

Project 505.0400

Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van bestrij-
dingsmiddelen en (organische) contaminanten
(ir L.G.M.Th. Tuinstra)

Rapport 87.48

Juli 1987

EEN GEAUTOMATISEERDE TWEEDIMENSIONALE
HPLC BEPALING VOOR GLYFOSAAT IN LAND-
EN TUINBOUWPRODUKTEN

ing. P.G.M. Kienhuis

Afdeling: Organische Contaminanten

Goedgekeurd door: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD WAGENINGEN
Postadres: Postbus 230, 6700 AE WAGENINGEN
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL

8748

VERZENDLIJST

INTERN:

Directeur

Sectorhoofden

drs J.M.P. den Hartog

Projectleider

afd. Organische Contaminanten (4x)

Projectbeheer

Bibliotheek

Circulatie

EXTERN:

Directie Landbouwkundig Onderzoek (dr K. Verhoef)

Directie Akker- en Tuinbouw (ir W.F.S. Duffhues)

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden (drs C.C.J.M. van der Meijs)

Directeur Plantenziektenkundige Dienst (dr ir E.A. Goewie)

Directeur Instituut voor Onderzoek van Bestrijdingsmiddelen
(dr ir A.M. van Doorn)

leden werkgroep Ontwikkelingen Verbetering van Residumethoden (10x)

Ware(n) Chemicus

AGRALIN, PUDOC

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

ABSTRACT

EEN GEAUTOMATISEERDE TWEEDIMENSIONALE HPLC BEPALING VOOR GLYFOSAAT
IN LAND- EN TUINBOUWPRODUCTEN

AUTOMATED TWO DIMENSIONAL HPLC RESIDUE PROCEDURE FOR THE DETERMINATION
OF GLYPHOSATE IN AGRICULTURAL PRODUCTS (in Dutch)

Report 87.48 Juli 1987

P.G.M. Kienhuis

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

5 tables, 13 figures, 11 references

The development of the analytical procedure for residues of the herbicide glyphosate (N-(phosphono methyl)glycine) in agricultural products is described.

After a simple water-chloroform extraction the sample is injected on an on line anion pre-column. The pre-column is washed with water, after which the glyphosate is forward eluted on the analytical anion column, followed by a post-column reaction with the OPA reagents and fluorogenic detection.

The optimization of the detection system resulted in a detection limit of about 0.5 ng (s/n=3).

The capacity of the pre-column is influenced by the sample amount. A maximum injection volume of 250 μ l (=25 mg sample) could be injected, resulting in an detection limit of 0,04 mg/kg. The method is tested for wheat, barley, rye, maize, rice, potatoes, asparagus and strawberry. The recovery of spiked samples at the 1-10 mg/kg level is better than 90% with exception of potatoes for which a recovery of 70% is found (CV 10%).

Keywords: Glyphosate, agricultural products, HPLC, precolumn-concentration, post-column derivatization.

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	I
SAMENVATTING	III
1 INLEIDING	1
2 METHODE VAN ONDERZOEK	2
3 RESULTATEN/DISCUSSIE	3
3.1 Analytische kolom	3
3.2 Post-column derivatisering	3
3.3 Voorkolom	7
3.4 Dialyse	10
3.5 Monsterintroductie	12
3.6 IJklijn	16
3.7 Testen procedure	16
3.7.1 Experiment 1	16
3.7.2 Experiment 2	18
3.8 Monsteronderzoek	19
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	20
LITERATUUR	22
BIJLAGE	
A INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 492	

SAMENVATTING

De ontwikkeling van een analysemethode voor het onkruidbestrijdingsmiddel glyfosaat (N-(phosphonomethyl)glycine) in land- en tuinbouwprodukten wordt beschreven.

Het basis HPLC detectiesysteem wordt gevormd door een analytische anionkolom en een post-column reactor. In de reactor wordt het glyfosaat geoxideerd tot een primair amine, dat vervolgens gederivatiseerd wordt met het OPA-reagens, waarna het gehalte m.b.v. een fluorescentie detector wordt bepaald. De beide reacties vinden plaats in een post-columnreactor opgebouwd uit onderdelen uit de continuous flow techniek. Om diffusie van de monsters te verhinderen worden stikstofbellen toegepast.

Na optimalisatie van de scheiding op de analytische kolom en de beide post-column reacties, blijkt de detectielimiet ca. 0.5 ng te zijn ($s/n=3$).

Glyfosaat wordt uit de monsters geëxtraheerd m.b.v. water/chloroform. Na een centrifugestap bevindt de component zich in de waterfase. In het algemeen vinden nu één of meerdere zuiveringsstappen plaats (kationkolom, anionkolom, gelpermeatie, enz.).

Om deze tijdrovende stappen te vermijden is het HPLC-detectiesysteem uitgebreid met een anionvoorkolom.

Het gecentrifugeerde extract wordt na injectie op de voorkolom gebracht, waarna deze gespoeld wordt met water. De glyfosaat wordt verwijderd door de voorkolom in het detectiesysteem te brengen, waarna het eluens de component meeneemt en de detectie plaatsvindt. De voorkolom wordt geregenereerd met resp. 1 M azijnzuur en gedeïoniseerd water in de back flush mode. Om de capaciteit van de voorkolom te testen zijn diverse volumina aan monsterextracten geïnjecteerd. Daaruit kwam naar voren dat maximaal 250 μ l (= 25 mg monster) geïnjecteerd kon worden. Onderzocht werden rogge, gerst, tarwe, mais, rijst, aardbei, asperge en aardappel.

Het terugvindingspercentage van glyfosaat toegevoegd aan de monsters op het 1-10 mg/kg niveau is beter dan 90% met uitzondering van aardappelen waarvoor 70% wordt bereikt (VC=10%). De analysecapaciteit is 45 injecties/24 uur, hetgeen door een persoon opgewerkt kan worden binnen 8 uur.

1 INLEIDING

Glyfosaat is een onkruidbestrijdingsmiddel, dat geïntroduceerd werd in 1971 en op de markt kwam in 1974 als voornaamste bestanddeel van het middel "Roundup".

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

Glyfosaat wordt voornamelijk toegepast als onkruidbestrijdingsmiddel op permanent cq. tijdelijk onbeteeld land. Het middel wordt, opgelost in water, verneveld.

De opname in het gewas geschiedt via het blad, waarna het door de sapstroom wordt verdeeld over de gehele plant, zodat ook het wortelgedeelte afsterft. Het deel dat op de grond terecht komt wordt onder andere door complexvorming met metaalionen als ijzer en koper gefixeerd en vervolgens betrekkelijk snel door de microflora omgezet in componenten zoals CO_2 en fosfaat. Hierdoor is het mogelijk om reeds korte tijd na de toepassing het behandelde terrein weer te gebruiken voor het telen van gewassen.

Het middel is zeer effectief bij de toepassing op zowel éénjarige 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 g/kg lichaamsgewicht) wordt het tegenwoordig steeds meer gebruikt.

Voor land- en tuinbouwproducten geldt een residuetolerantie van 0,05 mg/kg met uitzondering van enkele granen (gerst 20, haver 10 en tarwe 5 mg/kg) en droog te oogsten peulvruchten (erwten, bonen 5 mg/kg).

Reden hiervoor is de toegestane toepassing van glyfosaat voor de bestrijding van onkruid tussen deze gewassen tot maximaal 7 dagen voor de oogst. Daarbij geldt als voorwaarde, dat de te oogsten planten reeds geheel afgerijpt zijn.

Ter controle van deze toleranties is het gewenst een eenvoudige, voldoende gevoelige en snelle analysemethode ter beschikking te hebben. In de praktijk blijkt glyfosaat echter een moeilijk te analyseren component te zijn, voornamelijk door de matrix waarin het voorkomt.

Door zijn polaire karakter heeft glyfosaat een sterke voorkeur voor polaire oplosmiddelen. Het gangbare extractiemiddel is dan ook water, al of niet in combinatie met een niet mengbare organische vloeistof, zoals chloroform, om apolaire componenten te verwijderen. Na de extractie vinden een of meerdere opwerkingsstappen plaats, met behulp van een kation-, anion- en/of gelpermeatiekolom. Om tot een voldoende laag detectieniveau te kunnen komen is het noodzakelijk om tussentijds en/of aan het eind van de opwerking de waterfase sterk in te dampen. Over het algemeen gebeurt dit meerdere malen per extractie (Kienhuis). Als detectiemethode wordt zowel vloeistof- (HPLC met pre- of postcolumn derivatisering) als gaschromatografie (GC)₂ (na derivatisering) toegepast.

Het nadeel van al deze bepalingsmethoden is de bewerkelijkheid ervan. Vooral het handmatige deel van de opwerking vergt veel tijd. Het gestelde doel is dan ook om de analyse, op de extractie na, geheel geautomatiseerd te laten verlopen.

2 METHODE VAN ONDERZOEK

Het gestelde doel is een geautomatiseerde opwerking en detectie direct na een simpele extractie. Hierdoor vallen GC methoden af, aangezien hiervoor buiten de opwerking een aparte derivatisering steeds noodzakelijk is. Blijft over een HPLC methode, waarbij werd gedacht aan een combinatie van dialyse, pre-column concentrering en zuivering, HPLC scheiding en post-column derivatisering met fluorescentie detectie. Archer en Moya passen de HPLC scheiding met post-column derivatisering toe als detectiestap. De dialyse en pre-column concentrering zijn tot nu toe echter niet beschreven.

Bij de ontwikkeling is eerst het detectiesysteem opgebouwd en geoptimaliseerd. Vervolgens is de voorkolom in het systeem opgenomen en uitgetest qua capaciteit met standaardoplossingen. Bij de dialyse is gekeken naar de overdracht van glyfosaat door het membraan. De voorkolom is vervolgens qua capaciteit en regeneratie verder uitgetest met behulp van monsterextracten.

Tenslotte is de uiteindelijke procedure vastgelegd in een intern analysevoorschrift (bijlage A) en vervolgens uitgetest door diverse landbouwprodukten te analyseren.

In het voorschrift is een schema van het toegepaste systeem opgenomen.

3 RESULTATEN/DISCUSSIE

3.1 Analytische kolom

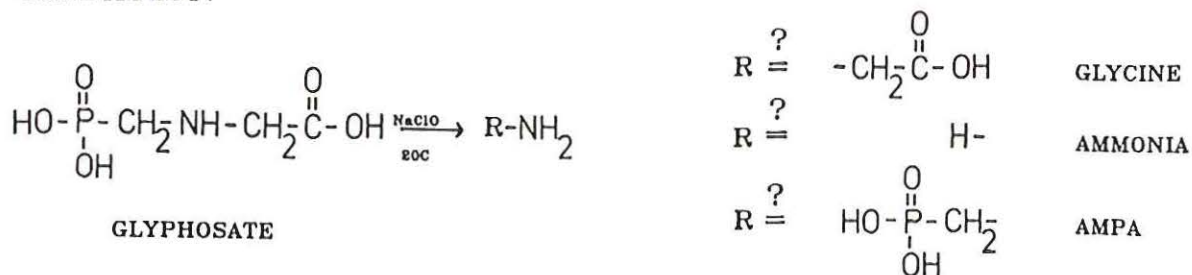
Glyfosaat is dermate polair, dat een ionenwisselaar als analytische kolom bij uitstek geschikt is. Bij de opbouw van het systeem is gebruik gemaakt van een "Ionospher-A" anionkolom (0,3 x 10 cm, glas, ChromSep systeem, quarternair ammonium als functionele groep met silica als dragermateriaal). De optimalisatie van de eluenssamenstelling is uitgevoerd met behulp van een UV-detektor bij 195 nm (Burns). Daarbij kwam een HPLC eluenssamenstelling van 0,0025 M K_2HPO_4 (0,34 g/l) + 1 ml H_3PO_4 85%/1 (pH=2,1) als het gunstigste naar voren, met als criteria een goede piekvorm en voldoende retentie om goed te worden gescheiden van de oplosmiddelpiek. De retentietijd bedraagt ca. 7 min. bij een flow van 0,6 ml/min en een piekbreedte op halve hoogte ($w_{1/2}$) van 0,4 min, hetgeen resulteert in een theoretisch schotelgetal (N_{th}) van 1700.

