

Afdeling Organische Contaminanten

1986-08-18

RAPPORT 86.76 Pr.nr. 505.0400

Onderwerp: Literatuuroverzicht
glyphosate.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling OCON,
bibliotheek (1x), projectleider, projectbeheer, circulatie.

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
bestrijdingsmiddelen en (organische) contaminanten.

Onderwerp: Literatuuroverzicht glyphosate.

Bijlage: 1

Doel:

Het raadplegen en samenvatten van de literatuur, betreffende glyphosate, om te komen tot een richtlijn voor het ontwikkelen van een analyse methode in landbouwprodukten.

Samenvatting:

Via diverse ingangen zijn artikelen over de eigenschappen en analysemethoden van glyphosate verzameld. Hieruit blijkt, dat het zinvol is de belangrijkste metabooliet van glyphosate (amino methylphosphonic acid = AMPA) mee te bepalen.

Van de diverse artikelen zijn de samenvattingen (voorzien van commentaar) in dit verslag vermeld.

Conclusie:

Van de gepubliceerde methodes komt die van Guinivan (7) als gunstig naar voren.

Deze methode bestaat uit: extractie, gelpermeatie, kationexchange en GC-ECD detectie na derivatisering. De detectiegrens van glyphosate is 0,01 ppm en van AMPA 0,05 ppm.

Gezien de bewerkelijkheid van de bestaande methodes wordt er aanbevolen een methode te ontwikkelen, die in staat is ook de opwerking geautomatiseerd af te handelen.

Dit is waarschijnlijk realiseerbaar door de mogelijkheden van auto-analyser en HPLC te combineren.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Medewerker/samensteller: ing. P. Kienhuis

Projectleider: L.G.M.Th. Tuinstra

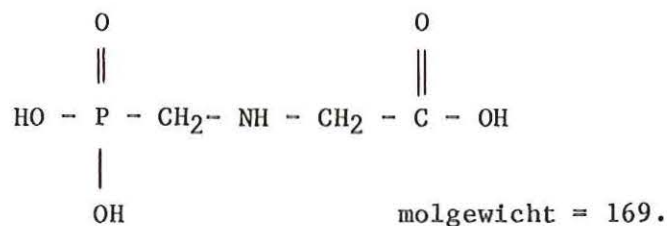
Inleiding

Glyphosate is een onkruidbestrijdingsmiddel, dat geïntroduceerd werd in 1971.

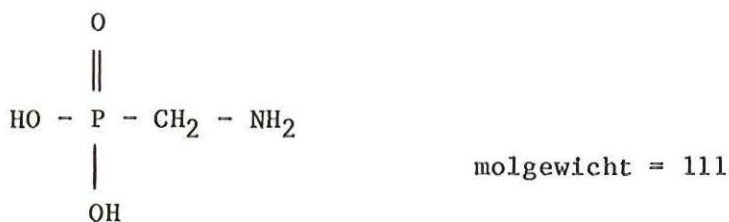
Het middel is zeer effectief bij de toepassing op zowel eenjarige als meerjarige planten. Mede omdat het snel afgebroken wordt zonder schadelijke residuen te vormen en omdat het een lage toxiciteit bezit voor zoogdieren (de acute orale LD 50 voor ratten is 4,3 gram/kg) wordt het tegenwoordig erg veel gebruikt (zie bijlage 1 voor informatie over de toepassing).

Het gevaar voor de mens schuilt dan ook niet zo zeer in de residue stapeling zoals bij PCB's, maar veel meer in het onzorgvuldig gebruik ervan b.v. naast percelen met oogstbare producten.

Structuur:



Glyphosate = N - (phosphonomethyl) glycine.



Metaboliët = Amino methyl phosphonic acid (AMPA)

De structuur en de eigenschappen van glyphosate lijken veel op die van aminozuren. De werking ervan berust dan ook op de verstoring van de aminozuurhuishouding van de plant.

