampa de 30 °C/minuto hasta 270 °C.

La identificación de los analitos se llevó a cabo de igual forma que en el inciso 4.1.1 comparando los espectros de masas de los picos (ver Figura 19) con los espectros

de masas esperados. En la Figura 18 se muestra el cromatograma en el cual se puede ver que la separación obtenida resultó adecuada y en un tiempo pequeño. El orden de elución en esta columna es primero AMPA, luego glifosato y por último glufosinato. A simple vista se puede ver que la sensibilidad para el AMPA es mayor que para el glifosato, y esta última mayor que para el glufosinato. Otro detalle particular es que el glifosato aparece como un pico con forma de doblete. Se confirmó que es glufosinato simplemente y que no son dos compuestos que coeluyen analizando el espectro de masas de cada pico del doblete: éstos resultaron ser muy similares (ver Figura 19).

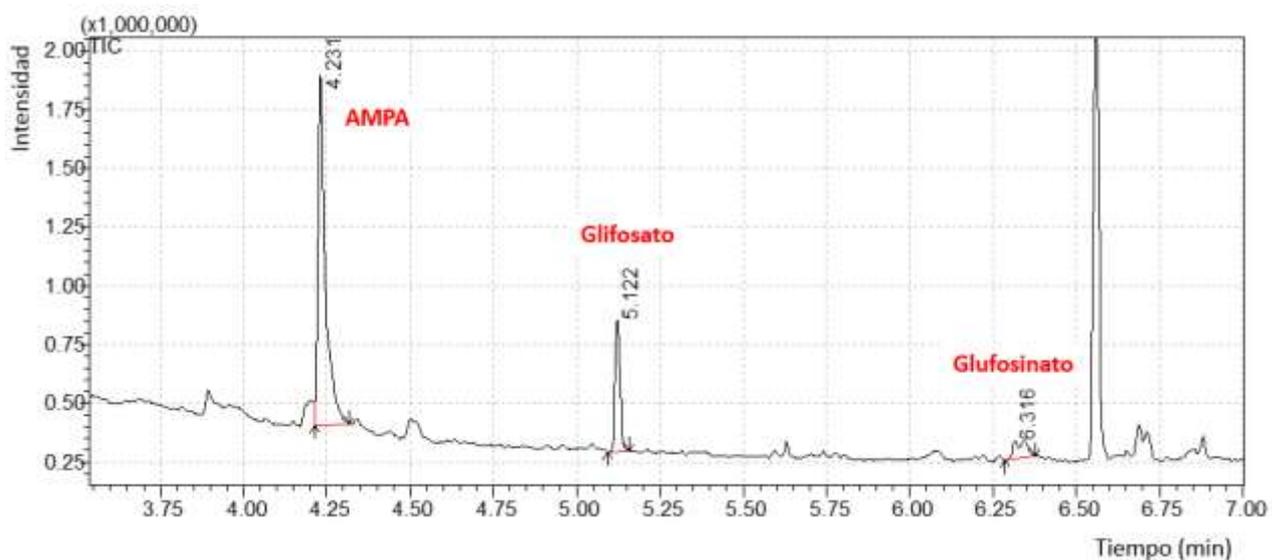


Figura 18. Cromatograma TIC ($50 < M/Z < 550$, event time de 0.2 segundos), $V_{iny} = 3.8 \mu\text{L}$, Conc= 2 mg/L de glifosato, glufosinato y AMPA.

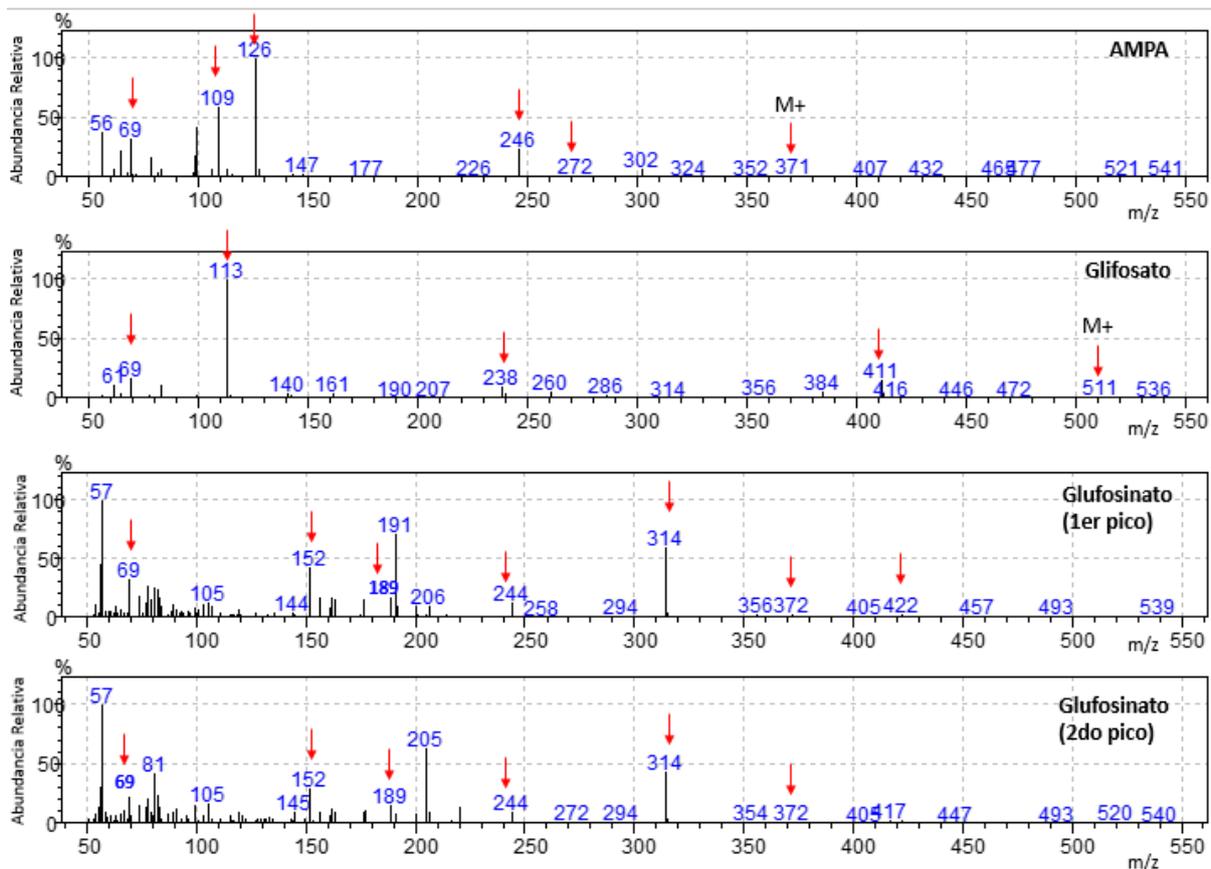


Figura 19. Espectros de masas de los picos correspondientes a AMPA, glifosato y glufosinato derivatizados con TFAA y TFE. Flechas rojas: fragmentos buscados.

En base a los tiempos de retención observados en la cromatografía en modo TIC, se configuró el método de detección SIM programado en el tiempo: AMPA de 3.00 min a 4.68 min monitoreando el fragmento m/z 126, glifosato de 4.68 min a 5.76 min monitoreando el fragmento m/z 113 y glufosinato de 5.76 min en adelante monitoreando el fragmento m/z 314. La tasa de adquisición empleada fue de 10 Hz, o lo que es equivalente, constante de tiempo de adquisición de 0.1 seg.

El resultado del análisis cromatográfico de la misma solución en idénticas condiciones cromatográficas pero con detección SIM se muestra en la Figura 20. Los resultados del análisis de la relación S/N para cada analito se muestran en la Tabla 6. La detectabilidad se incrementó debido a que la disminución del nivel de ruido fue mucho mayor que la de cada analito.

Tabla 6. Comparación de la relación S/N obtenidas con los distintos modos de detección.

