

Validierungsdokument zur Norm DIN 38407-22

Bestimmung von Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in Wasser durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion (F22)

0 Allgemeine Angaben

0.1 Beginn und Ende der Bearbeitung

Dezember 1995 bis Oktober 2000

0.2 Obmann und stellvertretender Obmann

| | |
|--|--|
| Obmann: ab Juli 1997 Herr Dipl. Ing. Rolf Rainer Reupert Landesumweltamt NRW Wallneyer Str. 6 45133 Essen Tel. 0211/1590-2279 Fax. 0211/1590-2425 E-Mail: rolf.reupert@lua.nrw.de | Stellvertretender Obmann: ab Nov. 1997 Herr Dr. Claus Schlett Gelsenwasser AG Willy-Brandt-Allee 26 45891 Gelsenkirchen Tel. 0209/708379 Fax. 0209/708666 E-Mail: schlett@gelsenwasser.de |
|--|--|

0.3 Liste der Arbeitskreismitglieder und ständige Gäste

| | |
|---|---|
| Herr Dr. Peter Balsaa IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserchemie u. Wassertechnologie GmbH Moritzstraße 26 45476 Mülheim/Ruhr Tel. 0208/40303221 Fax.0208/4030380 | Frau Susanne Bremer (Gast) Landesumweltamt NRW Wallneyer Str. 6 45133 Essen Tel. 0211/1590-2278 Fax. 0211/1590-2425 |
| Frau Dipl.-Ing. U. Hechler Dr. Weißling Laboratorien GmbH Oststr. 6 48341 Altenberge Tel. 02505/89118 Fax 02505/89119 | Herr Dr. Ralph Kombal Staatliches Lebensmittel- Untersuchungsamt Oldenburg Postfach 2462 26014 Oldenburg Tel.: 0441/9803163 Fax: 0441/980312 |
| Frau Dipl.-Ing. Heike Korpjen Stadtwerke Frankfurt a.M. WT 31.2 60276 Frankfurt a. M. Tel. 069/213-23149 Fax: 069/213-22740 | Herr Dr. Frank Thomas Lange DVGW-Technologiezentrum Wasser Karlsruher Straße 84 76139 Karlsruhe Tel.: 0721/9678-157 Fax: 0721/9678-104 |
| Frau M.A. Reding MONSANTO-Ceregen Environmental Sciences Rue Laid Burniat B-1348 Louvain-la-Neuve-Belgium Tel. 32 10 494292 Fax: 31 10 494242 | Herr Dr. L. Rexilius Amt für ländliche Räume Kiel Abteilung Pflanzenschutz, Dez. 33 Postfach 2980 24028 Kiel Tel. 0431/880-1322 Fax: 0431/880-1314 |
| Herr Dr. Rainer Schuster Hewlett-Packard GmbH Hewlett-Packard-Straße 8 76337 Waldbronn Tel.: 07243/602-252 Fax: 07243/602-149 | Frau Katrin Strack Dr. Rietzler Labor für Umweltanalytik Schnorrstraße 5a 90471 Nürnberg Tel: 0911/8688218 Fax: 0911/8688222 |

| | |
|---|---|
| Frau Dipl.-Chem. Janet Weinig Hessische Landesanstalt für Umwelt Dezernat III/2 Bleichstraße 1 65185 Wiesbaden Tel.: 0611/581613 Fax: 0611/581555 | Herr Dr. Alexander Witzel (Gast) LC-Tech Am Rennsteig 17 96117 Lichteneiche Tel. 08081-4920 Fax: 08081-4990 |
| Herr Dr. Christian Zwiener Engler-Bunte-Institut DVGW-Forschungsstelle Richard-Willstätter-Allee 5 76131 Karlsruhe Tel.: 0721/6082788 Fax: 0721/695515 | |

1 Anwendungsbereich

1.1 Erfasste Parameter

Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA), Glufosinat kann mit dem Verfahren nicht bestimmt werden.

Der Metabolit AMPA kann auch durch Hydrolyse aus Phosphonsäure freigesetzt werden (Bild 1).

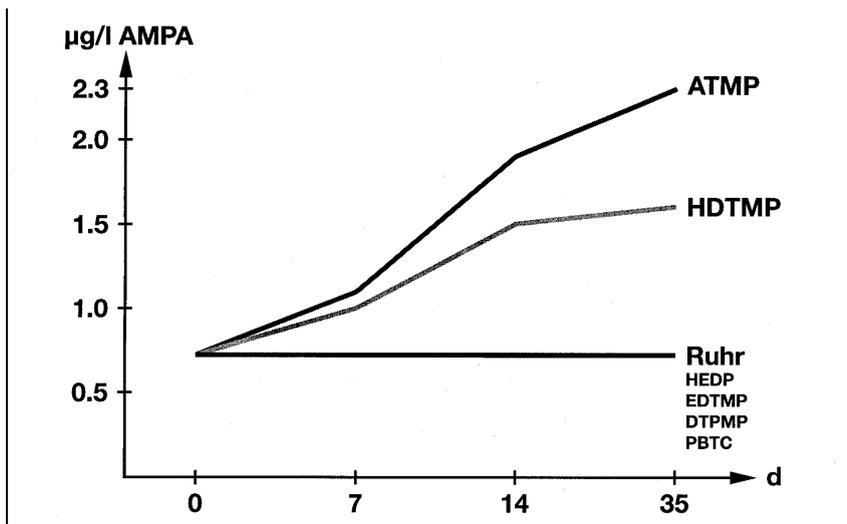


Bild 1: Bildung von AMPA aus Phosphonsäuren [1]

ATMP Aminotris(methylenephosphonic acid); EDTMP Ethylenediamintetra(methylenephosphonic acid); HEDP 1-Hydroxy-(ethandiphosphonic acid) HDTMP Hexamethylenediaminetetra(methylenephosphonic acid); DTPMP Diethylenetriaaminepenta(methylenephosphonic acid)

1.2 Arbeitsbereich

1.2.1 Geprüfte Matrices

Trinkwasser, Grundwasser und Oberflächenwasser verschiedener Herkunft.

1.2.2 Geprüfter und kalibrierter Konzentrationsbereich

Grund- und Verfahrenskalibrierung für das Verfahren A im Bereich von 0,025 µg/l bis 2,0 µg/l und für das Verfahren B von 0,05 µg/l bis 1,0 µg/l.

2 Störungen

Siehe Norm

3 Chemikalien/Geräte

3.1 Haltbarkeit von Chemikalien, Lösungen, Standards

Die Stabilität der Lösungen der Einzelsubstanzen nach Abschnitt 7.27 der Norm ist bei sachgerechter Aufbewahrung über einen Zeitraum von 6 Monaten gewährleistet. Bild 2 zeigt die Wiederfindungsraten einer Standardlösung vor und nach Lagerung der Lösung über etwa 6 Monate bei 4 °C. Die Abweichungen der Massenkonzentrationen von den Sollwerten bewegen sich im Bereich der Standardabweichung der analytischen Messung (Bild 2).

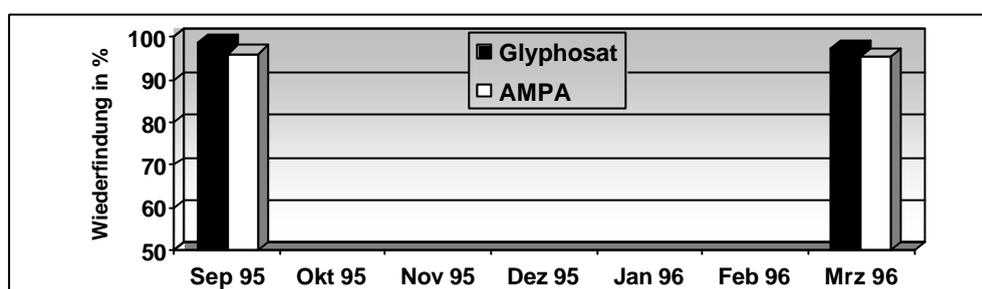


Bild 2: Stabilität von Stammlösungen

Lösung von Glyphosat und AMPA in Wasser ($r_i = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$), Lagerung bei 4 °C.

3.2 Stabilität der Geräteparameter

Die Wiederholstandardabweichungen der Retentionszeiten und der Peakflächen wurden an drei verschiedenen HPLC-Anlagen durch Injektion von Bezugslösungen ermittelt:

Tabelle 1 : Wiederholstandardabweichung der Retentionszeiten und der Peakflächen

Messbedingungen: Siehe Tabelle 2 , Beispiel A der Norm

| Meßgrößen | Glyphosat | AMPA |
|-------------|---|--|
| \bar{t}_R | 8,26 min, s = 0,03 min (n=10) 7,68 min, s = 0,02 min (n=10) 8,45 min, s = 0,04 min (n=50) | 16,58 min, s = 0,08 min (n=10) 14,52 min, s = 0,05 min (n=10) 16,60 min, s = 0,12 min (n=50) |
| \bar{A} | 495 F*s, v = 4,6 % (n=11) 63,8 F*s, v = 2,6 % (n=10) | 781 F*s, v = 3,3 % (n=11) 117 F*s, v = 1,5 % (n=10) |

Die Untersuchungen ergaben des weiteren, dass die Konditionierung mit KOH im Anschluss an die Trennung notwendig ist. Hierdurch wird die Stabilität der Retentionszeiten verbessert. Nach Konditionierung mit KOH ist die Trennsäule mindestens 10 min mit dem Eluenten zu equilibrieren, um wieder eine stabile Basislinie zu erhalten.

3.3 Trennphasen

Tabelle 2 führt die im AK getesteten Trennsäulen auf.

Tabelle 2: Getestete Trennsäulen

| Bezeichnung der Säule | Testergebnis |
|--|---|
| Pickering-Glyphosate Column, Cation Exchange, K^+ , 8 μm (150 x 4 mm) | Effiziente Trennung. Säule unter Routinebedingungen erprobt. |
| PRP-X400, Hamilton, K^+ , 7 μm (250 x 4,1 mm) | Effizienz der Trennsäule relativ gering. Durch kurze Retentionszeiten der Analyten keine ausreichende Abtrennung von polaren Begleitstoffen. |
| CarboPac PA-100, Anion Exchange, NR_4^+ , 10 μm (250 x 4 mm) | Effiziente Trennung. AMPA wird vor Glyphosat eluiert. Säule wurde nicht unter Routinebedingungen erprobt. |
| Aminex Glyphosate Column, Cation Exchange, 11 μm (250 x 4,6 mm) | Aufgrund von starken Störungen durch Blindwerte war eine Bestimmung von Glyphosat und AMPA nicht möglich. Eine zweite Säule wurde nicht erprobt. |
| SynChropak Q, 6 μm , Anion Exchange (250 x 4,6 mm) | Zur Bestimmung von Glyphosat geeignet. AMPA wird vor Glyphosat eluiert, wobei die Retentionszeit jedoch zu gering ist, um bei Proben eine ausreichende Abtrennung von polaren Begleitsubstanzen zu erreichen. [2] |

4 Proben und Probenaufarbeitung

4.1 Probenstabilität / Probenkonservierung

Durch die Gegenwart von freiem Chlor in der Wasserprobe werden Glyphosat und AMPA abgebaut. Bei einer Massenkonzentration von 0,3 mg/l freies Chlor in der Wasserprobe erfolgt der Abbau bereits nach wenigen Minuten [3]. Durch Zugabe von Natriumthiosulfat kann die Wasserprobe konserviert werden (Bild 3).