Metabolisme

Na toepassing wordt glyphosate snel (in 100-150 dagen) afgebroken door de microflora in de grond. Daarbij wordt de voornaamste metaboliet AMPA gevormd, dat op zich ook snel weer wordt afgebroken. Het maximale gehalte aan AMPA in de grond, dat bereikt kan worden is ong. 20% t.o.v. de toegepaste hoeveelheid glyphosate (13). Omdat glyphosate intussen al voor een groot deel is afgebroken, zit ongeveer 50 - 100 dagen na toepassing het gehalte van glyphosate en AMPA op een gelijkwaardig niveau (Variaties worden veroorzaakt door grondsoort en aanwezige microflora). In hoeverre de glyphosate, die rechtsstreeks op eetbare delen van gewassen terecht komt, wordt afgebroken is niet vermeld.

In de bestrijdingsmiddelenwet (zie bijlage 1) worden geen eisen gesteld t.a.v. de metaboliet. Omdat de aanwezigheid ervan in een monster echter een extra indicatie is, wordt in dit verslag ook de mogelijkheid bekeken of deze component meebepaald kan worden.

Overzicht literatuur

(1) Arcker, Stokes: Glyphosate in bramen.

Extractie: 15 gram koken in 0,25 N HCl (3x)

Opwerking: kation kolom (AG 50W-X8)

anion kolom (AG 1-X8)

Indampstappen met water: 2x

Detectie: HPLC met postkolom derivatisering (O.P.A)

Fluorescentie meting

Recovery is 85% na toevoeging 0,05 0,1 en 0,25 ppm

Detectie limiet: 1 ng op de kolom \sim 0,04 ppm

Injectie volume is 100 μ l \sim 0,025 gram monster.

Opm:- De extractie d.m.v. koken met zuur wordt alleen door (1) toegepast. De voordelen ervan zijn, dat de extractie erg intensief is, dat eventuele conjungaten worden gesplitst en tenslotte dat eventuele geleringsprodukten ontleden.

- De postkolom reactie met O.P.A. vereist een vrij complex HPLC systeem met meerdere pompen. Zo'n systeem wordt pas voordelig bij grotere monster stromen.

(2) Glass: Glyphosate in grond en watermonsters

Extractie: 20-30 gram grond met 50 ml 0,1 n NaOH.

Opwerking: anion kolom (AG 1-X8)

Indampstappen met water: geen

Detectie: Derivatisering met 9-Fluorenylmethyl-chloroformaat

(FMOCCL) 15 min bij kamertemperatuur.

HPLC meting met fluorescentie detectie

Recovery: Watermonsters: 90% op 20 ppb niveau.

Grondmonsters: afhankelijk van de grondsoort 20-50%.

Detectielimiet: 1 ng op de kolom.

10 ppb in water en 0,25 ppm in grond.

Injectievolume = 5 μ l.

Opm: De opwerking is kort en weinig bewerkelijk. Het nadeel is echter, dat er geen concentratie van het monster plaatsvindt, waardoor de gevoeligheid van de bepaling matig is, ondanks de goede gevoeligheid van de detectiemethode.

(3) Glass: Glyphosate als complex vormer.

De eigenschap, dat glyphosate een complex vormt met koper is onderzocht m.b.v. U.V. en differentialpuls polarografie.

Er wordt geen bepalingmethode aangegeven. De mogelijkheid tot complexvorming zou echter wel gebruikt kunnen worden om te komen tot een snellere opwerking cq. bepalingmethode, aangezien ze vrij specifiek is (AMPA bezit deze eigenschap niet).

(4) Burns: Glyphosate in technische mengsels.

Extractie: oplossen in water

Detectie: HPLC-UV detectie

Detectie: 5 µg op de kolom

100 ppm

Opm: De bepaling is duidelijk geënt op technische mengsels en is als zodanig niet nuttig binnen de huidige context.

(5) Burns: Ringonderzoek van de AOAC betreffende methode (4)

(6) Moye, Boning: Glyphosate en AMPA met standaarden

Derivatisering: reactie met FMOCCl

20 min. bij kamertemp.

reagens extraheren na de reactie met ethylether.

Detectie: HPLC met fluorescentie detectie. Anion exchangekolom
(pentylamine)

Detectielimiet: 0,1 ng op de kolom ~ 50 ppb.

Injectievolumen: 20 µl

Opm: De reactie en detectie is uitgewerkt met standaarden. Een opwerking wordt niet beschreven.

