

ICS 13.060.50

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge — Jointly determinable substances (group F) — Part 22: Determination of Glyphosate and Aminomethyl phosphonic acid (AMPA) by high performance liquid chromatography (HPLC), post-column derivatization and fluorescence detection (F 22)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues — Substances déterminables ensembles (groupe F) — Partie 22: Dosage de Glyphosate et de l'acide aminométhyl phosphone (AMPA) avec la chromatographie liquide de haute performance (HPLC), dérivatisation de pile finale et détection en fluorescence (F 22)

Vorwort

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Wasserchemischen Gesellschaft — eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker — aufgestellt (siehe Anhang A).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung zusätzlicher Randbedingungen erforderlich ist.

Zu DIN 38407 „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)“ gehören weitere Teile. Eine Übersicht der Gruppen A bis T der „Deutschen Einheitsverfahren“ enthält Anhang A.

Anhang A ist informativ.

Einleitung

Glyphosat ist ein nicht-selektives Blattherbizid, das zumeist in Form seines Isopropylammonium- bzw. Trimethylsulfonium-Salzes (Glyphosat-trimesium) in verschiedenen Pflanzenschutzmitteln enthalten ist und — z.T. in Kombination mit anderen herbiziden Wirkstoffen — zur Unkrautbekämpfung in der Pflanzenproduktion sowie zur Vegetationskontrolle auf Verkehrsflächen eingesetzt werden kann. Als Hauptabbauprodukt entsteht Aminomethylphosphonsäure (AMPA), die auch beim Abbau anderer Phosphonsäuren gebildet werden kann.

Fortsetzung Seite 2 bis 27

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

WARNHINWEIS Anwender dieser Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren fest, das zur Bestimmung von Glyphosat und seinem Hauptabbauprodukt AMPA (siehe Tabelle 1) in Trink-, Grund- und Oberflächenwasser in Massenkonzentrationen $> 0,05 \mu\text{g/l}$ geeignet ist. An Schwebstoffen adsorbierte Anteile werden mit diesem Verfahren nicht erfasst.

Tabelle 1 — Physikalische und chemische Daten [1], [2]

Trivialname	Glyphosat	AMPA
Chemische Bezeichnung	N-(Phosphonomethylglycin)	Aminomethylphosphonsäure
Molare Masse	169,08 g/mol	111,04 g/mol
Schmelzpunkt	200 °C (unter Zersetzung)	285 °C (unter Zersetzung)
Löslichkeit in Wasser	1,2 g je 100 ml bei 25 °C	5,8 g je 100 ml bei 25 °C

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 12242-1, *Laborgeräte aus Glas — Kegelschliffe für austauschbare Verbindungen — Maße, Toleranzen*.

DIN 12680-2, *Laborgeräte aus Glas — Messzylinder — Mit Hauptpunkte-Ringteilung*.

DIN 38402-12, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Probenahme aus stehenden Gewässern (A 12)*.

DIN 38402-13, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Probenahme aus Grundwasserleitern (A 13).

DIN 38402-14, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Allgemeine Angaben (Gruppe A) – Probenahme von Rohwasser und Trinkwasser (A 14).

DIN 38402-15, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Allgemeine Angaben (Gruppe A) – Probenahme von Fließgewässern (A 15).

DIN 38402-51, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (A 51).

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Messkolben (ISO 1042:1998); Deutsche Fassung EN ISO 1042:1999.*

DIN EN ISO 4796-2, *Laborgeräte aus Glas – Flaschen – Teil 2: Flaschen mit konischem Hals (ISO 4796-2:2000): Deutsche Fassung EN ISO 4796-2:2000.*

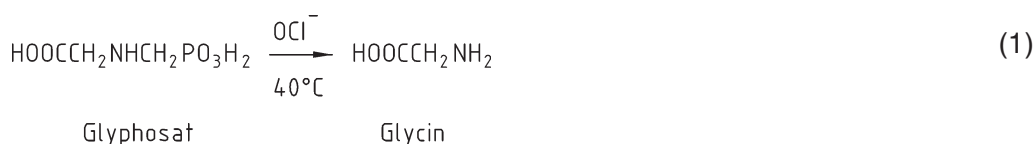
DIN ISO 1773, Laborgeräte aus Glas — Erlenmeyer-, Rund- und Stehkolben, enghalsig (ISO 1773:1997).