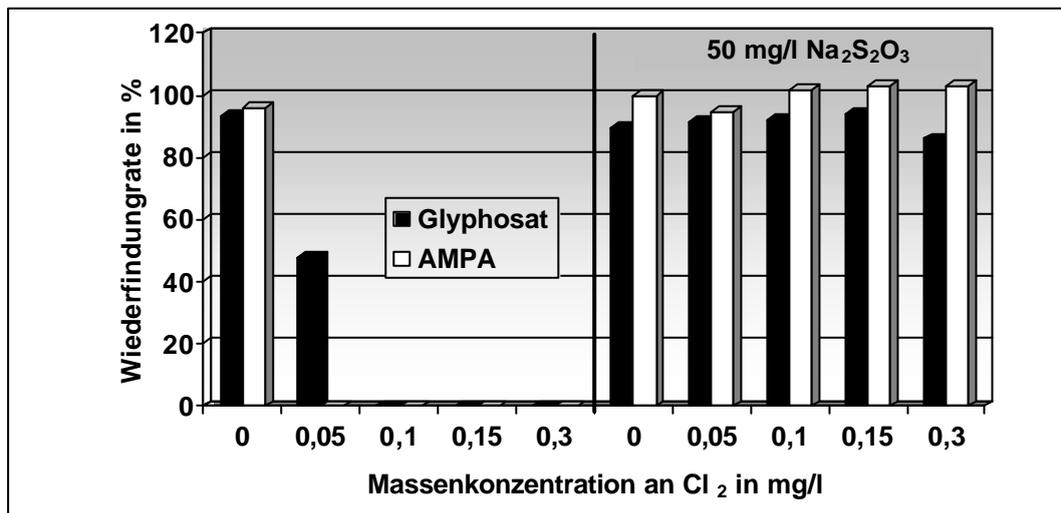


Bild 3: Einfluss von freiem Chlor in der Wasserprobe auf die Wiederfindungsraten von Glyphosat und AMPA

Chlorfreies Wasser mit Glyphosat und AMPA dotiert (Massenkonzentration $r_{i, \text{sol}} = 0,4 \mu g/l$) und auf verschiedene Chlorgehalte eingestellt, Lagerung der Wasserproben bis zur Aufarbeitung 1 Tag bei 4°C

Der hydrolytische Abbau von Glyphosat und AMPA verläuft relativ langsam. Nach etwa 1 Jahr Lagerung von dotiertem Trinkwasser wurden noch 50 % der Ausgangskonzentrationen ($r_i = 10 \mu g/l$) wiedergefunden [4,5].

Chlorfreie Wasserproben können eingefroren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens 2 Monate gelagert werden (Bild 4).

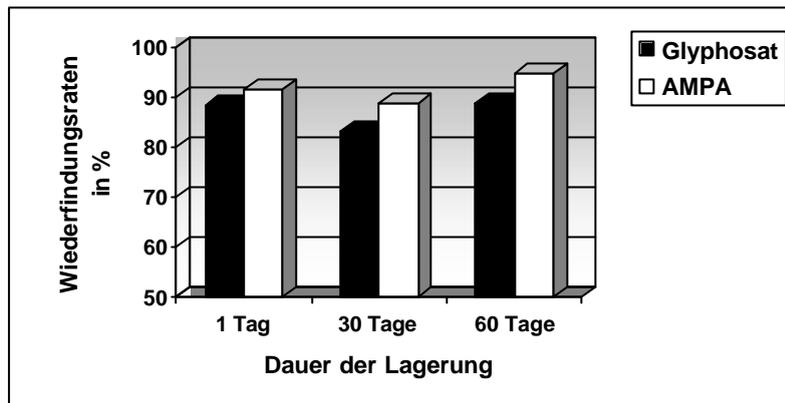


Bild 4: Wiederfindungsraten von Glyphosat und AMPA nach Einfrieren von chlorfreien Wasserproben

Massenkonzentration $r_{i, \text{soll}} = 0,4\text{ }\mu\text{g/l}$, jeweils $n=3$

4.2 Anreicherung und Clean-up-Verfahren

4.2.1 Modifizierte Durchführung des Verfahrens A [3,6]

Bild 5 zeigt den Aufbau eines einzelnen Extraktionsplatzes.

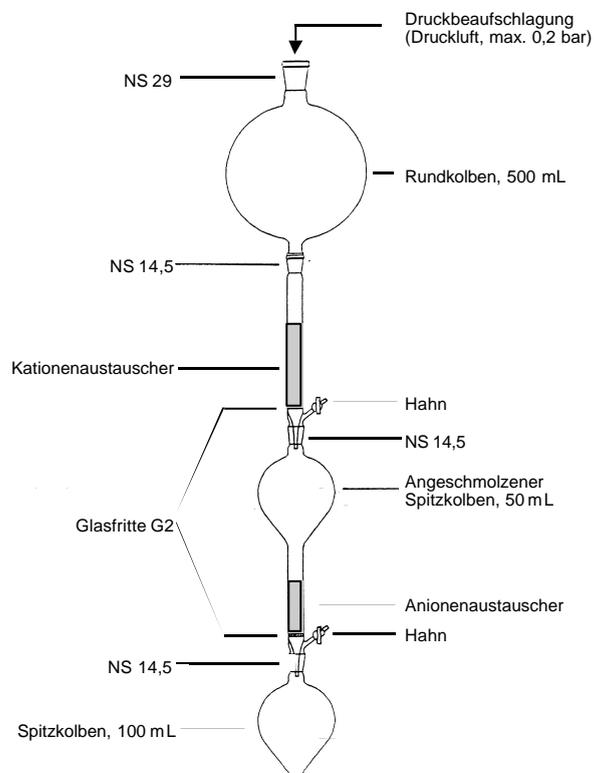


Bild 5: Aufbau einer Anreicherungsapparatur zur Extraktion von Glyphosat und AMPA mit gekoppelter Extraktreinigung durch Eisenentfernung.

a) Anreicherung am eisen(III)-beladenen Kationenaustauscher

250 mL der angesäuerten Wasserprobe werden auf den eisenbeladenen Kationenaustauscher gegeben. Nachdem die Probe mit einer Tropfgeschwindigkeit von 6-8 mL/min die Säule passiert hat (nötigenfalls Anreicherungskolben mit Druckluft, ca. 0,1 bar, beaufschlagen), wird mit 20 mL 0,02 M Salzsäure nachgespült.

Das Aufreinigungsröhrchen (Anionenaustauscher) wird an das Anreicherungs-röhrchen angesetzt und der Hahn des Anreicherungs-röhrchens (Kationenaustauscher) geöffnet. Die Elution wird mit 10 mL 32%iger Salzsäure bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 4 mL/min vorgenommen. Das Eluat tropft in das Vorratskölbchen des Aufreinigungsröhrchens und vermischt sich dabei mit der Vorlage von 4 mL an 37%iger Salzsäure.

b) Eisenentfernung aus dem Eluat am Anionenaustauscher

Der Hahn des Anreicherungs-röhrchens wird nun geschlossen und der Hahn des Aufreinigungsröhrchens geöffnet. Die durch das Aufreinigungsröhrchen tropfende Lösung wird im Spitzkolben aufgefangen (ggf. druckbeaufschlagen). Die Eisen(III)-Ionen werden als Chloroferrat-Komplexe unter Ausbildung eines braunen Ringes bereits am Säulen-anfang adsorbiert. Das Eluat ist farblos. Zum Nachspülen des Aufreinigungsröhrchens wird über den Anreicherungs-röhrchen 7 mL 32%ige Salzsäure aufgegeben.

Das so erhaltene Eluat wird wie in der Norm beschrieben aufgearbeitet.

4.2.2 Effizienz verschiedener Phasen zur Abtrennung polarer Begleitstoffe

Zur Abtrennung polarer Begleitstoffe bei der Probenaufarbeitung nach Verfahren B der Norm erwiesen sich Materialien auf Polystyrolbasis besser geeignet, als modifizierte Silicagele [7].

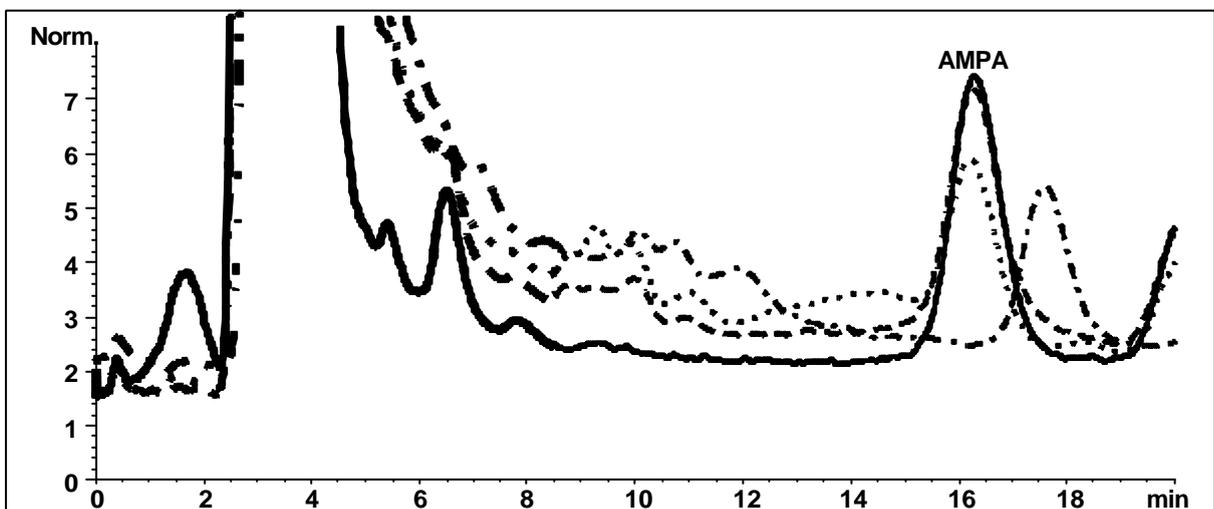


Bild 6: Einfluss von verschiedenen Phasen bei der Reinigung der Wasserprobe (Verfahren B)

Probe: Oberflächenwasser: — LiChrolut EN (200 mg), - - - RP-C18 (100 mg)

- · - · benzolsulfonsäuremodifiziertes Silicagel (500 mg), ····· ohne clean-up

5 Kalibrierungen

5.1 Art der Kalibrierung

Wegen der Komplexibilität des Verfahrens und der im allgemeinen begrenzten Stabilität des Messsystems wird zur Aufstellung der Bezugsfunktionen eine Kalibrierung des HPLC-Bestimmungsschrittes (Grundkalibrierung) mit externem Standard durchgeführt (siehe Norm).

Im Rahmen der Validierung der Verfahren wurden zur Ermittlung der Kenndaten auch Kalibrierungen über die Gesamtverfahren durchgeführt.