Ook aminozuren met primaire of secundaire stikstofatomen kunnen met dit reagens gederivatiseerd worden.

Een aantal aminozuren zijn uitgetest. Ze elueren echter allen eerder dan AMPA en glyphosate. Deze detectie methode wordt toegepast door (2) (11) en (15).

(7) Guinivan: Glyphosate en AMPA in blueberries

Extractie: 25 gram monster met 2x 100 ml water

Opwerking: Gelpermeatie (Bio - Gel P2)

Kationwisselaar (AG 50X-X8)

Indampstappen met water: 4x

Derivatiseren: 45 min met BCL_3 -2-chloroethanol bij 110°C

45 min met HFBA bij 110°C

Naderhand extractie met 3x4 ml hexaan.

Detectie: GC - ECD

Glazen kolom met DC-200

Carrier: Argon-methaan

Temp.: 130-220°C

Injectiepoort: 250°C DET: 300°C

Recovery: 60 tot 70 %. Goede recoveries tot een niveau van 0,01 ppm (AMPA 0,05 ppm)

Detectielimiet is 50 pg op de kolom \sim 1 ppb (glyphosate)

Injectie volume = 5 μ l \sim 75 mg monster.

- Opm:- Gelinging van het extract tijdens het indampen wordt voorkomen, door na extractie de pH op 8 te brengen en vervolgens te extraheren met ethylacetaat. Pectines en suikers worden hierdoor voldoende verwijderd.
- AMPA wordt slecht gescheiden van 'n stoorkomponent. Dit wordt onderkent door (8) en door (12). Misschien, dat de toepassing van een capillaire kolom een verbetering is.
 - Het aantal indampstappen (sterk tijdrovend) is erg groot. Hierdoor wordt echter wel een laag detectie niveau mogelijk.
 - De gelpermeatie kolom moet na 5 monsters gereinigd worden met een 4 M ureum oplossing pH = 8

- (8) Moyer, Miles, Scherer: Glyphosate en AMPA in groente en fruit.
Extractie: 25 gram monster met 50 ml water en 25 ml chloroform.
Opwerking: kation kolom (Dowex 50 W-X8)
2 aparte frakties voor glyphosate en AMPA.
Indampstappen met water: 3x
Detectie: HPLC met post kolom derivatisering (o.p.a)
Fluorescentie meting.
kolom op 62°C (olie bad)
Aparte kolom voor AMPA en Gly.
Recovery is 70% bij 0,05 ppm.
Detectie limiet is 0,01 ppm (1 ng op de kolom)
Injectie volume is 20 µl ~ 0,1 gram monster

Opm:- Het grote nadeel van deze methode is de gescheiden detectie van AMPA en glyphosate. Indien alleen glyphosate bepaald moet worden, dan is nog steeds het HPLC systeem erg complex. Het voordeel is wel dat de derivatisering tijdens de HPLC stap plaats vindt.
- De opwerking is eenvoudig en de gevoeligheid goed.

- (9) Moyer, Deyrup: Glyphosate en AMPA (standaarden)
Derivatisering: m.b.v. MTBSTFA
Detectie: GC- FID

Opm: De recoverie van deze derivatiseringsmethode varieert zeer sterk. Het spoelen van de wand van het reactievaatje met fosforzuur vermindert deze variatie enigszins (voorkomen adsorptie aan de wand. Wordt ook toegepast door (15)). Moyer (10) ondermijnt dit artikel door nogmaals te wijzen op de onbetrouwbaarheid van de derivatisering.

(10) Moyer, Deyrup: Glyphosate en AMPA met standaarden

Derivatisering: met Trifluoro ethanol (TFE)
en Trifluoro acetic anhydride (TFAA)
Detectie: GC - ECD of NPD
kolom: glazen met Ultra Bond 20 SE
of capillair met DB 5 NFC.
Detectie limiet: ECD 10 pg op de kolom
NPD 1 ng op de kolom
Recoverie 100% bij additie aan gedeïoniseerd water tot 10 ppb.
Injectievolume = 1 µl.

Opm: De derivatisering is kort en eenvoudig. Het detectieniveau is vrij laag met de ECD. In hoeverre deze methode in de praktijk voldoet moet nog blijken.

