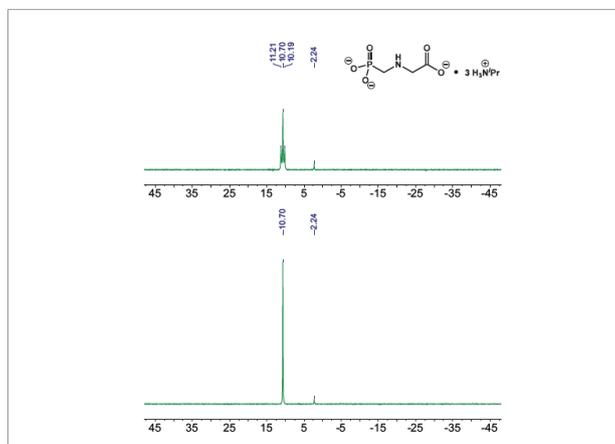


## ANALISI DI ERBICIDI, INSETTICIDI E FERTILIZZANTI TRAMITE $^{31}\text{P}$ NMR DA BANCO

A causa del loro ruolo fondamentale nell'agricoltura, pesticidi e fertilizzanti sono stati oggetto di molti studi.<sup>1,2</sup> A causa del fatto che questi possono spesso penetrare nei corsi d'acqua, le sottoclassi di pesticidi, erbicidi e insetticidi, sono state oggetto di molte critiche nel corso degli anni, in particolare per quanto riguarda il loro impatto ambientale potenzialmente duraturo e il loro assorbimento da parte degli organismi viventi.<sup>3,4</sup> Tali prodotti sono controllati sia dalle agenzie sanitarie che da quelle di regolamentazione ed esistono diversi metodi per l'analisi qualitativa e quantitativa dei loro principi attivi, così come il resto delle loro formulazioni commerciali. Spesso, la gascromatografia-spettrometria di massa (GC/MS o GC/MS/MS) o la cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC/MS o LC/MS/MS) vengono utilizzate per identificare e quantificare questi componenti, anche se sono presenti in concentrazioni estremamente basse.<sup>5</sup>

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è un altro strumento molto potente che consente ai chimici di analizzare questi tipi di prodotti.<sup>6,7</sup> Mentre l' $^1\text{H}$  rimane il nuclide più utilizzato per la NMR, l' $^{31}\text{P}$  eteronucleare offre un'elegante alternativa per queste analisi.<sup>8,9</sup> Gli eteronuclidi hanno molte finestre di spostamento chimico, più ampie rispetto ai protoni, riducendo al minimo la sovrapposizione del segnale e sono ideali per l'identificazione e la quantificazione dei picchi nelle miscele. Gli organofosfati costituiscono un'importante classe di pesticidi e fertilizzanti comunemente usata dagli agricoltori di tutto il mondo e, sebbene alcuni di questi prodotti siano disponibili per l'uso domestico, molti sono limitati per operazioni agricole su larga scala.<sup>10</sup>

