

## GLYPHOSAT / AMPA



Glyphosat (*N*-Phosphonomethylglycin), die aktive Komponente in den kommerziellen Unkrautvernichtungsmitteln Roundup® und Rodeo®, ist ein modernes Breitband-Herbizid. Dessen intensiver Einsatz in der Landwirtschaft und im privaten Bereich kann zu Kontaminationen des Grundwassers und der kultivierten Pflanzen führen. Um Glyphosat und dessen Hauptmetaboliten AMPA (Aminomethylphosphonsäure) im Spurenbereich nachweisen zu können, wird von PICKERING eine komplette Methode (PINNACLE PCX und Applikationskit) angeboten, die auf der amerikanischen EPA-Methode 547 basiert. Das Glyphosat-Kit enthält neben der Säule auch Reagenzien, Diluenten, Eluenten und Standard.

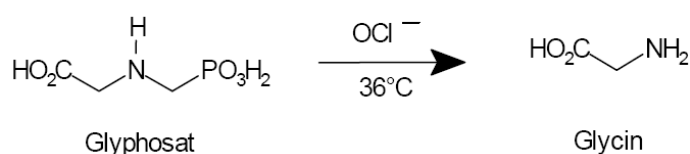
### Methodenbeschreibung

Mit dieser HPLC-Nachsäulenderivatisierungsmethode ist es möglich, einen weiten Bereich von Probenmatrices (Lebensmittel, Wasser, etc.) abzudecken.

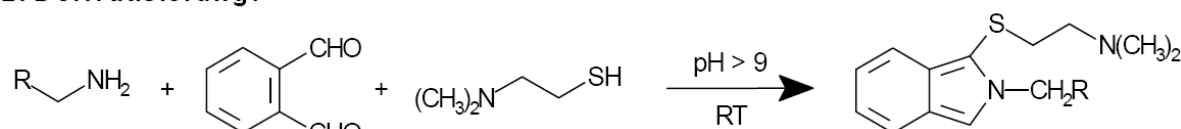
Die Derivatisierung von Glyphosat (sekundäres Amin) erfolgt in einer zweistufigen Reaktion. Im ersten Schritt wird Glyphosat zum primären Amin Glycin oxidiert, das danach im zweiten Schritt mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und Thiofluor® (2-Mercapoethanolderivat) zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat reagiert. AMPA als primäres Amin reagiert ohne vorhergehende Oxidation spontan mit OPA/Thiofluor®.

### Derivatisierung von Glyphosat/AMPA zu fluoreszierenden Isoindolderivaten

#### 1. Oxidation:



#### 2. Derivatisierung:

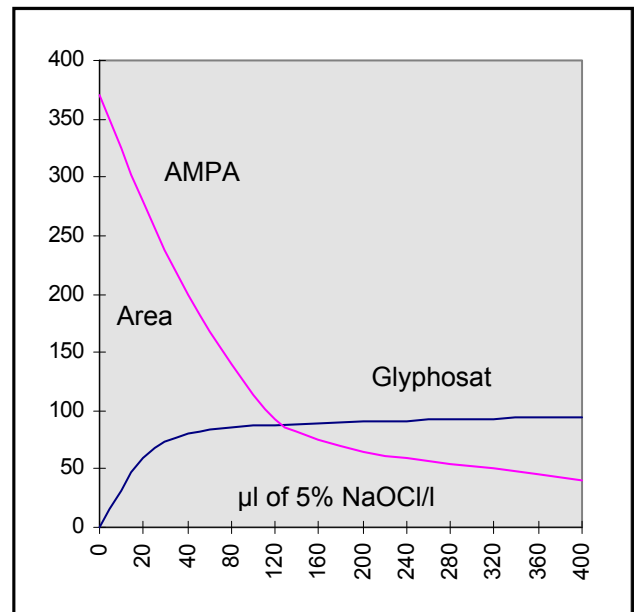


R = -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>    AMPA (Aminomethylphosphonsäure)