3.2 Post-column derivatisering

De post-column derivatisering is gebaseerd op een oxidatie van de secundaire amine van glyfosaat naar een primair amine met behulp van hypochloriet, gevolgd door een reactie met het OPA reagens (o-ftaalaldehyde + 2-mercapto-ethanol) waarbij een fluorescerend complex gevormd wordt (fig. 1).

Gezien het feit, dat er 2 reacties na elkaar moeten plaatsvinden met een totale reactietijd van meerdere minuten, is gekozen voor een "segmented flow" reactor. De eluensstroom wordt bij dit type reactor in partjes van ± 2 sec. verdeeld door een luchtbel. Binnen elk partje vindt een goede menging plaats. De menging tussen de partjes wordt echter verhinderd. Het principe wordt in fig. 2 toegelicht.

OXIDATION



DERIVATIZATION

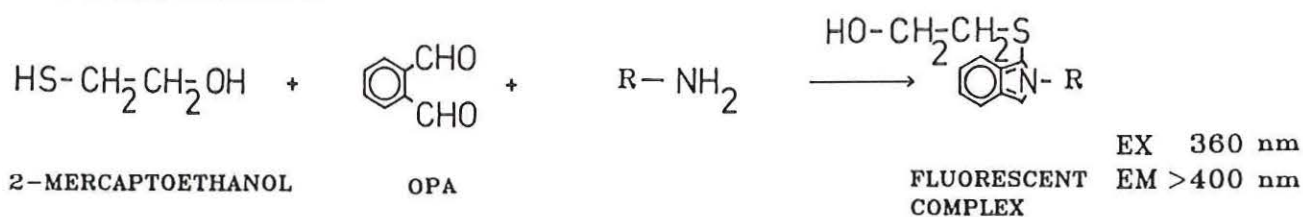


Fig. 1: Reactieschema post-columnderivatisering.

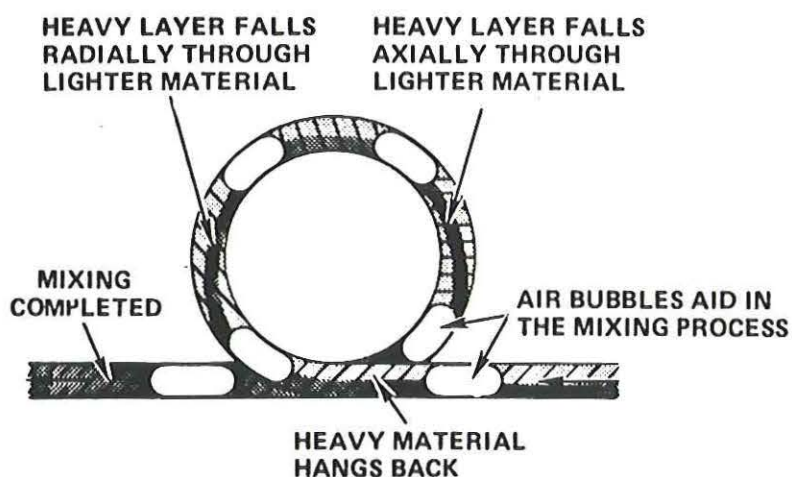


Fig. 2: Menging en scheiding met behulp van luchtbelletten.

Omdat lucht invloed heeft op de stabiliteit van de basislijn (opgeloste zuurstof "dooft" de fluorescentiestraling (de Galan) en eventueel aanwezige ammonia reageert net als een primair amine met OPA) wordt N₂ gebruikt om de partjes te scheiden.

De toevoeging van reagentia en N₂ en de verwijdering van N₂ geschiedt met behulp van een slangenpomp. Het schema van de post-column reactie is gegeven in bijlage A. Op basis van literatuurgegevens (Moye, Archer, Cowell) is een globale samenstelling van de reagentia en de mengspiralen gekozen. In tegenstelling tot Moye is de toevoer van de hypochlorietoplossing op 0,4 ml/min gezet en de concentratie van de buffer gehalveerd, omdat Archer aangeeft, dat een flow van 0,2 ml/min instabiliteit tot gevolg heeft. Archers keuze van 1,0 ml/min is vanwege een te grote verdunning niet overgenomen. Voor de hypochloriet-reactie is een mengspiraal van 20 windingen genomen (i.d. = 2 mm, volume = 4,6 ml), waardoor een reactietijd ontstaat van $\approx$ 3,5 min. Dit is langer dan Moye aangeeft, maar door de opdeling van de stroom met N₂-bellen is dit geen bezwaar, terwijl de contacttijd borg staat voor een goede reactie. De reactietijd van de derivatisering bedraagt 0,5 min hetgeen ruim voldoende is voor de OPA reactie, die zeer snel verloopt (5 windingen, i.d. = 2 mm, volume = 0,9 ml).

Omdat de analytische kolom een beduidend minder sterk eluens nodig blijkt te hebben dan Archer en Moye aangeven (beide passen 0,01 M H₂SO₄ en 0,09 M H₃PO₄ toe) moet de pH van de beide post-columnreacties worden geoptimaliseerd.

De oxidatiereactie wordt uitgevoerd met hypochloriet. Uitgegaan is van een geconcentreerde oplossing van Na-hypochloriet (chloorbleekloog), welke wordt toegevoegd aan een K₂HPO₄/NaCl buffer (pH=9).

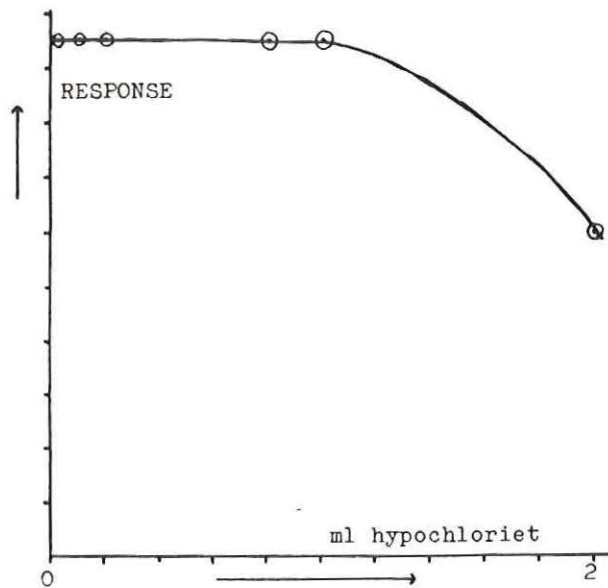


Fig. 3: Relatie piekhoogte/hypochloriet concentratie (ml/liter bufferoplossing).

Uit fig. 3 blijkt dat reeds bij een hoeveelheid van 0,01 ml/l een goede respons verkregen wordt. Uit ervaring is echter gebleken, dat de stabiliteit van zo'n oplossing erg slecht is. Reeds enige uren na de aanmaak van de 0,01 ml/l oplossing gaat de respons sterk achteruit.

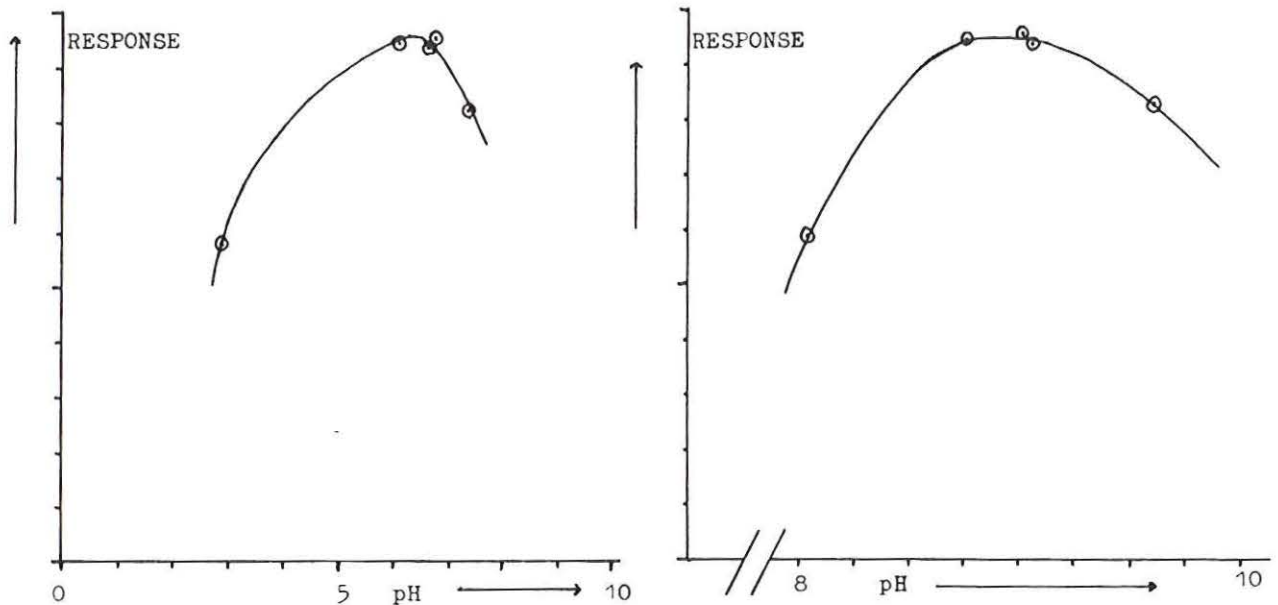


Fig. 4: Invloed van de pH op de oxidatiereactie.

Hypochloriet conc.=0,8 ml/liter buffer (pH OPA reactie=9).

Fig. 5: Invloed van de pH op de OPA reactie (pH hypochloriet reactie=6).

Bij addities boven de 1 ml/l wordt de respons minder. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door afbraak van het reeds gevormde primaire amine (Böhlen). Gekozen is voor een concentratie van 0,8 ml/l buffer, omdat deze oplossing gedurende meerdere dagen stabiel blijft zonder dat er afbraak optreedt.

Na optimalisatie van de concentratie is gekeken naar de pH van de hypochlorietreactie. Menging van 0,6 ml/min eluens (pH=2,1) met 0,4 ml/min hypochlorietbuffer (pH=9) leidt tot een reactie bij een pH van ca. 6.