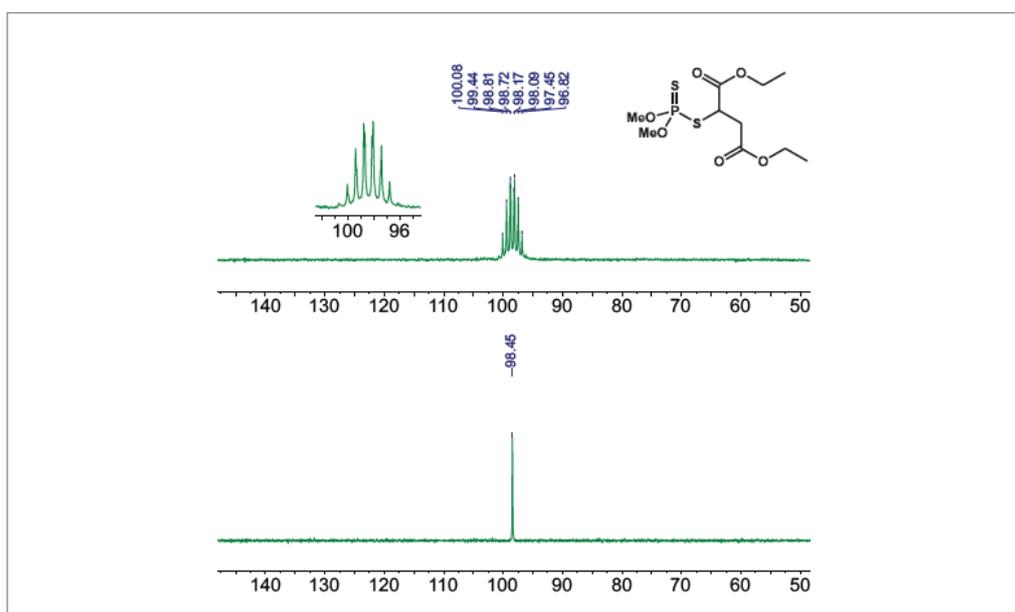
I principi attivi degli organofosfati sono particolarmente adatti per l'analisi NMR  $^{31}\text{P}$ . Sfortunatamente, i significativi costi iniziali e ricorrenti dei tradizionali spettrometri NMR ad alto campo, così come i loro requisiti di spazio e la necessità di manutenzione ordinaria, significano che questi sono spesso proibitivi. L'emergere di strumenti NMR da banco ad alta risoluzione negli ultimi anni rende questa tecnologia più accessibile che mai, consentendo agli utenti non esperti di raccogliere spettri NMR in modo rapido e semplice. Inoltre, l' $^{31}\text{P}$  NMR è una tecnica intrinsecamente quantitativa (qNMR), il che significa che l'area sotto la curva è direttamente proporzionale al numero di nuclei in ciascun ambiente chimico che dà origine a questo segnale. Ciò significa che non sono richiesti standard analitici specifici per quantificare i componenti nelle miscele.



**Figura 1. Spettri NMR  $^{31}\text{P}$  (24,3 MHz) del glifosato (sale di isopropilammina) nel superconcentrato Roundup® puro. In alto: disaccoppiamento  $^1\text{H}$  disattivato. In basso: disaccoppiamento  $^1\text{H}$  attivato.**

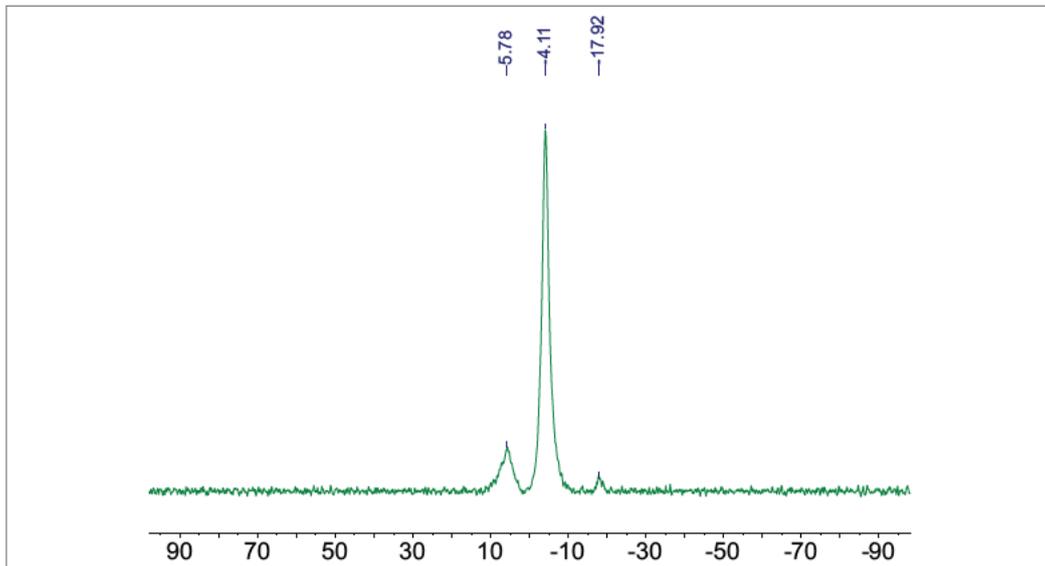
Uno degli erbicidi più diffusi al mondo, Roundup®, contiene il principio attivo glifosato, presente come sale di isopropilammina. Gli spettri  $^{31}\text{P}$  NMR di Roundup® Super Concentrate puro raccolti su uno spettrometro da banco a 60 MHz sono mostrati nella Figura 1. Nello spettro disaccoppiato  $^1\text{H}$ , si osserva un singoletto nitido corrispondente al glifosato a 10,7 ppm, insieme a una piccola impurità intorno a 2,2 ppm. Nello spettro accoppiato  $^1\text{H}$ , si osserva un tripletto dovuto all'accoppiamento tra il fosforo e i protoni di metilene adiacenti. Sospettiamo che l'impurità minore possa essere l'acido fosforoso ( $\text{H}_3\text{PO}_3$ ), un possibile prodotto di degradazione del glifosato, ma non lo abbiamo confermato nel nostro laboratorio.<sup>12</sup>