	Glifosato	AMPA	Glufosinato
TIC	70	28	4
SIM	42966	18836	2322

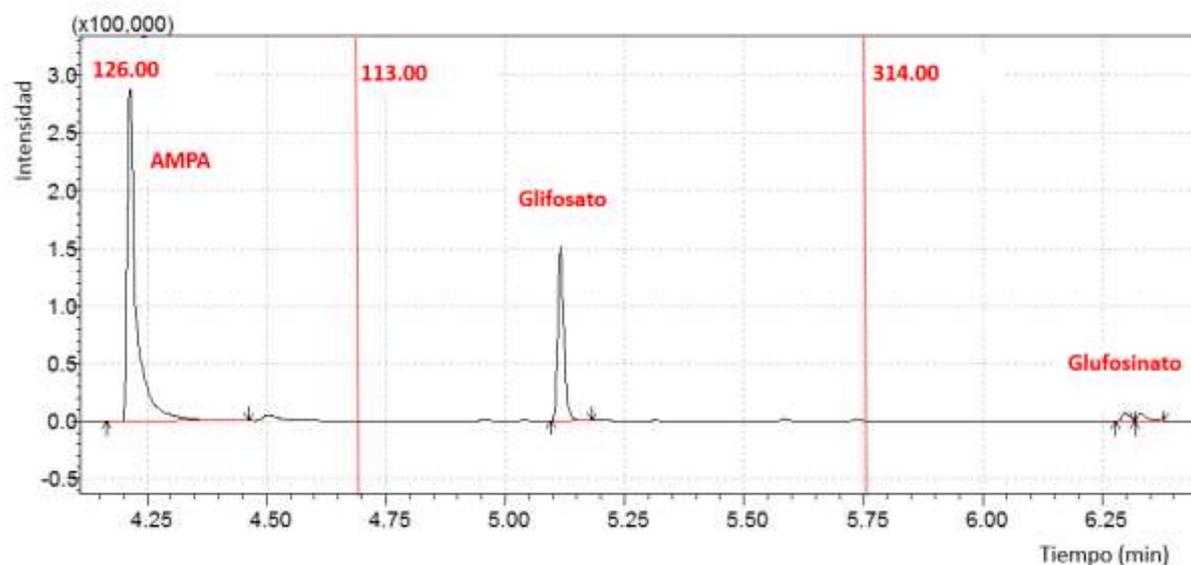


Figura 20. Cromatograma obtenido con programa de detección SIM: $m/z = 126$ (3-4.68 min), 113 (4.68-5.76 min) y 314 (5.76-10 min). Event time: 0.1 seg. $C_{analitos} = 2$ mg/L, $V_{iny} = 3.8 \mu\text{L}$.

En la corrida cromatográfica sin inyección no se observaron picos fantasmas.

Para elegir el estándar interno se inyectó, con la técnica AM empleando relación de split de 20 y con el método de detección TIC, una mezcla de hidrocarburos que contenía heptano, octano, nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano y tetradecano.

Se seleccionó al tetradecano como estándar interno (ver Figura 21) por ser el menos volátil y porque no interfiere con los picos analizados. Se procedió a preparar una solución del mismo en acetato de etilo que por inyección de $3.8 \mu\text{L}$ en modo SIM programado en el tiempo generase un pico con área del orden de la de los picos de los analitos. Además se analizó el espectro de masas del tetradecano (ver Figura 22), se observó que el fragmento m/z 113 está presente pero no es muy

intenso y se optó por emplear dicho fragmento para monitorearlo en el modo SIM programado en el tiempo al igual que el glifosato.

La concentración de la solución de estándar interno en acetato de etilo resultó ser 0.8 µg/L.

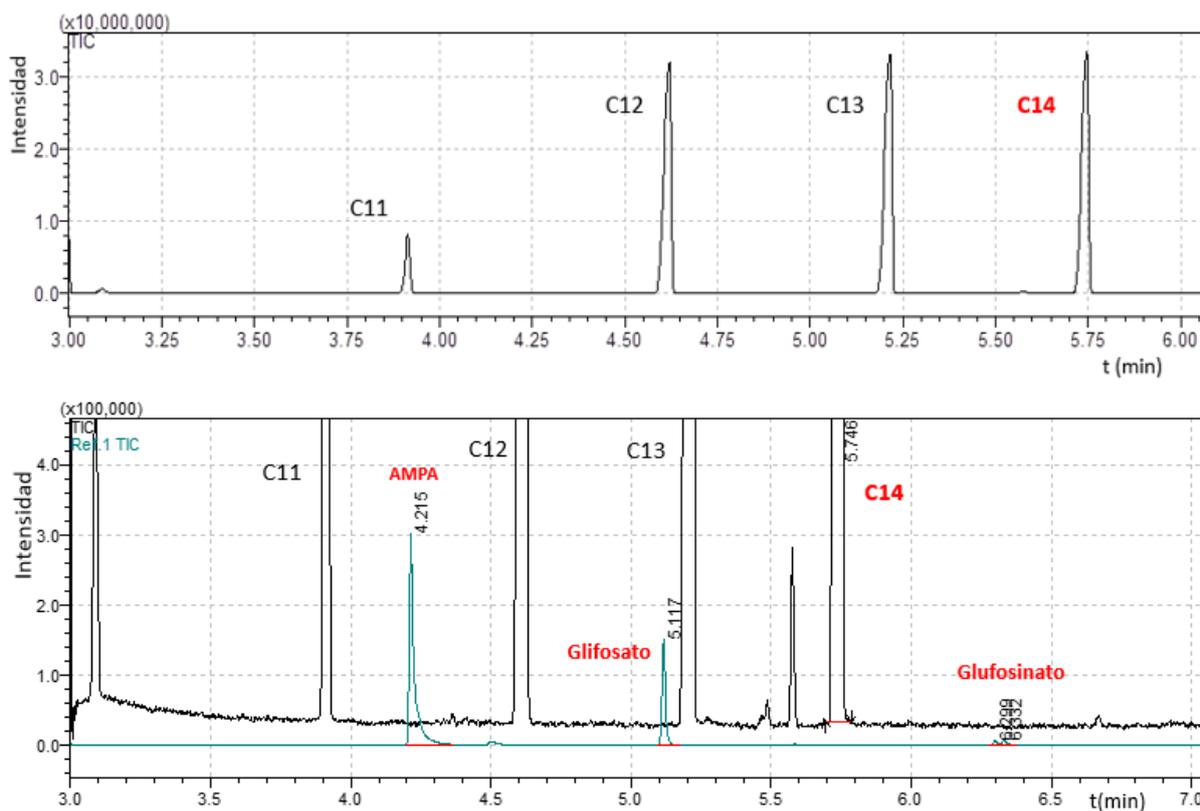


Figura 21. Arriba: Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrocarburos para la elección de estándar interno. Modo Detección= TIC ($50 < M/Z < 550$). Abajo: comparación de los tiempos de retención de los hidrocarburos con el de los analitos.

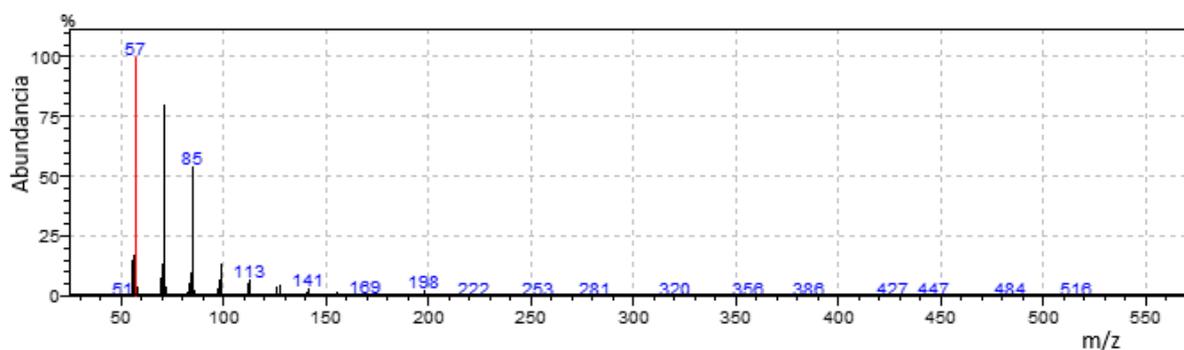


Figura 22: Espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico asignado a tetradecano.

