

Elektrochemisches Mikrosensorsystem zur Messung von Glyphosat

Besnik Uka^{1,2}, Jochen Kieninger^{1,2}, Stefan J. Rupitsch², Gerald A. Urban¹ und Andreas Weltin^{1,2}

¹Professur für Sensoren, IMTEK – Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland

²Professur für Elektrische Messtechnik und Eingebettete Systeme, IMTEK – Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland
Kontakt: uka@imtek.de

Einleitung

Glyphosat, *N*-(Phosphonomethyl)glycin (GLY), ist ein Breitbandherbizid. Es liegt in verschiedenen ionischen Zuständen vor, die vom pH-Wert abhängen. Seine Wirkungsweise basiert auf der Hemmung eines Enzyms, der 5-Enolpyruvat-Shikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSP-Synthase) im Shikimat-Stoffwechselweg, der für die Entwicklung von Pflanzen von grundlegender Bedeutung ist. Glyphosat-Isopropylaminsalz ist der aktive Bestandteil in üblichen kommerziellen Herbizidformulierungen, die seit 1974 auf dem Markt erhältlich sind [1]. GLY ist das weltweit am häufigsten verwendete Herbizid. Obwohl es überwiegend in der Landwirtschaft eingesetzt wird, findet GLY auch in der Forstwirtschaft, in Städten und in Privathaushalten Verwendung. GLY wurde erstmals von Monsanto im Jahr 1974 unter dem Namen „Roundup“ auf den Markt gebracht. Die Einführung gentechnisch veränderter, herbizidtoleranter „Roundup Ready“ Nutzpflanzen (z.B. Mais, Sojabohnen, Baumwolle) im Jahr 1996 hat die Gesamtverwendung von GLY stark erhöht. Bis Ende 2014 wurden 8,6 Milliarden Kilogramm des Wirkstoffs GLY weltweit ausgebracht [2]. Dieser verstärkte Einsatz hat zu wachsender Besorgnis über den Verbleib von Glyphosat in der Umwelt geführt. In erster Linie wird GLY je nach Bodenbeschaffenheit durch mikrobielle Prozesse abgebaut, wobei Aminomethylphosphonsäure (AMPA) das Hauptabbauprodukt ist [3].

Obwohl die Affinität von GLY zu Böden hoch und die potentielle Löslichkeit gering ist, wurde GLY in Oberflächen- und Grundwasser nachgewiesen [4]. Der EU-Grenzwert für maximale GLY-Rückstände im Wasser liegt bei $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,6 \text{ nM}$) gegenüber $700 \mu\text{g L}^{-1}$ ($4,1 \mu\text{M}$) in den USA. Die aquatische Halbwertszeit von GLY wird auf 7-14 Tage geschätzt [5].

Die breite Verwendung von GLY weltweit hat zu großem Interesse an den ökotoxikologischen Auswirkungen und Risiken für den Menschen geführt [6,7]. Bei all den Ungewissheiten über die Auswirkungen von GLY auf das Ökosystem und den langfristigen Gesundheitsgefahren für den Menschen ist die kontinuierliche Überwachung von GLY im Wasser von äußerster Wichtigkeit.

Derzeit werden in GLY-Studien hauptsächlich chromatographische Analysemethoden verwendet. Trotz der hohen Empfindlichkeit dieser Methoden schränken die aufwändige Vorbehandlung der diskreten Proben, die teure Ausrüstung und die schlechte Kosten- und Zeiteffizienz die Verwendung chromatographischer Techniken ein. Daher ist die Entwicklung von praktischeren und effizienteren Nachweismethoden von großem Interesse.

Die Vorteile elektrochemischer Sensoren liegen in der Möglichkeit der kontinuierlichen Überwachung, der Miniaturisierung, kostengünstiger Instrumentierung und einfacher Anwendung. Seit der Pionierarbeit von Clark und Lyons im Jahr 1962 [8] wurden elektrochemische Sensoren ausgiebig erforscht und sie werden in vielen Bereichen der Medizin, der Natur- und der Ingenieurwissenschaften eingesetzt. Auch Pestizide wurden in Umweltstudien mit elektrochemischer Sensorik direkt im Feld untersucht [9].