Un insetticida domestico molto comune, il malathion, può anche essere analizzato utilizzando  $^{31}\text{P}$  NMR. Gli spettri per questo prodotto sono mostrati nella Figura 2, come una soluzione 1:1 in toluene- $d_8$ . Sebbene questo prodotto sia formulato come una miscela al 50% in distillati di petrolio, si osserva una singola risonanza poiché stiamo osservando solo specie contenenti fosforo. Quando viene attivato il disaccoppiamento  $^1\text{H}$ , si osserva un singoletto acuto, ma quando viene disattivato, si può vedere un multipletto complesso, dovuto all'accoppiamento tra il fosforo, i due frammenti di metile adiacenti e probabilmente il frammento C-H adiacente allo zolfo.



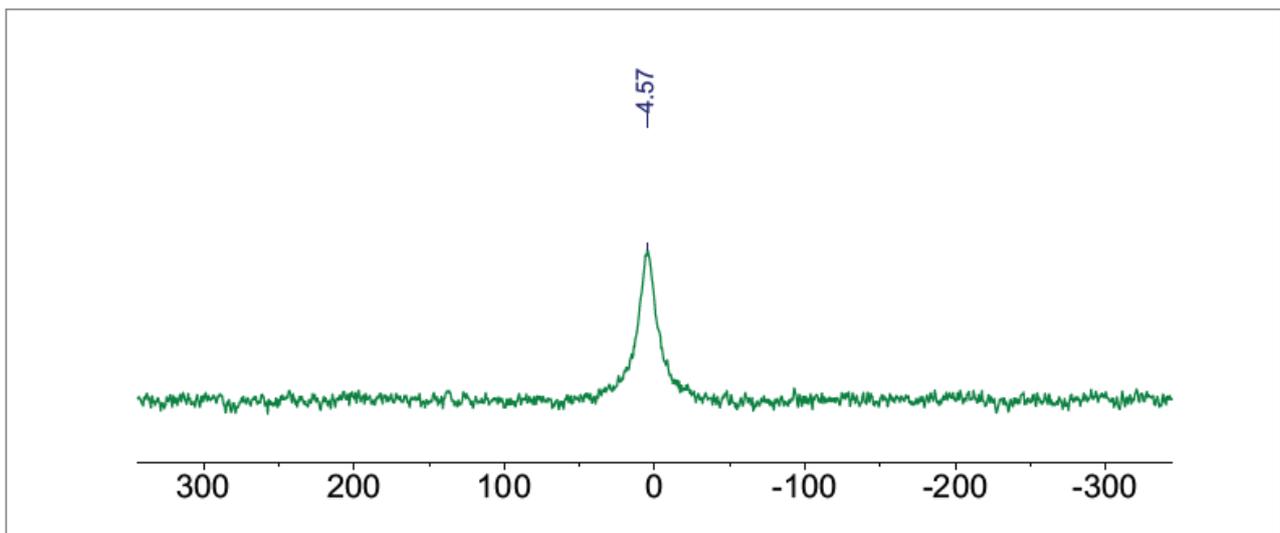
**Figura 2. Spettri NMR  $^{31}\text{P}$  (24,3 MHz) di Malathion Concentrate Insecticide® nel 50% di Malathion Concentrate Insecticide®, preparato come soluzione 1:1 in toluene- $d_8$ . In alto: disaccoppiamento  $^1\text{H}$  disattivato. In basso: disaccoppiamento  $^1\text{H}$  attivato.**