5.2 Verwendete Kalibriersubstanzen

Tabelle 3: Bezugsquellen von Referenzsubstanzen (Beispiele)

| | |
|----------------------------------|---|
| Promochem GmbH, Wesel | Glyphosate, certified IPO 260 Reinheitsgrad: mind. 98 % |
| | AMPA, Lösung in Wasser, Massenkonzentration 10 µg/ml Reinheitsgrad: mind. 98 % |
| Riedel-de Haen | Glyphosate solution 100 ng/ml in water, Pestanal® Reinheitsgrad: mind. 98 % |
| Supelco | Glyphosat, 1 g |
| | Aminomethyl phosphonic acid, 1 g |
| Monsanto Deutschland GmbH | Glyphosate Reinheitsgrad: 96,5 % |
| Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz) | AMPA Reinheitsgrad: 99 % |

5.3 Kalibrierter Konzentrationsbereich

Verfahren A: 10 pg/µl bis 400 pg/µl, entspricht für $V_p = 200$ ml, $V_o = 1$ ml, $V_{inj.} = 100$ µl einem Arbeitsbereich von 0,05 µg/l bis 2 µg/l

Verfahren B: 0,5 pg/µl bis 10 pg/µl, entspricht für $V_p = 10$ ml, $V_o = 1$ ml, $V_{inj.} = 100$ µl einem Arbeitsbereich von 0,05 µg/l bis 1 µg/l

5.3.1 Verfahrenskennndaten für das Verfahren A

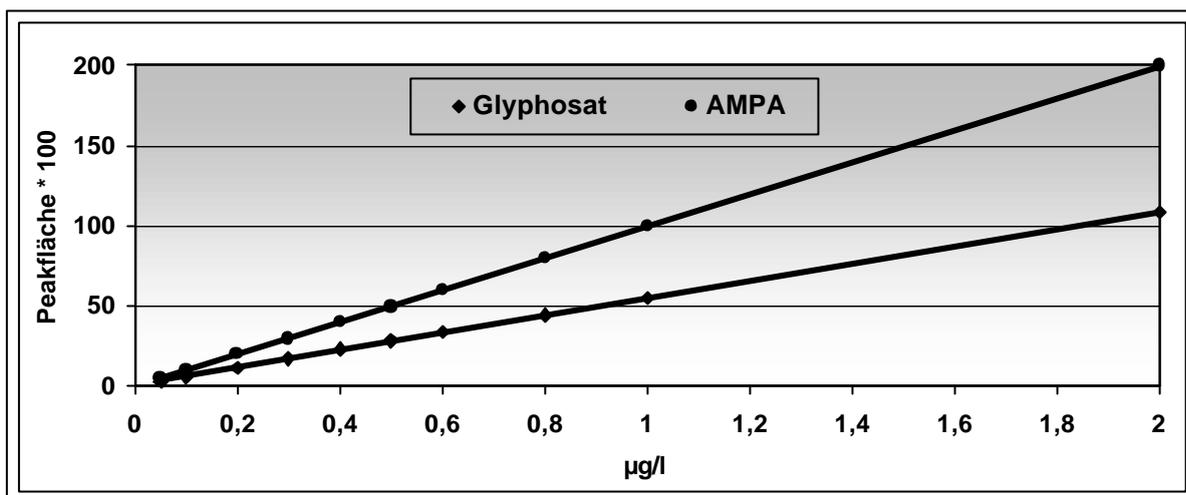


Bild 7: Bezugsfunktionen von Glyphosat und AMPA aus einer Grundkalibrierung
Massenkonzentrationen absolut jeweils von 10 – 400 pg/µl

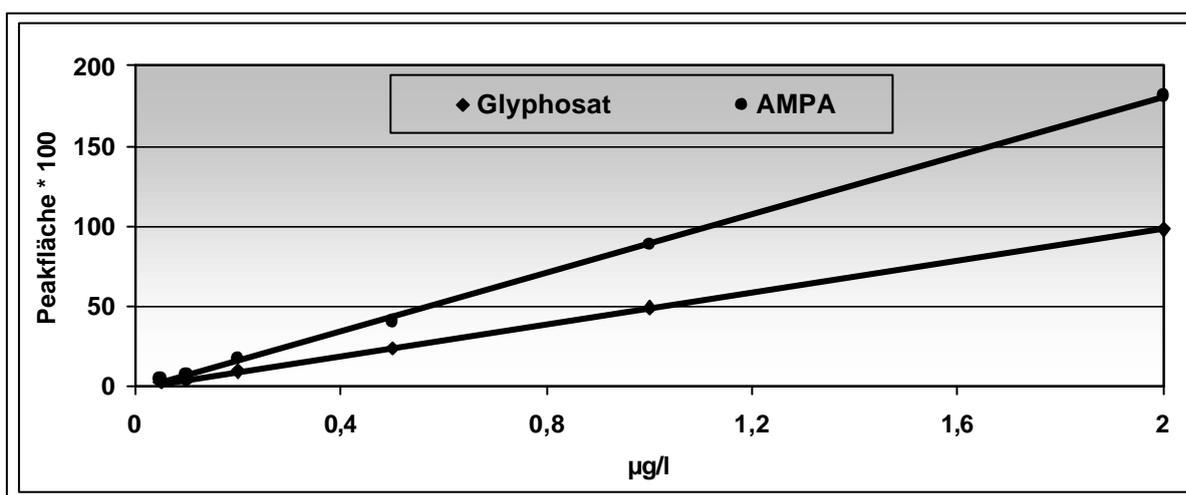


Bild 8: Bezugsfunktionen von Glyphosat und AMPA aus einer Verfahrenskalibrierung

Tabelle 4: Verfahrenskennndaten für das Verfahren A

| Kenndaten | Grundkalibrierung | | Verfahrenskalibrierung | |
|---|-------------------|---------|------------------------|--------|
| | Glyphosat | AMPA | Glyphosat | AMPA |
| Steigung | 5399 | 10000,8 | 4931,5 | 9093,6 |
| Regressionskoeffizient | 0,9999 | 0,9999 | 0,9999 | 0,9996 |
| Rel. Verfahrensstandardabweichung, in % | 1,23 | 0,48 | 1,59 | 3,4 |
| Nachweisgrenze, DIN 32645 | 0,015 | 0,0059 | 0,025 | 0,054 |
| Bestimmungsgrenze, DIN 32645 | 0,055 | 0,022 | 0,096 | 0,20 |
| Mittlere Wiederfindungsrate, in % | | | 0,91 | 0,91 |

5.3.2 Verfahrenskennndaten für das Verfahren B

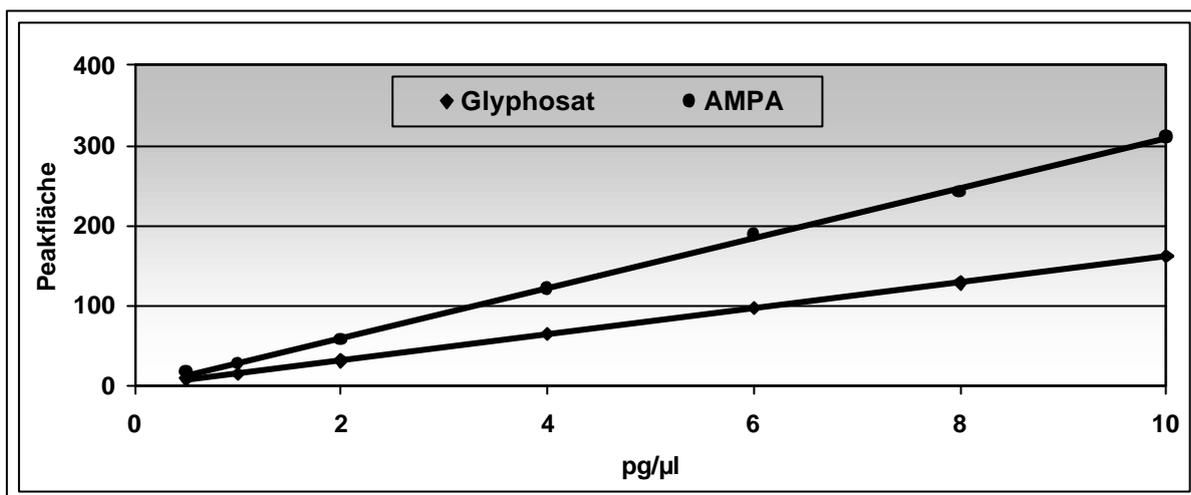


Bild 9: Bezugsfunktionen von Glyphosat und AMPA aus einer Grundkalibrierung

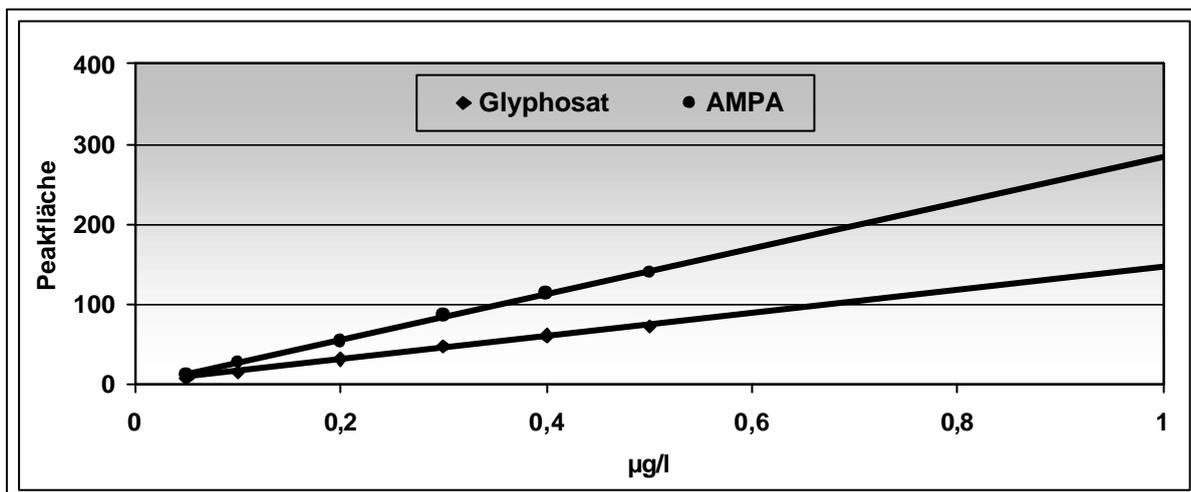


Bild 10: Bezugsfunktionen von Glyphosat und AMPA aus einer Verfahrenskalibrierung

Tabelle 5: Verfahrenskennndaten für das Verfahren B

| Kenndaten der Kalibrierung | Grundkalibrierung | | Verfahrenskalibrierung | |
|---|-------------------|--------|------------------------|--------|
| | Glyphosat | AMPA | Glyphosat | AMPA |
| Steigung | 161,55 | 310,6 | 152,0 | 285,9 |
| Regressionskoeffizient | 0,9999 | 0,9996 | 0,9999 | 0,9996 |
| Rel. Verfahrensstandardabweichung, in % | 1,23 % | 2,64 % | 1,28 | 2,10 % |
| Nachweisgrenze, DIN 32645 | 0,013 | 0,028 | 0,009 | 0,015 |
| Bestimmungsgrenze, DIN 32645 | 0,049 | 0,11 | 0,034 | 0,055 |
| Mittlere Wiederfindungsrate, in % | | | 94,1 | 92,1 |

5.4 Stabilität der Kalibrierung

5.5.1 Verfahren A

Bild 11 gibt die Stabilität des Meßsystems über 5 Meßsequenzen anhand der absoluten Flächenwerte eines Kontrollstandards für den Kalibrierbereich des Verfahrens A wieder. Die Variationskoeffizienten über alle Flächenwerte betragen für Glyphosat 9,2 % und für AMPA 7,7 % [6].