3 Grundlage des Verfahrens

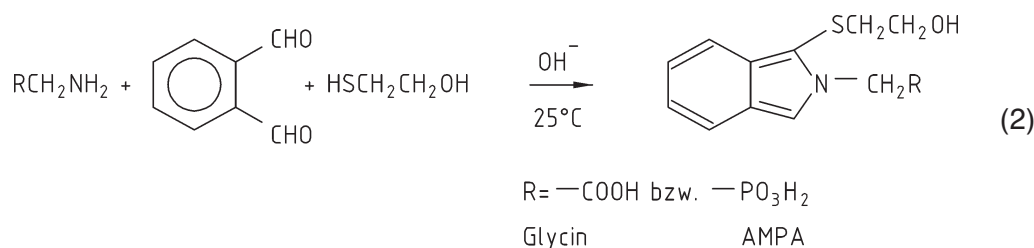
Glyphosat und AMPA werden aus der angesäuerten Wasserprobe an einem Kationenaustauscher angereichert und das salzsaure Eluat zur Reinigung über einen Anionenaustauscher filtriert. Anschließend wird das Filtrat zur Trockne eingengt, und der Rückstand wird für die HPLC-Messung in einer Pufferlösung aufgenommen [3].

Bei entsprechender Messempfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors steht ein alternatives Verfahren zur Probenvorbereitung zur Verfügung. Hierbei wird die angesäuerte Wasserprobe über ein Adsorbens filtriert. Das Filtrat wird zur Trockne eingengt und der Rückstand wird für die HPLC-Messung in einer Pufferlösung aufgenommen.

Glyphosat und AMPA werden durch isokratische HPLC an einem Kationenaustauscher aufgetrennt und direkt einer zweistufigen Nachsäulenderivatisierung zugeführt, wobei im ersten Schritt Glyphosat durch Oxidation mit Natriumhypochlorit zu Glycin umgesetzt wird (siehe Gleichung (1)).



Im zweiten Schritt werden die primären Amine Glycin und AMPA mit Phthaldialdehyd (OPA) in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol derivatisiert. Die entstehenden Isoindolderivate werden durch Fluoreszenzdetektion nachgewiesen (siehe Gleichung (2)) [3], [4].



4 Störungen

4.1 Störungen bei der Probenahme und der Probenaufbereitung

Um Störungen bei der Probenahme zu vermeiden, die Probe wie in Abschnitt 8 angegeben und unter Beachtung der Festlegungen nach DIN 38402-12 bis DIN 38402-15 nehmen. Schwebstoffe in der Wasserprobe können die in den Säulen oder Kartuschen vorgelegten Materialien verstopfen; um derartige Verstopfungen zu vermeiden, die Wasserprobe vor der Probenaufbereitung durch ein Glasfaserfilter filtrieren.

Die Gegenwart von Oxidationsmitteln in der Wasserprobe, insbesondere freies Chlor, führt zum Abbau von Glyphosat und AMPA. Bei einer Massenkonzentration von z. B. 0,3 mg/l freies Chlor erfolgt dieser Abbau innerhalb weniger Minuten. Gechlorte Wasserproben sind deshalb mit Natriumthiosulfat zu stabilisieren.

4.2 Störungen bei der HPLC

4.2.1 Peaküberlagerung

Verbindungen, die fluoreszieren oder die Fluoreszenz unterdrücken und ähnliche chromatographische Eigenschaften wie die zu bestimmenden Substanzen besitzen, stören die Bestimmung und können je nach Ausmaß die Richtigkeit des Ergebnisses beeinträchtigen. Unsymmetrische und gegenüber den Referenzsubstanzen verbreiterte Peaks weisen auf Peaküberlagerungen hin. Eine Auswertung des Signals ist in diesen Fällen nicht zulässig.

Üblicherweise werden zu Beginn der Chromatographie fluoreszierende Begleitstoffe eluiert, die zu einer Beeinträchtigung der Peakintegration beim Glyphosat-Peak führen können. Die Peakintegration ist daher bei allen Proben zu kontrollieren und gegebenenfalls zu korrigieren.

4.2.2 Instabile Retentionszeiten

Vorausgesetzt, die HPLC-Pumpe arbeitet einwandfrei und es liegt keine Leckage vor, weisen stetig ansteigende Retentionszeiten der Substanzen bei der chromatographischen Trennung an Kationenaustauschern auf eine Kontamination der stationären Phase mit Eisen(III)-Ionen hin. Die Kontamination kann

aus Proben oder aus dem HPLC-System stammen und lässt sich durch Spülen der Vor- und Trennsäule mit etwa 10 ml eines Phosphorsäurepuffers (7.25) beseitigen.