Door toevoeging van hoeveelheden 2,5 N NaOH of 6 N HCl aan de hypochlorietbuffer is de pH van de reactie beïnvloed. Uit fig. 4 blijkt, dat de reactie bij een pH van ca. 6 een optimum heeft (de pH van de OPA reactie is hierbij constant gehouden op pH=9). Op dezelfde manier is de pH van de derivatiseringsreactie beïnvloed. Het optimum blijkt hier bij pH 9 te liggen (fig. 5). De reagentia van de post-column derivatisering zijn conform deze meetresultaten aangemaakt. Aan de hypochloriet-oplossing is van begin af aan Brij 35 (Merck) toegevoegd. Dit is een zeepachtige component, die er voor zorgt, dat de doorstroming in de reactor vloeiend verloopt en de stikstofbellen intact blijven, door verlaging van de oppervlaktespanning. Het heeft daarmee een duidelijk positieve invloed op de reproduceerbaarheid van de meting, terwijl het de feitelijke reacties niet beïnvloedt noch een verhoging van de basislijn geeft. Bij het vaststellen van het eluens van de analytische kolom is reeds vermeld, dat de piekbreedte op halve hoogte ($w_{1/2}$) 0,4 min is bij een retentietijd van ± 7 min (UV detector, 10 μ l injectievolume = 50 μ g op de kolom). Na installatie van de post-column reactor in combinatie met de fluorescentiedetector blijkt de retentietijd toegenomen te zijn tot 12 à 15 min met een piekbreedte op halve hoogte ($w_{1/2}$) van 0,5 min (50 μ l injectievolume = 50 ng op de kolom). Het detectieniveau ($s/n = 3$) ligt in de orde van 0,5 ng. Deze waarde komt overeen met waarden, die door Moye en Archer zijn vermeld.

3.3 Voorkolom

Uit de literatuur komt duidelijk naar voren, dat het noodzakelijk is na de extractie een of meerdere zuiveringsstappen te doorlopen voor de uiteindelijke detectie.

Om deze stap on-line te krijgen wordt een voorkolom geïntroduceerd met als doel zowel verwijdering van storende bestanddelen als concentrering van het extract om een voldoende laag detectieniveau te kunnen bereiken.

Het feit, dat glyfosaat in neutraal milieu (pH 7) 3-waardig negatief en 1-waardig positief is, geeft aan dat een anionenwisselaar betere perspectieven biedt, gezien het feit, dat di- en trivalente ionen een beduidend grotere selectiviteit bezitten dan monovalente. Dit komt overeen met de ervaringen van Archer en Glass. Beide gebruiken grote hoeveelheden water (100-1000 ml) bij het opbrengen van een monster op een anionkolom.

De voorkolom moet voldoen aan meerdere eisen:

- De diameter van de pakking moet niet te klein zijn, omdat anders bij het opbrengen van het extract verstopping optreedt, terwijl tevens wordt voorkomen, dat de drukverschillen bij het schakelen in en uit het detectiesysteem te groot zijn.
- De voorkolom moet voldoende capaciteit hebben om ook bij een extract met veel negatieve ionen (b.v. aminozuren) de glyfosaat te binden.
- Het HPLC eluens moet in staat zijn om de glyfosaat snel van de voorkolom te verwijderen.

Als vulmateriaal is dan ook gekozen voor een quarternaire ammoniumgroep op silicabasis met een diameter van 35-50 μm (AX/Corasil van Bondapak).

Bij de experimenten is eerst gewerkt met een kolom van 1,0 cm lengte en 2,1 mm i.d. (het leeg volume is 0,037 ml). De voorkolom is in plaats van de loop over de injectiekraan gezet om de capaciteit van de voorkolom te kunnen testen. Na het schakelen van "inject" naar "load" bevat de voorkolom HPLC-eluens, dat door te spoelen met 1 ml gede-ioniseerd water verwijderd kan worden. Na injectie van 50 μl standaardoplossing glyfosaat blijkt, dat spoelen met 1 ml water reeds voldoende is om een deel van de glyfosaat van de voorkolom te verwijderen. Vervanging van het divalente tegenion (HPO_4^{2-}) door regeneratie m.b.v. 1 ml HCl 1N direct gevolgd door 1 ml water bracht weliswaar een duidelijke verbetering, maar de capaciteit bleek bij monsters toch onvoldoende te zijn.

Op grond daarvan is een nieuwe voorkolom aangemaakt (10 cm x 0,3 cm id volume is 0,7 ml), die bij standaarden uitstekend blijkt te voldoen. De injectievolgorde van 1 ml gedeïoniseerd water (regeneratie), 50 µl standaardoplossing glyfosaat (= 50 ng) al of niet gevolgd door 50 ml water (spoelfase) brengt geen verschil in piekhoogte teweeg. Opmerkelijk is, dat vervanging van een 50 µl loop door een voorkolom van 0,7 ml (porievolume 0,35 ml) geen gevolgen heeft voor de piekbreedte (fig. 6).

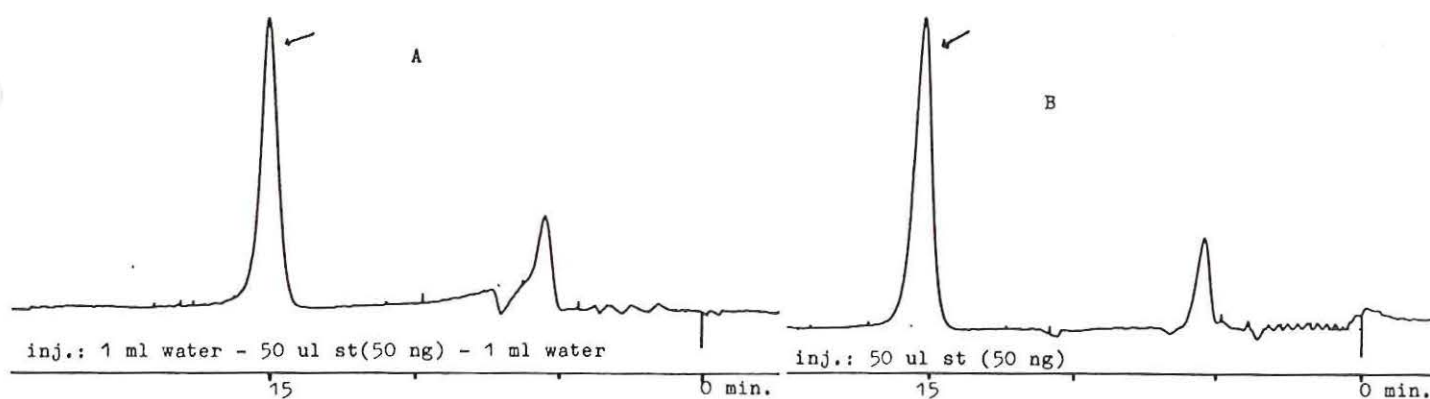


Fig. 6: Piekbreedte met of zonder voorkolom
A = met voorkolom, B = met loop

Gezien de te geringe capaciteit van de 1,0 cm voorkolom van 0,037 ml (porievolume 0,02 ml) moet geconcludeerd worden, dat glyfosaat niet in een kleine band voor op de kolom aanwezig is. Desondanks treedt geen piekverbreding op, waarschijnlijk ten gevolge van herconcentratie bij de elutie. Na het schakelen van de voorkolom in het detectiesysteem, doorloopt een vloeistoffront van het eluens de kolom. Bij een voldoende sterk eluens wordt de component direct meegenomen, waardoor het als een smalle band de voorkolom verlaat (fig. 7).

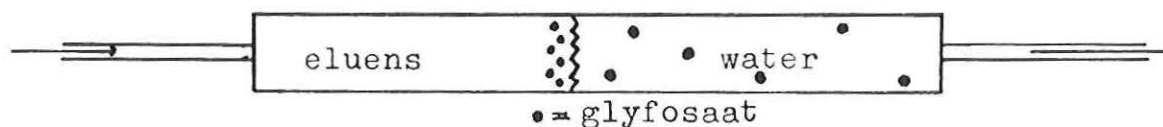


Fig. 7: Concentratie van de glyfosaat bij elutie van de voorkolom

Dit houdt in dat de lengte van de voorkolom niet direct van invloed is op de piekvorm, indien het eluens voldoende sterk is.

De elutie vindt plaats in dezelfde flow richting als het opbrengen om te voorkomen, dat eventuele deeltjes op de top van de voorkolom naar de analytische kolom gebracht worden. Na 4 min wordt de voorkolom weer teruggeschakeld uit het HPLC eluens om vervolgens geregenereerd te worden. Bij standaarden bleek, dat gedeïoniseerd water reeds voldoende was. Bij monsters voldoet dit echter niet. Na enige monsters gaat de capaciteit sterk achteruit. Daarom wordt na iedere analyse een extra regeneratiestap met een overdosis monovalente ionen uitgevoerd. 1 M azijnzuur (pH=2,4) blijkt hierbij beter te voldoen dan 1 M HCl, omdat de laatste oplossing het dragermateriaal (silica) van de voorkolom te sterk aantast. Na het uitspoelen van de overmaat acetaationen met gedeïoniseerd water is de voorkolom weer gereed voor gebruik.

3.4 Dialyse

De dialyse stap is onderzocht met de bedoeling het extract te zuiveren van grotere moleculen (b.v. eiwitten) en vaste deeltjes.

Bij de experimenten is gebruik gemaakt van een slangenpomp en een dialyseblok. Dit zijn onderdelen, die veel gebruikt worden bij de continuous flow (auto-analyzer) techniek. Een aliquot van het extract wordt door de pomp met een flow van 1 ml/min over een membraan gestuurd. Een deel van de kleinere moleculen gaat er door heen en wordt opgenomen in de onderstroom, die ze naar de voorkolom brengt (fig. 8).

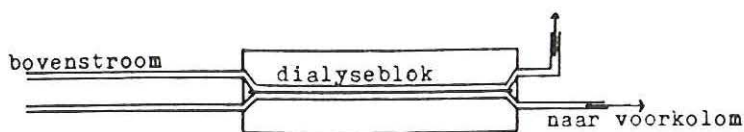


Fig. 8: Schema dialyse. Contactlengte membraan is 24 inch

Vervolgens wordt de voorkolom in het detectiesysteem geschakeld en kan de analyse plaatsvinden. Reeds na enige experimenten bleek, dat het terugvindingspercentage bij lagere concentraties erg slecht is. Bij de experimenten is steeds per standaard een hoeveelheid van 10 ml standaardoplossing over het membraan gepompt met een flow van 1 ml/min voor zowel de onder- als de bovenstroom.

Bij een standaard van 250 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ blijkt de overdracht 5% te zijn, hetgeen een gangbare waarde is bij een contactlengte met het membraan van 24 inch. Bij een hoeveelheid van 20 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ (= 10 mg/kg niveau in monsters) is het terugvindingspercentage gedaald tot 0,35% (fig. 9). Variaties van de pH in onderstroom of bovenstroom leidden niet tot een verbetering. De oorzaak moet dan ook gezocht worden in de adsorptie van glyfosaat aan de wand. De additie van fosfaationen aan de monsteroplossing (pH 6,5) (Miles) om actieve plaatsen af te schermen brengt een geringe verbetering tot stand (fig. 10), maar het terugvindingspercentage is desondanks zo laag en tevens afhankelijk van de concentratie, dat afgezien is van de dialysestap.