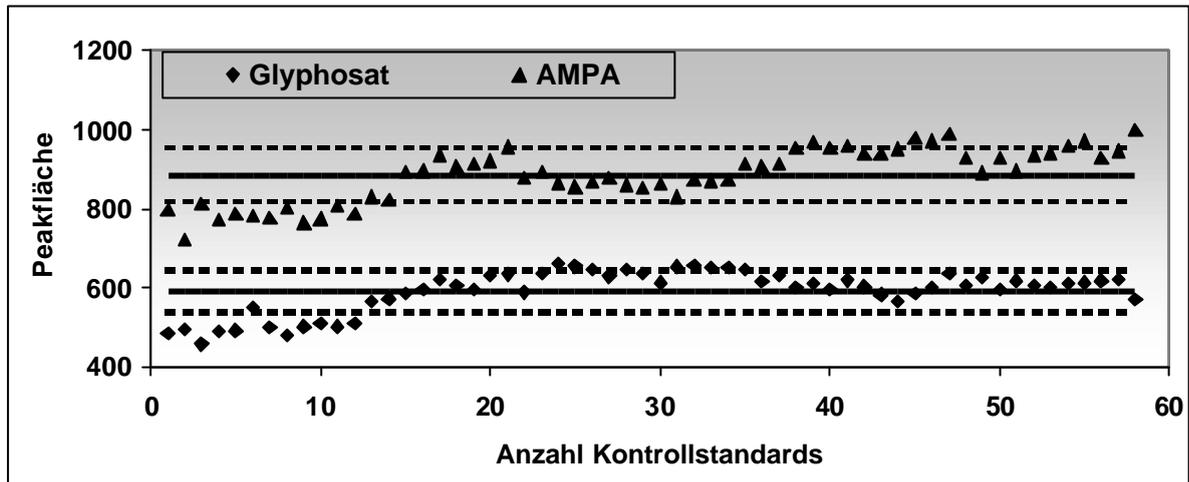


Bild 11: Systemstabilität einer Grundkalibrierung nach Verfahren A

5.5.2 Verfahren B

Für den Kalibrierbereich des Verfahrens B ist beispielhaft eine Mittelwert-Zielkarte mit dem Sollwert als Zentrallinie und den Kontrollgrenzen bei $\pm 10\%$ des Sollwertes wiedergegeben (Bild 12). In den 7 Meßsequenzen wurden insgesamt etwa 120 Proben und etwa 50 Kontrollstandards ($r_i = 4 \text{ pg}/\mu\text{l}$) analysiert. Die Mittelwert-Zielkarte gibt für jede Messsequenz jeweils den Mittelwert der Messergebnisse von den Kontrollstandards wieder.

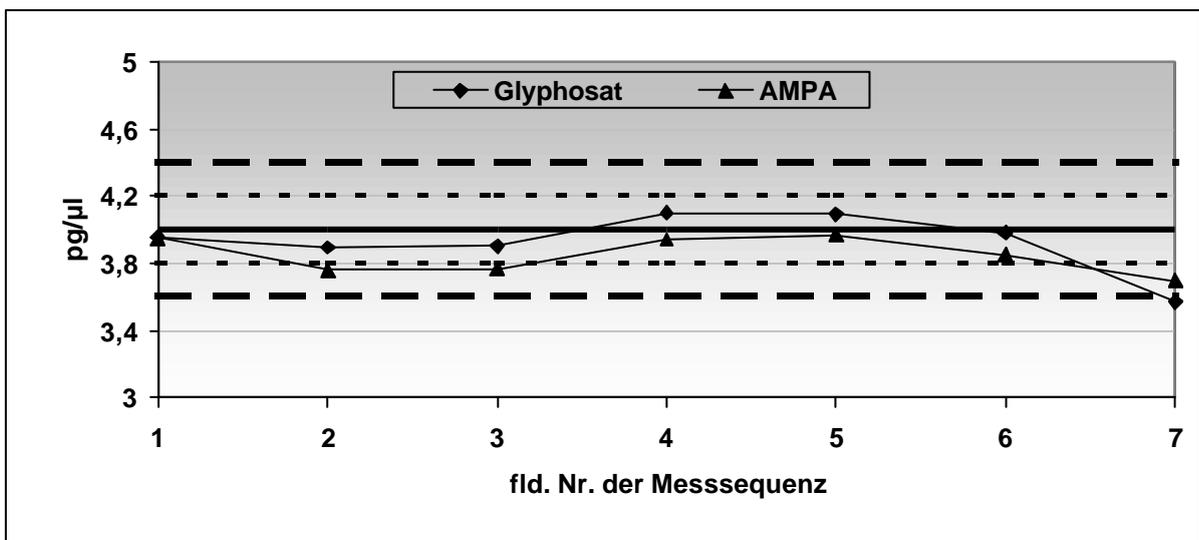


Bild 12: Mittelwert-Zielkarte einer Grundkalibrierung nach Verfahren B

6 Untersuchungen zur Richtigkeit

6.1 Vergleichsuntersuchungen

Zur Orientierung wurde zu Beginn der Arbeiten eine Vergleichsuntersuchung mit 3 Laboratorien durchgeführt, wobei unterschiedliche Verfahren zur Anwendungen kamen (Tabelle 6).

Verfahren A: siehe Norm

Verfahren B: siehe Norm

Verfahren V: Vorsäulenderivatisierung, siehe Anhang

Tabelle 6: Vergleichende Untersuchung bei Anwendung verschiedener Verfahren

| Labor | Glyphosat (µg/l) | | | | AMPA (µg/l) | | | |
|--|-----------------------------------|---------|---------|---------|-------------|---------|---------|---------|
| | Standard, Sollwert 10 µg/l | | | | | | | |
| | 1. Inj. | 2. Inj. | 3. Inj. | WFR (%) | 1. Inj. | 2. Inj. | 3. Inj. | WFR (%) |
| 1A | 9,6 | 9,9 | n. b. | 98 | 9,9 | 10,0 | n. b. | 99,5 |
| 2V | 12,1 | 11,7 | 11,9 | 119 | 9,9 | 9,5 | 9,70 | 96,8 |
| 3B | 10,8 | 10,6 | 10,7 | 107 | 10,0 | 10,1 | 10,4 | 101,7 |
| Oberflächenwasser, nicht dotiert | | | | | | | | |
| | 1. A | 2. A | 3. A | MW | 1. A | 2. A | 3. A | MW |
| 1A | < 0,09 | < 0,09 | < 0,09 | < 0,09 | 0,58 | 0,52 | 0,49 | 0,53 |
| 2V | 0,0/ | 0,07 | 0,0/ | 0,0/ | 0,51 | 0,52 | 0,500 | 0,51 |
| 3B | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | 0,49 | 0,47 | 0,48 | 0,48 |
| Oberflächenwasser, dotiert mit jeweils 0,5 µg/l | | | | | | | | |
| | 1. A | 2. A | 3. A | WFR (%) | 1. A | 2. A | 3. A | WFR (%) |
| 1A | 0,42 | 0,38 | 0,35 | 76,4 | 1,29 | 1,26 | 1,17 | 142 |
| 2V | 0,25 | 0,25 | 0,24 | 35,5 | 0,92 | 0,93 | 0,89 | 80,7 |
| 3B | 0,37 | 0,31 | 0,38 | 70,3 | 0,89 | 0,90 | 0,93 | 85,7 |

Die Vorsäulenderivatisierung wurde im Arbeitskreis nicht weiter verfolgt, da sich dieses Verfahren grundsätzlich von der Nachsäulenderivatisierung unterscheidet und die Bestimmung von Glyphosat bei einigen Proben seinerzeit durch Begleitsubstanzen gestört wurde.

6.2 Vergleichende Untersuchung zwischen den Verfahren A und B der Norm

Tabelle 7: Analysenergebnisse für ausgewählte Proben

| Probe | Glyphosat (µg/l) | | AMPA (µg/l) | |
|-------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Verfahren A | Verfahren B | Verfahren A | Verfahren B |
| Nidda 14 | < 0,05 | 0,05 | 0,42 | 0,42 |
| Nidda 15 | < 0,05 | < 0,05 | 0,23 | 0,27 |
| Nidda 16 | < 0,05 | < 0,05 | 0,084 | 0,091 |
| Rhein 18 | < 0,05 | < 0,05 | 0,16 | 0,16 |
| Nidda 20 | < 0,05 | 0,10 | 0,53 | 0,80 |
| Ruhr 21 | < 0,05 | < 0,05 | 0,12 | 0,28 |
| Aare 22 | < 0,05 | < 0,05 | 0,073 | 0,056 |
| Nidda 23 | < 0,05 | < 0,05 | 0,37 | 0,31 |
| Rhein 24 | < 0,05 | < 0,05 | 0,32 | 0,25 |
| Rhein 25 | < 0,05 | < 0,05 | 0,59 | 0,45 |
| Nidda 26 | 0,28 | 0,10 | 6,75 | 7,6 |
| Donau 27 | < 0,05 | < 0,05 | 0,15 | 0,11 |
| Main, Uferfiltrat | < 0,05 | < 0,05 | 0,066 | <0,05 |

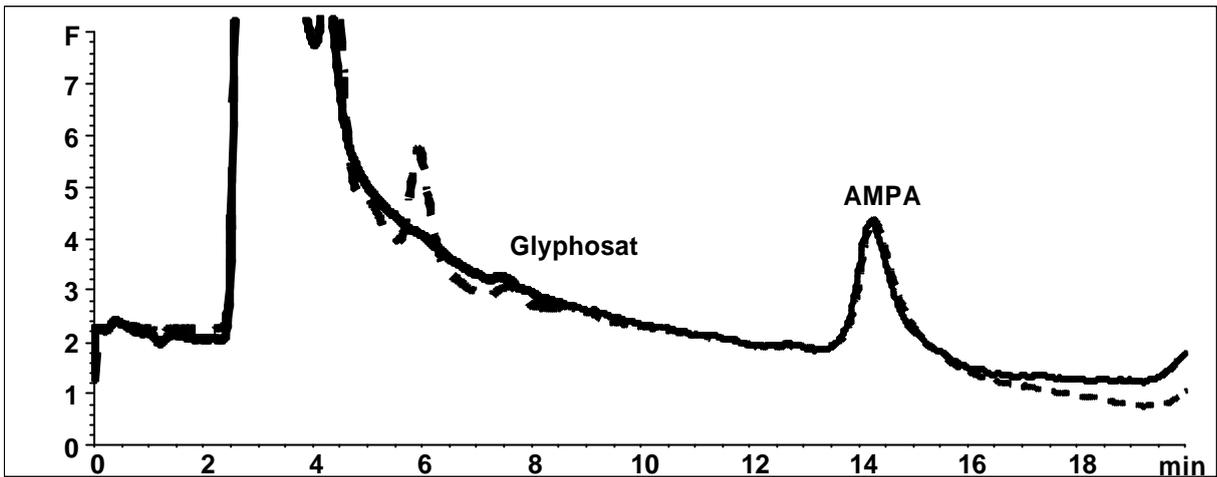


Bild 13: Vergleich der Chromatogramme von Verfahren A und B

Probe: Oberflächenwasser (Nidda); ——— Verfahren A: ρ (Glyphosat) < 0,05 $\mu\text{g/l}$, ρ (AMPA) = 0,42 $\mu\text{g/l}$; - - - Verfahren B: ρ (Glyphosat) = 0,05 $\mu\text{g/l}$, ρ (AMPA) = 0,42 $\mu\text{g/l}$

7 Untersuchung zur Wiederfindung

Tabelle 8 gibt die im AK ermittelten Wiederfindungsraten aus verschiedenen Trinkwässern wieder. Weitere Wiederfindungsraten sind in [1] und [3-7] aufgeführt.