4.1.3 Evaluación de la columna tipo HP-5 construida

La columna construida resultó tener una longitud igual a 26.35 m.

Todos los cromatogramas que se muestran a continuación se obtuvieron bajo las siguientes condiciones:

Temperatura de la columna a 80 °C (isotérmica); P igual a 8 kPa; Temperatura del inyector a 270 °C; Modo de Inyección AM. Modo Detección TIC (50<M/Z<500, Event time de 0.2 segundos).

El 1-octanol (ver Figura 23) presentó una asimetría leve (TF=7.680) indicando actividad por silanoles. La actividad evidenciada se exagera en el 2,4-pentanodiol (ver Figura 24), como era de esperar por su mayor interacción con los grupos hidroxilo de la superficie (TF=8.925).

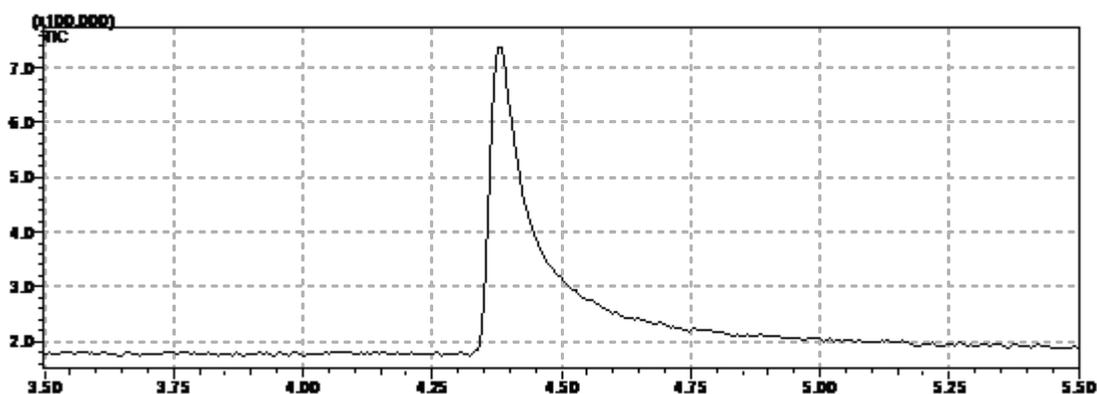


Figura 23. Cromatograma del 1-octanol.

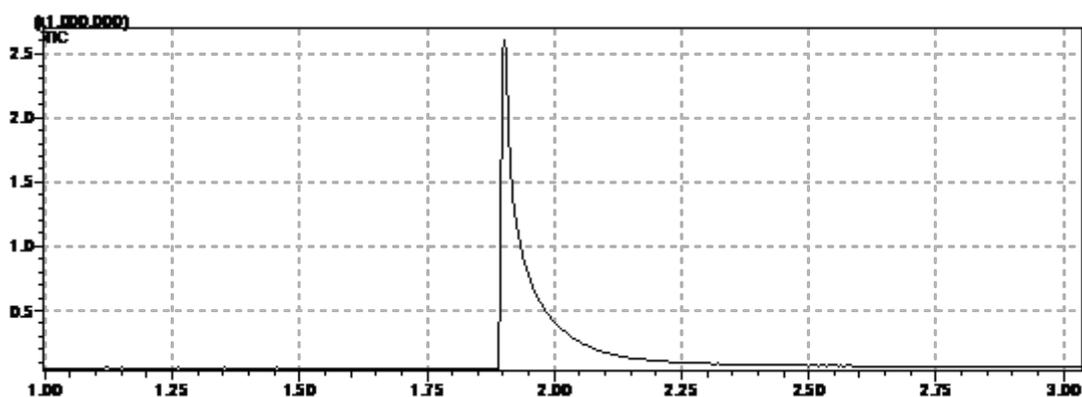


Figura 24. Cromatograma del 2,4-pentanodiol.

El ácido 2-etilhexanoico mostró un pico marcadamente asimétrico (ver Figura 25). En este caso la actividad se observa en la fuerte adsorción del ácido. (TF=1.064, el frente y el coileo se compensan, pero el pico no es gaussiano).

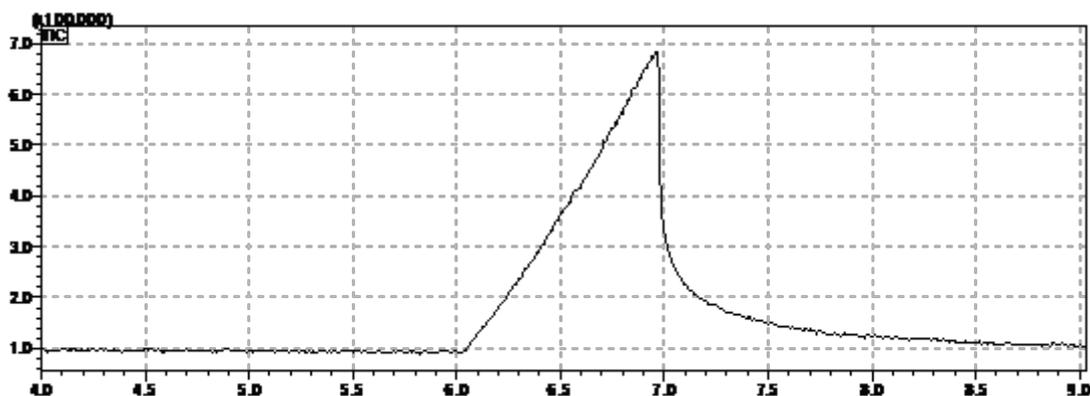


Figura 25. Cromatograma del ácido 2-etilhexanoico.

En la Figura 26 la 2-pentanona mostró un pico simétrico (TF=1.006), lo que indica baja actividad a ácidos de Lewis (iones Al^{+3} de la sílice expuestos en la superficie interna).

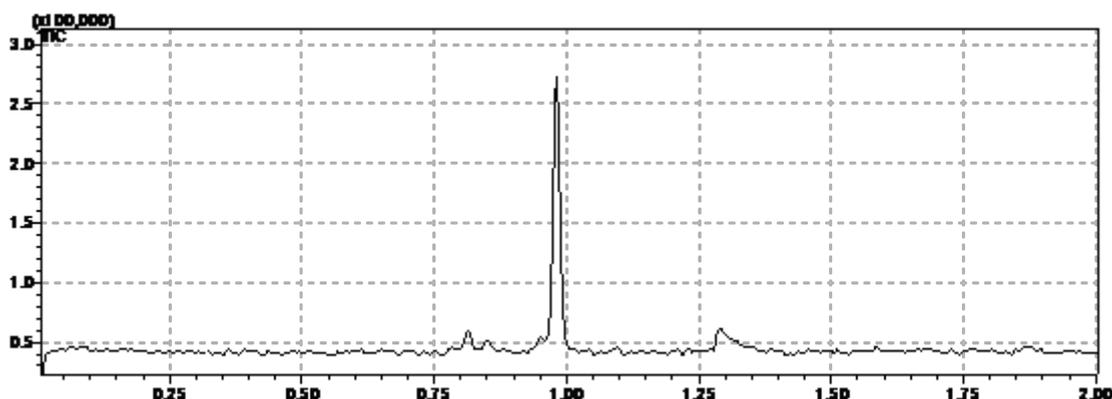


Figura 26. Cromatograma de la 2-pentanona.

Los picos obtenidos para el benceno (ver Figura 27) y el tolueno (ver Figura 28) resultaron simétricos (TF= 1.035 y 0.986 respectivamente), por lo que se deduce que éstos interaccionan casi únicamente con la fase estacionaria. Esto se traduce a que el comportamiento de la columna como ácido de Lewis (electrófilo) es leve.