R = -CO<sub>2</sub>H    Glycin

# APPLIKATIONSNOTE

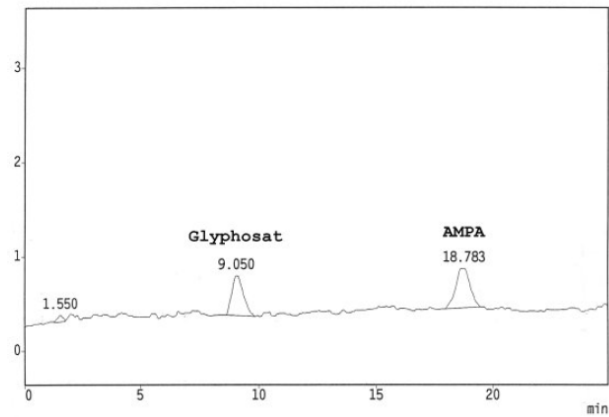
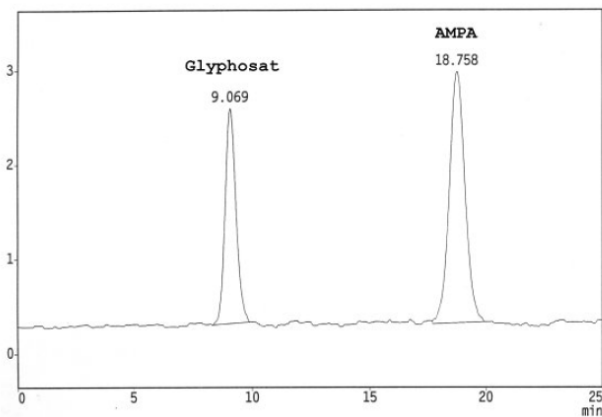
Die Peakflächen der Glyphosat- und AMPA-Derivate hängen deutlich von der Konzentration des Oxidationsmittels ab. Zuviel Oxidationsmittel zerstört das AMPA, während bei zuwenig das Glyphosat nur unzureichend oxidiert wird. In der Grafik erkennt man gut, dass mit einer Hypochlorit-Konzentration von etwa 100  $\mu$ L 5-%iger Hypochlorit-Lösung/L Diluent beide Verbindungen mit guter Empfindlichkeit bestimmt werden können. Je nach verwendetem Fluoreszenz-Detektor liegt die Nachweisgrenze der Derivate bei jeweils 250 bis 1500 pg absolut. Eine zeitaufwändige und damit teure Doppelbestimmung jeder Probe mit und ohne Oxidationsmittel ist somit nicht nötig.



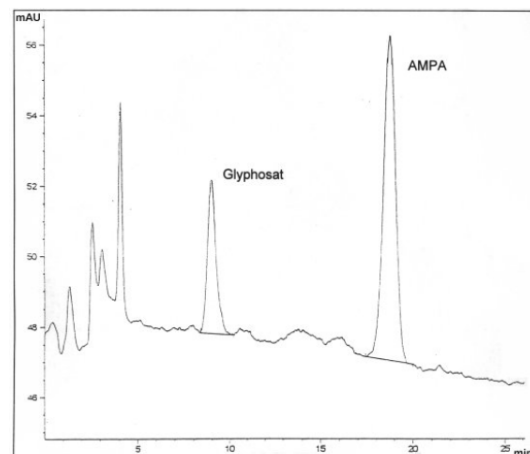
## Chromatogramme

### Chromatogramm eines Glyphosat / AMPA-Standards

Konzentration (abs.) je Verbindung: 2,5 ng (links) und 0,25 ng (rechts)



Chromatogramm (rechts) einer mit Glyphosat / AMPA-Standard versetzten Oberflächenwasserprobe nach Aufreinigung (DFG-Methode)  
Konzentration (abs.): 2,5 ng je Verbindung



