

Naturstyrelsens Referencelaboratorium for Kemiske og Mikrobiologiske Miljømålinger

NOTAT

Til: Lis Morthorst Munk

cc: Anne Christine Duer

Fra: Maj-Britt Fruekilde

Dato: 12. november 2014

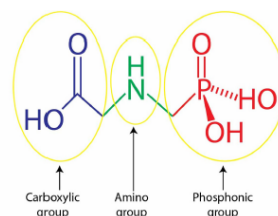
QA: Stine Ottsen

Emne: Analytisk procedure ved måling af glyphosat i grundvand/drikkevand/overfladevand

Nærværende notat har til formål at vurdere analytiske procedurer til bestemmelse af glyphosat i grundvand, drikkevand og overfladevand. Det ønskes afklaret, hvorvidt glyphosat i vandprøver kan være bundet til multivalente metalioner, der kan forårsage, at glyphosat evt. ikke frigives ved den analytiske procedure, og herved resultere i bestemmelse af for lavt et indhold af glyphosat i den aktuelle vandprøve.

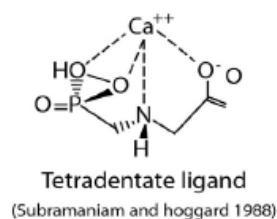
Glyphosat

Selvom glyphosat har været genstand for meget opmærksomhed de seneste år, er glyphosat fortsat udfordrende ud fra et analytisk synspunkt. Dette skyldes glyphosats fysisk-kemiske egenskaber: relativ lille molekylvægt, høj polaritet, høj vandopløselighed, lav opløselighed i solventer, amfoter egenskab, og at glyphosat let danner komplekser med metaller. Glyphosat har 3 polære funktionelle grupper (carboxyl, amino og phosphat), se figur 1.



Figur 1: Strukturformel af glyphosat molekyle og dets funktionelle grupper.

Glyphosat er ved pH 5,2 en dianion, hvorimod en trianion dominerer ved pH 7 /2/. Under disse betingelser vil glyphosat kunne danne stærke komplekser med metalioner (figur 2) /1/. Derudover kan glyphosat sandsynligvis binde til humusstoffer (fluvolsyre og humussyre) ved let sur pH /2/.



Figur 2: Struktur for kompleks mellem en metalion og glyphosat.

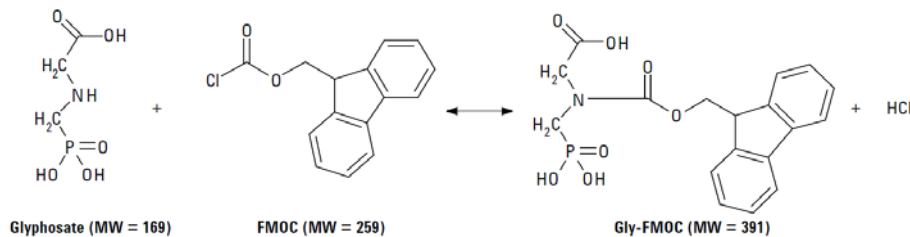
Ved nedbrydning af glyphosat er det primære nedbrydningsprodukt aminomethylphosphonsyre (AMPA). I modsætning til glyphosat indeholder AMPA kun 2 funktionelle grupper (amino og phosphat), og det forventes derfor, at en evt. kompleksbinding til kationer vil være væsentlig svagere for AMPA end for glyphosat.

Analytiske procedurer

Bestemmelse af glyphosat på lavt koncentrationsniveau i miljøprøver er vanskeligt at udføre pga. glyphosats zwitterionegenskab samt dets tendens til at kompleksbinde til metalioner. Eksisterende analytiske metoder til bestemmelse af glyphosat i vand eller andre matricer er baseret på kromatografiske teknikker, gaskromatografi (GC) eller væskechromatografi (LC), ofte koblet med massespektrometri.

Generelt derivatiseres prøven inden analyse ved GC for at omdanne den polære glyphosat til et tilstrækkelig flygtigt og termisk stabilt derivat, men også analyse ved LC er ganske udfordrende. Et derivatiseringstrin er ofte nødvendig ved LC analyse pga. manglende chromophor eller fluorophor, og derfor anvendes ofte en derivatisering inden bestemmelse af glyphosat ved LC-MS. Derivatisering af prøven før GC analyse kan udføres med anvendelse af trifluoroeddikesyre-trifluoroeddikesyreanhydrid-trimethylorthoacetat reagens /6/ eller isopropyl chloroformat og diazomethan /7/, alternativt kan anvendes trifluoroacetic anhydrid og heptafluoro-1-butanol /8/.