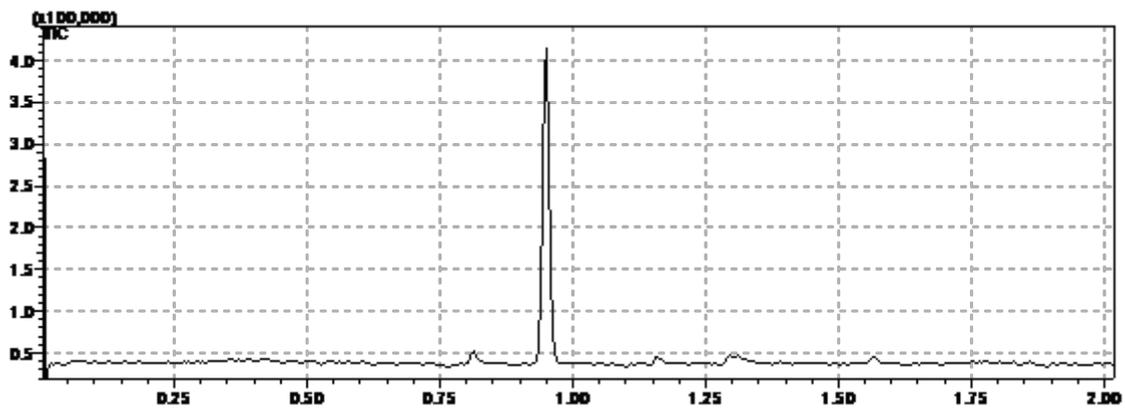


Figura 27. Cromatograma del benceno.

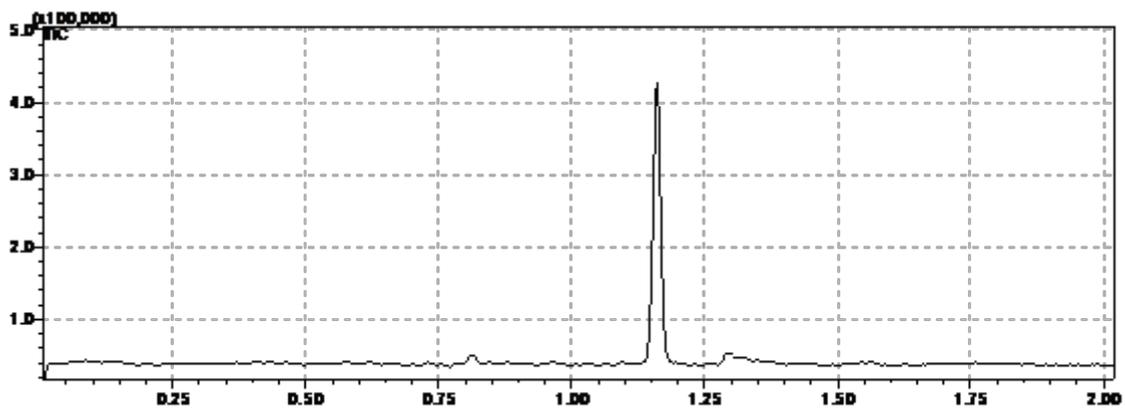


Figura 28. Cromatograma del tolueno.

No obstante, la piridina presentó un pico con asimetría leve (TF= 4.136) poniendo en evidencia cierto carácter ácido de la columna (ver Figura 29).

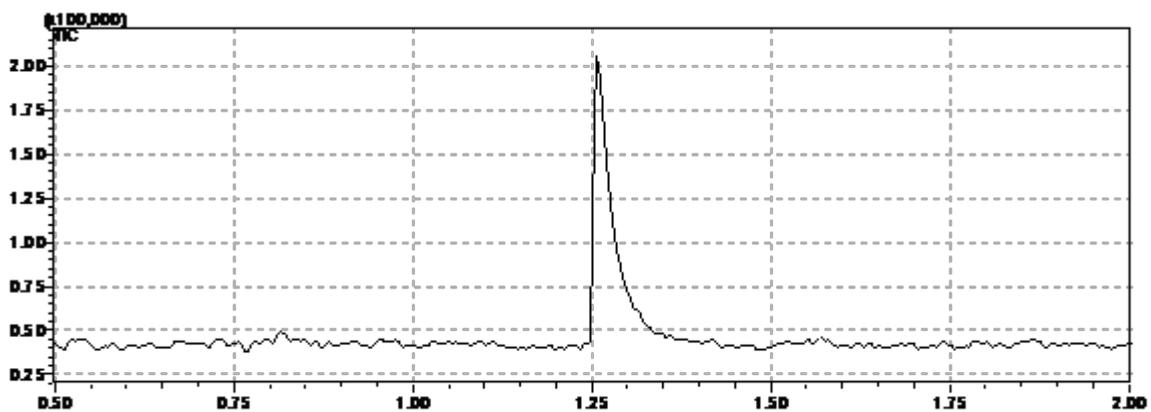


Figura 29. Cromatograma de la piridina.

Con estas pruebas se concluye que la columna posee cierto carácter ácido debido principalmente a la existencia de grupos silanoles, lo que produce la adsorción de los alcoholes y la piridina, pero una baja actividad por presencia de ácidos de Lewis en su superficie. Esto indicaría que la sílice con la que fue construido el capilar es de buena calidad y la concentración de Al^{+3} es baja.

4.2 Alternativas en la derivatización

Las soluciones de analitos derivatizados que se utilizaron en esta etapa se prepararon llevando a sequedad 20 μ L de la solución acuosa de 100 mg/L de AMPA, glifosato y glufosinato. Luego de derivatizar, eliminar el excedente de reactivos con corriente de nitrógeno, los compuestos derivatizados se resuspendieron con 200 μ L de solución de estándar interno en acetato de etilo.

4.2.1 Evaluación de la derivatización empleando distintos alcoholes

4.2.1.1 Derivatización con 1,1-dihidroperfluorobutanol

Las condiciones cromatográficas iniciales fueron las siguientes:

- MS: Temperatura de la fuente de iones: 210.00 °C, temperatura de interfase: 210.00 °C, tiempo de corte de solvente: 3 min, ganancia del detector: 1.04 kV. Modo de detección: TIC ($50 < m/z < 850$), event time= 0.1 seg, solven cut time= 3 min.
- GC: Temperatura de inyección: 250.00 °C, modo de inyección: splitless, tiempo de muestreo: 0.75 min, Presión constante: 8.0 kPa, flujo en la columna: 1.00 mL/min, gas portador: H_2 . El programa de temperatura empleado fue: 70 °C durante 2 minutos, luego rampa de 20 °C/min hasta 270 °C.

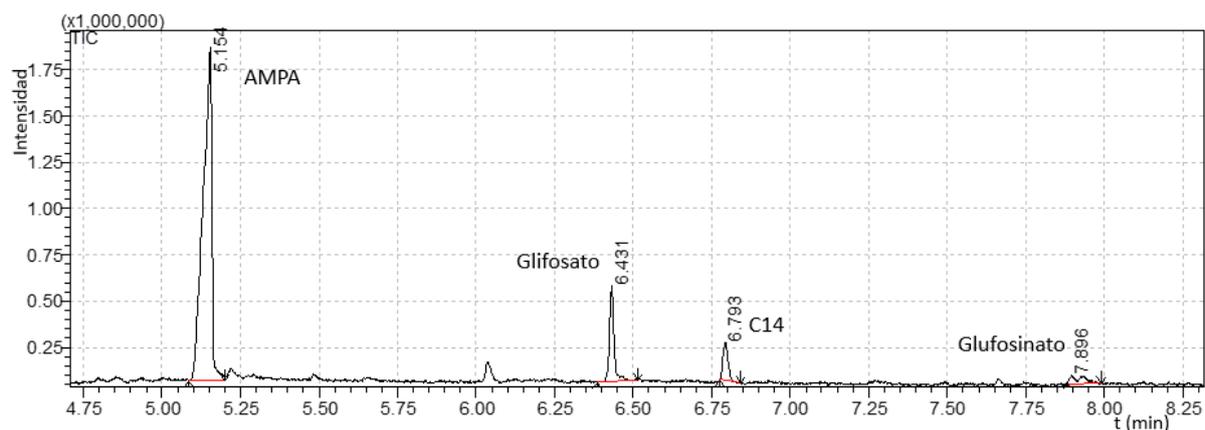


Figura 30. Cromatograma TIC correspondiente a la derivatización de glifosato, AMPA y glufosinato con TFAA y 1,1-dihidroperfluorobutanol. Conc=10 mg/L, vol iny= 3.8 µl.