4.2.3 Keine reproduzierbaren Peakflächen

Abnehmende Peakflächen für Glyphosat bei gleichzeitig ansteigenden Peakflächen für AMPA können auf eine zu geringe Konzentration des Oxidationsmittels hinweisen. In diesem Fall die Oxidationslösung mit frischer Natriumhypochlorit-Lösung neu ansetzen. Werden auch danach die ursprünglichen Peakflächen nicht erreicht, kommen andere Ursachen in Betracht, z. B. eine von der Einstellung abweichende Temperatur des Reaktors, Quench-Effekte durch Systemverunreinigungen oder eine veränderte Messempfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors.

4.2.4 Driften der Basislinie und hohe Untergrundfluoreszenz

Wenn die Reinheit des Eluenten und der Reagenzlösungen den Anforderungen entspricht und trotzdem eine hohe Untergrundfluoreszenz oder eine stark driftende Basislinie auftritt, so ist dies ein Hinweis für Verschmutzungen der Durchflussszelle des Fluoreszenzdetektors. In diesem Fall die Durchflussszelle zunächst mit Isopropanol, z. B. mittels einer Spritze, spülen. Tritt auch danach unverändert hohe Grundfluoreszenz auf, sollte die Detektorzelle mit jeweils 10 ml Salpetersäure (7.11), Wasser (7.1) und Isopropanol (7.12) gereinigt werden.

4.2.5 Schwankungen der Basislinie

Periodische Schwankungen der Basislinie deuten auf eine zu hohe Restpulsation der Pumpen hin, die besonders bei hoher Messempfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors zu Störungen bei der Peakerkennung und -integration führt. Die Störungen können von der HPLC-Pumpe oder den Reagenzpumpen ausgehen und lassen sich meist durch Verwendung zusätzlicher Pulsationsdämpfer beheben.

5 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung von Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure in Wasser durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion (F 22):

Verfahren DIN 38407 — F 22

6 Geräte

6.1 Allgemeines

Die verwendeten Glasgeräte müssen frei von Substanzen sein, die zu Störungen bei der Bestimmung von Glyphosat und AMPA führen können. Bei Glasgeräten ist hierzu üblicherweise eine Behandlung mit Wasser unter Zusatz eines Tensids und anschließendes Spülen mit Aceton ausreichend.

6.2 Enghals-Standflasche für die Probenahme, Nennvolumen z. B. 1 000 ml, vorzugsweise aus braunem Glas mit Glasstopfen NS 29/32 nach DIN 12242-1, z. B. Laborflasche ISO 4796-2 — 1 000 NJ

6.3 Glasfaserfilter aus Borosilicatglas, Faserdurchmesser 0,75 µm bis 1,5 µm, frei von organischen Bindemitteln

6.4 pH-Messgerät, mit Elektrode für pH-Bereich 0 bis 14

6.5 Magnetrührer, mit Magnetrührstab, Länge etwa 40 mm, PTFE-ummantelt (PTFE: Polytetrafluorethen)

6.6 Weithals-Glasflasche zur Aufbewahrung von Austauschermaterial, Nennvolumen 1 000 ml, aus braunem Glas mit Glasstopfen NS 60/46, z. B. Laborflasche ISO 4796-2 — 1 000 WJ

6.7 Chromatographiesäule aus Glas, für die Anreicherung der Wasserprobe und Reinigung des Extraktes, z. B. Länge 100 mm, Innendurchmesser 12 mm, mit Glasfritte Porosität 2 und Ablaufhahn mit PTFE-Küken

6.8 Glaswolle oder Glasfritten zur Abdeckung der Säulenpackung

6.9 Messzylinder, Nennvolumen 10 ml, 100 ml und 250 ml, z. B. Messzylinder DIN 12680-2 — MH 10

ANMERKUNG Anstelle von Messzylindern dürfen auch Flaschenaufsatz-Dosiergeräte aus Glas und/oder PTFE verwendet werden.