In dieser Arbeit kombinieren wir Konzentratoren auf Basis molekular geprägter Polymere (MIP) für GLY mit einer Festphasenextraktion und einem nachgeschalteten direkten elektrochemischen Nachweis von GLY in einem mikrofluidischen Lab-on-Chip. Dieses ist ein attraktiver Ansatz für dezentralisierte GLY-Messungen in Wasser und anderen wässrigen Medien, da kostengünstige Materialien verwendet werden, auf Grund der geringen Größe, der Vermeidung weiterer Probenbehandlung und der kurzen Zeit bis zum Ergebnis. Sowohl die Konzentratorkartusche als auch der Chip sind Einwegprodukte mit geringer Größe im Vergleich zu konventionellen Laborinstrumenten. Die chip-basierte elektrochemische Sensormethode ermöglicht kontinuierliche Messungen. Außerdem können kleinste Probenmengen mit dem mikrofluidischen Aufbau gemessen werden und das Eluat steht für weitere Analysen zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil ist eine mögliche Ko-Integration der elektrochemischen Sensoren mit anderen miniaturisierten Analysemethoden (z.B. optische Analyse und Mikro-NMR) für die Trinkwasseranalyse. Zur Entwicklung der elektrochemischen Sensorprotokolle, haben wir das Verhalten von GLY und seines Metaboliten (AMPA) mittels zyklischer

Voltammetrie und Chronoamperometrie im Detail untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem elektroaktiven Verhalten von GLY an Gold- und Platinelektroden bei verschiedenen pH-Werten. Aus diesen Ergebnissen leiteten wir ein chronoamperometrisches Protokoll zum Nachweis von GLY ab, wobei sich die Messung an Gold in H_2SO_4 als beste Wahl herausgestellt hat. Diese Methode wurde auf eine chipbasierte Mikrosensor-Plattform für die Online- und Echtzeit-Detektion von GLY in einem mikrofluidischen Aufbau übertragen. Schließlich haben wir die erfolgreiche Aufkonzentration von GLY aus Leitungswasser und dessen präzisen Nachweis in geringen Mengen mit unserem System gezeigt.

Methoden und Materialien

Gesamtkonzept

Das übergeordnete Ziel ist die Entwicklung einer Methode, um GLY im Trinkwasser kontinuierlich nachzuweisen. In Zukunft könnte ein solches System zum dezentralen at-line Nachweis von GLY im Trinkwasser, z.B. im Wasserversorgungsnetz, eingesetzt werden. Das Wasser wird dabei handelsüblichen Konzentratoren zugeführt, und der angereicherte Analyt wird anschließend eluiert und in den Detektorchip eingespeist. Die Konzentratoren basieren auf molekular geprägten Polymeren (MIP), mit denen eine Festphasenextraktion Extraktion (SPE) durchgeführt wird. Dieser Ansatz hat zahlreiche Vorteile. Das Wasser kann über einen langen Zeitraum durch den Konzentrator geleitet werden, unabhängig vom Nachweissystem. Sowohl Analytkonzentration als auch die Spezifität werden durch das MIP erhöht. Die Elution erfolgt mit einer Säure, und die On-Chip-Messung unter günstigen Bedingungen, bei niedrigem pH-Wert, direkt im Eluat, ohne weitere Probenbehandlung.