# APPLIKATIONSNOTE

---

## HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter

HPLC Bedingungen	
Betriebsmodus	binärer Gradient
Eluent	K200-Eluent (Kaliumdihydrogenphosphatpuffer) und RG019-Regenerant (Kaliumhydroxid-Lösung)
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	Kationenaustauschersäule 4.0 x 150 mm mit Vorsäule
Flussrate	0.4 mL/min
Injektionsvolumen	Bis 100 µL
Nachsäulenderivatisierung	
Pinnacle PCX	Zweistufig
Säulenofen	55 °C
Reaktorvolumen	0,5 mL
Reaktortemperatur	36 °C
Reagenz 1	100 µL 5% Natriumhypochlorit-Lösung/L. in GA116-Diluent
Reagenz 2	o-Phthaldialdehyd (OPA) und Thiofluor® in GA104-Diluent
Reagenzfluss	0.3 mL/min
Detektion	
Messart	Fluoreszenz-Detektion
Anregungswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis 7 bar

# APPLIKATIONSNOTE

---

## Achtung! Extremer pH-Bereich!

Wegen des alkalischen Regeneranten (pH 13) dürfen keine Teile aus Vespel im HPLC-System vorhanden sein, sondern müssen gegen Teile aus pH-inertem Material (Tefzel oder PEEK) ausgetauscht werden. Kontaktieren Sie dazu Ihren LC-Außendienst oder ziehen Sie Ihr Handbuch zu Rate.

Eine inerte Ausführung (Titan, PEEK) der HPLC-Anlage ist nicht notwendig, eine Kolbenhinterspülung der Pumpenköpfe aber empfehlenswert.

Um Korrosion der Anlage und Kontamination der Ionenaustauschersäule mit Metall-Ionen zu vermeiden, empfiehlt es sich vor allem ältere HPLC-Systeme zu passivieren. Kontaktieren Sie dazu Ihren LC-Außendienst oder ziehen Sie Ihr Handbuch zu Rate.

## Gradientenprogramm

Flussrate: 0,4 mL/min; Säulentemperatur: 55°C

Schritt	Zeit [min]	Intervall [min]	K200 [%]	RG019 [%]	
Equil.			100	0	Equilibrierung
0	0	0	100	0	Injektion bis 50 µL
1	0-15	3	100	0	Isokratisch
2	15-17	2	0	100	Sprung (Regenerant)
3	17-25	8	100	0	Re-Equilibrierung

# APPLIKATIONSNOTE

---

## Kontamination der Säule

Wenige Nanomol von Schwermetall-Ionen auf der „Glyphosat“-Ionenaustauschersäule verursachen eine drastische Signalverbreiterung und damit einen Verlust an Empfindlichkeit. Um eine Kontamination der Säule mit Schwermetall-Ionen zu vermeiden, empfiehlt es sich, bei älteren HPLC-Anlagen das System zu passivieren (s. o.). Sollten doch Schwermetall-Ionen auf die Säule gelangen, so können diese ohne großen Aufwand mit RESTORE®-Reagenz entfernt werden.

## Chemikalien und Säulen

### Nachsäulenderivatisierungssystem

Bestell Nr.	Beschreibung
1153-1052	PINNACLE PCX, zweistufig; 500 µL Reaktor

## Applikationskit

Bestell Nr.	Beschreibung
<b>0352-0010</b>	<b>Applikationskit Glyphosat / AMPA, bestehend aus:</b>
1954150	Trennsäule, Kationenaustauscher, K <sup>+</sup> -Form, 4 x 150 mm
1953020	Vorsäule, 3 x 20 mm, für Säule 1954150
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), „Chromatographic Grade™“, 5 g
GA104	OPA-Diluent, „Chromatographic Grade™“, 4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor®, „Chromatographic Grade™“, 10 g
GA116	Hypochlorit-Diluent, 4 x 950 mL
K200	Kaliumphosphatpuffer als Elutionsmittel, 4 x 950 mL
RG019	Säulenregenerant, 950 mL
1700-0140	RESTORE®, Säulenregenerant bei Schwermetall-Ionen-Kontamination, 250 mL
1700-0080	Glyphosat- und AMPA-Standard, qualitativ, 1,5 mL, 2,5 µg/mL

## Trennsäule für die Glyphosat-Analytik



- Speziell für die Glyphosat-Analytik entwickelt
- Schnelle, isokratische Methode
- Hohe Auflösung und Präzision
- Retentionszeiten unabhängig von Matrixeffekten
- Nicht-metallische Säulenfritten

Die PICKERING-Säule ist eine Kationenaustauschersäule (K<sup>+</sup>-Form), die speziell für die Glyphosat-Analytik entwickelt wurde. Die Retentionszeiten von Glyphosat und AMPA sind im Vergleich zu anderen Säulen wesentlich kürzer und die Peaks schärfer. Mehr über die Analytik von Glyphosat erfahren Sie unter Applikationen (Glyphosat).