I fertilizzanti sono fondamentali per garantire che le piante e le colture ricevano i nutrienti adeguati. Questi sono in genere etichettati utilizzando la notazione "NPK", con numeri come 20-20-20, che indicano che il fertilizzante è composto dal 20% in peso di specie di azoto (N), fosforo (P) e potassio (K). Inoltre, i fertilizzanti contengono spesso metalli chelati importanti per la crescita delle piante, come zinco, manganese, ferro e rame. Lo spettro  $^{31}\text{P}$  NMR di Schultz™ Liquid Plant Food (10-15-10) è mostrato nella Figura 3, preparato sciogliendo 50 mL del prodotto in 550 mL di  $\text{D}_2\text{O}$ . A causa della presenza di specie metalliche chelate paramagnetiche in soluzione, si osserva un significativo allargamento del segnale quando si utilizza troppo prodotto per l'analisi. Tuttavia, è stato trovato un buon equilibrio utilizzando queste quantità, consentendo l'osservazione di tre distinti segnali ampi, centrati intorno a 5,8 ppm, -4,1 ppm e -17,9 ppm. Sebbene queste singole specie non siano state identificate esplicitamente, corrispondono bene alle specie di fosfati note nei fertilizzanti, come gli ortofosfati (5,8 ppm), i pirofosfati (-4,1 ppm) e i polifosfati (-17,9 ppm).<sup>8</sup>



**Figura 3. Spettro NMR  $^{31}\text{P}$  (24,3 MHz) di specie contenenti fosforo in Schultz™ All Purpose Liquid Plant Food (10-15-10), preparato come soluzione diluita in  $\text{D}_2\text{O}$ .**

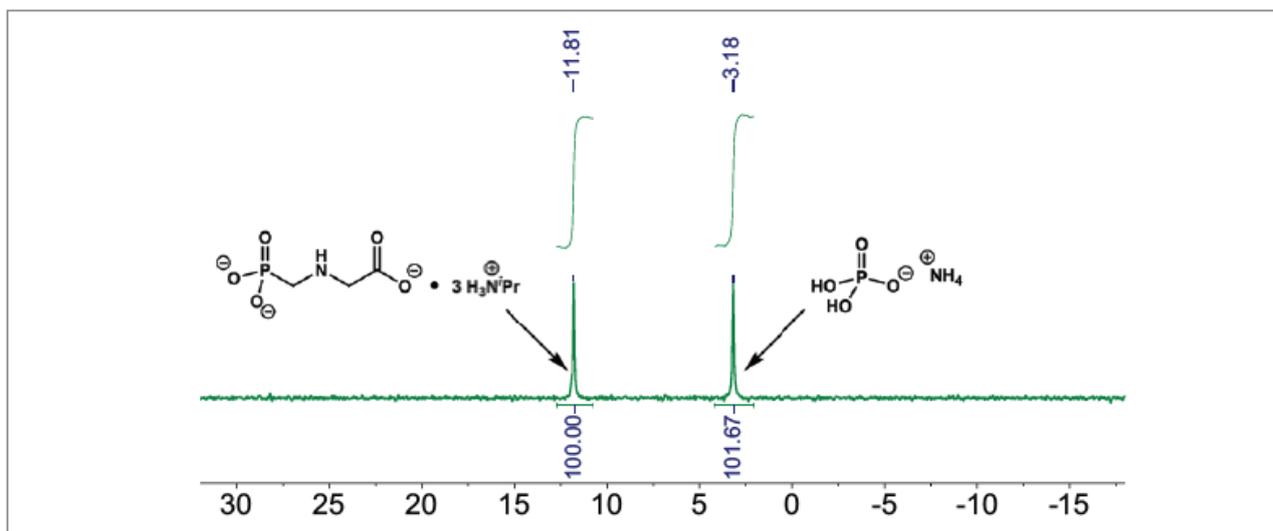
Per illustrare le differenze nelle specie contenenti fosforo presenti nei diversi fertilizzanti, è stato analizzato un campione di Miracle Gro® Water Soluble Plant Food (20-20-20) sciogliendo un campione da 60 mg in  $\text{D}_2\text{O}$ . Come il fertilizzante Schultz, la presenza di specie metalliche chelate porta ad un importante allargamento del segnale nello spettro  $^{31}\text{P}$ , mostrato in Figura 4. Infatti, l'ampiezza del picco a metà altezza è stata misurata intorno ai 300 Hz, il che rende difficile accertare se altre specie di fosfati sono nascoste sotto questa risonanza, o se questo campione contiene solo ortofosfati.



