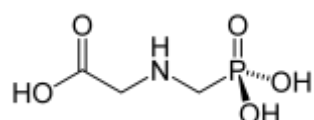


dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI
mgr MARZENA BONCZAROWSKA
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera
91-348 Łódź
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

Glifosat

– metoda oznaczania

Numer CAS: 1071-83-6



Słowa kluczowe: glifosat, pestycydy, analiza powietrza, stanowisko pracy, chromatografia cieczowa.
Key words: glyphosate, pesticides, air analysis, workplace, HPLC.

Metodę stosuje się do oznaczania stężeń glifosatu w powietrzu na stanowiskach pracy. Metoda polega na osadzeniu glifosatu na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji buforem boranowym, reakcji z chloromrówczanem 9-fluorenylometylu i oznaczaniu otrzymanej pochodnej za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Oznaczalność metody wynosi 0,1 mg/m³.

UWAGI WSTĘPNE

Najważniejsze właściwości fizykochemiczne glifosatu (*N*-(fosfonometylo)glicyna):

– wzór sumaryczny	C ₃ H ₈ NO ₅ P
– masa molowa	169,05
– temperatura wrzenia	230 °C (rozkład)
– temperatura topnienia	189,5 °C
– gęstość par (powietrze = 1)	5,89 (powietrze = 1)
– prężność par w temp. 25 °C	1,31 · 10 ⁻⁵ Pa
– gęstość	1,705 (w temp. 20 °C)
– współczynnik podziału: oktanol-woda	-2,8
– współczynniki przeliczeniowe (w temp. 25 °C; 101,3 kPa)	1 ppm = 6,91 mg/m ³ i 1 mg/m ³ = 0,145 ppm.

Glifosat (*N*-(fosfonometylo)glicyna) jest substancją stałą występującą w postaci bezbarwnych kryształów. Związek ten słabo rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych

(acetonie, octanie etylu, heksanie i propan-2-olu). Znacznie lepiej (12 g/l w temp. 25 °C) rozpuszcza się w wodzie. Glifosat powstaje w wyniku reakcji kwasu aminometylofosfonowego i nityrylu glikolowego w środowisku alkalicznym (pierwszy etap), a następnie hydrolizy powstałego *N*-fosfonometyloglicynonitrylu w obecności wodorotlenków. Glifosat jest powszechnie stosowany jako regulator wzrostu roślin w rolnictwie i skuteczny niespecyficzny herbicyd w małych dawkach. Związek ten ze względu na małą prężność par występuje w środowisku głównie w postaci stałej. Zawodowe narażenie na glifosat jest związane z produkcją i stosowaniem tego związku. W handlu dostępnych jest 45 preparatów zawierających glifosat (w postaci soli) jako substancję czynną.

Wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) glifosatu w powietrzu na stanowiskach pracy wynosi 10 mg/m³.

PROCEDURA ANALITYCZNA

1. Zakres metody

Metodę stosuje się do oznaczania glifosatu w powietrzu na stanowiskach pracy podczas przeprowadzania kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie glifosatu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonywania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi 0,1 mg/m³ powietrza.

2. Norma powołana

PN-Z-04008-7:2002 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników (zm. PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004).

3. Zasada metody

Metoda polega na ekstrakcji buforem boranowym zatrzymanego na filtrze z włókna szklanego glifosatu oraz oznaczaniu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej pochodnej powstałej w wyniku reakcji glifosatu z chloromrówczanem 9-fluorenylometylu.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

Do analizy należy stosować odczynniki i substancje wzorcowe o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.

4.2. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do 0,0002g.

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Czynności, podczas których używa się rozpuszczalników organicznych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym. Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się utylizacją.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. Aceton

Stosować aceton o czystości do HPLC.

5.2. Acetonitryl

Stosować acetonitryl o czystości do HPLC.

5.3. Borowodorek sodu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)

Stosować borowodorek sodu według punktu 4.

5.4. Chloromrówczan 9-fluorenylometylu (Fmoc Cl)

Stosować chloromrówczan 9-fluorenylometylu według punktu 4.

5.5. Fosforan potasowy jednozasadowy KH_2PO_4

Stosować fosforan potasowy jednozasadowy według punktu 4.

5.6. Glifosat

Stosować glifosat o czystości minimum 99%.

5.7. Kwas fosforowy

Stosować kwas fosforowy o stężeniu 85% (v/v).