(11) Roseboom, Berkhoff: Glyphosate en AMPA in stro.

Extractie: 15 gram met 100 ml water en 50 ml chloroform
gevolgd door 2x 40 ml water.
Opwerking: kation kolom Bio-RAD AG 50 W X-8
Glyphosate en AMPA apart uitvangen en verder
opwerken.
Indampstappen met water: 2x.
Derivatisering: met 9-Fluorenylmethylchloroformaat (FMOCCL)
20 min bij kamertemperatuur.
gevolgd door extractie met 3x20 ml ether.
Detectie: - HPLC met fluorescentiedetectie.
- Hypersil APS kolom.
- aparte eluentia voor glyphosate en AMPA
Recoverie: 70-80%
Detectie limiet: 1,0 ng op de kolom
0,1 ppm in stro.

Opm: De opwerking is vrij simpel door alleen gebruik te maken van een kation kolom. In hoeverre andere producten met deze methode te analyseren zijn is niet bekend.

De HPLC chromatogrammen, die getoond worden, zijn niet al te fraai. De glyphosate en de AMPA moeten beide als schouder op een grote stoorkomponenten gemeten worden.

(13) Rueppel: Metabolisme glyphosate in de grond.

Experimenten met ^{14}C - gelabeld glyphosate in grondmonsters.

- In de grond wordt glyphosate snel (50% ontwijkt binnen 28 dagen als $^{14}\text{CO}_2$) afgebroken. Na \pm 100 tot 150 dagen (afhankelijk van de grondsoort) is alles ontleed.
- Hoofd metaboliet is AMPA. Deze component wordt ook weer snel afgebroken. In sommige grondsoorten kan na enige tijd een gelijkwaardig niveau aan AMPA en glyphosaat aanwezig zijn.
- Opname via de grond in de plant is zeer gering.

(14) Bestrijdingsmiddelenwet: Zie bijlage 1.

(15) Miles, Moyer: Glyphosate en AMPA in natuurlijke wateren.

Opwerking: 150 ml filtreren (Whatmann nr.1)

Rotorvapor \rightarrow 5 ml

Derivatiseren: met 9-Fluorenylmethylchloroformaat (FMOCCL)

20 min bij kamertemperatuur.

naderhand extractie van het overtollig reagens met ethylether.

Detectie: - HPLC met fluorescentie detectie (0,2 ml loop)

- zwakke anionkolom (μ Carbohydrate)

- Een eluens voor zowel AMPA als glyphosate.

Recovery: 110% op het 0,01 ppm niveau.

Detectie limiet: 1 ppb in de monsters.

\pm 1 ng op de kolom.

Opm:- Over de door hun gepubliceerde methode (8) met het o.p.a.

reagens wordt vermeld, dat de stabiliteit ervan slecht is.

- Het toevoegen van fosfaatbuffer voor het indampen m.b.v. de rotorvapor verbetert de recovery en reproduceerbaarheid sterk (adsorptie aan glas).
- Indampen van de monsters levert geen verschil in recovery op indien de temperatuur gevarieerd wordt van 30-50°C.
- houdbaarheid:
 - standaard opl. in de koelkast: geen verlies in 6 mnd.
 - monster in de koelkast: duidelijke degradatie in 3 mnd.
 - monster bij 0°C (bevroren): geen degradatie in 3 mnd.

(16) Lundgren: Glyphosate en AMPA in grond.

Extractie: 3,5 gram monster + 30 ml 0,1 M triethylamine.

Opwerking: anion exchange (7 ml Dowex 1-X8)

In 'n beker glas laten absorberen.

De hars wordt gewassen met 2x 20 ml water.

Vrij maken met 0,1 M HCl (2x 10 ml)

Recovery anion exchange 50%.

Derivatisering: met 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene

1 uur bij kamertemperatuur

(produkt is licht gevoelig: in donker werken).

Gevolgd door enige extractie stappen om het reagens te verwijderen.

Detectie: HPLC met UV detectie.

50 µl injectie. Kolom is NOVAPAK C18.

Detectie limiet: 0,1 ppm

10 ng op de kolom.

