

Stanovení glyfosátu a AMPA ve vodách metodou HPLC s fluorescenční detekcí

ing. Alena Svobodová
Hana Donátová







Obsah příspěvku

- Vlastnosti a použití glyfosátu
- Metody přípravy vzorků
- Analytické postupy stanovení ve vodách
- Přehled dostupných norem a povolených limitů
- Zařízení, na kterém se provádělo měření
- Testované kolony a chromatografické podmínky stanovení
- Dosavadní výsledky a získané zkušenosti

Úvod

- Glyfosát se používá jako širokospektrální systémový neselektivní herbicid aplikovaný postřikem přímo na list rostlin na zemědělských plochách, v lesích i na plochách s všeobecným použitím
- AMPA (kyselina aminomethylfosfonová) je hlavním metabolitem glyfosátu

Specifikace sledovaných látek

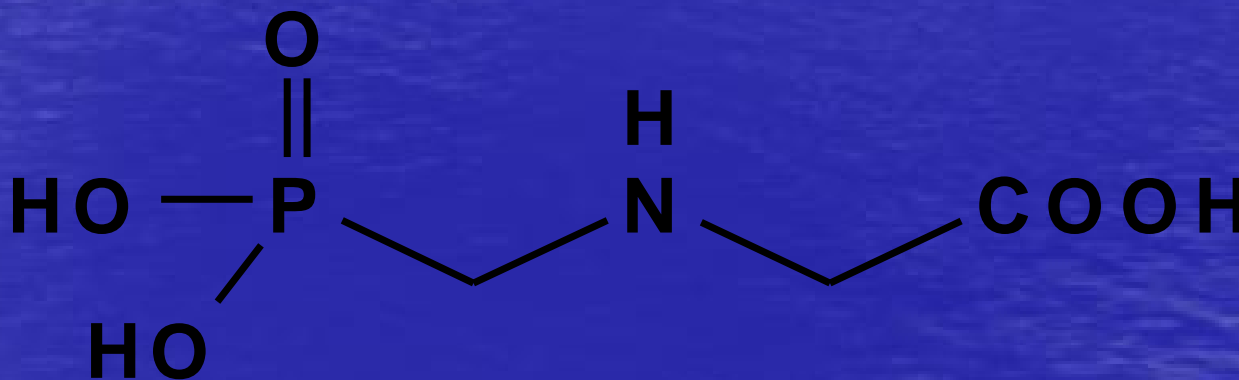
Glyfosát – Glyphosate

IUPAC názvosloví: N-(phosphonomethyl)glycine

CAS Number: 1071-83-6

Molekulová hmotnost: 169,08 g/mol

Strukturní vzorec:



Specifikace sledovaných látek

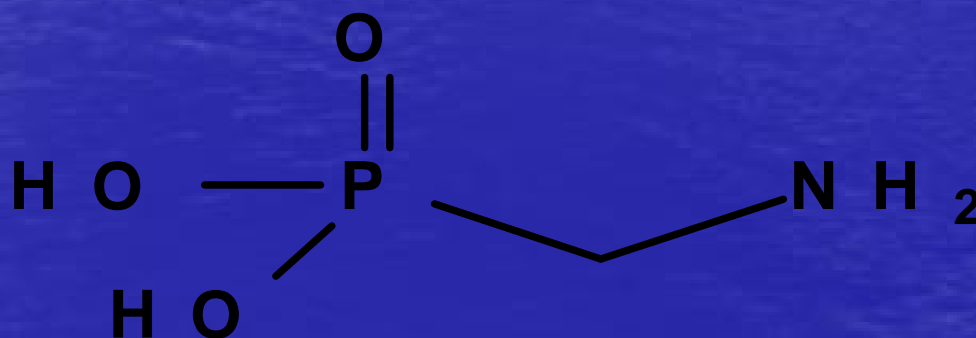
AMPA – kyselina aminomethylfosfonová

IUPAC názvosloví: Aminomethylphosphonic acid

CAS Number: 1066-51-9

Molekulová hmotnost: 111,04 g/mol

Strukturní vzorec:



Vlastnosti glyfosátu

- bílá krystalická látka bez zápachu
- nízká tenze par
- vysoká rozpustnost ve vodě
- silná sorpce na pevné částice
- ve většině organických rozpouštědel nerozpustný nebo se rozpouští jen omezeně
- slabá organická kyselina, iontová forma výskytu závisí na pH prostředí