Tabelle 8: Mittlere substanzspezifische Wiederfindungsraten aus Trinkwasser

| Stoff | Konz. Niveau (ng/l) | Labor 1 Verf. A | Labor 2 Verf. A | Labor 3 Verf. A | Labor 4 Verf. A | Labor 5 Verf. B | Labor 6 Verf. B |
|------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Glyphosat | 50 | 1,053 | 0,92 | 0,36 | 0,39 | 0,96 | 0,967 |
| | 100 | 0,924 | 0,88 | 0,74 | 0,87 | 1,01 | |
| | 200 | 0,867 | 0,92 | 0,75 | 0,90 | 0,98 | |
| | 300 | 0,925 | 0,92 | 0,70 | | 0,95 | 1,049 |
| | 400 | 0,927 | 0,91 | 0,81 | | 0,94 | 0,995 |
| | 500 | 0,924 | 0,93 | 0,77 | 0,96 | 0,89 | 1,014 |
| | MW | 0,937 | 0,91 | 0,69 | 0,78 | 0,955 | 1,006 |
| | STAW | 0,062 | 0,018 | 0,16 | 0,26 | 0,040 | 0,034 |
| AMPA | 50 | 1,175 | 1,06 | 0,92 | 0,79 | 0,88 | 0,941 |
| | 100 | 1,067 | 1,13 | 1,27 | 1,13 | 0,88 | |
| | 200 | 1,072 | 1,16 | 0,76 | 1,17 | 0,91 | |
| | 300 | 1,077 | 1,06 | 0,79 | | 0,93 | 0,986 |
| | 400 | 1,074 | 1,04 | 0,86 | | 0,92 | 1,014 |
| | 500 | 1,054 | 1,04 | 0,78 | 1,10 | 0,91 | 1,025 |
| | MW | 1,087 | 1,08 | 0,90 | 1,05 | 0,905 | 0,992 |
| | STAW | 0,044 | 0,050 | 0,19 | 0,17 | 0,021 | 0,037 |
| pH | | 7,3 | 7,9 | | | 7,3 | 7,6 |
| Lf (mS/m) | | 61,9 | 42,8 | | | 69,8 | 58,0 |
| Ca (mg/l) | | 112 | | | | 78,6 | |
| Mg (mg/l) | | 8,2 | | | | 12,7 | |
| DOC (mg/l) | | | | | | <1 | |
| ° dH | | | 9,5 | | | | 15,3 |

8 Probleme bei der Probenuntersuchung / Testdurchführungen

Siehe Norm

9 Verfahrenskenndaten zur Kontrolle der Richtigkeit, Präzision und Robustheit

Der Ringversuch zum Verfahren DIN-Entwurf 38407-22 wurde im Zeitraum vom 15.04.99 bis zum 07.05.99 an 3 Proben durchgeführt:

Probe 1: Standardlösung Glyphosat/AMPA

Probe 2: Trinkwasser, dotiert mit Glyphosat und AMPA

Probe 3: Oberflächenwasser, dotiert mit Glyphosat und AMPA

Zusätzlich zu den Proben wurde eine Standardlösung mit bekannten Sollwerten (Kontrolllösung) zur Prüfung der Kalibrierung und der selbst hergestellten Lösungen zur Verfügung gestellt.

9.1 Herstellung der Proben

Zur Herstellung der Proben wurde verschiedene Lösungen angesetzt:

a) Stammlösung I: r (Glyphosat) = 0,1552 mg/ml

Einwaage: 4,000 mg Glyphosat (Reinheit 97 %)

Lösemittel: Wasser

Volumen: 25 ml

b) Stammlösung II: r (AMPA) = 0,2376 mg/ml

Einwaage: 6,000 mg AMPA (Reinheit 99 %)

Lösemittel: Wasser

Volumen: 25 ml

c) Stammlösung III: r (Glyphosat) = 3,1040 µg/ml, r (AMPA) = 4,7520 µg/ml

Stammlösung I: 1000 µl

Stammlösung II: 1000 µl

Lösemittel: Wasser

Volumen: 50 ml

d) Spikelösung I: r (Glyphosat) = 0,9312 µg/ml, r (AMPA) = 1,1880 µg/ml

Stammlösung I: 600 µl

Stammlösung II: 500 µl

Lösemittel: Wasser

Volumen: 100 ml

e) Spikelösung II: r (Glyphosat) = 1,5520 µg/ml, r (AMPA) = 1,9008 µg/ml

Stammlösung I: 1000 µl

Stammlösung II: 800 µl

Lösemittel: Wasser

Volumen: 100 ml

Die Lösungen a bis e wurden zur Kontrolle vermessen. Dabei erfolgte die quantitative Auswertung mit Kalibrierfunktionen, die mit unabhängig angesetzten Stamm- bzw. Bezugslösungen erstellt wurden. Die Abweichungen von den Sollwerten betrug in allen Fällen weniger als ± 5 %.

Probe 1

Zur Herstellung der Probe 1 wurden 1000 µl der Stammlösung III in einen 100-ml-Messkolben gegeben und die Lösung mit 0,005 molarer Kaliumdihydrogenphosphat-Pufferlösung (pH 2,05) bis zur Marke aufgefüllt.

Sollwerte: $r(\text{Glyphosat}) = 0,0310 \mu\text{g/ml}$; $r(\text{AMPA}) = 0,0475 \mu\text{g/ml}$

Probe 2

Zur Herstellung der Probe 2 wurden 100 l Trinkwasser (pH =7,8, $\gamma_{25} = 61,9 \text{ mS/m}$, $\text{TOC} < 1,0 \text{ mg/l}$) in einen Glasbehälter eingefüllt und das Wasser über eine Zeit von 30 min gerührt. Anschließend wurden 1000 ml aus dem Glasbehälter für Blindwertuntersuchungen abgenommen.

Von der Spikelösung I wurden 10 ml in einen 1000-ml-Messkolben gegeben und die Lösung mit Trinkwasser bis zur Marke aufgefüllt. Der Inhalt des Messkolbens wurde quantitativ in den Glasbehälter überführt und die Probe anschließend 2 h durch Rühren homogenisiert.

Sollwerte: $r(\text{Glyphosat}) = 0,0931 \mu\text{g/l}$; $r(\text{AMPA}) = 0,1188 \mu\text{g/l}$.

Vor der Abfüllung der Proben, nach jeder 12. Probe und nach der Abfüllung wurde jeweils eine Kontrollprobe abgenommen.

Die Blindwertprobe und die Kontrollproben wurden nach Verfahren B des DIN-Entwurfes auf Glyphosat und AMPA analysiert.

Dabei ergab sich für die Blindwertprobe bei 6 parallelen Analysen über das Gesamtverfahren in keinem Fall positive Befunde an Glyphosat oder AMPA. In dem Elutionsbereich der zu untersuchenden Stoffe traten keine Störungen durch Begleitstoffe auf (Bild 14).

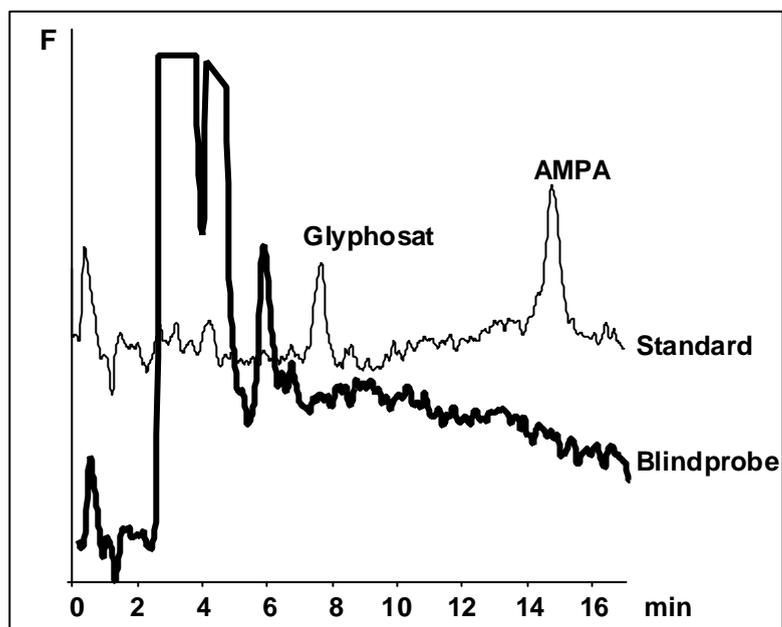


Bild 14: Vergleich der HPLC-Chromatogramme von einer Blindwertprobe (Trinkwasser) mit einer Standardlösung ($r_i = 0,05 \mu\text{g/l}$)

Die Analysenergebnisse der Kontrollproben wurden mit den mittleren laborinternen Wiederfindungsraten korrigiert [\bar{A} (Glyphosat) = 0,96 (s=4,0) und \bar{A} (AMPA) = 0,91 (s= 2,1)]

und ergaben für Glyphosat eine mittlere Massenkonzentration von $\bar{r} = 0,0970 \mu\text{g/l}$ ($s=0,0054 \mu\text{g/l}$) und für AMPA von $\bar{r} = 0,1280 \mu\text{g/l}$ ($s=0,0044 \mu\text{g/l}$). Hieraus ergeben sich Wiederfindungsraten für Glyphosat von 104,2 % und für AMPA von 107,7 %.

Bild 15 zeigt die mit \bar{A}_i korrigierten Einzelergebnisse für die Kontrollproben.

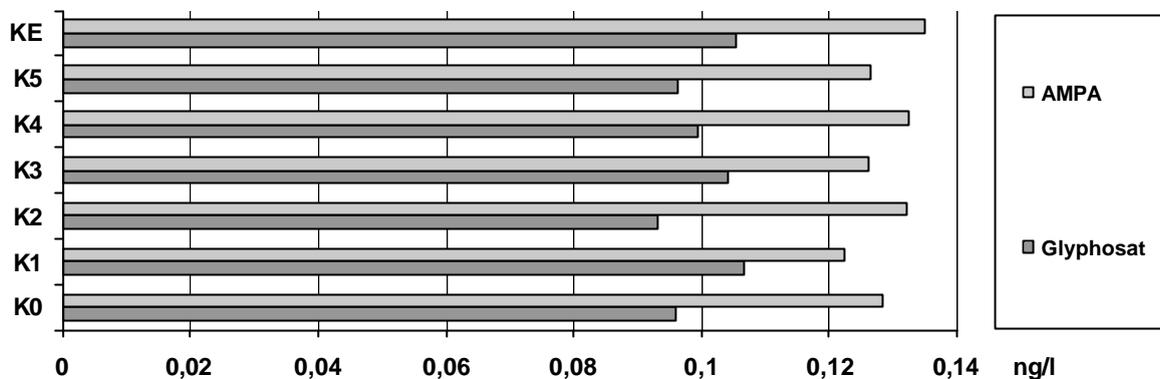


Bild 15: Gemessene Massenkonzentrationen von Glyphosat und AMPA in den Kontrollproben der Probe 2

Probe 3

Die Dotierung der Probe 3 (Rheinwasser Km 732 vom 99; pH = 7,98, $\gamma_{25}=55,9 \text{ mS/m}$, TOC = 2,6 mg/l) erfolgte analog Probe 2 mit 10 ml der Spikelösung II, wodurch sich die rechnerischen Sollwerte von $\bar{r} = 0,1552 \mu\text{g/l}$ für Glyphosat und $\bar{r} = 0,1901 \mu\text{g/l}$ für AMPA ergeben.