Die angebotene Vorsäule ist mit dem gleichen Ionenaustauschermaterial gefüllt und wird nach gleichen Kriterien wie die analytische Säule getestet.

Bestell Nr.	Beschreibung
1954150	Trennsäule für die Glyphosat-Analytik, Kationenaustauscher, K <sup>+</sup> -Form, 4 x 150 mm
1953020	Vorsäule für die Glyphosat-Analytik, 3 x 20 mm, für Säule 1954150

## o-Phthalaldehyd Reagenz

Primäre Amine bilden mit o-Phthalaldehyd (OPA) und einem Thioalkohol (Mercaptan) im alkalischen Milieu stark fluoreszierende Isoindol-Derivate. Bei Raumtemperatur ist diese Reaktion bei einem pH-Wert von 9-10 normalerweise innerhalb von ca. 30 sec abgeschlossen. Um eine maximale Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten, ist es notwendig, hochreine Chemikalien zu verwenden und die sauerstoffempfindliche OPA-Reagenzlösung ständig unter Inertgasatmosphäre zu halten. Es ist daher aber auch wichtig, nicht nur das Reagenzreservoir unter Inertgas zu halten sondern auch luftundurchlässige Gas- und Reagenzleitungen aus Saran® oder PEEK zu verwenden. Die so aufbewahrte Reagenzlösung kann bis zu 10 Tagen verwendet werden, ohne dass sich das Signal/Rauschverhältnis ändert.

Für die o-Phthalaldehyd-Reagenzlösung bietet PICKERING an:

- Hochreines, kristallines OPA
- Boratdiluent; garantiert frei von Aminen und Schwermetallen
- Thiofluor; ein kristallines 2-Mercaptoethanolderivat

Bestell Nr.	Beschreibung
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade™", 5 g

# APPLIKATIONSNOTE

---

## o-Phthalaldehyd Diluent

Für die Glyphosat-Analytik bietet Pickering einen Na-Boratpuffer mit pH 10,4 an, der auch saure Eluenten abpuffert.

Bestell Nr.	Beschreibung
GA104	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade™", 4 x 950 mL

## Thiofluor®

Thiofluor® der Firma PICKERING ist ein kristallines, schwer flüchtiges Nucleophil. Seine mit OPA und primären Aminen gebildeten Isoindolderivate sind bei gleichen Fluoreszenzeigenschaften stabiler als die des üblicherweise verwendeten 2-Mercaptoethanols.

Bestell Nr.	Beschreibung
3700-2000	Thiofluor®, „Chromatographic Grad™“, 10 g

## Hypochlorit Diluent

- Lösungsmittel für Natriumhypochlorit (Oxidationsmittel)
- Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- Vorfiltriert
- Gleichbleibende Qualität, Flasche für Flasche

Dieser Diluent wird zur Herstellung des Natriumhypochlorit-Reagenz verwendet.

Wie schon oben erwähnt, ist die Hypochloritmenge verantwortlich für die relativen Peakflächen von Glyphosat und AMPA. Das Reagenz ist nach Zugabe von Natriumhypochlorit mehrere Tage stabil, sollte jedoch täglich neu kalibriert werden.

**Achtung!** Verwenden Sie nicht Calciumhypochlorit als Oxidationsreagenz wie in der amerikanischen EPA-Methode 547 angegeben. Calciumhypochlorit reagiert mit dem Phosphatpuffer zu schwerlöslichen Verbindungen, die sich im Reaktor niederschlagen und zu schweren Schäden am Pickering-System führen können.