5.8. Roztwór buforu boranowego

Odważyć 9,54 g borowodoru sodu wg punktu 5.3., przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml i rozpuścić w wodzie wg punktu 5.15. Kolbę uzupełnić do kreski wodą. Całość doprowadzić do pH 9 za pomocą 1 mol/l NaOH wg punktu 5.11. Stężenie borowodoru sodu w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,025 mol/l.

5.9. Roztwór chloromrówczanu 9-fluorenylometylu

Odważyć 0,516 g chloromrówczanu 9-fluorenylometylu wg punktu 5.4., przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml i rozpuścić w acetonie wg punktu 5.1. Stężenie tego związku w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,002 mol/l.

5.10. Roztwór fosforanu potasu jednozasadowego

Odważyć 6,8 g fosforanu potasu wg punktu 5.5. i przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml, następnie rozpuścić w mieszaninie acetonitrylu i wody zmieszanych w stosunku 1:1. Całość doprowadzić do pH 5 stężonym kwasem fosforowym wg punktu 5.7. Stężenie tego związku w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,05 mol/l.

5.11. Roztwór wodorotlenku sodu

Odważyć 4 g wodorotlenku sodu wg punktu 5.14. i przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml, a następnie rozpuścić w wodzie wg punktu 5.15. Po ostygnięciu uzupełnić kolbę do kreski wodą. Stężenie wodorotlenku sodu w tak przygotowanym roztworze wynosi 1 mol/l.

5.12. Roztwór wzorcowy podstawowy glifosatu

Odważyć 250 mg glifosatu wg punktu 5.6. i przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml, a następnie rozpuścić w roztworze buforu boranowego wg punktu 5.8. Stężenie tego związku w przygotowanym roztworze wynosi 10 mg/ml. Tak przygotowany roztwór glifosatu przechowywany w chłodniarki jest trwały przez 30 dni.

5.13. Roztwory wzorcowe robocze glifosatu

Do ośmiu kolb pomiarowych o pojemności 10 ml odmierzyć w mililitrach odpowiednio: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 i 10 roztworu podstawowego glifosatu i uzupełnić do kreski roztworem buforu boranowego wg punktu 5.8. Stężenia glifosatu w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 i 10 mg/ml.

5.14. Sodu wodorotlenek

Stosować sodu wodorotlenek według punktu 4.

5.15. Woda

Stosować wodę o czystości do HPLC.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającym wykonanie oznaczeń przy długości fali 260 nm lub detektorem spektrofluorymetrycznym umożliwiającym wykonanie oznaczania przy długości fali wzbudzenia i emisji odpowiednio 260 i 310 nm.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną stalową o długości 250 mm oraz średnicy wewnętrznej 3 mm wypełnioną żelalem krzemionkowym modyfikowanym grupami $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (wypełnienie aminowe) o średnicy ziaren 5 μm .

6.3. Filtry z włókna szklanego

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm i wielkości porów 1,6 μm .

6.4. Kolby stożkowe

Stosować kolby stożkowe o pojemności 25 ml.

6.5. Naczynka (wialki)

Stosować naczynka (wialki) o pojemności około 2 ml.

6.6. Pipeta automatyczna

Stosować pipetę automatyczną o pojemności 100 μl .

6.7. Pompa

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobieranie powietrza ze stałym strumieniem objętości wg punktu 7.

6.8. Sączki z politetrafluoroetylenem

Stosować sączki o średnicy 25 mm i średnicy porów 0,45 μm .

7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobieraniu próbek powietrza należy stosować się do wymagań zawartych w normie PN-Z-04008-7:2002 (zm. PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004).

Za pomocą indywidualnego aspiratora średnioprzepływowego przepuścić przez filtry szklane wg punktu 6.3. około 100 l powietrza ze stałym strumieniem objętości do 50 l/h. Filtry z pobranymi próbkami powietrza umieścić w hermetycznych pojemnikach i przechowywać w chłodziarce do czasu wykonania analizy. Pobrane próbki są trwałe przez 20 dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać skład fazy ruchomej, aby zapewnić selektywne oznaczanie glifosatu od substancji współwystępujących. W razie stosowania kolumny chromatograficznej wg punktu 6.2. oznaczanie można wykonać przy zastosowaniu warunków podanych w tabeli 1.