Wie bei der Probe 2 wurden eine Blindwertprobe mit 6 parallelen Bestimmungen über das Gesamtverfahren und insgesamt 7 Kontrollproben nach Verfahren B des DIN-Entwurfes analysiert und die Analysenergebnisse mit der laborinternen mittleren Wiederfindungsrate korrigiert.

Die Blindwertuntersuchungen ergaben sowohl für Glyphosat wie auch für AMPA positive Befunde; die mittleren Massenkonzentrationen betragen für Glyphosat $\bar{r} = 0,0441 \mu\text{g/l}$ ($s = 0,0041 \mu\text{g/l}$) und für AMPA $\bar{r} = 0,1934 \mu\text{g/l}$ ($s = 0,009 \mu\text{g/l}$) (Bild 16).

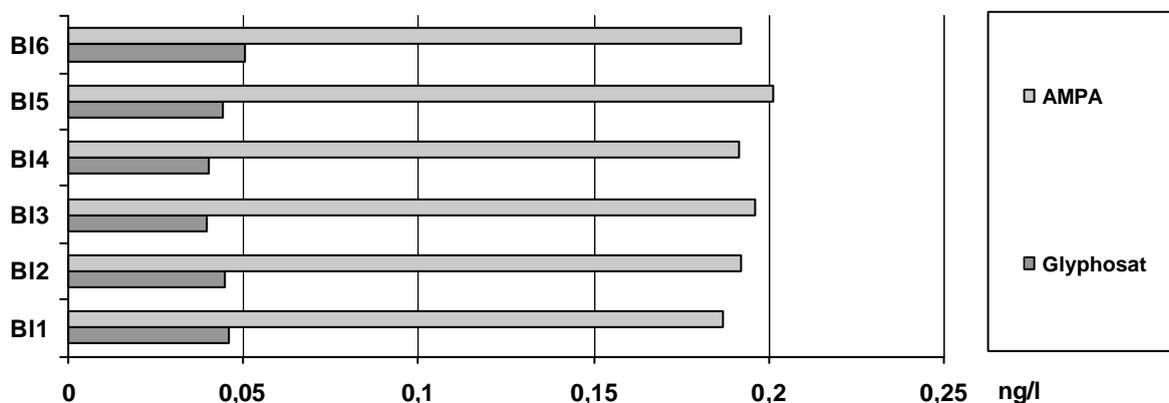


Bild 16: Gemessene Massenkonzentrationen von Glyphosat und AMPA in den Blindwertproben der Probe 3

Bild 17 zeigt, dass die Bestimmung der Stoffe in den Blindwertproben der Probe 3 auch für Glyphosat bei einer Massenkonzentration im Bereich der Bestimmungsgrenze noch relativ unproblematisch ausfiel. Der bei der Anwendung des Verfahrens B im allgemeinen höhere Anteil an polaren Begleitstoffen führt hier zwar zu einer Beeinträchtigung der Peakintegration, die der Standardabweichung nach zu urteilen noch keinen signifikanten Einfluss auf das quantitative Ergebnis hat.

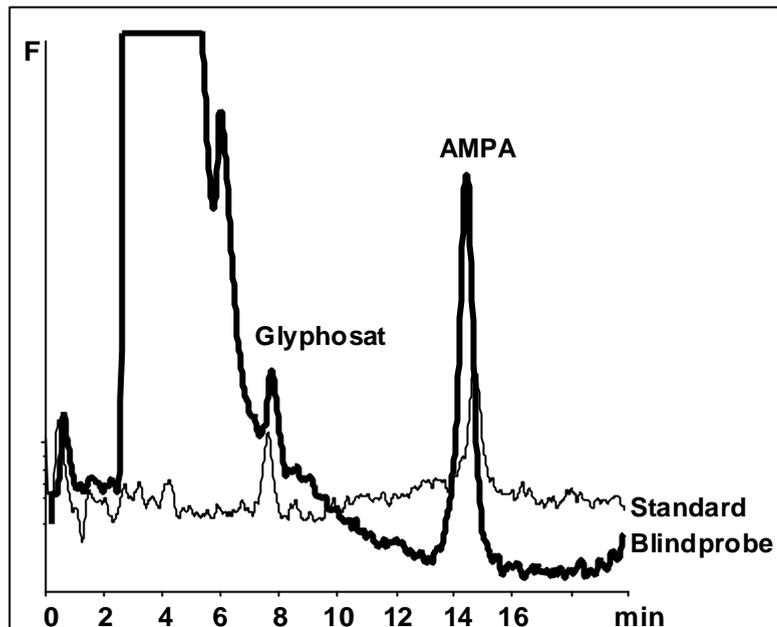


Bild 17: Vergleich der HPLC-Chromatogramme von einer Blindwertprobe (Rheinwasser) mit einer Standardlösung ($r_i = 0,05 \mu\text{g/l}$)

Entsprechend den Ergebnissen der Blindwertuntersuchungen lagen die nachgewiesenen Massenkonzentrationen für Glyphosat und AMPA in den Kontrollproben der Probe 3 über den errechneten Sollwerten und betragen für Glyphosat im Mittel $\bar{x} = 0,1820 \mu\text{g/l}$ ($s = 0,0117 \mu\text{g/l}$) und für AMPA $\bar{x} = 0,3890 \mu\text{g/l}$ ($s = 0,0090 \mu\text{g/l}$).

Bild 18 gibt jeweils die für die Kontrollproben ermittelten Einzelwerte wieder.

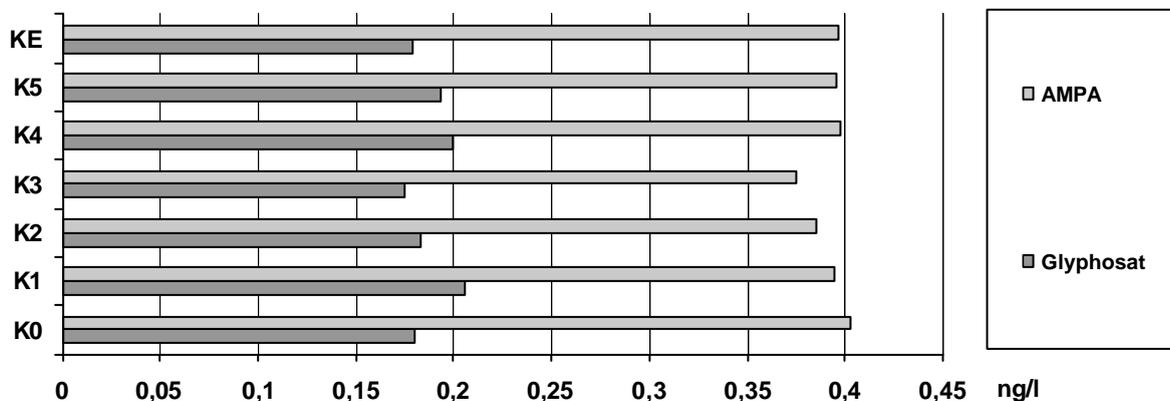


Bild 18: Gemessene Massenkonzentrationen von Glyphosat und AMPA in den Kontrollproben der Probe 3

Zur Berechnung der Wiederfindungsraten für die Kontrollproben sind die mittleren Massenkonzentrationen der Blindwerte den rechnerischen Sollwerten zuzurechnen. Bezogen auf die korrigierten Sollwerte ergibt sich für Glyphosat eine Wiederfindungsrate von 91 % und für AMPA von 101 %.

Sollwerte (blindwertkorrigiert): r (Glyphosat) = 0,1993 µg/l; r (AMPA) = 0,3835 µg/l.

9.2 Ergebnisse des Ringversuches

9.2.1 Allgemeines

Zur Teilnahme am Ringversuch hatten sich 19 Laboratorien angemeldet, wovon 16 Laboratorien Ergebnisse vorgelegt haben. Hierunter befinden sich 3 Laboratorien die außer Konkurrenz nach einem anderen Verfahren (Vorsäulenderivatisierung mit FMOC) gearbeitet haben und deshalb nicht bei der Auswertung des Ringversuches berücksichtigt werden konnten.

9.2.2 Probenvorbereitung

Tabelle 9 zeigt, dass von den meisten Laboratorien das Verfahren A zur Aufarbeitung der Wasserproben angewandt und dabei bis auf eine Ausnahme die gleichen Materialien zur Anreicherung und Reinigung verwendet wurden. Unterschiede bei der Durchführung ergeben sich besonders beim Probenvolumen (200-1000 ml) und der hierfür eingesetzten Volumina an Austauschermaterialien. Betrachtet man die Verhältnisse Probenvolumen/Austauschervolumen im Zusammenhang mit den laborinternen Wiederfindungsraten (Bild 19), sollten für ein Probenvolumen von 200 ml Austauschervolumina von etwa 5 ml ausreichend sein.

Tabelle 9: Probenvorbereitung

| Labor Nr | Verfahren | Datum Aufarb. | V _P ml | Anreicherung | Reinigung | | V _E | V ₀ | V _{inj} | f _A |
|----------|-----------|---------------|-------------------|------------------|--------------|-------|----------------|----------------|------------------|----------------|
| | | | | | | | ml | ml | µl | |
| 1 | A | 19.04 | 1000 | Chelex 100 12 ml | AG 1-X8 | 10 ml | 8 | 5 | 20 | 200 |
| 2 | B | 14.04 | 10 | Einengen | LiChrolut EN | 0,2 g | 10 | 1 | 100 | 10 |
| 3 | A | 27.04 | 200 | Chelex 100 6 ml | AG 1-X8 | 7 ml | 18 | 1 | 100 | 200 |
| 4 | A | 15.04 | 250 | Chelex 100 6 ml | AG 1-X8 | 4 ml | 21 | 1 | 200 | 250 |
| 5 | A | 20.04 | 200 | Chelex 100 16 ml | AG 1-X8 | 13 ml | 28 | 1 | 100 | 200 |
| 6 | A | 15.04 | 1000 | Chelex 100 12 ml | AG 1-X8 | 8 ml | 12 | 1 | 10-50 | 1000 |
| 7 | A | 28.04 | 200 | Chelex 100 5 ml | AG 1-X8, | 7 ml | 14 | 1 | 100 | 200 |
| 8 | A | 26.04 | 200 | Chelex 100 6 ml | Dowex 1-X 8 | 6 ml | 4 | 1 | 100 | 200 |
| 9 | A | 21.04 | 200 | Chelex 100 5 ml | AG 1-X8 | 5 ml | 18 | 1 | 100 | 200 |
| 10 | A | 15.04 | 250 | Chelex 100 6 ml | AG 1-X8 | 4 ml | 7 | 1 | 100 | 250 |
| 11 | B | 19.04 | 20 | Einengen | LiChrolut EN | 0,2 g | 20 | 0,25 | 100 | 80 |
| 12 | A | 19.04 | 300 | Chelex 100 10 ml | AG 1-X8 | 10 ml | 16 | 1 | 60 | 300 |
| 13 | A | 19.04 | 1000 | Chelex 100 16 ml | AG 1-X8 | 10 ml | 40 | 1 | 75 | 1000 |