Recovery: Door gebruik te maken van een interne standaard (N-phosphonomethyl-β-aniline) wordt een goede recoverie verkregen.

Door de opwerking gaat wel 50% van de totaalhoeveelheid verloren.

Opm:- Het toepassen van fluorescentie detectie levert mogelijk een betere gevoeligheid en specificiteit op.

- De extractiestappen na de derivatisering zijn sterk selektief hetgeen nuttig is als opwerkstap. Het nadeel is de lichtgevoeligheid van het derivaat.

Discussie

De doelstelling van dit literatuuroverzicht is, om te komen tot een gelijktijdige analyse van glyphosate en AMPA in voornamelijk landbouwprodukten.

Indien aan al deze voorwaarden voldaan moet worden, dan komen alleen (7), (8) en (11) hiervoor in aanmerking.

(8) heeft als detectie voor een HPLC systeem met postkolomderivatisering (met o.p.a. als reagens) gekozen. Dit is een ingewikkeld systeem met meerdere pompen. Voor AMPA en glyphosate zijn tevens aparte kolommen en eluentia nodig. In (15) worden aangegeven, dat de stabiliteit van het systeem slecht is. Deze methode komt alleen dan als gunstig naar voren, indien grotere serie's monsters moeten worden geanalyseerd. Voor kleinere serie's is de detectiemethode te bewerkelijk.

(11) maakt gebruik van maar één opwerkingsstap. Voor een methode, die voor diverse produkten geschikt moet zijn, is dat zeer waarschijnlijk onvoldoende.

(7) maakt bij opwerking gebruik van zowel gelpermeatie als kationexchange.

De detectie gebeurt met GC- ECD.

De methode maakt een betrouwbare indruk.

(12) beweert weliswaar, dat deze methode voor kiwi's en asperges niet voldoet, maar geeft tevens aan dat dat dan ook erg moeilijk analyseerbare produkten zijn.

Het nadeel van (7) is de bewerkelijkheid, maar dat is inherent aan het toepassen van meerdere opwerkingsstappen. Mogelijkerwijs is hier iets aan te doen door:

- bij specifieke produkten een opwerkingsstap te laten vallen.
- het toepassen van kleine ion exchange kolommetjes (b.v. Baker) met de mogelijkheid van versnelde elutie (over- en onderdruk).
- het toepassen van een snellere derivatiseringsmethode (Mogelijk ook interessant bij de aanwezigheid van stoorkomponenten bij specifieke produkten).

Wanneer tijd aanwezig is voor het ontwikkelen van een snellere analyse-methode, dan is het zinvol de mogelijkheden van een volledig geautomatiseerd systeem te onderzoeken.

Door de koppeling van een auto-analyser en een HPLC systeem moet het mogelijk zijn een filtratiestap (dialyse) en een ionenwisselstap (preconcentratie op een ionenwisselaar) te automatiseren. Door de ionenwisselaar vervolgens in een HPLC systeem te brengen, kan de hoeveelheid glyphosaat en AMPA bepaald worden. Door op deze manier de opwerkingsstap over te slaan, wordt een grote tijdsinstorting geboekt, doordat alleen de extractie nog maar handmatig hoeft te geschieden.

Conclusie

Van de gepubliceerde methodes komt die van Guinivan (7) als gunstig naar voren.

Deze methode bestaat uit: extractie, gelpermeatie, kationexchange en GC-ECD detectie na derivatisering. De detectiegrens van glyphosate is 0,01 ppm en van AMPA 0,05 ppm.

Gezien de bewerkelijkheid van de bestaande methodes wordt er aanbevolen een methode te ontwikkelen, die in staat is ook de opwerking geautomatiseerd af te handelen.

Dit is waarschijnlijk realiseerbaar door de mogelijkheden van auto-analyser en HPLC te combineren.

Literatuur

Geraadpleegde literatuur.