Bestell Nr.	Beschreibung
GA116	Hypochlorit-Diluent, 4 x 950 mL

## Kaliumphosphatpuffer

- Eluent für die isokratische Elution von Glyphosat und AMPA
- Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- Vorfiltriert, gebrauchsfertig
- Gleichbleibende Qualität, Flasche für Flasche

Dieser Puffer wird für die Elution von Glyphosat und AMPA gemäß der Methode von PICKERING verwendet. K200 wird außerdem für die Equilibrierung der Säule nach Regeneration verwendet. Eine Flasche mit 950 mL reicht für über 100 Analysen.

Bestell Nr.	Beschreibung
K200	Kaliumphosphatpuffer als Elutionsmittel, 4 x 950 mL

## Säulen-Regenerant für die Glyphosat-Analytik

- Entfernt stark gebundene Matrixbestandteile von der Säule
- Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- Vorfiltriert, gebrauchsfertig
- Gleichbleibende Qualität, Flasche für Flasche

Um stark adsorbierte Matrixbestandteile zu entfernen, ist eine Regeneration der Säule nach jedem Lauf empfehlenswert. So werden die Trennleistung der Säule und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf lange Zeit erhalten. Außerdem können durch die Regeneration nach jeder Analyse Basislinienanormalitäten und Überlappungen auf die gerade untersuchte Probe zurückgeführt werden.

Bestell Nr.	Beschreibung
RG019	Säulenregenerant, 950 mL

# APPLIKATIONSNOTE

---

## Glyphosat RESTORE®

- Entfernt Metallionenkontaminationen von der Säule
- Vorfiltriert, gebrauchsfertig

Das Kationenaustauschermaterial der Glyphosat-Säule bindet Schwermetallionen, die durch die Proben oder durch Korrosion der LC-Anlage auf die Säule gelangen können. Wenige Nanomol dieser Schwermetallionen verursachen eine drastische Signalverbreiterung und damit einen Verlust an Empfindlichkeit. Um eine Kontamination der analytischen Säule zu vermeiden, ist die Verwendung einer Vorsäule mit demselben Ionenaustauschermaterial dringend zu empfehlen. Bei den ersten Anzeichen von Peakverbreiterung sollte die Vorsäule mit RESTORE® behandelt werden.

RESTORE® ist stark sauer und entfernt sämtliche  $Fe_{3+}$ -Ionen. Dabei wird das  $K^{+}$ - und  $H^{+}$ -Ionen-Gleichgewicht der Säule erhalten wodurch eine lange Reequilibrierung mit Eluent vermieden wird.

### Vorgehensweise bei Metall-Ionen-Kontamination:

1. Entfernen der analytischen Säule
2. Rückspülen (0,4 mL/min) der Vorsäule mit RESTORE® für 15 min.
3. Entfernen von RESTORE® durch kurze Equilibrierung mit Phosphatpuffer.
4. Einbauen der Säulen in ursprünglicher Richtung und starten des HPLC und Nachsäulensystems.



Wenn die Behandlung der Vorsäule nicht ausreicht, kann es sein, dass die analytische Säule auch belastet ist. Ist dies der Fall wird die Vorsäule entfernt und die analytische Säule ca. 45 min mit RESTORE® zurückgespült.

Bestell Nr.	Beschreibung
1700-0140	RESTORE®, Säulenregenerant bei Schwermetall-Kontamination, 250 mL

## Glyphosat Testmischung

Die Testmischung (1,5 mL wässrige Lösung von 2,5 µL/mL Glyphosat und AMPA) ist ein qualitativer Standard, der zur Erstellung eines Elutionsprofils verwendet werden kann. Für die Kalibrierung ist er nicht geeignet. Bitte wenden Sie sich dafür an einen Anbieter von analytischen Pestizid-Standards.

Bestell Nr.	Beschreibung
1700-0080	Glyphosat und AMPA-Standard, qualitativ, 1,5 mL, 2,5 µg/mL

## Literatur

- 1) M. E. Oppenhuize, J. E. Cowell., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1991**, 74, 317 – 323. **(Wasserproben)**
- 2) DFG-Methode 405. **(Wasser-, Boden- und Lebensmittelproben)**
- 3) R. Reupert, S. Fuchs, *GIT Laborfachzeitschrift* **1997**, 5, 468 – 474. **(Wasserproben)**
- 4) DIN-Methode **38407-22 (Wasserproben)**.