**Figura 4. Spettro NMR  $^{31}\text{P}$  (24,3 MHz) di specie contenenti fosforo in Miracle Gro® Water Soluble Plant Food (20-20-20), preparato come soluzione diluita in  $\text{D}_2\text{O}$ .**

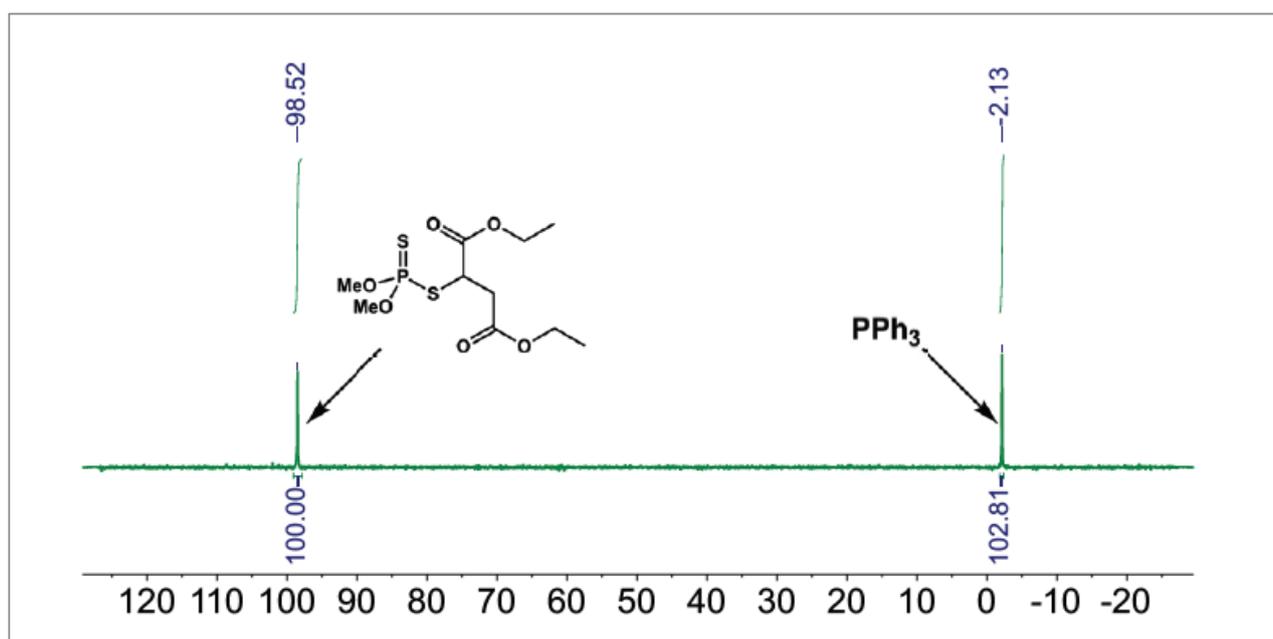
La quantificazione del fosforo mediante  $^{31}\text{P}$  NMR è semplice, a condizione che il calibrante interno utilizzato abbia una purezza nota,<sup>13</sup> sia solubile e stabile nel mezzo di analisi e che i suoi segnali non si sovrappongano agli altri nel campione.<sup>14-16</sup> Il contenuto di glifosato in Roundup® Super Concentrate è elencato come 356 g/L, insieme all'altro componente principale che è l'acqua. Come tale, il fosfato di ammonio solubile in acqua monobasico (APM) è stato utilizzato come calibratore interno per quantificare il contenuto di glifosato in questo prodotto. È stata preparata una soluzione madre di APM in  $\text{D}_2\text{O}$  e una quantità accurata è stata aggiunta a un volume misurato con precisione di Roundup® Super concentrato (47,4 mL, 16,9 mg). Il campione è stato analizzato in triplicato utilizzando un ritardo di scansione di 20 secondi per garantire che tutti i giri di interesse si era completamente rilassato tra le scansioni. I risultati qNMR di questa analisi hanno

fornito una massa media di glifosato di 16,6 mg, corrispondente molto strettamente alla quantità teorica di 16,9 mg. Inoltre, i valori triplicati di 16,5 mg, 16,4 mg e 17,0 mg sono molto simili. Uno degli spettri  $^{31}\text{P}$  utilizzati per qNMR è presentato in Figura 5.