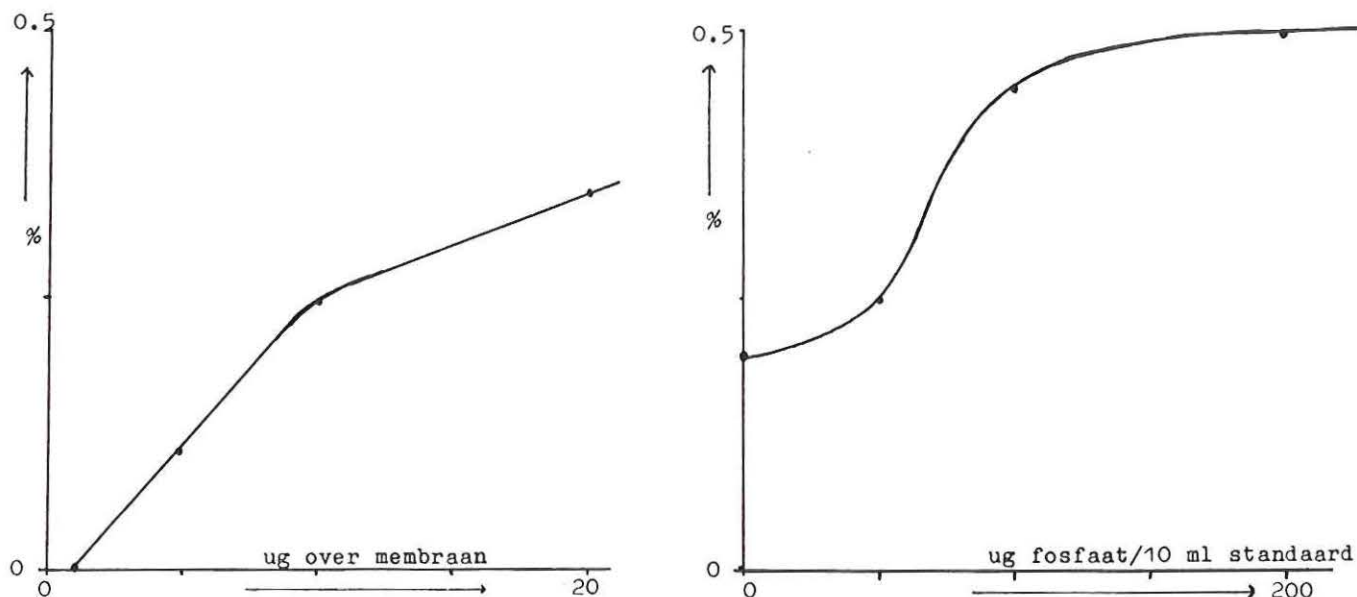


Fig. 9: Terugvindingspercentage glyfosaat bij dialyse.
Standaardvolume is 10 ml.

Fig. 10: Terugvindingspercentage na additie van fosfaationen aan de
standaard. Concentratie glyfosaat= 10 $\mu\text{g}/10\text{ml}$

Dit houdt echter wel in dat er gelet moet worden op de helderheid van het extract en dat de voorkolom beduidend meer te verwerken krijgt. Om vervuiling van de voorkolom te minimaliseren wordt de regeneratie in de backflush mode gedaan, waardoor grovere deeltjes na iedere analyse verwijderd worden van de top van de voorkolom. Om het effect van de backflush stap te versterken wordt de regeneratie uitgevoerd met een flow van 3 ml/min.

In de praktijk is gebleken, dat ook na enige honderden analyses de voorkolom geen tekenen van vervuiling vertoont.

3.5 Monsterintroductie

De experimenten tot nu toe om te komen tot een werkend systeem zijn grotendeels uitgevoerd met standaardoplossingen glyfosaat. Om de capaciteit van de voorkolom in aanwezigheid van een monsterextract te testen zijn enige proeven uitgevoerd met het complete systeem zoals beschreven in het interne analysevoorschrift (bijlage A).

De injectie wordt uitgevoerd door een WISP. Na injectie wordt het monster met een snelheid van 1 ml/min verplaatst (eluens is gedeïoniseerd water) naar de voorkolom, 4 min na injectie van de WISP wordt de voorkolom in het detectiesysteem geschakeld. Afhankelijk van het injectievolume is er maximaal ca. 2,5 min nodig om het monster in z'n geheel op de voorkolom te brengen. Van de 4 min kan dus minimaal 1,5 min als spoelfase beschouwd worden. Verlenging van deze spoelfase met water tot 3,5 en 5,5 min leverde bij graanmonsters identieke chromatogrammen op, waaruit blijkt, dat een periode van meer dan 1,5 min spoelen niet zinvol is.

De capaciteit van de voorkolom is getest door resp. 20 g ongemalen, grof gemalen ($0 < 2$ mm) en fijn gemalen ($0 < 1$ mm) graan (tarwe, rogge, gerst) te extraheren met 100 ml water en 50 ml chloroform. Na centrifugeren van de extracten vindt additie van glyfosaat aan de waterfase plaats op het 1 mg/kg niveau (= 20 µg glyfosaat aan 100 ml extract). De additie vindt achteraf plaats om een mogelijke invloed van de extractie uit te sluiten. Door variatie van het injectievolume kan de maximaal te injecteren hoeveelheid extract bepaald worden aan de hand van het terugvindingspercentage. Voor een standaard-oplossing glyfosaat (0,1 µg/ml) is het onderzochte gebied van 100 µl tot en met 1 ml (10 - 100 ng) lineair (fig. 11). Voor de graanmonsters blijkt uit tabel 1, dat het injectievolume, waarbij nog 100% recovery verkregen wordt, afhankelijk is van de fijnheid van het monster. Zowel bij gerst, rogge als tarwe komt dit patroon naar voren. Dit terugvindingspercentage kan enigszins gerelateerd worden aan de helderheid van het extract. De fijn gemalen fracties zijn sterk troebel, de grof gemalen iets en de ongemalen zijn helder.

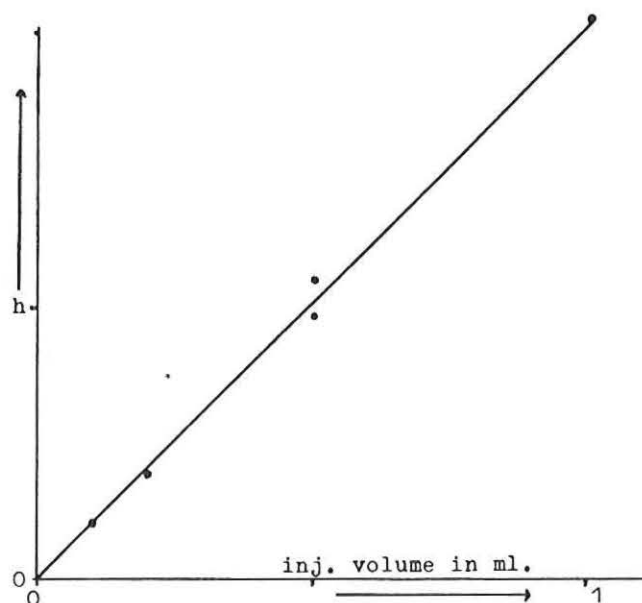


Fig. 11: Correlatie piekhoogte en injectievolume bij een standaard conc. van 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 1: Terugvindingspercentage bij diverse injectievolumina van graanextracten op een additieniveau van 1 mg/kg.

Tarwe Gerst Rogge	Terugvindings- percentage (%)	Injectievolume (μl)			
		125	250	500	1000
Ongemalen		100	100	100	100
Grof gemalen		100	100	100	60
Fijn gemalen		100	50	nb.	nb.
nb. = niet bepaald					

Extracten van fijngemalen mais en rijst zijn helder en geven ook bij een injectievolume van 250 μl nog een terugvindingspercentage van 100% (fig. 12). Blijkbaar bevat een troebele matrix dermate veel ionen dat de voorkolom bij grotere injectievolumina niet in staat is om de glyfosaat volledig vast te houden. Ook variatie in de opbrengsnelheid van 1 ml/min brengt geen verbetering.

Een filtratiestap is onderzocht door na de opwerking het extract in 3 gelijke fracties te verdelen en vervolgens resp. onbehandeld, via een 0,45 μm filter en via een Seppak C18 kolom te filtreren en te analyseren.

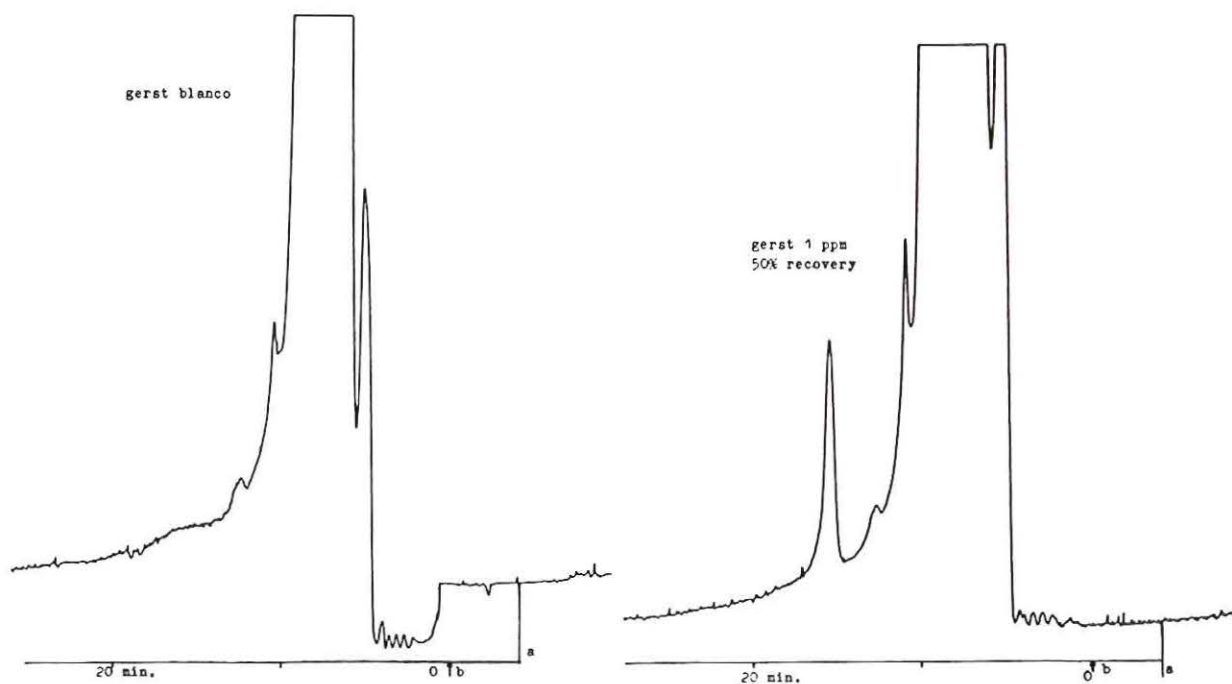
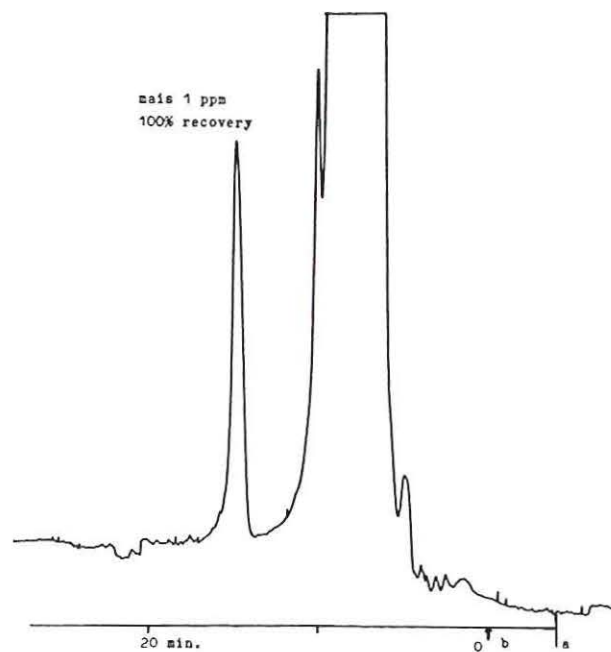


Fig. 12: Analyse fijngemalen graan. Injectievolume = 250 μ l
a: injectie WISP, b: voorkolom in detectiesysteem.