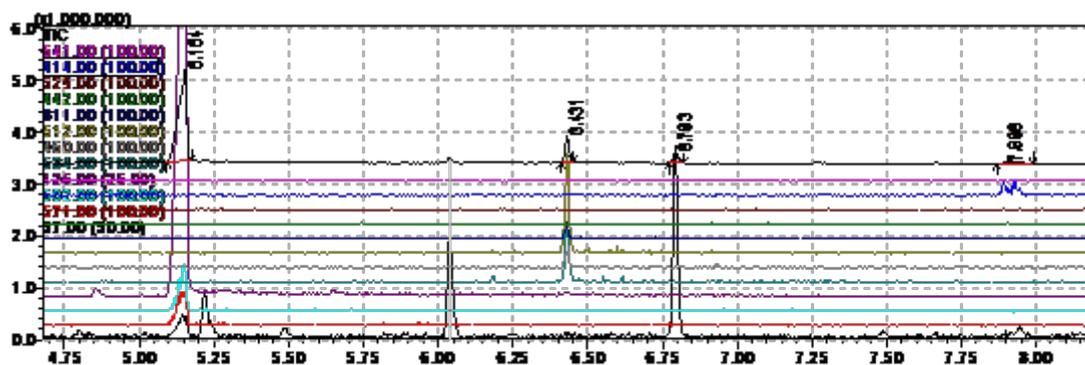


Figura 31. Proceso de identificación de picos en el cromatograma TIC.

Pudieron identificarse satisfactoriamente los tres derivados de interés:

Un pico ubicado a los 5.154 min mostró contener los fragmentos 69, 126 (bien pronunciado), 372, 446, 502, y 571 lo cual permitió identificarlo como AMPA derivatizado. Otro pico con tiempo de retención igual a 6.431 min presentó señal para los fragmentos 69, 612, 460, 584 y 811, y se lo pudo identificar como el derivado del glifosato. El glufosinato fue detectado a los 7.896 minutos, y presentó señal para los fragmentos 69, 289, 414 (bien pronunciado) y 442. El tetradecano se presentó a los 6.793 min.

Tabla 7. Tiempos de retención de los derivados de los analitos y del estándar interno.

Analito	AMPA	Glifosato	C14	Glufosinato
tr (min)	5.154	6.431	6.793	7.896

A partir de los resultados anteriores, se estableció un método de detección SIM programado en el tiempo:

m/z = 126 (3-6 min) para AMPA, 611 (6-6.6 min) para glifosato, 113(6.6-7 min) para tetradecano y 414 (7-13.6 min) para glufosinato; event time= 0.1 s.

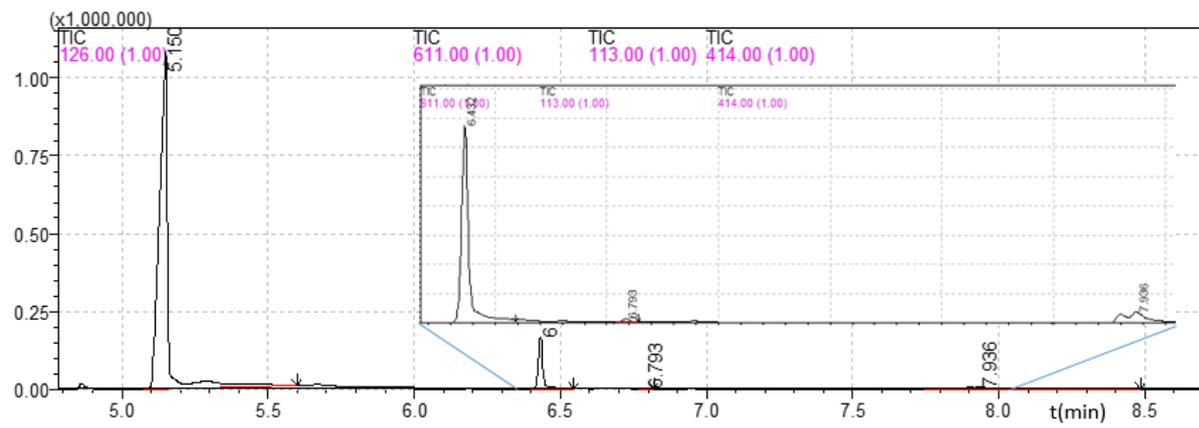


Figura 32. Cromatograma con detección SIM programada en el tiempo.

Se monitoreó el estándar interno con el fragmento m/z 113 para mantener igualdad de condiciones con el análisis SIM de la derivatización con TFAA y TFE. De esta manera los resultados de ambos métodos fueron comparables.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la comparación de las derivatizaciones según el alcohol empleado. La respuesta obtenida con DHPFB resultó menor a la obtenida con TFE. En el caso del AMPA la diferencia no es muy grande pero para el glifosato y el glufosinato es de un orden de magnitud.

Tabla 8. Relación de señales obtenidas para los distintos alcoholes.

Alcohol	AMPA	GLIFOSATO	GLUFOSINATO
	Altura analito / Altura IS		
TFE	729,4	690,9	29,0
DHPFB	419,7	65,2	3,6

4.2.1.2 Derivatización con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro,2-propanol

Las condiciones cromatográficas iniciales fueron las siguientes:

- MS: Temperatura de la fuente de iones: 210.00 °C, temperatura de interfase: 210.00 °C, tiempo de corte de solvente: 3 min, ganancia del detector: 1.04 kV. Modo de detección: TIC (50<m/z<750), event time= 0.1 seg, solven cut time= 3 min.

- GC: Temperatura de inyección: 250.00 °C, modo de inyección: splitless, tiempo de muestreo: 0.75 min, Presión constante: 8.0 kPa, flujo en la columna: 1.00 mL/min, gas portador: H₂. El programa de temperatura empleado fue: 70 °C durante 2 minutos, luego rampa de 20 °C/min hasta 270 °C.

Los espectros de masa de los picos observados con el cromatograma TIC son distintos de los esperados para los derivados. En las 3 figuras que se muestran a continuación se observan los cromatogramas con las señales de los fragmentos esperados amplificadas (ver Tabla 3). Por lo tanto, o la reacción no ocurre como se planteó o el rendimiento es muy bajo para las condiciones de reacción utilizadas.

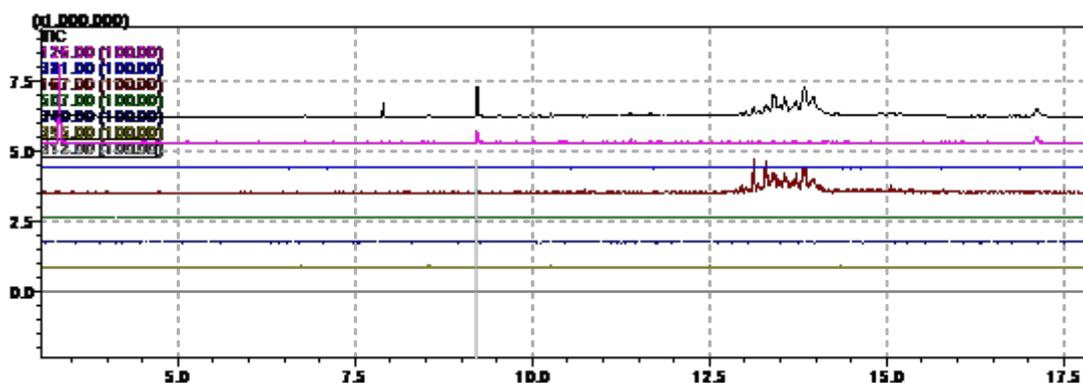


Figura 33. Amplificación de las señales propuestas del derivado de AMPA con el alcohol HF2P.