I løbet af de senere år er LC-MS/MS analyse til bestemmelse af glyphosat blevet den foretrukne teknik pga. teknikkens høje selektivitet og sensitivitet. Derivatisering med 9-fluorenyl-methyl chloro formate (FMOC-Cl) er det mest almindelige pre-kolonne derivatiseringsreagens /3/ /4/ /5/.



Figur 3: Reaktion mellem glyphosat og derivatiseringsreagenset FMOC-Cl

En forudsætning, for at derivatiseringsreaktionen kan foregå, er, at glyphosat er tilgængelig for reaktion med derivatiseringsreagenset, hvilket vil sige, at glyphosat forekommer på fri form (ikke bundet). Hvis glyphosat ikke er tilgængelig for reaktion med derivatiseringsreagenset, vil det føre til en underestimering af glyphosatindholdet.

Interferende stoffer

I de efterfølgende afsnit beskrives mulige kompleksbindinger af glyphosat, samt hvilken effekt dette kan have for den efterfølgende analyse for indhold af glyphosat.

Multivalente kationer (di- og trivalente kationer)

Det er velkendt, at multivalente kationer (di- og trivalente metalioner) kan danne komplekser med glyphosat /9/ /12/, og at disse komplekser påvirker kvantificeringen af glyphosat ved at forårsage en underestimering af glyphosatindholdet. Dette er dokumenteret for følgende metalioner: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} og Cd^{2+} /9/ samt for Al^{3+} , Co^{3+} og Cr^{3+} /12/.

Tilsætning af en mærket intern standard kan ikke korrigere for den underestimering, som forårsages af kompleksbinding mellem glyphosat og metalioner. En mulig forklaring på dette kan være, at reaktionshastigheden for dannelse af et kompleks mellem glyphosat og multivalente kationer i matricen og det tilsvarende kompleks mellem glyphosat intern

standard og multivalente kationer foregår langsomt. Intern standard tilsættes ved udførelsen af analysen /10/, og derved bliver tidsrummet, hvor den interne standard kan kompleksbinde med de multivalente kationer, meget kortere end for det glyphosat, der har været til stede i prøven i meget længere tid. Grundet langsom reaktionshastighed vil kompleksbinding af den interne standard til multivalente kationer ikke forekomme i samme grad som for glyphosat og multivalente kationer. Ved bestemmelse af koncentrationen i prøven vil mere af den interne standard end glyphosat være tilgængelig for reaktion med derivatiseringsreagenset, og dermed kan den interne standard ikke korrigerer for denne matrixeffekt.

Stabiliteten af glyphosat-kationkomplekser afhænger af pH. Ofte er disse komplekser stabile i basiske medier og ustabile i sure medier /9/ /12/. NMR-studier har indikeret, at multivalente kationer binder til mindst to af glyphosats funktionelle grupper: fosfat og carboxyl. Derudover kan nitrogenatomet i aminogruppen i glyphosat være protoneret eller ej alt efter mediets pH, hvorved aminogruppen alt efter pH kan medvirke eller ej i glyphosat-kation kompleksbinding /12/.

For at sikre frigivelse af glyphosat fra evt. komplekser med multivalente kationer, er det nødvendigt at anvende en pålidelig forbehandling inden derivatisering. Tilsætning af syre (forsurning) til pH 1 letter dissociationen af komplekser mellem glyphosat og multivalente metalioner /10/ /11/. Inden derivatiseringen er det nødvendigt at tilbageføre mediet til basiske betingelser (pH 9,2), hvilket kan resultere i gendannelse af de glyphosat-kationkomplekser, der dannes med de hurtigste reaktionshastigheder /9/. Gendannelse af disse glyphosat-kationkomplekser kan evt. forhindres ved tilførsel af en kompleksdanner (fx EDTA) inden udførelse af derivatiseringstrinet. Tilsætning af EDTA vil skifte ligevægten (mellem fri glyphosat og kompleks-bundet glyphosat) mod den frie form af glyphosat. DS/ISO 16308:2014 anbefaler tilsætning af EDTA inden derivatisering /11/.

Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger stiller allerede i dag krav til, at den analytiske procedure skal sikre, at glyphosat og dets nedbrydningsprodukt AMPA er frigivet fra eventuelle komplekser med divalente metalioner ved tilsætning af stærk syre eller tilsætning af EDTA (metodedatablad M059). DS/ 16308:2014 beskriver, at nogle prøver kan indeholde interferenser, som forårsager, at det er nødvendigt at tilsætte både EDTA og stærk syre under prøveforberedelsen for at sikre den analytiske procedure /11/. Det anbefales i DS/ISO 16308:2014, at laboratorierne på deres rutineanalyser tjekker nødvendigheden af at tilsætte både EDTA og stærk syre ved prøveforberedelsen.