6.10 Tropftrichter mit Druckausgleich, Nennvolumen 250 ml, mit NS 14/23 nach DIN 12242-1 und Ablaufhahn mit PTFE-Küken

6.11 Glasgefäß zum Auffangen von Eluaten, z. B. Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 ml, z. B. Erlenmeyerkolben nach DIN ISO 1773

6.12 Einmalspritze aus Polypropylen oder Glas, Nennvolumen 20 ml, mit Luerkonus

6.13 Kartusche aus Polypropylen oder Glas mit Luer-Lock-Anschluss, gefüllt mit einem Adsorbens (7.9)

6.14 Glasgefäß zum Einengen von Extrakten, z. B. Spitzkolben, Nennvolumen 25 ml bzw. 100 ml, mit Glasstopfen NS 14/23 nach DIN 12242-1

6.15 Vorrichtung zum Einengen der Extrakte, z. B. Rotationsverdampfer mit Vakuumkonstanthalter und thermostatisierbarem Wasserbad

6.16 Vakuumfiltrationsgerät aus Glas, z.B. Saugflasche, Nennvolumen 1 000 ml, und Filteraufsatz, Nennvolumen 250 ml, mit PTFE-beschichtetem Lochsieb für Membranfilter, Durchmesser 47 mm

6.17 Membranfilter, z.B. aus Celluloseacetat, Durchmesser 47 mm, zur Filtration von Pufferlösungen

6.18 Mikrofilter, z.B. mit Membran aus Nylon, Porenweite 0,45 µm, zur Klarfiltration der Extrakte für die HPLC-Messungen

6.19 Probenflaschen aus Glas, Volumen etwa 2 ml, mit inertem Verschluss, z.B. mit PTFE-beschichtetem Septum, zur Aufbewahrung der Extrakte

6.20 Messkolben, Nennvolumen 10 ml, 100 ml und 1 000 ml, z.B. Messkolben ISO 1042 — A10 — C

6.21 Mikroliterspritzen, Nennvolumen 50 µl, 100 µl, 250 µl, 500 µl und 1 000 µl

ANMERKUNG Zum Ansetzen der Bezugslösungen (7.29) sind Präzisionshubpipetten mit Spitzen aus Glas oder Polypropylen ebenfalls geeignet.

6.22 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph mit Datenauswertesystem, ausgelegt für den vorgesehenen Arbeitsbereich mit

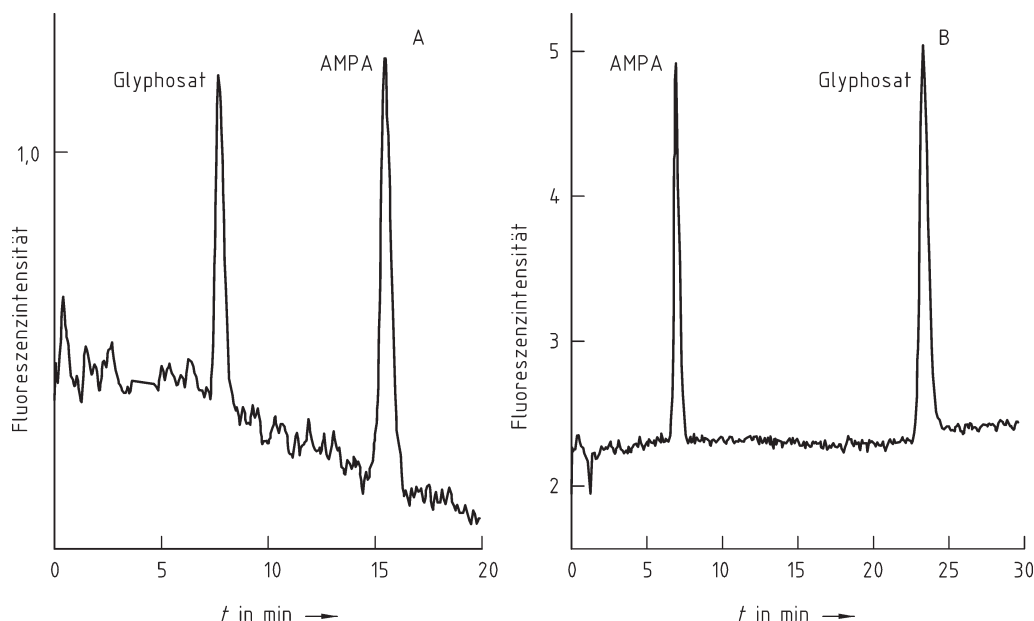
- a) pulsationsarmer analytischer Pumpe, mit Eluentenschaltventil oder geeignet für Gradientenbetrieb;
- b) manuellem oder automatischem Probenaufgabesystem für Probenvolumina bis 100 µl;
- c) Entgasungseinrichtung, z.B. Helium oder Vakuum-Entgaser zur Entgasung des Eluenten;
- d) Säulenofen oder -thermostat;
- e) Fluoreszenzdetektor, vorzugsweise mit Monochromator auf der Anregungs- und Emissionsseite; Filtergeräte sind ebenfalls geeignet (9.4.3).