Tabela 1.**Warunki pracy chromatografu cieczowego**

Kolumna analityczna	Kolumna typu NH2 250 · 3 mm
Faza ruchoma	0,05 mol/l KH ₂ PO ₄ pH 5,0 w mieszaninie acetonitryl: woda 1:1
Program	izokratycznie
Strumień objętości	0,6 ml/min
Temperatura kolumny	25 °C
Długość fali analitycznej	260 nm (UV-VIS)
Długość fali wzbudzenia i emisji	$\lambda_{wzb} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 310 \text{ nm}$
Objętość próbki	10 μl

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na dziewięć filtrów z włókna szklanego wg punktu 6.3. nanieść pipetą automatyczną po 100 μl roztworów wzorcowych roboczych glifosatu wg punktu 5.13 (ze względu na niemożność przygotowania roztworu glifosatu o stężeniu 20 mg/ml (niedostateczna rozpuszczalność glifosatu) ostatni wzorzec należy przygotować przez naniesienie na filtr z włókna szklanego 200 μl roztworu glifosatu o stężeniu 10 mg/ml). Po wysuszeniu filtry umieścić w kolbkach stożkowych o pojemności 25 ml wg punktu 6.4. i dodać 10 ml buforu boranowego wg punktu 5.8., a następnie ekstrahować przez godzinę na wytrząsarce rotacyjnej. Ekstrakty przesączyć przez sączi z politetrafluoroetyleny wg punktu 6.8. Przenieść po 1 ml ekstraktów do kolb pomiarowych o pojemności 10 ml i uzupełnić buforem boranowym do kreski. Stężenia glifosatu w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0,0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$. Przenieść po 0,5 ml rozcieńczonych ekstraktów do wialek wg punktu 6.5. i dodać 0,5 ml roztworu chloromrówczanu 9-fluorenylometylu wg punktu 5.9. Wialki szczelnie zamknąć, wymieszać zawartość i pozostawić na 30 min. Po tym czasie roztwory poddać analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilość glifosatu nanieśioną na filtr, a na osi rzędnych – pole powierzchni (wysokości) pików tego związku.

10. Wykonanie oznaczania

Filtry z pobranymi próbkami powietrza przenieść do kolb stożkowych wg punktu 6.4., dodać 10 ml buforu boranowego wg punktu 5.8. i ekstrahować na wytrząsarce rotacyjnej przez godzinę. Ekstrakty przesączyć przez sączi z politetrafluoroetyleny wg punktu 6.8. Otrzymane roztwory rozcieńczyć w stosunku 1: 9 roztworem buforu boranowego wg punktu 5.8., wymieszać, a następnie 0,5 ml przenieść do naczynek wg punktu 6.5. i dodać 0,5 ml roztworu chloromrówczanu 9-fluorenylometylu. Naczynka zakapslować, wstrząsnąć zawartością i pozostawić na 30 min. Po tym czasie próbki poddać analizie chromatograficznej. Próbki, których wartości pola powierzchni (wysokości) pików przekraczają wartości pola powierzchni

(wysokości) pików wzorca o najwyższym stężeniu, należy rozcieńczyć acetonitrylem. Dodatkowe rozcieńczenie należy uwzględnić w obliczeniach.

11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie glifosatu (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny, na podstawie wzoru:

$$X = \frac{m}{V},$$

w którym:

- m – zawartość glifosatu odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując chromatograf cieczowy firmy Waters model Breeze wyposażony w automatyczny dozownik próbek, detektor spektrofotometryczny i spektrofluorymetryczny oraz kolumnę analityczną.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań otrzymano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy: 0,1 ÷ 20 µg/ml; 0,1 ÷ 20 mg/m³ (dla próbki powietrza 100 l)
- granica oznaczania ilościowego, X_{ozn} : 0,004 µg/ml (FLD) i 0,006 µg/ml (UV-VIS)
- granica wykrywalności: 0,001 µg/ml (FLD) i 0,002 µg/ml (UV-VIS)
- współczynnik korelacji charakteryzujący liniowość krzywych wzorcowych, $r = 0,999$
- całkowita precyzja badania, V_c : 5,1% (FLD) i 5,7% (UV-VIS)
- niepewność całkowita metody: 9,9% (FLD) i 11,0% (UV-VIS).

SŁAWOMIR BRZEŹNICKI, MARZENA BONCZAROWSKA

Glyphosate – determination method

A b s t r a c t

Air samples are collected by drawing a known volume of air through glass fiber filters. Glyphosate is desorbed with 0,025 M borate buffer, derivatized by means of 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOCCL) and analyzed by high performance chromatography using ultraviolet ($\lambda = 260$ nm) or fluorimetric detection ($\lambda_{ex} = 260$ nm i $\lambda_{em} = 310$ nm).

The working range of the analytical method is from 0.1 to 20 µg/ml (0.1 ÷ 20 mg/m³ for 100 l air sample).