De C18 kolom is in het onderzoek betrokken, omdat het gebruik ervan niet alleen een zuiverend effect kan hebben, maar ook ionogene componenten met een apolair gedeelte erin kan binden.

Omdat uit het vorige experiment gebleken is, dat rogge, tarwe en gerst een identiek gedrag vertonen, is dit experiment uitgevoerd met grof gemalen rogge, aardbei, aardappel (met schil; met Moulinex gemalen) en asperge (met Moulinex gemalen). Voor de extractie werd op een additieniveau van 1 mg/kg glyfosaat toegevoegd. De inweeg is t.o.v. het vorige experiment met een factor 2 verminderd tot 10 g. Gebleken is, dat er vooral bij meel zoveel vloeistof wordt opgenomen door het monster, dat de extractie moeizaam verloopt. Uit de resultaten blijkt geen verschil in terugvindingspercentage. Injectie bij hogere injectievolumina leveren een identiek beeld op ongeacht een al of niet toegepaste filtratiestap. Ook qua helderheid van het extract is er geen verschil. In tabel 2 staan enige waarden vermeld bij verschillende injectiehoeveelheden. Er is geen uitsplitsing gemaakt per filtratiesoort, omdat dat geen verschil opleverde.

Tabel 2: Terugvindingspercentage bij verschillende injectievolumina.

Inweeg 10 g. Additieniveau 1 mg/kg product.

Terugvindingspercentage Produkt	Injectievolumen		
	250 µl	500 µl	1000 µl
Rogge	100	98	65
Aardbei	100	26	19
Aardappel	68	25	19
Asperge	94	66	37

Op grond van de resultaten is besloten geen filtratiestap toe te passen tijdens de opwerking. Tevens is uit beide experimenten gebleken, dat bij een injectievolumen van 250 µl het terugvindingspercentage, met uitzondering van aardappel, groter dan 90% is. Een hoger injectievolumen is voor een aantal produkten niet mogelijk, omdat dan een te groot deel van de glyfosaat van de voorkolom verdwijnt. In het interne analysevoorschrift (bijlage A) wordt dan ook van een injectievolumen van maximaal 250 µl uitgegaan bij een inweeg van 10 g monster.

3.6 IJklijn

De lineariteit is onderzocht over een gebied van 0-0,5 ng/ μ l bij een injectievolumen van 250 μ l, hetgeen overeenkomt met 0-125 ng op de kolom of 0-5 mg/kg in een monster bij een inweeg van 10 gram. De metingen zijn uitgevoerd met het complete systeem zoals beschreven in bijlage A. Het systeem blijkt lineair te zijn over het gehele meetbereik.

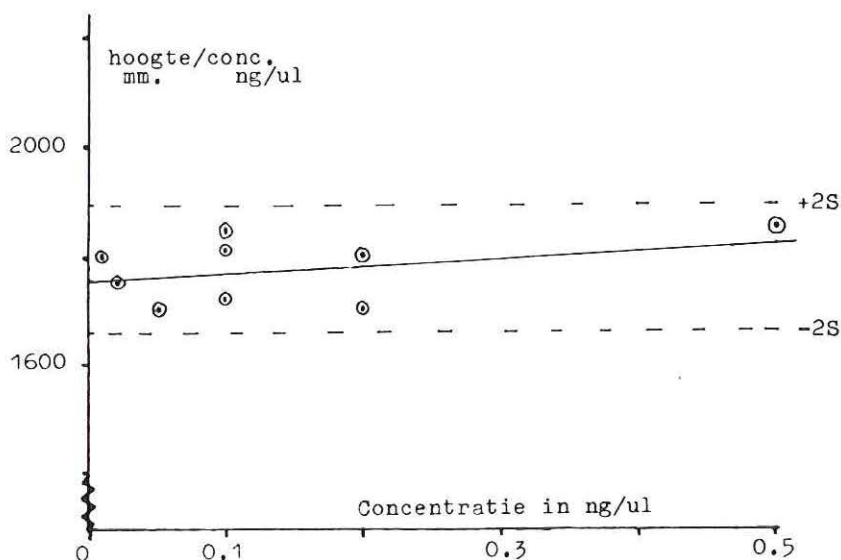


Fig. 13: Lineariteit glyfosaat. Injectievolumen = 250 μ l.
Correlatiecoëfficiënt = 0.9994

3.7 Testen procedure

Na optimalisering van het geautomatiseerde HPLC systeem zijn, om een indruk te krijgen van de bepaling, twee experimenten uitgevoerd.

3.7.1 Experiment 1

Voor enkele granen geldt een tolerantie op een niveau van 5-20 mg/kg. Om na te gaan of het terugvindingspercentage over een groter bereik lineair is, is er een experiment opgezet met diverse graansoorten op een additieniveau van resp. 1, 3 en 10 mg/kg. Per soort is een ongemalen en een grof gemalen (Moulinex: deeltjes $0 < 2$ mm) vorm meegenomen. Aan de graanmonsters is voor de extractie resp. 10, 30 en 100 μ g glyfosaat, 100 ml gedeïoniseerd water en 50 ml chloroform toegevoegd. Bij de serie is tevens een blanco chemicaliën meegenomen op het 3 mg/kg niveau.

Na de opwerking volgens bijlage A zijn de extracten 3x geanalyseerd in 3 meetseries uitgevoerd op afzonderlijke dagen. Tussen de metingen door zijn de extracten in de koelkast bewaard. De periode van extractie tot laatste meting was 2 weken. Voor de resultaten zie tabel 3. De gemiddelde waarde en de standaarddeviatie zijn berekend over alle meetwaarden per graansoort, omdat er geen duidelijk verschil is in het terugvindingspercentage per additieniveau.

Tabel 3: Terugvindingspercentage voor diverse graansoorten. Detectie in 3 afzonderlijke meetserie's. Inweeg is 10 g. Injectievolume is 250 µl.

Monster	Additie in mg/kg	Terugvindingspercentage (%)					
		Ongemalen			Grof gemalen		
Tarwe	1	70	77.2	63.0	75.8	68	70.4
	3	77	77	63.5	68.3	68.5	65.0
	10	72	n.b.	n.b.	91.3	72.2	65.7
		x = 71 (s = 6)			x = 72 (s = 8)		
Rijst	1	67	n.b.	65.6	103	93.0	82.5
	3	64	69.8	74.7	88.2	96.3	84.3
	10	68	n.b.	n.b.	80.0	108.5	76.7
		x = 68 (s = 4)			x = 90 (s = 11)		
Gerst	1	69	n.b.	65.5	75.7	68	65.5
	3	80	n.b.	81	71.3	70.5	67.7
	10	64	n.b.	80	92.1	85.6	74.5
		x = 74 (s = 8)			x = 75 (s = 9)		
Rogge	1	57	73.4	n.b.	74.1	68	63.0
	3	67	n.b.	68	86.2	78.5	73.3
	10	66	74.4	65	80.2	66.7	69.4
		x = 67 (s = 6)			x = 73 (s = 7)		

n.b. = niet bepaald

In de blanco experimenten op het 3 mg/kg niveau werd een terugvindingspercentage van respectievelijk 92.8, 90.5 en 90.3 gemeten; gemiddeld 91 (s = 1.4).

Uit de resultaten blijkt, dat het terugvindingspercentage constant is in het onderzochte additieniveau per monstersoort en maling. Tevens blijken de extracten stabiel te zijn gedurende meerdere dagen, indien ze bewaard worden in de koelkast.

3.7.2 Experiment 2

Rogge (gehomogeniseerd m.b.v. mixer), aardappel (met schil), asperge en aardbei zijn onderzocht op een additieniveau van 1 mg/kg. Van elk product is eenmaal of tweemaal 10 g afgewogen. Na het toevoegen van 100 ml water en 50 ml chloroform volgt een additie van 10 µg glyfosaat, waarvan de monsters verder worden opgewerkt zoals beschreven in bijlage A. Tevens is leidingwater en gedeïoniseerd water meegenomen. Aan 100 ml ervan is 50 ml chloroform toegevoegd en tevens resp. 1 of 10 µg glyfosaat. Het gedeïoniseerde water is te beschouwen als een blanco chemicaliën. Het leidingwater bevat meer ionen en kan dus een lagere retentie op de voorkolom veroorzaken. Na de extractie en centrifugestap is elk extract over 3 Wispflesjes verdeeld en zijn alle monsters in één serie geanalyseerd. Uit tabel 4 blijkt dat het terugvindingspercentage goed is met uitzondering van aardappel.

Tabel 4: Terugvindingspercentage van glyfosaat toegevoegd aan rogge, asperge, aardappel en aardbei op het 1 mg/kg niveau en aan water op het 0,01-0,1 mg/kg niveau.

Monster	Additie mg/kg	Terugvindingspercentage (%)			
					$\bar{x}$
Rogge (grof gemalen)	1	97.5	98	95.6	97.0
	1	107	107	91	102
Asperge	1	92	95	94	94
Aardappel	1	75	68	63	69
Aardbei	1	101	104	103	103
	1	101	95	103	100
Leiding- water	0.1	113	101	107	107
	0.01	110	109	110	110
Gedeïoniseerd water	0.1	100	105	105	103
	0.01	100	110	112.5	108

Tussen experiment 3.7.1 en 3.7.2 is het systeem $\pm$ 1 maand bewaard in gedeïoniseerd water. Na deze periode bleken zowel de voorkolom als de analytische kolom niet meer goed te functioneren en zijn daarom vervangen. De oorzaak moet gezocht worden in een biologische afbraak van het kolommateriaal. Op grond hiervan wordt in bijlage A aanbevolen de beide kolommen te bewaren in een 1 : 1 methanol-water mengsel, indien het systeem gedurende enige tijd niet gebruikt wordt.