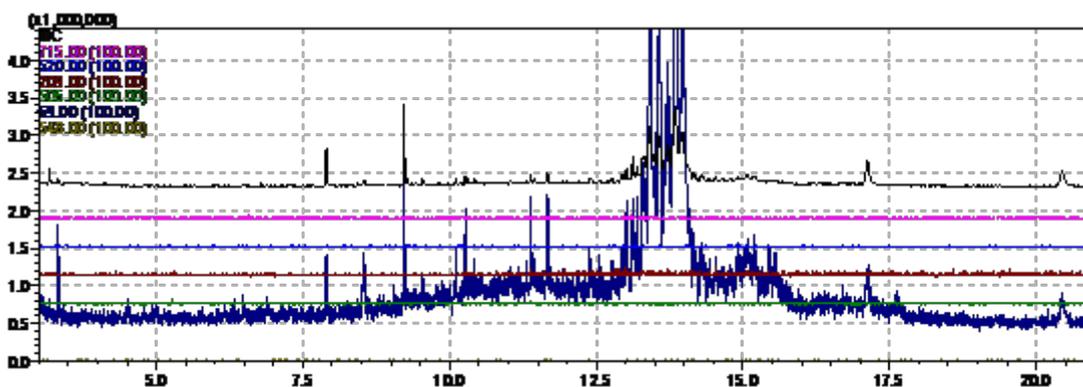


Figura 34: Amplificación de las señales propuestas del derivado de glifosato con el alcohol HF2P.

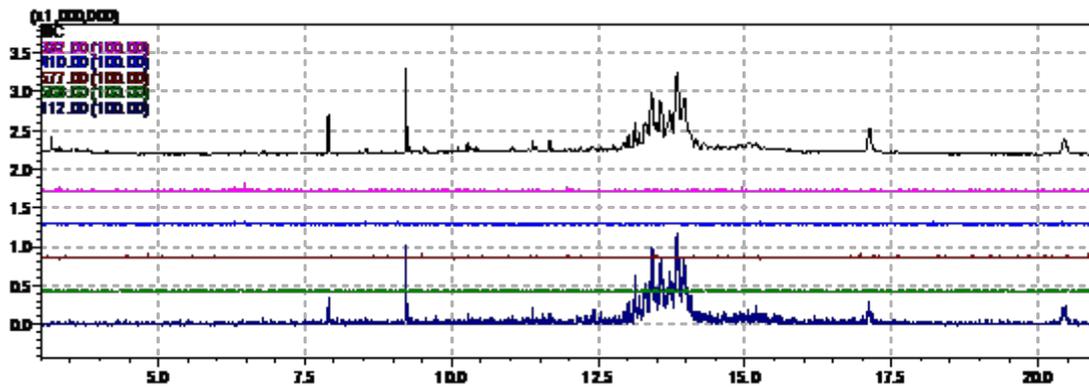


Figura 35: Amplificación de las señales propuestas del derivado de glufosinato con el alcohol HF2P.

Por lo tanto, o la reacción no ocurre como se planteó, o las condiciones de temperatura no son las indicadas, o los fragmentos propuestos no fueron adecuados.

4.2.2 Estudio de la derivatización asistida térmicamente en un horno de microondas.

En el análisis de la solución, conteniendo los tres analitos derivatizados en el horno de microondas, por CG-MS con el método cromatográfico optimizado previamente utilizando detección en modo SIM programada en el tiempo se obtuvieron 3 picos a los tiempos de retención esperados (ver Figura 36).

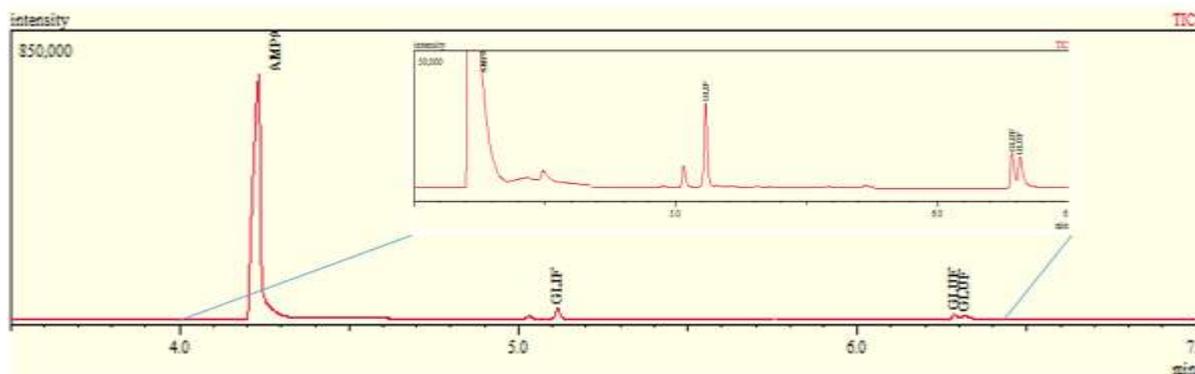


Figura 36. Cromatograma correspondiente a la derivatización asistida térmicamente en un horno de microondas a 992 W durante 1.5 min. Detección con programa SIM : $m/z = 126$ (3-4.68 min), 113 (4.68-5.76 min) y 314 (5.76-10 min). Event time: 0.1 seg. $P = 8$ kPa; $T_{inector} = 270$ °C; $V_{iny} = 3.8$ μ L, $Modo_{iny} = splitless$, $t_{sampling} = 0.5$ min.), T_{col} inicial= 70 °C (2 minutos) y rampa de 30 °C/ minuto hasta 270 °C. $C = 10$ mg/L de glifosato, glufosinato y AMPA.

Con el análisis de la solución con detección en modo TIC se logró confirmar la identidad de los picos cromatográficos (ver Figura 36) a partir de sus espectros de masas (ver Figura 38).

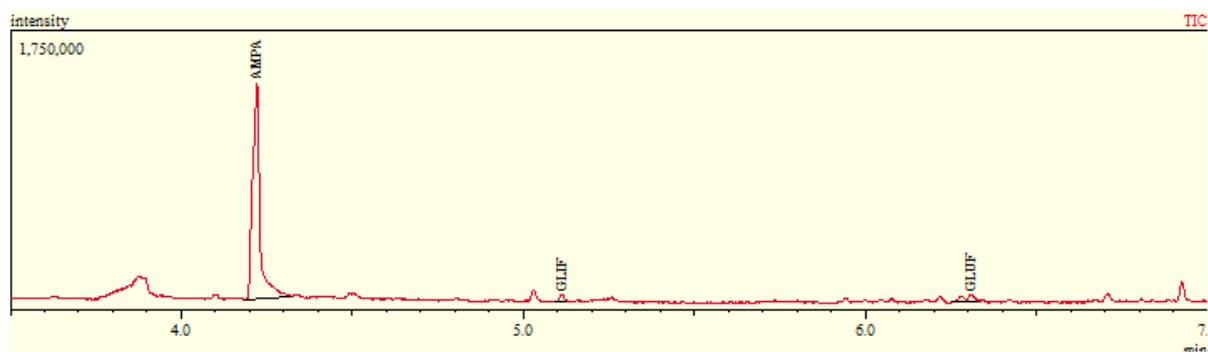


Figura 37. Cromatograma correspondiente a la derivatización asistida térmicamente en un horno de microondas a 992 W durante 1.5 min. Modo Detección= TIC (50<M/Z<500, Event time de 0.2 segundos) P= 8 kPa; $T_{inyector}$ = 270 °C; V_{iny} = 3.8 μ L, Modo_{Iny}= splitless, $t_{sampling}$ = 0.5 min., T_{col} inicial= 70°C (2 minutos) y rampa de 30 °C/ minuto hasta 270 °C. C= 10 mg/L de glifosato, glufosinato y AMPA.