1. Archer, Stokes
J. Agric. Food Chem., 1984, 32, 586-588.
2. Glass
J. Agric. Food Chem., 1983, 31, 280-282.
3. Glass
J. Agric. Food Chem., 1984, 32, 1249-1253.
4. Burns
J. of Chromatographic Science, 17, (1979), 333-335.
5. Burns
J.A.O.A.C., Vol. 66, no. 5, 1983, 1214-1219.
6. Moye, Boning
Anal. Letters, 12 (B1), 25-35 (1979).
7. Guinivan
J.A.O.A.C., Vol. 65, no. 1, 1982, 35-39.
8. Moye et al.
J. Agric. Food Chem., 1983, 31, 69-72.
9. Moye, Deyrup
J. Agric. Food Chem., 1984, 32, 192-195.
10. Moye, Deyrup
J. Agric. Food Chem., 1985, 33, 944-947.
11. Rosenboom, Berkhof
Analytica Chim. Acta, 135, (1982), 373-377.
12. Seiber
J. Agric. Food Chem., 1984, (32), 678-681.
13. Rueppel et al.
J. Agric. Food Chem., 1977, (25), 517-528.
14. Bestrijdingsmiddelenwet.
15. Miles, Moye
J.A.O.A.C., Vol. 69, no. 3, 1986, 458-461.
16. Lundgren
J. Agric. Food Chem., 1986, 34, 535-538.
17. Gids voor Ziekten en Onkruidbestrijding in de land- en tuinbouw,
1981.

Nagetrokken literatuur

- Food Science and Technology abstracts.
- Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Analytica Chim. Acta.
- Analytical methods for Residues of Pesticides.
- Bestrijdingsmiddelenwet.
- J.A.O.A.C.

Tijdschriftperiode 1975-1986.

A: uit (17)

glyfosaat

Werkzame stof: N-(fosfonomethyl) glycine(iopropylamine-zout).

Chemische groep: diversen.

Oplosbaarheid: 1%.

Werking:

- systemisch via bovengrondse delen.
- remming biosynthese van aromatische aminozuren.
- tegen aanwezige éénjarige en overblijvende onkruiden.

Gebruik:

- op tijdelijk onbeteeld land o.a. tegen kweekgras en klein hoefblad in de stoppel en akkerranden.
- pleksgewijs onder appel- en perebomen (tot 1 juli).
- in de bosbouw (Am. vogelkers) mits niet vruchtdragend, en geen bramen of bosbessen worden geraakt.
- weilanden waarin geen vee aanwezig is (herinzaai en doorzaai).
- in de teelt van maïs ter bestrijding van aardappelopslag, slechts met gebruik van een strokendruppelmachine.

- graszaadteelt (pleksgewijs).
- meerjarige teelt narcis.
- op verse stobben van loofhoutsoorten ter voorkoming van uitlopen.

Toepassingsomstandigheden: bij niet te warm, bewolkt weer met een hoge luchtvochtigheid worden de beste resultaten verkregen. Niet toepassen als er binnen 6 uur kans op regen bestaat. De onkruiden mogen niet te veel zijn afgehard en moeten goed zijn ontwikkeld.

Opmerkingen: 2-4 weken wachten met inzaaien van een volgend gewas (afhankelijk van het afsterven). Bij doorzaaien in grasland ongeveer 10 dagen wachttijd. Klaver- en wikke-soorten zijn minder gevoelig gebleken; ook paardestaart, zwaluwtong, kleine brandnetel en windesoorten zijn minder gevoelig. Niet mengen met andere middelen. In de fruitteelt voorkomen dat bebladerde takken of verse snoeiwonden worden geraakt.

Merken:

vloeistoffen: Agrichem Glyfosaat (360 g/l), Roudup (360 g/l).

B:

Bestrijdingsmiddelenwet

Uitvoeringsvoorschriften (C II-4)

43

Residubeschikking

Bestrijdingsmiddel, bestanddeel daarvan of omzettingsprodukt	Omzettingsproducten inbegrepen in toegelaten max. residu	Max. residu uitgedrukt als	Toegelaten Opm. max. residu (mg/kg)
glufosinaat	geen	glufosinaat	0*(0,05)
glyfosaat	geen	glyfosaat	0,05*
		alle fruit	0,05*
		groente	0,05*
		gerst	20
		haver	10
		tarwe	5
		aardappel	0,05*
		melk	0,05*
		vlees	0,05*
		overige	0*(0,05)