Bij vergelijking van de meetresultaten van experiment 3.7.1 en 3.7.2 blijkt het terugvindingspercentage gestegen te zijn. Omdat rogge in beide experimenten is gebruikt, geeft dit een goede vergelijkingsmogelijkheid. In hoeverre het vervangen van de voorkolom hieraan

bijgedragen heeft, kon niet bewezen worden, omdat de oude voorkolom niet meer functioneerde. Wel kan geconcludeerd worden, dat ook voor granen een terugvindingspercentage van > 90% haalbaar is maar dat de voorkolom, ondanks de regeneratiestap na iedere analyse, op den duur in capaciteit vermindert.

3.8 Monsteronderzoek

In totaal zijn 5 tarwe, 5 rijst, 5 gerst, 10 rogge, 5 mais, 1 aardbei, 1 asperge en 1 aardappelmonster onderzocht. De granen zijn van buitenlandse herkomst. De overige monsters zijn van Nederlandse herkomst. De graansoorten zijn zowel ongemalen als grof gemalen (Moulinex) opgewerkt. Op enkele roggemonsters na is in geen van de monsters glyfosaat gevonden (detectieniveau 0,04 mg/kg bij $s/n = 3$). In enkele van de rogge's werd een geringe hoeveelheid glyfosaat gevonden vlak boven het detectieniveau. De meetwaarden van alle roggemonsters zijn daarom gespecificeerd in tabel 5.

Tabel 5: Analyseresultaten roggemonsters.

Rogge nummer	Glyfosaatgehalte in mg/kg	
	Ongemalen	Gemalen (deeltjes 0 - < 2 mm)
1	-	-
2	n.b.	-
3	n.b.	0,13
4	0,10	0,08
5	n.b.	-
6	n.b.	-
7	-	-
8	-	-
9	0,10	0,14
10	n.b.	-

n.b. = niet bepaald.

- = lager dan detectieniveau van 0,04 mg/kg

Omdat er geen monsters aanwezig zijn, die als duidelijk positief naar voren komen, is niet duidelijk of het nodig is om het graan te malen. Voor de zekerheid is daarom in het voorschrift (bijlage A) gekozen voor de grof gemalen vorm, maar ook ongemalen en fijn gemalen graan (meel) kan geanalyseerd worden.

4. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Bij de inleiding is als doel gesteld, dat na een simpele extractie direct gemeten moet kunnen worden. Dit doel is bereikt door een pre-concentratie van glyfosaat op een voorkolom te introduceren. Het resultaat is een methode, die bij uitstek geschikt is om routinematig te worden ingezet. De opstelling vergt weliswaar een combinatie van meerdere apparaten (sampler, kranen, 2 pompen, slangenpomp, detector en stuureenheid), maar blijkt na de opbouw vrijwel probleemloos te draaien, mede doordat de voorkolom gereinigd wordt na elke analyse tijdens de regeneratiestap in de backflush mode. De analysetijd bedraagt 32 min hetgeen overeenkomt met 45 injecties/24 uur (met andere woorden ca. 35-40 monsters per dag). De voorbewerking is dermate simpel, dat dit aantal door één analist in 8 uur kan worden voorbereid met vooraf gehomogeniseerde monsters.

De post-columnreactie blijkt betrouwbaar en reproduceerbaar te werken. Archer en Moye passen deze reactie ook toe, maar maken geen gebruik van "stikstof" segmentatie. Bij het opzetten van de post-columnderivatisering viel reeds op, dat de piekbreedte amper toenam ($w_{1/2}$ van 0,4 naar 0,5 min met een retentietijd van 12-13 min). Vergeleken met beide bovengenoemde auteurs ($w_{1/2}$ 0,9 en 1,2 min bij een retentietijd van resp. 13 en 17 min) komt de piekbreedte dan ook als gunstig naar voren. Qua detectieniveau (0,5 ng op de kolom bij $s/n = 3$) is er weinig verschil aanwezig. Het terugvindingspercentage (ca. 90% met uitzondering van aardappels 70%) van het totale systeem, gecombineerd met de aangegeven extractiemethode, komt overeen met de waarden die in de literatuur vermeld worden (Archer, Moye, Roseboom). De methode is geschikt voor de analyse van een breed scala van landbouw- en tuinbouwproducten.

De maximum residu tolerantie van 0,05 mg/kg voor een aantal producten (Bestrijdingsmiddelenwet) ligt echter dermate dicht in de buurt van het detectieniveau (ca. 0,04 mg/kg), dat het gewenst is, dit verder te verlagen. Mogelijkheden hiervoor zijn de verbetering van het detectiesysteem door toepassing van een gevoelige detector en/of verhoging van het injectievolume door b.v. de introductie van een extra clean-up stap of een betere of langere voorkolom. Tot die tijd dient de methode op het 0,05 mg/kg niveau als screeningsmethode beschouwd te worden.

LITERATUUR

Archer T.E., Stokes J.D. Residue Analysis of Glyphosate in Black-berries by High-Performance Liquid Chromatography and Post-Column Reaction Detection.

J. Agric. Food Chem., 32, (1984), 586-588.

Bestrijdingsmiddelenwet, Uitvoeringsvoorschrift CII-4 (residubeschikking), Koninklijke Vermande BV, Lelystad, 1986.

Böhlen, P., Mellet M. Automated Fluorometric Amino Acid Analysis: The determination of Proline and Hydroxyproline.

Analytical Biochemistry, 94, (1979), 313-321.

Burns A.J., Tomkins D.F. The Determination of N-(Phosphonomethyl) Glycine in Formulation and Technical Samples by High Pressure Liquid Chromatography.

(Chromatogr. Sci, 17, (1979), 333-335.

Cowell J.E., Kunstman J.L., Nord P.J., Steinmetz J.R., Wilson G.R. Validation of an Analytical Residue Method for Analysis of Glyphosate and Metabolite: An Interlaboratory Study.

J. Agric. Food Chem., 34, (1986), 955-960.

De Galan L. Analytische spectrometrie.

2e druk. Amsterdam/Brussel, Elsevier, (1972), 69.

Glass R.L. Liquid Chromatographic Determination of Glyphosate in Fortified Soil and Water Samples.

J. Agric. Food Chem., 31, (1983), 280-282.

Kienhuis P.G.M., Tuinstra L.G.M.Th. Literatuuroverzicht glyphosate, Wageningen 1986, RIKILT rapport 86.76.

Miles C.J., Wallace L.R., Moye M.A. Determination of Glyphosate Herbicide and (Aminomethyl) phosphonic Acid in Natural Waters by Liquid Chromatography Using Pre-Column Fluorogenic Labeling with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 69, no. 3, (1986), 458.

Moye H.A., Miles C.J., Scherer S.J. A Simplified High Performance Liquid Chromatographic Residue Procedure for the Determination of Glyphosate Herbicide and (Aminomethyl) phosphonic Acid in Fruits and Vegetables Employing Post-column Fluorogenic Labeling.

J. Agric. Food Chem., 31, (1983), 69-72.

Roseboom H., Berkhoff C.J. Determination of the herbicide glyphosate and its major metabolite, aminomethyl phosphonic acid, by high performance liquid chromatography after fluorescence labelling.

Anal. Chim. Acta, 135, (1982), 373-377.

AFDELING ORGANISCHE CONTAMINANTEN F 110

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 492

1e oplage (1987-07-10)

GRANEN, FRUIT, AARDAPPELEN - BEPALING VAN GLYFOSAAT MET BEHULP VAN
TWEEDIMENSIONALE VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE EN POST-COLUMN DERIVATISERING
- FLUORESCENTIE DETECTIE

Verzendlijst: sectorhoofd, bibliotheek (5x), afdeling OCON (4x)

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 492

1e oplage (1987-07-10)

Granen, fruit, aardappelen - bepaling van glyfosaat met behulp van tweedimensionale vloeistofchromatografie en post-column derivatisering - Fluorescentie detectie

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Het bepalen van residuen van glyfosaat in land- en tuinbouwproducten. De methode is getest voor tarwe, gerst, rogge, mais, rijst, aardappelen, asperges en aardbeien.

De detectiegrens bedraagt 0,04 mg/kg op product. Voor de producten waarvoor het maximum toelaatbare gehalte 0,05 mg/kg bedraagt, kan de methode als een screeningsmethode beschouwd worden.

De recovery van glyfosaat op het 1-10 mg/kg niveau toegevoegd aan bovengenoemde producten is groter dan 90% met uitzondering van aardappelen waarvoor de recovery ca. 70% bedraagt.

2 PRINCIPE

Glyfosaat wordt uit de matrix geëxtraheerd met behulp van een gedeïoniseerd water/chloroform mengsel. Een aliquot van de waterfase wordt na een centrifugestap onderworpen aan een tweedimensionale vloeistofchromatografische bepaling gevolgd door een post-column derivatisering en fluorescentie detectie.

3 REAGENTIA

De gebruikte reagentia moeten van een zodanige kwaliteit zijn dat bij een blanco-bepaling volgens dit voorschrift geen interferentie met glyfosaat optreedt.

Alleen gedeïoniseerd water wordt toegepast!

3.1 Basisoplossing glyfosaat 100 µg/ml in water.

Maak door verdunnen met water uit deze basisoplossing de werkoplossing van 0,1 µg/ml voor producten met een tolerantie op het 0,05 mg/kg niveau respectievelijk 1,0 µg/ml voor de overige producten (opm. 7.1).

3.2 Chloroform, p.a.

3.3 Azijnzuur, 100%.

Maak een 1 M azijnzuuroplossing door verdunning van 60 ml 100% azijnzuur met water naar 1,0 liter.

3.4 HPLC eluens (pH = 2,1).

Los 0,34 g kaliumdihydrogenfosfaat (KH_2PO_4) op in 1 l water en voeg 1,0 ml fosforzuur (85%) toe (opm. 7.2).

3.5 Brij 35 (Merck nr. 801962).

Weeg 25,0 g Brij 35 af en vul aan met water tot 100 ml.

3.6 Chloorbleekloog, 10 g werkzaam chloor/100 ml.

3.7 Basisoplossing oxidatiereagens.

Los 87,0 g dikaliumhydrogenfosfaat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 58,0 g natriumchloride (NaCl) en 10 ml Brij 35 (3.5) op in 1,0 l water. Bewaar deze oplossing in de koelkast.

3.8 Werkoplossing oxidatiereagens (pH = 9).

Voeg aan 100 ml basisoplossing oxidatiereagens (3.7) 0,8 ml chloorbleekloog toe en verdun naar 1,0 l met water. Dagelijks vers bereiden.

3.9 Basisoplossing derivatiseringsreagens.

Los 31,0 g boorzuur (H_3BO_4) en 31,0 g natriumhydroxide (NaOH) op in 1,0 l water.

3.10 Werkoplossing derivatiseringsreagens (pH = 9,2)

Los 0,9 g o-ftaaldialdehyde (OPA) en 1,0 ml 2-mercapto-ethanol volledig op in 10 ml methanol. Voeg daarna 100 ml basisoplossing derivatiseringsreagens (3.9) toe en vul aan tot 1,0 l met water.

4 APPARATUUR

De opbouw van het HPLC-systeem is gegeven in bijlage A.