V_E: Volumen des Eluates; V₀: Volumen der Messlösung; V_{inj}: Injektionsvolumen; f_A: Anreicherungsfaktor

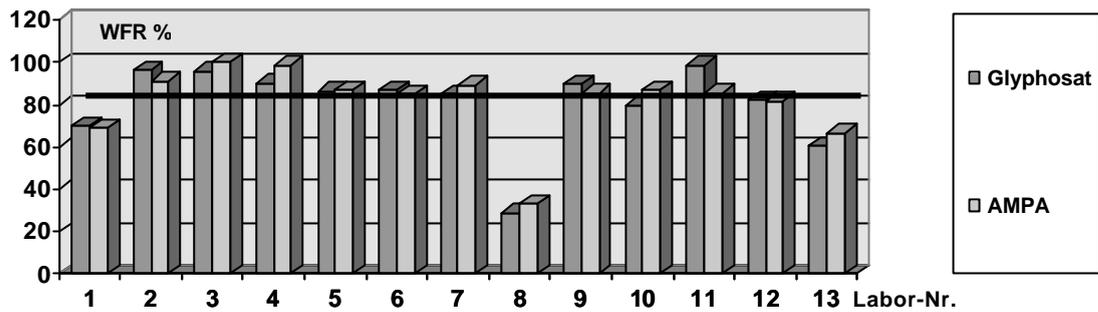


Bild 19: Laborinterne Wiederfindungsraten

Bei nur 2 Laboratorien kam das Verfahren B des DIN-Entwurfes zur Anwendung. Entsprechend den Ausführungen des DIN-Entwurfes ist zur Anwendung des Verfahrens B eine besondere Messempfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors erforderlich, die nach den Angaben zum Verhältnis des Signals zum Rauschen bei nur wenigen Laboratorien gegeben ist (vgl. Tabelle 11).

Die angegebenen Wiederfindungsraten (Bild 19) wurde nur z. T. nach den Vorgaben des DIN-Entwurfes als mittlere Wiederfindungsraten über den kalibrierten Arbeitsbereich ermittelt und erfüllen nicht in jedem Fall die angestrebten Anforderungen (> 80 %). Besonders auffallend sind die geringen Wiederfindungsraten des Labors Nr. 8, die auf Störungen bei der Probenaufarbeitung schließen lassen. Hierauf dürfte zurückgeführt werden, dass das Labor Nr.8 bei der statistischen Auswertung bei den Proben 2 und 3 als Ausreißer erkannt wird (siehe Anlage).

9.2.3 HPLC-Trennung

Zur chromatographischen Trennung von Glyphosat und AMPA wurde bis auf eine Ausnahme die Glyphosat-Säule der Fa. Pickering (Beispiel A des DIN-Entwurfes) verwendet. Das Labor Nr. 8 setzte zur Trennung der Stoffe eine Spezialsäule der Fa. Hamilton ein, bei der sich die Abtrennung der polaren Begleitstoffe aufgrund der relativ geringen Retentionszeiten der Analyten als unzureichend erwies.

Als Eluent wurde bei allen Laboratorien gemäß E-DIN 38407-22 eine 5 mmolare Kaliumdihydrogenphosphat-Pufferlösung (pH 2-2,1) verwendet, bei Labor Nr. 5 mit einem Zusatz von 4 V% Methanol. Die Trennsäule wurde meist bei 55 °C thermostatisiert, die Flüsse betragen in der Regel 0,4 ml/min. Grössere Variationen ergaben sich nur beim Injektionsvolumen (siehe Tabelle 1).

9.2.4 Nachsäulenderivatisierung

Tabelle 10 zeigt, dass bis auf die Laboratorien Nr. 7 und 8, die ein selbst gebautes System verwendet haben, das Nachsäulenderivatisierungssystem der Fa. Pickering eingesetzt wurde. Die Bedingungen für die Nachsäulenderivatisierung richten sich deswegen weit gehend nach der entsprechenden Firmenapplikation, die den optimalen Einstellungen recht nahe kommt.

Tabelle 10: Bedingungen der Nachsäulenderivatisierung

| Lab. Nr | System | O-Puffer | NaOCl | | Fluss ml/min | R ₁ °C | D-Puffer | OPA g/l | Thio g/l | MEt g/l | Fluss ml/min | R2 °C |
|---------|----------|--------------|-------|------|--------------|-------------------|--------------|---------|----------|---------|--------------|-------|
| | | | µl | % | | | | | | | | |
| 1 | PCX | Fertigpuffer | 60 | 13 | 0,3 | 36 | Fertigpuffer | 0,11 | 2,1 | | 0,3 | RT |
| 2 | PCX | Fertigpuffer | 50 | 13 | 0,2 | 40 | Fertigpuffer | 0,21 | 2,1 | | 0,3 | RT |
| 3 | PCX | Fertigpuffer | 100 | 8 | 0,3 | 36 | Fertigpuffer | 0,2 | 2 | | 0,3 | RT |
| 4 | PCX | Fertigpuffer | 35 | 15 | 0,3 | 36 | Fertigpuffer | 0,11 | 2,11 | | 0,3 | RT |
| 5 | PCX | Fertigpuffer | 50 | 12 | 0,5 | 36 | Fertigpuffer | 0,1 | 2,0 | | 0,5 | RT |
| 6 | PCX | Fertigpuffer | 300 | 2 | 0,3 | 35 | Fertigpuffer | 0,1 | 2,0 | | 0,3 | RT |
| 7 | Eigenbau | Fertigpuffer | 50 | 6-14 | 0,3 | 30 | Fertigpuffer | 0,1 | 2 | | 0,3 | 30 |
| 8 | Eigenbau | nach F22 | 50 | 12 | 0,25 | 40 | nach F22 | 0,2 | | 2,0 | 0,25 | RT |
| 9 | PCX | Fertigpuffer | 100 | 13 | 0,3 | 40 | Fertigpuffer | 0,1 | 2,0 | | 0,3 | RT |
| 10 | PCX | Fertigpuffer | 150 | 13 | 0,13 | 40 | Fertigpuffer | 0,2 | | 0,45 | 0,20 | RT |
| 11 | PCX | Fertigpuffer | 125 | 12 | 0,4 | 36 | Fertigpuffer | 0,1 | 1,0 | | 0,4 | RT |
| 12 | PCX | Fertigpuffer | 83 | 12 | 0,3 | 36 | Fertigpuffer | 0,1 | 2,0 | | 0,3 | RT |
| 13 | PCX | Fertigpuffer | 150 | 13 | 0,3 | 36 | Fertigpuffer | 0,1 | 2,0 | | 0,3 | RT |

Bei Labor Nr. 8 war die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in einem Lauf nicht möglich, da AMPA durch das Oxidationsmittel vollständig mineralisiert wurde. Als Ursachen hierfür kommen eine zu lange Verweilzeit des Säuleneluates in dem ersten Reaktor oder die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösung in Frage, die nur bei Labor Nr. 8 selbst hergestellt wurde.

9.2.5 Detektion

Die hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit optimale Wellenlängenkombination 330/450 nm wurde nur von einem Labor eingestellt. Bei den üblichen Bandbreiten dürfte der Gewinn an Empfindlichkeit gegenüber den sonst verwendeten Detektionsbedingungen aber nur gering ausfallen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Detektionsbedingungen

| Labor Nr | FLD-Detektor | l _{EX} nm | l _{EM} nm | S/N | r ₁ ng/ml |
|----------|----------------------|--------------------|--------------------|--------|----------------------|
| 1 | Shimadzu RF-551 | 330:15 | 465:15 | 6 : 1 | 10 |
| 2 | Jasco FP-920 | 340:18 | 440:10 | 4 : 1 | 0,5 |
| 3 | Jasco FP-920 | 330:18 | 450:10 | 42 : 1 | 10 |
| 4 | HP 1046 | 330 | 465 | 7 : 1 | 6,25 |
| 5 | HP 1046A | 330 | 465 | | |
| 6 | Shimadzu | 330 | 465 | 6 : 1 | 15 |
| 7 | Merck-Hitachi F-1050 | 330:15 | 465:15 | 4 : 1 | 5 |
| 8 | Merck-Hitachi F-1050 | 330:15 | 450:15 | 9 : 1 | 10 |
| 9 | Kontron SFM 25 | 330:10 | 465:10 | 2 : 1 | 10 |
| 10 | HP 1100 | 340:20 | 450:20 | 30 : 1 | |
| 11 | Sykam 821 FP | 340 | 440 | 3 : 1 | 4 |
| 12 | Gynkotek | 330:15 | 465:15 | 17 : 1 | 20 |
| 13 | Jasco FP-920 | 330:18 | 465:18 | 87 : 1 | 20 |

9.2.6 Statistische Auswertung

Der Ringversuch wurde nach DIN 38402-42 ausgewertet (Anlage); Tabelle 12 gibt die Verfahrenskennndaten wieder.

Tabelle 12: Verfahrenskenngrößen

| Parameter | L | N | NAP % | X Soll µg/ml | X µg/ml | WFR % | SR µg/l | VR % | SI µg/l | VI % | |
|---|---|----|----------|-----------------|------------|----------|---------------------------------|---------|------------|---------|--|
| Verfahrenskennndaten für den HPLC-Bestimmungsschritt ¹⁾ | | | | | | | | | | | |
| Glyphosat | 13 | 52 | 0 | 0,0310 | 0,0312 | 100,8 | 0,0029 | 9,54 | 0,0013 | 4,3 | |
| AMPA | 13 | 52 | 0 | 0,0475 | 0,0471 | 99,1 | 0,0039 | 8,25 | 0,0019 | 3,9 | |
| Verfahrenskennndaten für die Matrix Trinkwasser ²⁾ | | | | | | | | | | | |
| Glyphosat | 11 | 43 | 8,5 | 0,0931 | 0,0962 | 103,4 | 0,0200 | 20,85 | 0,0076 | 7,9 | |
| AMPA | 12 | 47 | 0 | 0,1188 | 0,0849 | 71,5 | 0,0321 | 37,83 | 0,0089 | 10,5 | |
| Verfahrenskennndaten für die Matrix Oberflächenwasser ^{3), 4)} | | | | | | | | | | | |
| Glyphosat | 12 | 47 | 7,84 | 0,1993 | 0,1590 | 79,8 | 0,0434 | 27,30 | 0,0158 | 9,9 | |
| AMPA | 12 | 47 | 7,84 | 0,3835 | 0,3243 | 84,6 | 0,0994 | 30,65 | 0,0223 | 6,9 | |
| Es bedeuten: | | | | | | | | | | | |
| L | Anzahl der Laboratorien | | | | | WFR | Wiederfindungsrate | | | | |
| N | Anzahl der Messwerte | | | | | SR | Vergleichsstandardabweichung | | | | |
| NAP | Prozentualer Anteil der Ausreißerwerte | | | | | VR | Vergleichsvariationskoeffizient | | | | |
| X Soll | Konventionell richtiger Wert (Sollwert) | | | | | SI | Wiederholstandardabweichung | | | | |
| X | Gesamtmittelwert | | | | | VI | Wiederholvariationskoeffizient | | | | |
| 1) ermittelt an einer Standardlösung; 2) ermittelt an einer dotierten Trinkwasserprobe; 3) ermittelt an einer dotierten Oberflächenwasserprobe (Rhein); 4) zur Berechnung der Wiederfindungsraten wurden die bei den laborinternen Kontrolluntersuchungen ermittelten Sollwerte zu Grunde gelegt. | | | | | | | | | | | |

9.2.7 Zusammenfassung und Bewertung

In Anbetracht der aufwendigen Messtechnik fällt das Ergebnis für die Probe 1 überraschend gut aus und zeigt, dass die HPLC-Messung ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden kann. Für beide Stoffe entsprechen die Gesamtmittelwerte nahezu den Sollwerten, und die Variationskoeffizienten liegen unterhalb von 10 %; Ausreißer treten nicht auf.