Humusstoffer

NMR-studier indikerer, at glyphosat spontant binder til opløste humusstoffer (fluvolsyre og humussyre) ved let sur pH /2/. Binding af fluvolsyre til glyphosat er stærkere (ved pH 5,2) end binding af humussyre til glyphosat (ved pH 7), hvilket indikerer, at bindingen sker mellem glyphosat's carboxyl- og fosfatgruppe og protoneret oxygen i humussyre.

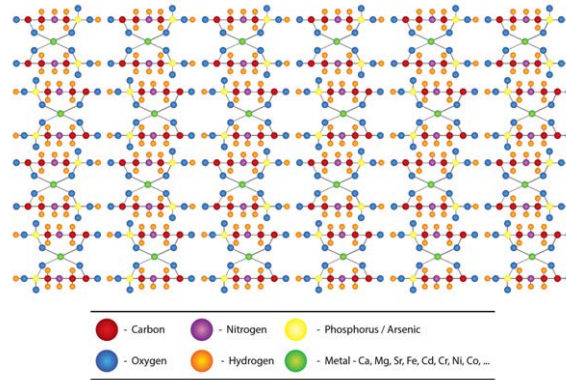
Kompleksdannelsen mellem glyphosat og humusstoffer er således stærk pH-afhængig

Kompleksdannelsen mellem glyphosat og humusstoffer kan potentielt forårsage en underestimering af glyphosatindholdet, hvis glyphosat ikke er tilgængelig for reaktion med derivatiseringsreagenset. Det er referencelaboratoriets vurdering, at tilsætning af stærk syre (DS/ISO 16308:2014) vil resultere i dissociation af glyphosat-humusstof binding.

Interferens fra humusstoffer kan forekomme hyppigere i nogle typer af vand end i andre. I vand med højt indhold af organisk materiale vil nogle af disse interferenser kunne reduceres delvis pga. kompleksdannelse af de interfererende kationer med organisk materiale /9/.

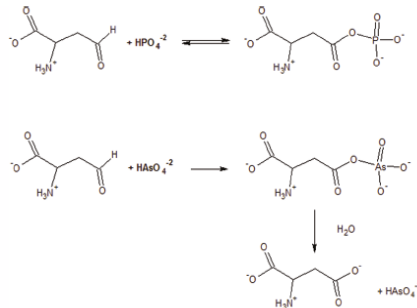
Arsen

Jayasumana et al. (2014) har præsenteret et muligt netværk/gitter, hvor glyphosat binder til metalioner, se figur 5. I dette gitter er det symboliseret, at nogle af glyphosats phosphor-atomer kan være substitueret af arsen



Figur 5: Struktur af et "hypotetisk" glyfosat-metal-arsen gitter (Jayasumana et al. (2014)).

En bakteriestamme, der kan gro/vokse ved tilstedeværelse af arsenat og muligvis uden tilstedeværelse af fosfat, er blevet identificeret /14/. Dette betyder teoretisk set, at arsenat kan substituere fosfat i nogle eller i stort set alle essentielle fosfat-baserede biomolekyler. Den fysiske-kemiske lighed mellem disse to oxyanioner (fosfat og arsenat) indikerer, at dette kan være muligt. Så ideen om at enzymer, der normalt benytter orthofosfat kan anvende arsenat i stedet forekommer, dog hydrolyserer den dannede ester af arsenat hurtigt /15/ /14/, se figur 6. Modsat arsenat-ester er alkyl-arsensyre ($R-CH_2-AsO_3^{-2}$) stabil og kan anvendes tilsvarende alkyl-phosphonaten ($R-CH_2-PO_3^{-2}$). Med udgangspunkt i denne reaktion, er det teoretisk muligt, at en tilsvarende substitution kunne forekomme i glyfosat.



Figur 6: Eksempel på en reaktion, hvor fosfat substitueres af arsenat (reaktionen er katalyseret af L-asparat- β -semialdehyd dehydrogenase). Arsenat-ester er ekstrem ustabil og hydrolyserer i vandige miljøer.

Arsen forekommer naturligt i det danske grundvand, visse steder i Danmark i koncentrationer væsentligt højere end grænseværdien på $5 \mu\text{g/L}$ /16/ /17/. Ligeledes forekommer fosfor i grundvandet i væsentlig højere koncentrationer end arsen. Det må antages, at eventuel forekomst af substitutionsreaktioner af glyfosats fosfor med arsen vil være afhængig af forholdet mellem fosfor og arsen i matricen. Ud fra denne teori vil det forventes, at substitution af glyfosats fosfor med arsen er minimal.