4.1 Mixer, b.v. Moulinette.

4.2 Schudapparaat (Desaga).

4.3 Centrifuge.

4.4 WISP-injectieautomaat.

4.5 HPLC-pompen (Waters M45).

4.6 Zespoortkranen, automatisch bestuurbaar.

4.7 System controller voor automatische flowinstelling van de HPLC-pompen en het schakelen van de kranen (Waters 720).

4.8 Solvent switch selector (Waters) (opm. 7.3).

4.9 Slangenpomp, meerkanaals (Cenco) (opm. 7.4).

4.10 Fluorescentiedetector (Aminco, excitatie filter 360 ± 20 nm, emissie filter > 400 nm).

4.11 Recorder, dubbelpens.

4.12 Integrator.

4.13 Voorkolom (0,3 x 10 cm, glas) droog gevuld met AX/Corasil (37-50 μ m, Bondapak, Waters), een quarternaire ammoniumgroep op silicabasis.

4.14 Analytische kolom (0,3 x 10 cm, glas) gevuld met Ionospher A (10 μ m, Chromsep systeem, Chrompack), een quarternaire ammoniumgroep op silicabasis.

5 WERKWIJZE

5.1 Extractie

Het monster wordt zonodig gehomogeniseerd en verkleind in een mixer (4.1).

Weeg 10 g gehomogeniseerd monster af in een fles van 250 ml voorzien van een schroefdop met inlage. Voeg 100 ml water en 50 ml chloroform toe. Sluit de fles. Schud het monster 30 min op een schudapparaat (4.2). Breng het monster over in een centrifugebuis van 250 ml. Centrifugeer 10 min bij 3000 g. Vul een monsterflesje met ca. 3 ml van de bovenstaande heldere waterfase. Plaats het monsterflesje in de WISP-injectieautomaat.

5.2 Blanco bepaling

Breng 100 ml water en 50 ml chloroform in een fles van 250 ml. Schud gedurende 30 min en volg de methode beschreven onder 5.1 vanaf: Breng het monster ...

5.3 Recovery bepaling

Weeg 10 g gehomogeniseerd monster af in een fles van 250 ml voorzien van een schroefdop met inlage. Voeg 10 ml werkoplossing glyfosaat ($1,0 \mu\text{g/ml} \sim 1,0 \text{ mg/kg}$ niveau), 90 ml water en 50 ml chloroform toe. Sluit de fles. Schud gedurende 30 min en volg de methode beschreven onder 5.1 vanaf: Breng het monster ...

5.4 Instellen apparatuur

Controleer of er voldoende HPLC-, oxidatie- en derivatiseringsreagens is voor het aantal te analyseren monsters.

Zet de fluorescentiedetector aan. Instelling multiplier is 100 en damping in on-positie.

Stel de eluensflow door de analytische kolom (0,6 ml/min) en door de voorkolom (1,0 ml/min) in. Schakel eerst de slangenpomp in en daarna de HPLC-pompen. Laat het systeem gedurende 30 min stabiliseren (opm. 7.5).

Stel na aanzetten van de WISP-injectieautomaat de volgende waarden in:

- 1) "SYS"
MES : " 71 " : "enter"
- 2) "01" : "enter"

De combinatie van de eerste twee instructies maakt een injectievolume tot 2000 µl mogelijk.

Open de onderste deur van de WISP, wacht even tot de automaat de monstercarrousel laat "vallen". Neem deze uit de automaat. Plaats een flesje met standaardoplossing (3.1) in de carrousel. Plaats deze terug in de automaat dusdanig dat het flesje zich vóór het injectiepunt bevindt.

Sluit de deur en wacht enige ogenblikken.

Het rode lampje voor "auto" moet branden en zo niet, druk dan op de toets "auto/single" zodat het gaat branden. Nu worden in de aangegeven volgorde de injectieparameters ingetoetst.

- 1) " sample "
no : " 0 " : "enter"
- 2) " inj. "
vol : "250" : "enter"
- 3) " run "
time : " 30" : "enter"
- 4) " no of "
inj. : " 1 " : "enter"
- 5) " enter"

De in te stellen waarden voor de system controller (4.7) zijn gegeven in bijlage B.

Met behulp van de "blank adjust" van de Aminco detector is de basislijn op de recorder in te stellen. Het gebruik van een dubbelpens-recorder (instelling 10 en 50 mV) maakt een bepaling over een groot bereik mogelijk.

De belangrijkste in te stellen parameters voor de integratie met het SP 4000 systeem zijn:

file center: pw 40, pt 400, ma 1000

function file: ap 0, tb 3, tp 1

time file: rt 1 ii 1, rt 100 ii 0, rt 180 t6 1, rt 181 t6 0.

(zie verder Intern Analysevoorschrift nr. A 345 voor de bediening van het SP-integratiesysteem).

Als alle apparatuur op de juiste waarden ingesteld zijn kan de WISP-injectie-automaat gestart worden.

Van de standaardoplossing wordt nu éénmaal 250 µl geïnjecteerd. De ingestelde runtijd bedraagt 30 minuten. Als de analyse goed verloopt kunnen de monsters en standaarden in de WISP geplaatst worden.

De system controller stopt 50 min na het injecteren van het laatste monster de recorder en de flow door de voorkolom (opm. 7.6/7.7).

De verschillende fasen in de HPLC-analyse zijn gegeven in bijlage C.

6 BEREKENING

De berekening van het gehalte in het monster kan zowel gebeuren met behulp van de piekhoogte als het oppervlak (via de integrator).

Gebruik als referentie de gemiddelde piekhoogte cq. oppervlak van de 2 dichtstbijzijnde standaarden en pas de volgende formule toe voor de berekening van het gehalte.

$$\frac{H_m}{H_s} \times [S] \times \frac{V_s}{V_m} \times \frac{100}{I} = \text{glyfosaatgehalte in } \mu\text{g/g}$$

H_m = response glyfosaat in monster (mm of opp.)

H_s = response glyfosaat in standaard (mm of opp.)

[S] = concentratie van de standaard (µg/ml)

V_s = injectievolumen standaard (µl)

V_m = injectievolumen monster (µl)

I = inweeg monster (g)

7 OPMERKINGEN

7.1 Volgens C.J. Miles, L.R. Wallace and H.A. Moyer, J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 69, no. 3 (1986), 458-461 blijkt dat standaarden minimaal 6 maanden in de koelkast zijn te bewaren. Voor extracten van monsters bedraagt de bewaartijd ca. 3 maanden.

7.2 Om luchtbellens te voorkomen wordt het eluens met behulp van helium of stikstof ontlucht.

7.3 In plaats van de solvent switch selector kan ook via externe besturing gebruik gemaakt worden van een gasdruk gestuurde Valco zespoortskraan. Het schema voor de toepassing van een gasgestuurde kraan is gegeven in bijlage D.

7.4 Een slangenpomp kan toegepast worden na de analytische kolom voor de toevoer van het oxidatiereagens, het derivatiseringsreagens en aan- en afvoer van de stikstofstroom door gebruik te maken van slangen met een verschillende diameter. Een en ander is voordeliger dan toepassing van HPLC-pompen.

7.5 De ruis op de basislijn is te beïnvloeden met behulp van de instelschroef op de slangenpomp behorende bij het afdrukmechanisme van de stikstofaanvoerslang.

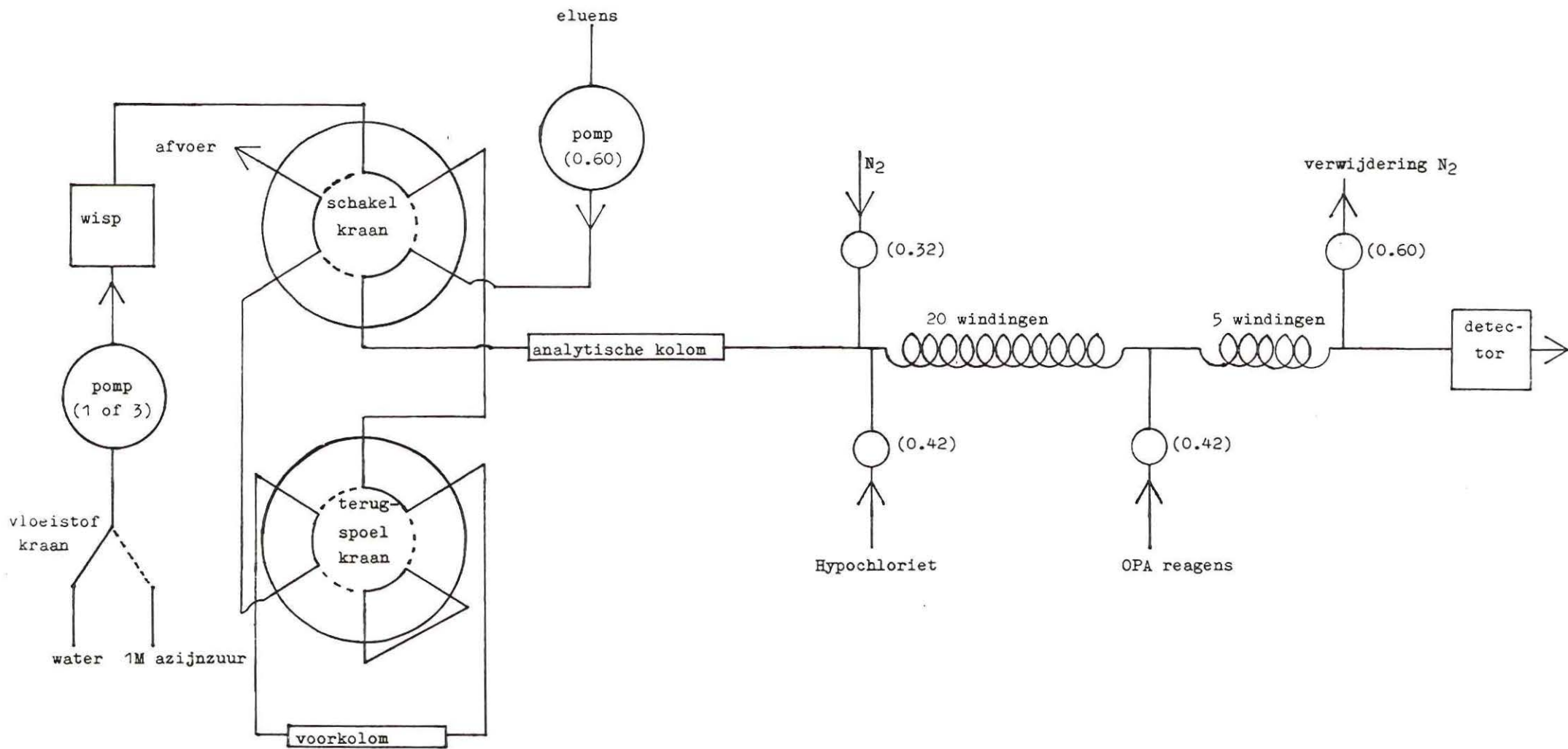
7.6 Indien de opstelling niet gebruikt wordt, moet het eluens in de beide kolommen vervangen worden door een methanol/watermengsel (1:1). Zet daartoe de voorkolom en de analytische kolom op lijn (bijlage C: schakelstand B) en verpomp het mengsel met de eluenspomp. Het kolommateriaal heeft een silicabasis welke redelijk bestand is tegen de pH van het HPLC eluens. Echter het onnodig lang laten staan van het eluens in de kolom leidt tot een verhoogd verlies aan functionele groepen met als bijkomstigheid, dat de detectie met hypochloriet en OPA gevoelig is voor quarternaire ammoniumgroepen tot op een zeer laag niveau. Vooral bij een nieuwe kolom kan dit leiden tot een verhoogde basislijn. Enige tijd uitspoelen met eluens is daarbij de remedie.