Das gute Resultat dürfte in nicht unerheblichem Masse auf die geringen Variationen der Messtechnik bei der Durchführung des Ringversuches zurückgeführt werden (vgl.9.2.3 - 9.2.5).

Die zur Verfügung gestellte Kontrolllösung zur Prüfung der Kalibrierung dürfte ein weiterer Grund für das gute Ergebnis sein.

Das Ergebnis für die Probe 2 ist für Glyphosat mit einer Wiederfindungsrate von 103 % und einem Variationskoeffizient von etwa 20 % noch recht zufriedenstellend, zumal die Prüfung im unteren Konzentrationsbereich durchgeführt wurde. Für AMPA dagegen fällt der

Variationskoeffizient mit 37 % für eine Trinkwasserprobe deutlich zu hoch aus und die Wiederfindungsrate von 71 % ist unbefriedigend. Untersuchungen im Anschluss an den Ringversuch ergaben, dass diese Unterbefunde auf die Gegenwart von freiem Chlor in der dotierten Wasserprobe zurückzuführen sind (siehe Abschnitt 4.1 des Dokumentes).

Das Ergebnis der Probe 3 ist für eine Oberflächenwasserprobe mit Variationskoeffizienten von unter 30 % bzw. für AMPA etwas darüber und Wiederfindungsraten um 80 % in Anbetracht der aufwendigen Probenaufarbeitung noch akzeptabel. Bedingt durch den höheren Einfluss an polaren Begleitstoffen auf die Peakintegration fällt der Wiederholvariationskoeffizient für Glyphosat (VI = 9,9 %) erwartungsgemäss etwas höher aus als bei der dotierten Trinkwasserprobe. Für AMPA werden dagegen geringere Werte für VR und VI als bei der dotierten Trinkwasserprobe erhalten.

Literatur

- [1] Reupert, R. und Schlett, C.: Glyphosat in der Ruhr – Analytik und Ergebnisse. Gwf Wasser – Abwasser 138 (1997) Nr. 11, S. 559-563
- [2] Kombal, R.: Persönliche Mitteilung
- [3] Vorkommen von Glyphosat und AMPA in Gewässern und ihr Verhalten bei der Bodenpassage und in der Wasseraufbereitung. Abschlussbericht zu einem vom DVGW geförderten F&E-Vorhaben (2000).
- [4] Rexilius, L.: Bestimmung von Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in Wasser - Methodik und erste Ergebnisse aus Schleswig-Holstein -; Vom Wasser 92 (1999) 257-274
- [5] Rexilius, L.: Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Wasser; Lebensmittelchemie **52/4** (1998) 107-108
- [6] Lange, F. Th.: Modifizierte Probenaufbereitung zur Anreicherung von Glyphosat und AMPA aus Wasser. Unveröffentlichte Ergebnisse
- [7] Reupert, R. und Fuchs, S.: HPLC-Analytik von Glyphosat und AMPA durch Nachsäulenderivatisierung. GIT-Verlag, 5/97, S. 468-474
- [8] Balsaa, P: Bestimmung von Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in Wasser durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), Vorsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion. Unveröffentlichte Ergebnisse

Anhang

Bestimmung von Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in Wasser durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), Vorsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion [8]

Durchführung der Analyse

Vor Beginn der Analyse alle Glasgeräte mit Dichlormethan/2-Propanol (3+1) spülen.

Derivatisierung und Extraktion

25 ml der Wasserprobe (RT) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 4 ml Boratpuffer (Boratpuffer ist eine 1:1 Mischung der Lösung A und B. Lösung A: 19,108 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ in 1 Liter H_2O lösen. Lösung B: 12,404 g H_3BO_3 + 2,925 g NaCl in 1 Liter H_2O lösen. Die 1:1 Mischung hat einen pH-Wert von 8,5, mit 30 %iger NaOH wird die Mischung auf $\text{pH } 9,0 \pm 0,1$ eingestellt) und 25 ml FMOCL-Reagens (16 mg 9-Fluorenylmethylchloro-formiat in 100 ml Aceton gelöst) mischen und 14 h bei Raumtemperatur umsetzen. Die Reaktionslösung anschließend in einen Scheidetrichter überführen, Erlenmeyerkolben mit wenigen Millilitern Aceton nachspülen, dann die Lösung zweimal mit je 20 ml Dichlormethan/2-Propanol (3+1) ausschütteln, die organische Phase verwerfen. Die wäßrige Phase mit 2 ml 2,5 m Schwefelsäure ansäuern und wiederum zweimal mit je 20 ml Dichlormethan/2-Propanol (3+1) ausschütteln. Nach diesem Schritt befinden sich nun die Derivate von Glyphosat und AMPA im organischen Lösungsmittelgemisch. Dieses im 100 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 1 g Natriumsulfat trocknen und dann in einen zweiten 100 ml Erlenmeyerkolben dekantieren, das Natriumsulfat mit wenigen Millilitern Dichlormethan/2-Propanol nachspülen. Fünf Tropfen 25%igen Ammoniak zusetzen und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen. Den eingedampften Rückstand in 5 ml Methanol lösen, in ein 10 ml Reagensglasröhrchen pipettieren und im Stickstoffstrom erneut bis zur Trockene eindampfen. Den Rückstand in 0,5 ml Methanol-Wasser-Gemisch (1:1) lösen und in ein HPLC-Vial überführen.

Chromatographische Bedingungen:

| | |
|-------------------------------|---|
| Trennsäule: | 100-3 Nucleosil C18 HD, Macherey-Nagel (250 x 3 mm) |
| Elutionsmittel: | A= Acetonitril B= Kaliumdihydrogenphosphat 0,002 molar (250 mg KH_2PO_4 pro 1 Liter), pH 7 |
| Gradientenprogramm: | 0 min: 7 % A, 25 min: 57 % A, 27 min: 95 % A, 35 min: 95 % A, 37 min: 7 % A, 42 min: 7 % A |
| Druck, bei Anfangsbedingungen | 300 bar |
| Säulentemperatur: | 25 °C |
| Volumendurchfluss | 0,5 ml/min |
| Injektionsvolumen: | 20 μl |
| Detektions: | Fluoreszenz λ_{ex} : 258 nm, Bandbreite 12,5 nm λ_{em} : 305 nm, Bandbreite 25 nm |

Verfahrenskennndaten:

| | |
|--|---|
| Retentionszeiten | Glyphosat-FMOC-Derivat: 13,5 min AMPA-FMOC-Derivat: 20,2 min |
| Signal-Rauschverhältnis bei einer Massenkonzentration von 100 ng/l | Glyphosat-FMOC-Derivat: 16:1 AMPA-FMOC-Derivat: 29:1 |
| Kalibrierter Arbeitsbereich: | 50 - 1000 ng/l; 7-Punkt-Kalibrierung: 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ng/l, linear |

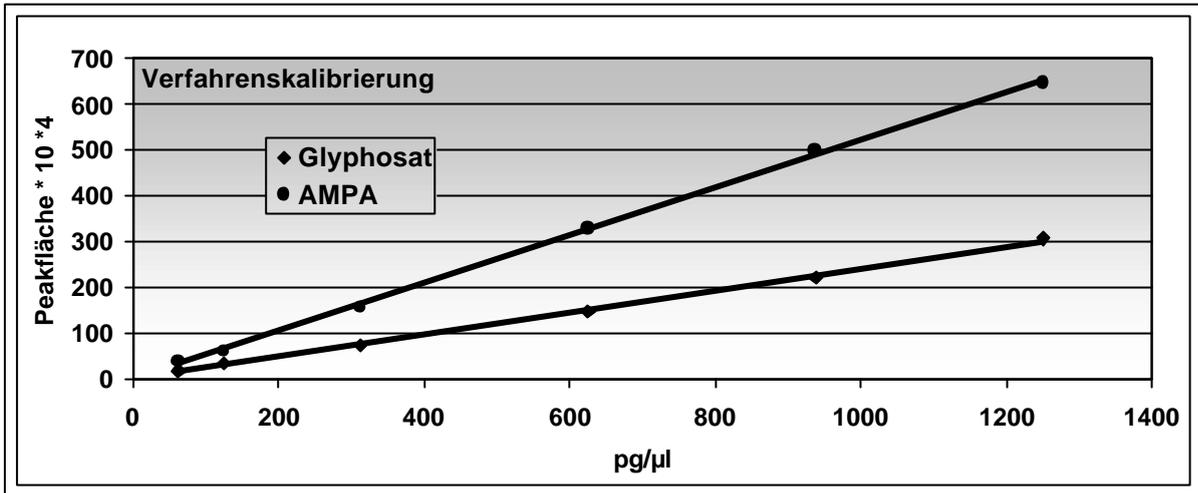


Bild A.1: Bezugsfunktionen von Glyphosat und AMPA

In jeder Meßsequenz werden Wasserproben mit folgenden Glyphosat- und AMPA-Konzentrationen zusätzlich aufgearbeitet: 100, 250 und 500 ng/l.

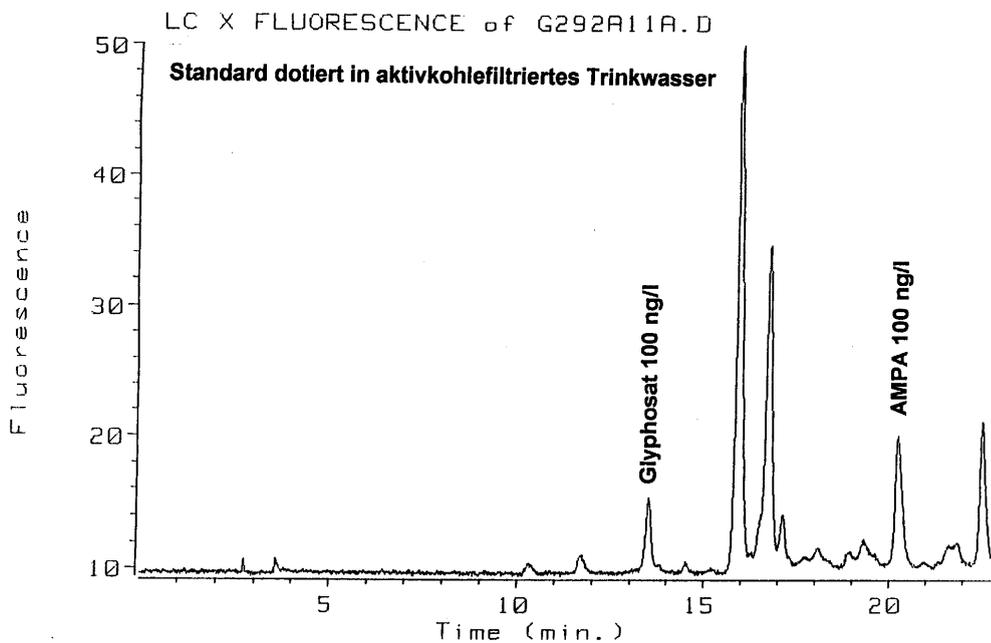


Bild A.2: Chromatogramm einer Standardlösung