Působení na rostliny a živočichy

- Rychlý účinek daný rychlým prostupem z nadzemních částí rostlin do podzemních
Blokace aktivity enzymů, které rostliny používají při tvorbě aminokyselin, nezbytných k vytvoření proteinů podmiňujících růst
- Pro savce nízká akutní i chronická toxicita po orálním užití a dermálním kontaktu
Živočichové získávají aminokyseliny přímo z potravy a popsáný biosyntetický proces u nich neprobíhá
- Pokud u člověka pozorovány nepříznivé účinky po požití přípravku, vysvětleny jako účinky pomocných látek pro aplikaci
Při práci nutné dodržovat hygienická pravidla

Chování ve vodách a v půdě

- Vzhledem k silným adsorpčním vlastnostem se váže na půdní částice, z nichž se může louhovat a druhotně ho mohou absorbovat necílové rostliny
- Vzhledem k nízké mobilitě v půdě se nepředpokládá významná kontaminace podzemních vod
- Do povrchových vod se dostává po přímých aplikacích v bezprostřední blízkosti toků. Nálezy potvrzeny i několik kilometrů po proudu toku od místa aplikace

Degradace

- V půdách střední perzistence s poločasem rozpadu 12 hodin až 7 týdnů (174 dní)
- Degradace především mikrobiálně
Za aerobních podmínek rychleji než v anaerobních podmínkách
Podíl chemického rozkladu a fotolýzy je zanedbatelný
- Při degradaci jsou štěpeny vazby mezi uhlíkem a dusíkem za vzniku AMPA, hlavního metabolitu glyfosátu ve vodě a půdě
AMPA se samostatně komerčně nevyužívá. Má podobnou chemickou strukturu a vlastnosti jako glyfosát

Přípravky na bázi glyfosátu

- 1971 vývoj glyfosátu Monsanto
1974 výroba prvních herbicidů
1980 jedny z nejpoužívanějších na světě
- Nejznámější komerční přípravky
Roundup (Monsanto), obsahuje isopropylaminovou sůl glyfosátu v ekvivalentu 360 mg/l volné kyseliny
Touchdown (Zeneca Ag Products)
Touchdown Quattro (Syngenta)
- Uvedené přípravky jsou běžně dostupné i v ČR

Mezinárodní legislativa

- Maximální povolená dávka pro člověka podle Světové zdravotnické organizace **WHO** (program Water Sanitation and Health) činí **0,3 mg glyfosátu/kg tělesné váhy a den**
- Prováděcí vyhláška **Sanco/221/2000 (2003) k směrnici 91/414/EEC** o stanovení závažnosti aktivních látek uvedených ve směrnici a jejich relevantních metabolitů pro podzemní vodu (tj. včetně glyfosátu a AMPA) povoluje s odkazem na Směrnici EU o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu 98/83/EC maximální zbytkovou koncentraci na úrovni **0,1 µg/l**
- Limitní hodnota Směrnice pro ochranu vodních organismů **CCME** (Canadian Council of Ministers of the Environment) je stanovena na **65 µg/l**
- Podle Americké agentury pro ochranu životního prostředí **EPA** je maximální povolená koncentrace glyfosátu v pitné vodě **0,7 mg/l**
- Řádově vyšší hodnotu pro glyfosát ve vodách **2 mg/l** povolují Water Quality Management Criteria Items vydané **japonským Ministry of Health, Labour and Welfare Ordinance** v roce 2003

Česká legislativa

- V české legislativě se limitní hodnoty pro glyfosát objevují ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví **272/2008 Sb.**, o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v potravinách a surovinách

Jsou zde uvedeny prozatímní MLR (maximální limity reziduí, mg/kg) pro glyfosát v potravinách rostlinného a živočišného původu, např. v obilninách, ovoci, zelenině, vejcích, mase a mléčných výrobcích

Pro ilustraci povolená hodnota pro pšenici je **10 mg/kg**, hrozny **0,5 mg/kg**, mléko a mléčné výrobky **0,05 mg/kg**

- Požadavek **ČHMÚ** na mez stanovitelnosti glyfosátu pro monitoring jakosti vod ve vodárenských nádržích je **0,05 µg/l**