7.7 Bij een stilstaande slangenpomp mag het deksel de pompslangen niet vastklemmen op de rollers, omdat deze anders vervormd worden, waardoor de flow instabiel wordt en het debiet kan veranderen.
Controleer de pompslangen regelmatig op slijtage en vervang ze indien nodig.

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

Samensteller: ing. P.G.M. Kienhuis





SCHEIDING

OXIDATIE

DERIVATISERING

DETECTIE

PRECONCENTRERING EN ZUIVERING

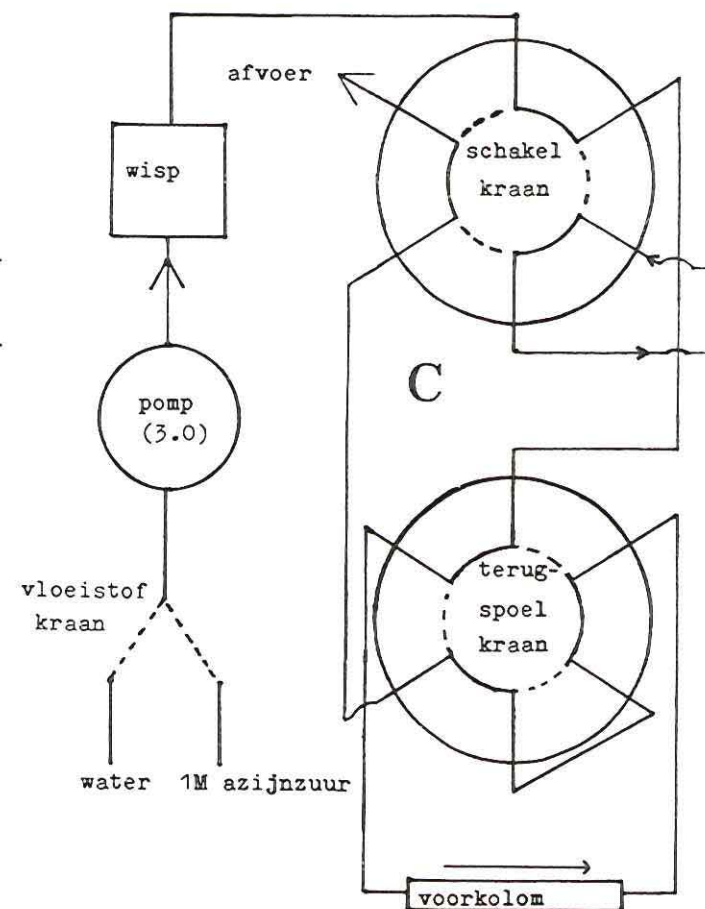
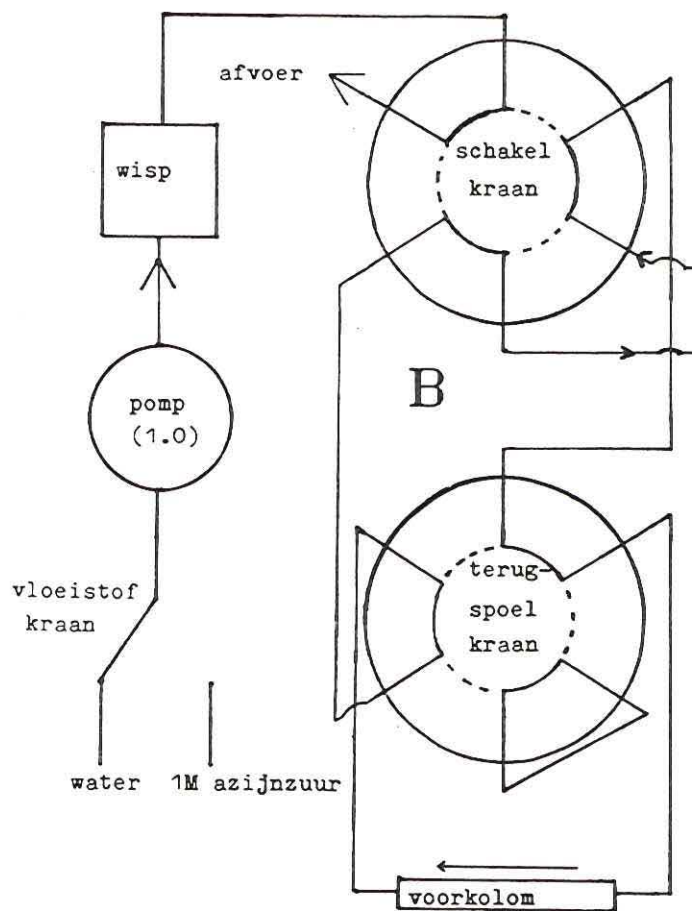
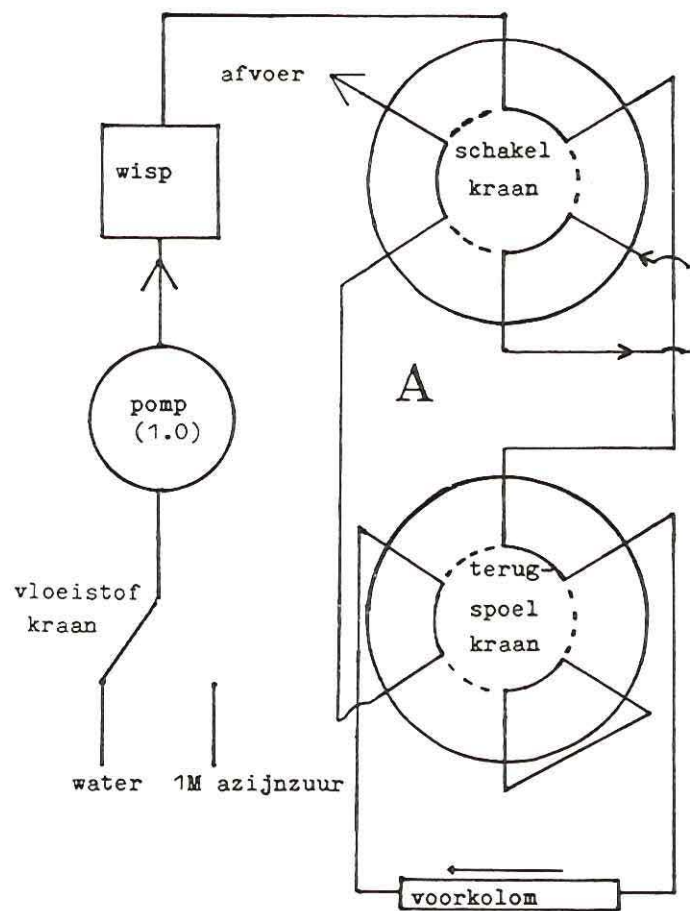
DETECTIESYSTEEM

Flow in ml/min tussen haakjes

Programmering stuureenheid

Tijd in minuten	PROGRAMMEERSCHERM									EVENTS: PUMPSET 3	
	GRADIENT		EVENTS							1. vloeistofkraan	5.
	flow ml/min	curve	1	2	3	4	5	6	7	2. integrator set RUN	6. recorderpapier
init	1									3. schakelkraan	7.
										4. terugspoelkraan	
										OPMERKINGEN	
0	1									injectie WISP 250 µl	
0,01								on		start recorderpapier	
4					on					voorkolom in detectiesysteem	
4,01				pulse						start integrator	
8					off					voorkolom uit detectiesysteem	
10	3	11	on							eluens voorkolom van water naar 1 M azijnzuur en flow naar 3 ml/min	
10,01						on				omkeren van de flow door de voorkolom	
16			off							eluens voorkolom terug naar water	
26	1	11				off				omkeren van de flow door de voorkolom	
50								off		stopt recorderpapier	
51	0	11								stopt flow door WISP en voorkolom	

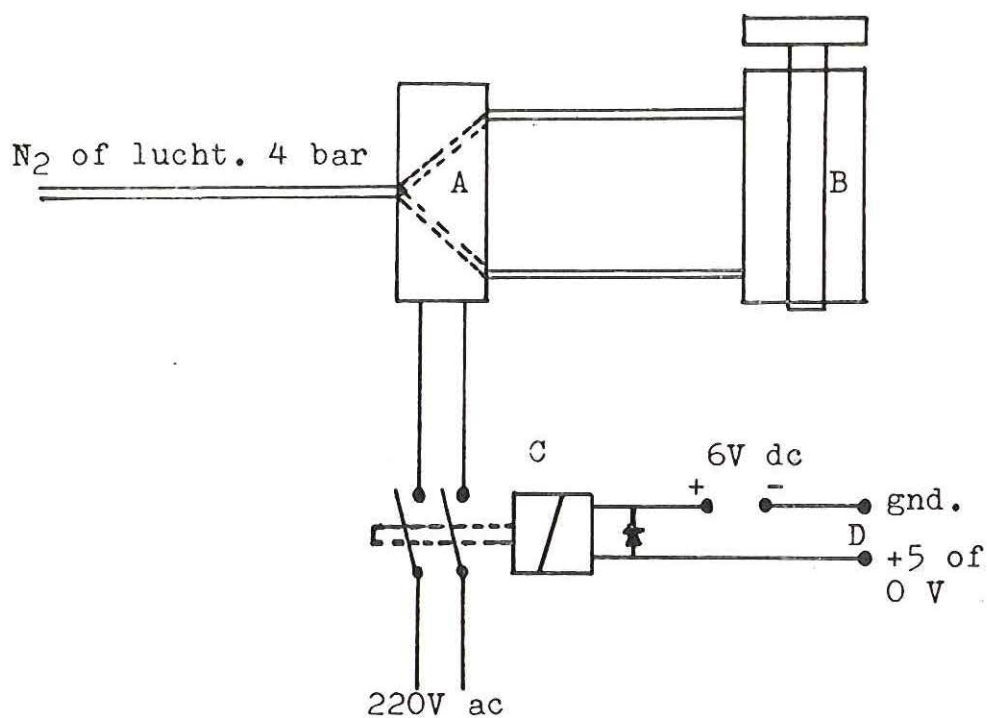
De WISP heeft een "runtime" van 30 min. Daarna wordt de loop gevuld met het volgende monster en na injectie begint het schema weer bij t = 0. Na het laatste monster stoppen het recorderpapier en de flow door de WISP automatisch na respectievelijk 50 en 51 min.



Schakelstanden

- A: injectie van WISP naar voorkolom
- B: injectie van voorkolom naar analytische kolom
- C: regeneratie voorkolom (Back Flush)

Voor gehele schema zie bijlage A

Schakelschema gasgestuurde kraan

- A: gasklep 220 V gestuurd
- B: gasgestuurde zespoortskraan
- C: 6 V relais
- D: stuureenheid

De system controller (4.6) schakelt met + 5V dc al of niet aanwezig. Het relais heeft 6 V dc nodig, waarvoor een extra voeding in de vorm van een adaptor is toegevoegd.