Wegen der besonderen Störanfälligkeit der für die chromatographische Trennung von Glyphosat und AMPA üblichen Phasen gegenüber Eisen(III)-Ionen sollten alle Materialien, die mit dem Eluenten vor der Säule in Kontakt kommen, vorzugsweise aus nicht eisenhaltigen Werkstoffen bestehen. Dies gilt besonders für Eluentenfilter, die aus Titan, Glas oder geeigneten Kunststoffen, z.B. PEEK (Poly-Ether-Ether-Keton), bestehen müssen.

6.23 Analytische Trennsäule, Länge bis 250 mm, Innendurchmesser bis 4,6 mm, mit vorzugsweise stark saurem Kationenaustauscher auf Polystyrol-Divinylbenzolbasis, Kalium-Form, mit Vorsäule gleichen Materials. Das Material muss eine vollständige Trennung von Glyphosat und AMPA ermöglichen (siehe Bild 1 und Tabelle 2).

ANMERKUNG 1 Zur Trennung von Glyphosat und AMPA sind stark basische Anionenaustauscher ebenfalls geeignet.

ANMERKUNG 2 Spezielle HPLC-Säulen zur Trennung von Glyphosat und AMPA sind im Handel erhältlich.



Arbeitsbedingungen siehe Tabelle 2

Bild 1 — Chromatographische Trennung von Glyphosat und AMPA

Tabelle 2 — Arbeitsbedingungen für isokratische Trennung und Nachsäulenderivatisierung (Beispiele)

Chromatogramm A	
Injektion	100 µl Standardlösung ($\varrho = 1 \text{ pg}/\mu\text{l}$) in Kaliumdihydrogenphosphat, pH = 2,05
Säule	Kennbuchstabe A
Säulentemperatur	55 °C
Eluent	Pufferlösung, Kaliumdihydrogenphosphat/Phosphorsäure, pH = 2,05
Durchfluss	0,4 ml/min
Druck	50 bar
Reagenzpumpe 1	Oxidationslösung (950 ml Fertigpuffer mit 50 µl Natriumhypochlorit)

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Chromatogramm A	
Durchfluss	0,2 ml/min
Temperatur, Reaktorspule 1	40 °C
Reagenzpumpe 2	Derivatisierungslösung (950 ml Fertigpuffer mit 2 g 2-Dimethylaminoethanthiol-Hydrochlorid und 10 ml Phthaldialdehyd-Lösung in Methanol ($\rho = 20 \text{ mg/ml}$))
Durchfluss	0,3 ml/min
Temperatur, Reaktorspule 2	Raumtemperatur
Detektion	Fluoreszenz: Anregungswellenlänge 340 nm, Bandbreite 18 nm, Emissionswellenlänge 440 nm, Bandbreite 10 nm; Cut-Off-Filter 390 nm
Chromatogramm B	
Injektion	100 μl Standardlösung ($\rho = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$) in Kaliumdihydrogenphosphat, pH = 2,05
Säule	Kennbuchstabe B
Säulentemperatur	40 °C
Eluent	0,01 mol/l Phosphorsäure, pH = 2,22
Durchfluss	0,4 ml/min
Druck	80 bar
Übrige Arbeitsbedingungen siehe Chromatogramm A	

6.24 Nachsäulenderivatisierungssystem

- zwei pulsationsarme Reagenzienpumpen, ausgelegt für analytische Flussraten;
- Reagenzienflaschen aus Glas, 1 000 ml, mit dichtschießender Schraubkappe und Ventilen, geeignet für die Entnahme der Reagenzienlösungen unter Druck;
- Reaktorspule, z. B. aus PTFE, Innendurchmesser etwa 0,25 mm, Volumen etwa 500 μl , thermostatisierbar im Bereich von 30 °C bis 60 °C;
- Reaktorspule, z. B. aus PTFE, Innendurchmesser etwa 0,25 mm, Volumen etwa 100 μl ;