Možnosti stanovení ve vodách

- Vzhledem k polárnímu charakteru, nízké těkavosti, nízké rozpustnosti v organických rozpouštědlech a vysoké rozpustnosti ve vodě je stanovení glyfosátu a AMPA oproti dalším herbicidům běžně používaným v zemědělství relativně komplikované, často s nízkou výtěžností
- Problematická je i detekce, protože tyto látky v molekule postrádají chromofory i fluorofory

Příprava vzorků

- Řada metod, zahrnujících kombinace koncentračního kroku, čištění extraktu a derivatizace
- Klasická L-L extrakce organickými rozpouštědly nelze vzhledem k polárnímú charakteru látek použít, využívá se SPE v in-line i off-line provedení
- Vzhledem k amfoternímú charakteru glyfosátu lze pro SPE použít anion- i cation-exchange sorbenty
- U některých postupů se nejprve glyfosát a AMPA zderivatizují. Adiční sloučeniny lze ze vzorku vyextrahovat metodou L-L, jejich polarita je nižší než u výchozích sloučenin

Analytické stanovení

- Několik způsobů, preferují se metody HPLC/FD a LC/MS v single nebo tandemovém uspořádání
- Lze použít GC/MS, ale i s detektory ECD a NPD
- Možné je využití IC/UV, vodivostní nebo ICP - MS detekcí, popř. kapilární elektroforézy s elektrochemiluminiscenční detekcí

Derivatizace

- Pro fluorescenční detekci nutná reakce s derivatizačními činidly za vzniku fluoreskujících derivátů, pre- nebo post-kolonové provedení
- Derivatizační činidla pro pre-kolonovou derivatizaci
9-fluorenyl(methyl)chloroformát (FMOC-Cl), dansylchlorid, p-toluensulfonylchlorid nebo phenylisothiokyanát
- Pro post- kolonovou derivatizaci
o-phthaldialdehyd (OPA), ninhydrin, činidlo Al^{+3} -morin.
Oproti běžné HPLC instrumentaci nutné zařízení k provádění post-kolonové derivatizace
- Pro GC/MS
směs anhydridu k. trifluoroctové a trifluoroethanolu, která převádí glyfosát a AMPA na těkavé deriváty

Přehled norem pro stanovení glyfosátu a AMPA ve vodách

- EPA Method 547 - HPLC/FD s post-kolonovou derivatizací (1990)
- DIN 38407-22 (stejný princip, 2001)
- ISO 21458:2008 - HPLC/FD s pre-kolonovou derivatizací pomocí FMOC-Cl (XI/2008)

Stanovení podle ISO 21458:2008

- Norma je určena pro stanovení glyfosátu a jeho metabolitu AMPA v pitné, podzemní a povrchové vodě s mezí stanovitelnosti 0,05 µg/l
- Je založena na derivatizaci glyfosátu a AMPA pomocí derivatizačního činidla FMOC-Cl v alkalickém prostředí a stanovení pomocí HPLC s fluorescenční detekcí

Rušivé vlivy

- Přítomnost dvoumocných kationtů Ca, Cu, Fe a Zn - vznik komplexů - negativní chyba
Odstranění - předúprava pomocí k. chlorovodíkové a hydroxidu draselného nebo k. štavelové
- Přítomnost volného aktivního chloru ve vodě upravované na pitnou - oxidace analytů
Odstranění - thiosíran sodný
- Adsorpce analytů na skleněný povrch - plastové vzorkovnice a zkumavky
Skleněné nádoby (vialky do autosamplerů) - mytí bez detergentů a korozivních látek

Postup

- Podíl vzorku vody (přeúprava)
- Úprava pH
- Přídavek diethyletheru
- Protřepání, usazení
- Odběr vodné fáze
- Přídavek ACN, FMOC-Cl
- Zastavení derivatizace k. fosforečnou
- Přídavek diethyletheru
- Třepání, usazení
- Převedení vodné fáze k měření

Analytické kolony, podmínky detekce

Dva typy analytických kolon:

- kolona s reverzní fází (silikagel modifikovaný oktadecylovými řetězci C18)
- kolona s polární stacionární fází (silikagel s navázanými NH_2 skupinami)

Optimální kombinace vlnových délek pro FD:

- excitační 260 nm
- emisní 310 nm

Experimentální část

- Cílem práce bylo ověřit postup stanovení glyfosátu a AMPA ve vodách podle normy ISO 21458:2008 v podmínkách laboratoře VÚV T.G.M. Praha

Příprava vzorků

- Jako vhodná voda pro testování metody byla vytipována přírodní pramenitá voda Rosana firmy Rosa Bohemia s.r.o.
- Pro sestavení kalibračních křivek byly připraveny koncentrace glyfosátu a AMPA v rozsahu 0,05 – 0,1 – 0,5 – 1,0 – 2,0 µg/l. Výrobce standardů je Dr. Ehrenstorfer
- Vzorky vody s přidávkou standardů byly zpracovány postupem přesně podle návodu normy ISO 21458:2008

Zařízení



Výběr kolony

- Kolona s C18 řetězci
Nucleosil 100-5 C18-AB (Grom)
rozměry 300 x 4 mm, velikost částic 5 μm
- Kolona s NH_2 skupinami
LiChrospher 100 NH_2 (Merck)
rozměry 250 x 4 mm, velikost částic 5 μm

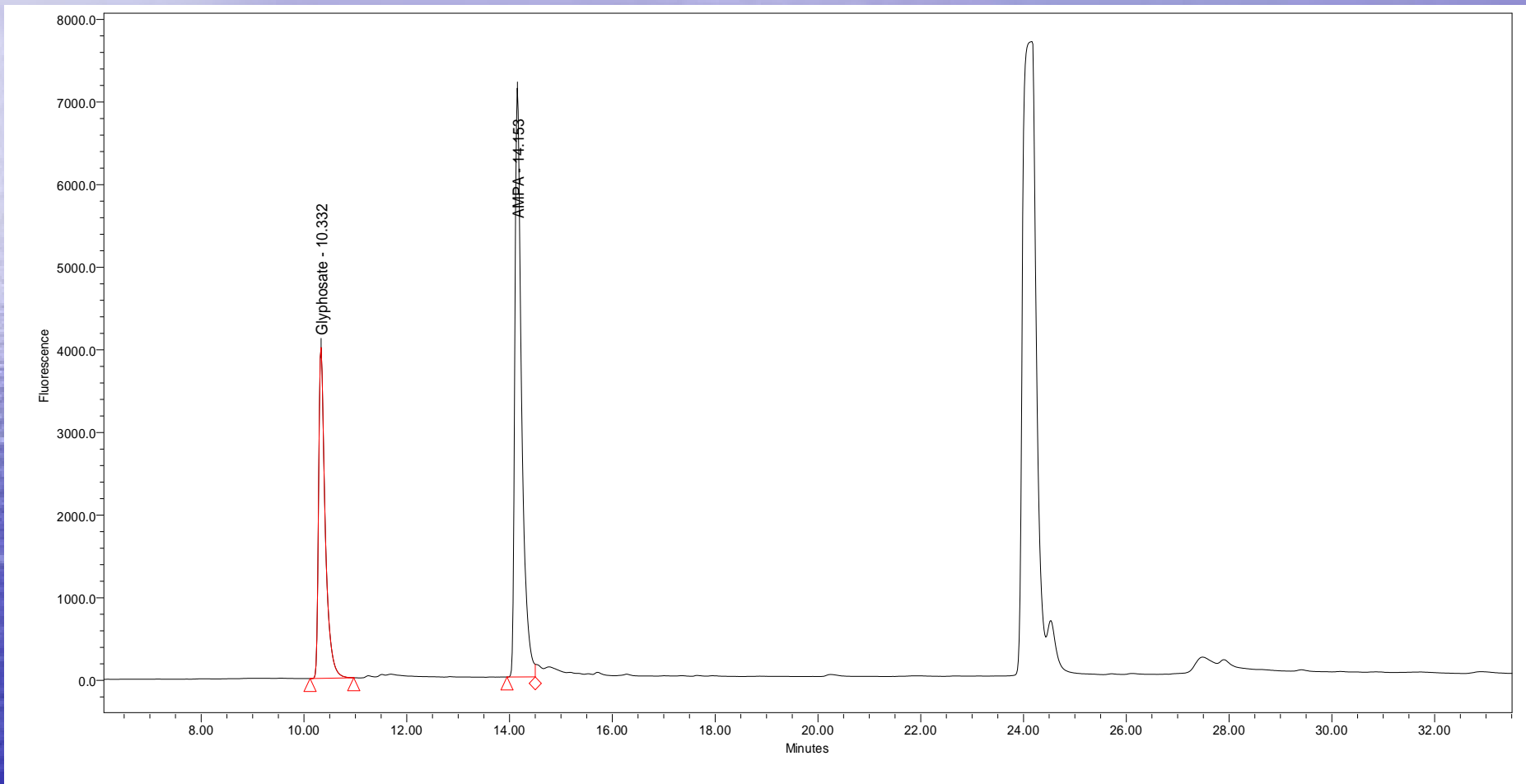
Podmínky měření na koloně C18

- Teplota na koloně 30 °C
- Průtok mobilní fáze 1 ml/min
- Složení mobilní fáze
ACN/dihydrogenfosforečnanový
pufr (pH = 7)
- Nastavení vlnových délek FD
260/310 nm
- Nastavení citlivosti FD
v oblasti eluce analytů maximální,
pro FMOC-Cl minimální

- Závislost složení mobilní fáze na čase

as (min)	ACN (%)	pufr (%)
0	7	93
25	57	43
27	95	5
35	95	5
37	7	93

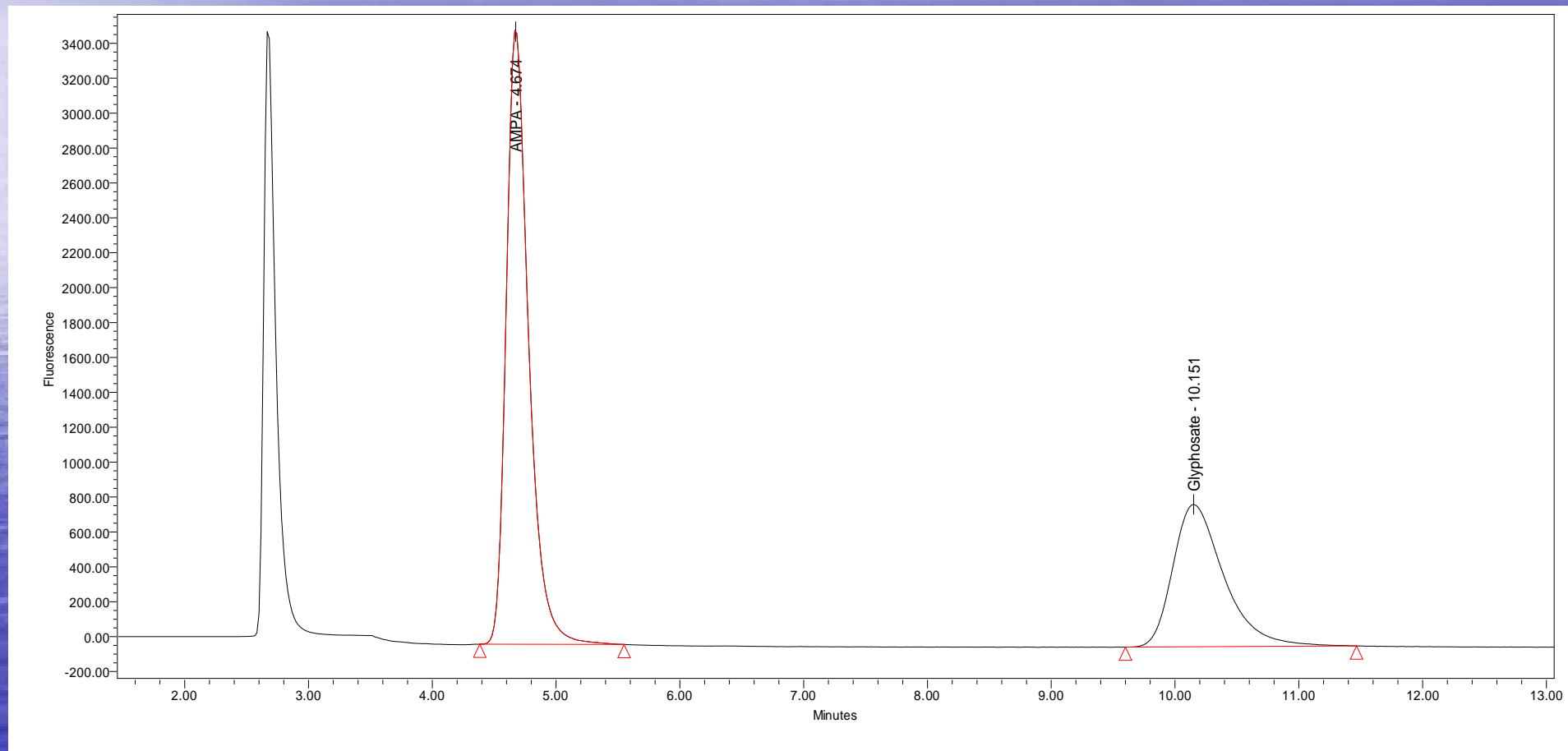
Záznam analýzy standardu glyfosátu a AMPA na koloně C18