Hvis der mod forventning forekommer en substitution af glyfosats fosfor med arsen, vil det dannede produkt ikke længere være glyfosat, idet sammensætningen af molekylet er ændret. Denne glyfosat-substitut vil ikke kunne bestemmes direkte ved den tidligere beskrevne derivatisering (figur 3). Umiddelbart kan det forventes, at derivatiseringsreagensens Fmoc-Cl vil kunne reagere tilsvarende med glyfosat-substituten som med glyfosat, idet arsen og fosfor fysisk-kemisk minder meget om hinanden. Dog er arsen-atomet større end fosfor-atomet, og bindinger mellem arsen og oxygen er typisk 10% længere end bindinger mellem oxygen og fosfor /15/. Under

antagelse af, at FMOC-Cl kan reagere med glyphosat-substituten vil glyphosat-substitut-FMOC kunne bestemmes ved nogle andre ion-par, som er korrigeret for den højere molekylvægt af arsen i forhold til phosphor.

Alternativ kunne en bestemmelse af glyphosat-substitut forventes foretaget ved ELISA /5/ /13/.

Konklusion

Det er referencelaboratoriets vurdering, at retvisende bestemmelse af glyphosat kan opnåes ved en analytisk procedure, der sikrer, at glyphosat frigives fra eventuelle komplekser ved tilsætning af EDTA og behandling med stærk syre, som det er beskrevet i DS/ISO 16308:2014.

Nuværende version af metodedatablad M059 beskriver behandling enten ved tilsætning af EDTA eller en forsuring med stærk syre, mens DS/ISO 16308:2014 beskriver, at det for nogle prøver er nødvendigt med tilsætning af både EDTA og stærk syre inden derivatisering af glyphosat. For at sikre retvisende resultater for bestemmelse af glyphosat og AMPA i alle vandprøver, anbefaler Referencelaboratoriet en opdatering af metodedatablad M059 til at omfatte både tilsætning af EDTA og stærk syre.

Det vurderes, at interferens ved substitution af glyphosats phosphatgruppe med arsenat enten ikke vil forekomme eller vil forekomme i et minimalt omfang, der ikke har indflydelse på resultatet af målingen.

Referencer

- /1/ Subramaniam, V. og Hoggard, P.E. (1988), J. Agric. Food Chem. 36, 1326-1329
- /2/ Mazzei, P. og Piccolo, A. (2012), J. Environ. Sci. Technol. 46, 5939-5948
- /3/ Raina-Fulton, R. (2014), J. AOAC Int. 97, 965-977
- /4/ Hanke, I. Singer H. og Hollender, J. (2008), Anal. Bioanal. Chem. 391, 2265-2276
- /5/ Sanchis, J. Kantiani, L. Llorca, M. Rubio, F. Ginebreda, A. Fraile, J. Garrido, T. og Farré, M. (2012), Anal. Bioanal. Chem. 402, 2335-2345.
- /6/ Kudzin, ZH. Gralak, DK. Drabowicz, J. og Luczak, J. (2002), J. Chrom A, 947, 129-141
- /7/ Kataoka, H. Ryu, S. Sakiyama, N. Makita, M. (1996), J. Chrom A, 726, 253-258
- /8/ Royer, A. Beguin, S. Tabet, JC. Hulot, S. Reding, MA. Communal, PY. (2000), Anal Chem, 72, 3826-3832. via ref Sanchis et al)
- /9/ Freuze, I. Jadas-Hecart, A. Royer, A. og Communal, P-Y. (2006), J. Chrom. A 1175, 197-206
- /10/ Ibáñez, M. Pozo, ÓJ. Sancho, J.V. López, F.J. og Hernández, F. (2006), J. Chrom. A, 1134, 51-55
- /11/ DS/ISO 16308, Water quality – Determination of glyphosate and AMPA – Method using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric detection, 2014

- /12/ Caetano,MS. Ramalho, T.C. Botrel, D.F. da Cunha, E.F.F. og de Mello, W.C. (2012), Int. J. Quan. Chem. 112, 2752-2762.
- /13/ Jayasumana, C. Gunatilake, S. Senanayake, P. (2014), Int. J. Environ. Res. Public Health, 11,2125-2147.
- /14/ Trafic, D.S. og Viola, R.E. (2011), BioChem. 50, 1128-1134
- /15/ Dixon, H.B.F (1997), Advan. Inorg. Chem., 44, 191-227
- /16/ Larsen, F. og Kjøller, C. (2009) Arsen i dansk grundvand og drikkevand - Bind 1: Arsen i dansk grundvand, GEUS, Miljøstyrelsen
- /17/ Bekendtgørelse om vandkvalitet og tilsyn med vandforsyningsanlæg (Bekendtgørelse 292, (26/03/2014)).