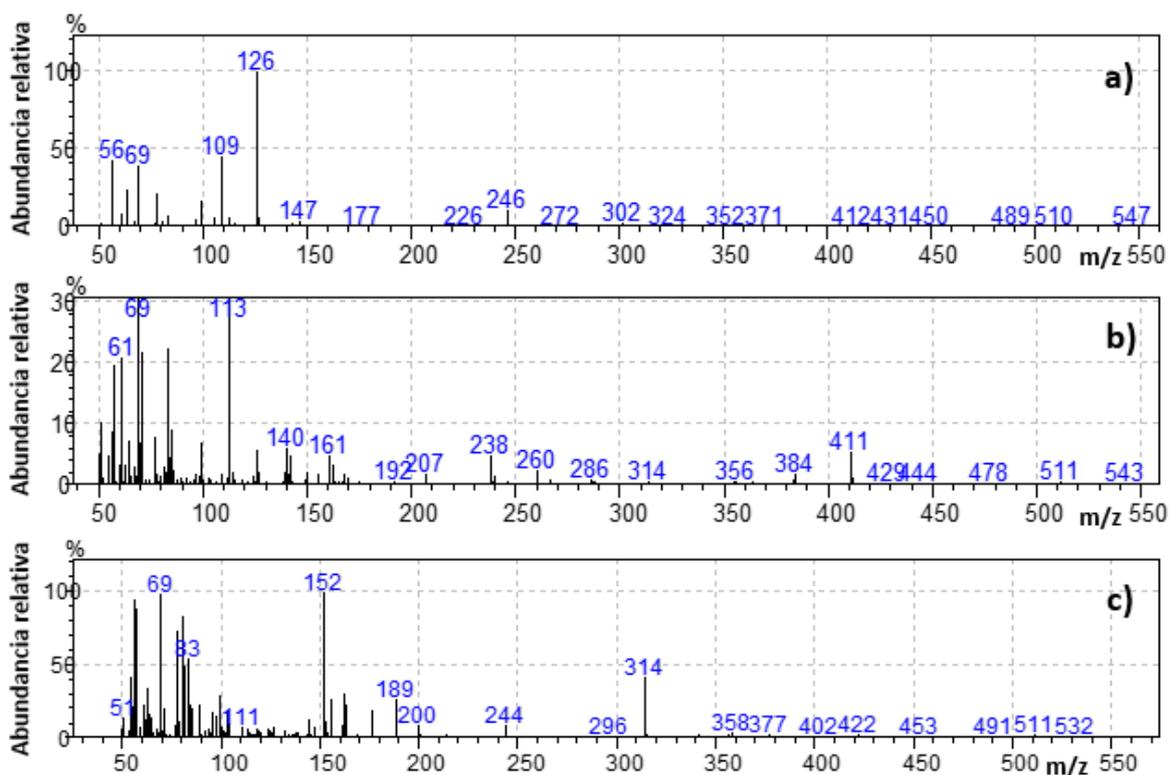


Figura 38. Espectros de masas de los derivados de (a) AMPA, (b) glifosato y (c) glufosinato con TFAA y TFE obtenidos del cromatograma TIC.

El estudio de la derivatización a potencia variable y durante 8 minutos arrojó los resultados que se muestran en la

Tabla 9. Los mismos fueron graficados en la Figura 39 donde puede observarse que existe una tendencia creciente de la relación señal analito/señal IS con la potencia aunque los resultados muestran variabilidad.

La derivatización a 800 W durante 8 minutos no pudo lograrse debido al sobrecalentamiento de la lámpara del horno de microondas, lo que activó el corte por seguridad.

Tabla 9: *Estudio de la derivatización a distintas potencias para 8 minutos de reacción.*

POTENCIA(W)	Altura analito /Altura IS		
	AMPA	GLIFOSATO	GLUFOSINATO
0	160,7	3,4	8,7
504	189,7	65,3	6,8
552	343,9	326,4	26,1
600	370,8	408,6	38,8
664	274,2	275,8	22,8
720	461,5	510,9	48,5
504	466,0	406,7	29,9
664	726,4	725,1	40,3
800	-		

El mejor valor de relación señal analito/señal IS se obtuvo a 664 W. Al comparar el mismo con los obtenidos con un horno convencional (Tabla 10) se observa que los resultados son del mismo orden, lo que no implicaría una diferencia apreciable en la detectabilidad.

Tabla 10: *Resultados obtenidos mediante la derivatización en un horno convencional a 95 °C durante 30 minutos.*

Réplica	Altura analito /Altura IS		
	AMPA	GLIFOSATO	GLUFOSINATO
1	729,4	692,9	29,1
2	729,3	690,7	29,0

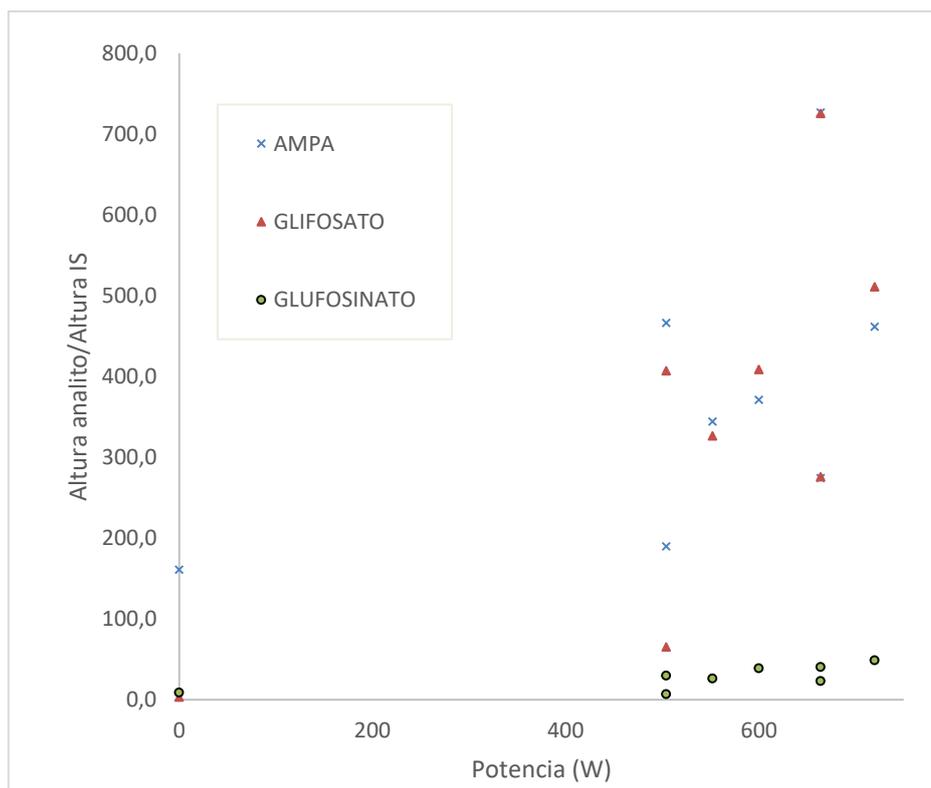


Figura 39. Correlación entre el rendimiento de la reacción de derivatización y la potencia aplicada para un tiempo constante de 8 minutos.

Ante la gran variabilidad observada en los resultados se hizo un experimento para evaluar si la radiación dentro del horno es homogénea.

La medida de la temperatura del agua de cada recipiente reveló que la radiación dentro del equipo no es homogénea, siendo ésta más intensa en las posiciones 3 y 4, como puede apreciarse en la Tabla 11 y en la Figura 40.