**Figura 5. Spettro NMR  $^{31}\text{P}$  (24,3 MHz) di Roundup® Super Concentrate e ammonio fosfato monobasico in  $\text{D}_2\text{O}$ , utilizzato per la quantificazione del glifosato.**

Questo stesso approccio fondamentale può essere utilizzato per quantificare il 50% di Malathion Concentrate Insecticide®, ma deve essere utilizzato un calibrante interno diverso a causa della natura alifatica della miscela. Per questo studio, è stata preparata una soluzione madre di trifenilfosfina in toluene- $\text{d}_8$  e una quantità precisa è stata aggiunta ad una soluzione accuratamente pesata del prodotto Malathion. Il campione è stato analizzato in triplicato utilizzando un ritardo di scansione di 10 secondi. È stata calcolata una composizione media del 48,9% di Malathion (% in peso), che corrisponde quasi perfettamente alla composizione sull'etichetta (50%). Inoltre, i valori triplicati di 48,9%, 49,0% e 48,9% sono molto simili. Uno degli spettri  $^{31}\text{P}$  NMR utilizzati per qNMR è presentato nella Figura 6.



**Figura 6. Spettro NMR  $^{31}\text{P}$  (24,3 MHz) del 50% di Malathion Concentrate Insecticide® e trifenilfosfina in toluene- $\text{d}_8$ , utilizzato per la quantificazione del Malathion.**

Come dimostrato in questa nota applicativa, l'uso dell'NMR eteronucleare è un modo molto potente di analizzare molecole che potrebbero altrimenti esibire spettri  $^1\text{H}$  complessi o i cui spettri potrebbero essere sovrapposti dagli altri componenti della miscela, come acqua o distillati di petrolio. Ciò è particolarmente applicabile a molti erbicidi, insetticidi e fertilizzanti poiché spesso contengono eteroatomi come fosforo o fluoro. Questo studio mostra solo una piccola parte dei tipi di prodotti in queste aree che possono essere analizzati utilizzando la spettroscopia NMR da banco. Se hai domande sulle analisi presentate qui utilizzando NMR da banco o su come incorporare i nostri strumenti nel tuo flusso di lavoro, non esitare a contattarci!

## References

- [1] Geisseler, D.; Scow, K. M. *Soil Biol. Biochem.* 2014, 75, 54–63.
- [2] Jikomes, N.; Zoorob, M. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1–15.
- [3] Van Wijngaarden, R. P. A.; Brock, T. C. M.; Van Den Brink, P. J. *Ecotoxicology* 2005, 14, 355–380.
- [4] Rani, L.; Thapa, K.; Kanojia, N.; Sharma, N.; Singh, S.; Grewal, A. S.; Srivastav, A. L.; Kaushal, J. J. *Clean. Prod.* 2021, 283, 124657.
- [5] Alder, L.; Greulich, K.; Kempe, G.; Vieth, B. *Mass Spectrom. Rev.* 2006, 25, 838–865.
- [6] Krolski, M. E.; Bosnak, L. L.; Murphy, J. J. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 458–461.
- [7] Keith, L. H.; Alford, A. L. *J. AOAC Int.* 1970, 53, 1018–1035.
- [8] Cade-Menun, B. J.; Carter, M. R.; James, D. C.; Liu, C. W. *J. Environ. Qual.* 2010, 39, 1647–1656.
- [9] Cade-Menun, B. J. *Talanta* 2005, 66, 359–371.
- [10] Kwong, T. C. *Ther. Drug Monit.* 2002, 24, 144–149.
- [11] Rundlöf, T.; Mathiasson, M.; Bekiroglu, S.; Hakkarainen, B.; Bowden, T.; Arvidsson, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 52, 645–651.
- [12] Kudzin, M. H.; Zylla, R.; Mrozinska, Z.; Urbaniak, P. *Water* 2019, 11.
- [13] Pauli, G. F.; Chen, S. N.; Simmler, C.; Lankin, D. C.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Napolitano, J. G. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 9220–9231.
- [14] Beyond structural elucidation, introduction to qNMR – Part I (<https://www.nanalysis.com/nmready-blog/2019/2/27/beyond-structural-elucidation-introduction-to-qnmrpart-i>) (accessed May 10, 2021).
- [15] Beyond Structure Elucidation - Introduction to qNMR Part II - Calibrants (<https://www.nanalysis.com/nmready-blog/2019/4/17/beyond-structure-elucidation-introductionto-qnmr-part-ii>) (accessed May 10, 2021).
- [16] Beyond Structural Elucidation - Introduction to qNMR Part III - Relaxation Delays (<https://www.nanalysis.com/nmready-blog/2019/5/30/beyond-structural-elucidationintroduction-to-qnmr-part-iii-relaxation-delays>) (accessed May 10, 2021).