Podmínky měření NH₂ koloně

- Teplota na koloně 30 °C
- Průtok mobilní fáze 1 ml/min
- Složení mobilní fáze ACN/dihydrogenfosforečnanový pufr (pH = 5,4)
- Izokratická eluce poměru 30/70 (v/v)
- Nastavení vlnových délek FD 260/310 nm
- Nastavení citlivosti FD
v oblasti eluce analytů maximální, pro FMOC-Cl minimální

Záznam analýzy standardu glyfosátu a AMPA na koloně NH₂



Hodnocení testovaných kolon

- C18
Pořadí píků derivát Gly, AMPA a FMOC-Cl,
Pro měřitelnost koncentrace 0,05 µg/l je nutný objem
nástriku na kolonu 50 µl
Délka analýzy vč. kondicionace 45 min
- NH₂
Pořadí píků obrácené, FMOC-Cl, Gly, AMPA
Odezvy nižší, koncentrace 0,05 µg/l není měřitelná
Délka analýzy 20 min
Nevýhodou podle literatury nízká životnost a změny
retenčních časů během stárnutí kolony

Nucleosil 100-5 C18-AB (Grom)

- Kolona doplněná předkolonkou se stejným sorbentem
- Na koloně provedena validační měření, tj. potvrzena linearita kalibračních křivek, ověřena mez stanovitelnosti a zjištěna opakovatelnost celým postupem z vícenásobných měření na dvou koncentračních úrovních
 $Rep_{Gly} = 16 \%$, $Rep_{AMPA} = 14 \%$
- Kontrola výtěžnosti metody (spike 0,5 $\mu\text{g/l}$)
 $Rec_{Gly} = 74,9 \%$, $Rec_{AMPA} = 97,6 \%$
- Ověřeno, že stanovení není rušeno látkami přítomnými v reálných vzorcích

Monitoring vodárenských nádrží

- Počet profilů: 25 v Čechách, 21 na Moravě
- Odběry: červenec – říjen
- Počet dosud změřených vzorků: 83
- Kontrola sumy Ca+Mg:
u všech < 3 mmol/l, tj. bez přeúpravy

Monitoring vodárenských nádrží

- Orientační přehled dosavadních výsledků stanovení glyfosátu a AMPA ($\mu\text{g/l}$)

Glyfosát				
Rozmezí koncentrací	< 0,5	0,5 - 1,0	1,0 - 3,0	3,0 - 6,5
18 nálezů/ 11 přehrad	9	1	4	4
AMPA				
Rozmezí koncentrací	< 0,1	0,1 - 0,5		
14 nálezů/ 12 přehrad	5	9		

Monitoring vodárenských nádrží

- Ukázka výsledků stanovení glyfosátu ($\mu\text{g/l}$)

Glyfosát					
Žlutice		Lučina		Boskovice	
14/7/09	0,33	21/7/09	2,45	20/7/09	1,49
3/8/09	3,05	11/8/09	5,34	20/8/09	6,33
8/9/09	6,11				

Závěr

- Bylo ověřeno, že postup specifikovaný v normě ISO 21458:2008 lze aplikovat na rutinní stanovení glyfosátu a AMPA ve vodných vzorcích včetně zajištění deklarované meze stanovitelnosti 0,05 µg/l
- Zároveň je nutné konstatovat, že příprava vzorků k měření vyžaduje vysoký podíl manuální práce a je relativně časově náročná
- Hydroprojekt – příprava ČSN ISO 21458