Tabla 11: Estudio de la homogeneidad de la radiación en el horno de microondas. Potencia suministrada = 1600 W.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)			
	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4
1	32	32	36	34
2	38,5	40	48	47
3	45	49	58	61
4	49	54	67	68
5	59	63	78	80
6	63	65,5	82	86

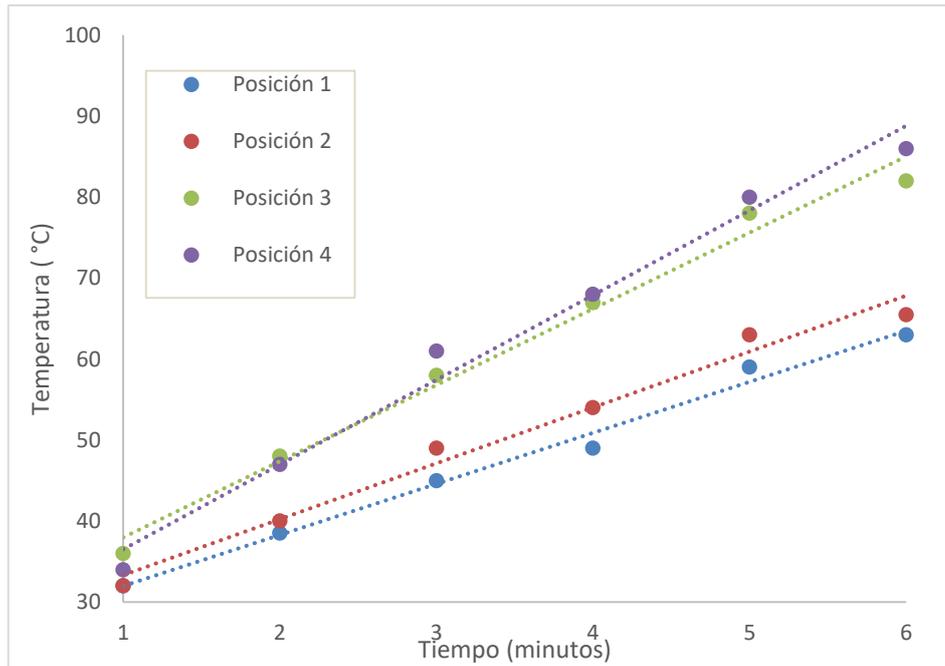


Figura 40. Estudio de la homogeneidad de la radiación en el horno de microondas. Potencia suministrada = 1600 W.

Conclusiones

Conclusiones

- Se evaluaron la eficiencia y la simetría de picos obtenidas en el análisis del derivado de glifosato con la columna HP-5 (columna de referencia del método) y la columna propuesta (Carbowax) utilizando un CG-FID obteniéndose mejores resultados con la columna de carbowax.
- Se optimizaron las condiciones cromatográficas incluyendo la programación del detector en el CG-MS para la separación de los derivados de glifosato, glufosinato y AMPA con la columna de Carbowax. Sin embargo, en el análisis de blancos se detectaron picos fantasmas de área considerable a los tiempos de retención de los tres analitos. Se pudo identificar en dónde se produce el trapeo de analitos y posterior sangrado y se propuso una posible solución.
- Se construyó una columna capilar con la fase estacionaria 5%fenilo, 95%polidimetilsiloxano de características compatibles con CG-MS y se la caracterizó.
- Se optimizaron las condiciones cromatográficas, la configuración del detector para la separación de los derivados de glifosato, glufosinato y AMPA con la columna construida. Se comparó la sensibilidad obtenidas para cada analito mediante la relación señal/ruido empleando los distintos modos de detección. La intensidad de la señal se vio incrementada al operar el detector en modo SIM.
- Se realizó un estudio de posibles mejoras en la reacción de derivatización utilizando los alcoholes 1,1-dihidroperfluorobutanol y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro,2-propanol como alternativa al trifluoroetanol. Con el primero se logró obtener e identificar los tres derivados a través de los fragmentos m/z propuestos, sin embargo, la detectabilidad de los mismo resultó ser de un orden de magnitud menor que la obtenida con la derivatización de referencia. Con el segundo alcohol no se encontraron picos en los cromatogramas con espectros de masas que contengan los fragmentos esperados, por lo tanto, o la reacción no ocurre como se planteó o el rendimiento es muy bajo para las condiciones de reacción utilizadas.
- Con el fin de disminuir el tiempo de derivatización de los analitos con TFAA y TFE, se evaluó la posibilidad de asistir térmicamente la reacción empleando un horno de microondas. Se lograron derivatizar los tres analitos obteniéndose resultados comparables con los obtenidos en la derivatización en un horno convencional y en un tercio del tiempo.

Otra ventaja fue poder utilizar tubos Eppendorf en lugar de los costosos viales de vidrio silanizados. No obstante, los resultados fueron poco reproducibles debido posiblemente a la inhomogeneidad de la radiación en el microondas.

Referencias

- [1] S. Solonesky, M. Larramendy, *Herbicides, Theory and Applications*, InTech, Rijeka, Croacia, 2011.
- [2] H. Kataoka, S. Ryu, N. Sakiyama, M. Makita, Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection, *J. Chromatogr. A.* 726 (1996) 253–258. doi:10.1016/0021-9673(95)01071-8.
- [3] M.G. Cikalo, D.M. Goodall, W. Mathews, Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection., *J. Chromatogr. A.* 745 (1996) 189–200.
- [4] P. Sprankle, W.F. Meggitt, D. Penner, Separation of Glyphosate and possible metabolitos by thin-layer chromatography, *Weed Sci.* 26 (1978) 673–674.
- [5] J. V. Sancho, F. Hernandez, F.J. Lopez, E.A. Hognedoom, E. Dijkman, P. van Zoonen, Rapid Determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography., *J. Chromatogr. A.* 737 (1996) 75–83.
- [6] S.Y. Chang, C.H. Liao, Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.* 959 (2002).
- [7] I. Hanke, H. Singer, J. Hollender, 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 (2008) 2265–2276.
- [8] A.E. Smith, Transformation of the herbicide [14C]glufosinate in soil., *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 267–271.
- [9] M. Tsuji, Y. Akiyama, M. Yano, Simultaneous determination of glufosinate and its metabolite, and glyphosate in crops., *Anal. Sci.* 13 (1997) 283–285.
- [10] H.A. Moye, C.L. Deyrup, A Single-Step Derivatization Method for the Gas

Chromatographic Analysis of the Herbicide Glyphosate and Its Metabolite., *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984) 192–195.

[11] N. Tsunoda, Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 637 (1993) 167–173. doi:10.1016/0021-9673(93)83209-B.

[12] C.L. Deyrup, S.M. Chang, A. Weintraub, H.A. Moyer, Simultaneous Esterification and Acylation of Pesticides for Analysis by Gas Chromatography. 1. Derivatization of Glyphosate and (Aminomethyl)phosphonic Acid with Fluorinated Alcohols-Perfluorinated Anhydrides., 33 (1985) 944–947. doi:10.1080/09571739985200061.

[13] C.D. Stalikas, G.A. Pilidis, M.I. Karayannis, An integrated gas chromatographic method towards the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides, *Chromatographia.* 51 (2000) 741–746. doi:10.1007/BF02505414.

[14] McNair, H. M., J.M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., 2009.

[15] J. Cazes, R.P.W. Scott, *Chromatography Theory*, 2002.

[16] T. Holm, J.Ø. Madsen, T. Holm, J.Ø. Madsen, Methane Formation by Flame-Generated Hydrogen Atoms in the Flame Ionization Detector, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3607–3611.

[17] J.H. Gross, *Mass spectrometry: a textbook.*, Heidelberg, 2004.

[18] R.A.W. Johnstone, M.E. Rose, *Mass spectrometry for chemist and biochemist.*, 1996.

[19] C.G. Herbert, R.A.W. Johnstone, *Mass spectrometry basics.*, CRC Press, 2003.

[20] E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry. Principles and applications.*, Wiley, 1999.

[21] R.L. Grob, E.F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, 2004.

[22] Guía de selección de columnas Agilent J & W para GC., (2010).

- [23] E.A. Mistryukov, R.B. Golovnya, A.L. Samusenko, High-Pressure static coating of glass capillary columns., *J. Chromatogr.* 148 (1978) 490–494.
- [24] G. Alexander, S.R. Lipsky, Factors Effecting film Thickness in Glass Capillary Chromatographic Columns Coated by the Mercury Plug., *Chromatographia*. 10 (1977) 478.
- [25] R.L. Barry, E. F.; Grob, *Columns for Gas Chromatography. Performance and Selection*, John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- [26] F.R. González, Application of capillary gas chromatography to studies on solvation thermodynamics, 1037 (2004) 233–253. doi:10.1016/j.chroma.2003.11.024.
- [27] J.O. Grisales, C. Exactas, Desarrollo de capilares conteniendo derivados de β -ciclodextrina como fases estacionarias quirales para cromatografía gaseosa capilar., (2010).
- [28] E. Börjesson, L. Torstensson, New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil., *J. Chromatogr. A*. 886 (2000) 207–216.