Konzentratoren

MIP-basierte Konzentratoren für GLY (AFFINIMIP SPE Glyphosate 6 mL) wurden von AffiniseP, Frankreich, erworben. Für Adsorption und Festphasenextraktion wurden die Konzentratoren zunächst mit 6 mL Reinstwasser konditioniert, gefolgt von einer Vorwäsche mit 250 mL 0,5 M H_2SO_4 [Tabelle 1]. Ein weiterer Waschschrift mit 20 mL Reinstwasser wurde vor dem Beladen mit 100 mL Leitungswasser, das mit GLY (4,1 bzw. 50 μM) versetzt war, durchgeführt. Danach wurde ein Reinigungsschrift mit 6 mL Reinstwasser durchgeführt. Schließlich wurde der Analyt mit 16 mL 0,5 M H_2SO_4 eluiert. Die vom Hersteller empfohlene Flussrate von 1 Tropfen s^{-1} wurde mit Hilfe von Vakuumdruckreglern kontrolliert.

Elektrochemischer Aufbau

Für die grundlegenden elektrochemischen Untersuchungen wurde eine elektrochemische Standard-Dreielektrodenzelle verwendet, bestehend aus einer Goldscheiben-Arbeits-elektrode (Metrohm, 6.1204.140, 2 mm Durchmesser), einem Platinstab als Gegenelektrode (Metrohm, 6.1248.000, 2 mm Durchmesser) und einer Silber/Silberchlorid-Bezugselektrode (Metrohm, 6.0726.100), mit 3 M KCl als Innenelektrolyt und K_2SO_4 als Brückenelektrolyt. Alle Experimente wurden durchgeführt mit dem CompactStat-Potentiostaten (Ivium Technologies, Niederlande) und der Software IviumSoft 4. Alle Potentiale sind in Bezug auf Ag/AgCl angegeben, sofern nicht anders ausgewiesen. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Chemikalien

Glyphosat (PESTANAL, analytischer Standard), AMPA (PESTANAL, analytischer Standard), wurden von Sigma Aldrich, Deutschland, gekauft und ohne weitere Aufbereitung verwendet. Glyphosat-Isopropylamin, gereinigt und durch NMR-Spektroskopie bestätigt, wurde von der TU Kaiserslautern, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Die Experimente wurden in 0,5 M H_2SO_4 (pH = 0,35), 0,1 M HClO_4 (pH = 1), 0,1 M PBS (pH = 7,4) und 0,1 M NaOH (pH = 13) durchgeführt. Die Zusammensetzung von PBS war 85,2 mM Na_2HPO_4 , 14,8 mM NaH_2PO_4 und 0,1 M NaCl in Wasser. Stammlösungen von GLY in allen Elektrolyten wurden entsprechend hergestellt und bei 4 °C gelagert.

Tab. 1: Protokoll für den Festphasenextraktionsprozess aus den MIP-basierten Konzentratoren.

Schritte	Protokoll
Äquilibration	6 mL deionisiertes Wasser
Vorwaschen	250 mL 0,5 M H_2SO_4
Reinigung	20 mL deionisiertes Wasser
Adsorption	100 mL Trinkwasser + GLY
Reinigung	6 mL deionisiertes Wasser
Elution	16 mL 0,5 M H_2SO_4

Ergebnisse und Diskussion

Voltammetrische Untersuchungen an der Goldelektrode

Zyklische Voltammetrie wurde zur Untersuchung des elektrochemischen Verhaltens von GLY an Goldelektroden in sauren, neutralen und basischen Medien durchgeführt. Im zyklischen Voltammogramm (CV) in 0,5 M H_2SO_4 zeigt sich die Goldoxidbildung (AuOH , AuO) im Vorwärtsscan bei etwa

1,1 V, während der Peak im Rückwärtsscan bei 0,85 V auf die Reduktion des Oberflächenoxids zurückzuführen ist. Wenn der Elektrolyt mit einer bekannten Menge GLY versetzt wird, ist ein Oxidationspeak bei $\sim 1,0$ V zu erkennen und der Oxidationsstrom nimmt proportional mit der Zugabe von GLY zu [Abb. 1]. Eine Oxidation von GLY wurde auch im Bereich der Goldoxidbildung beobachtet, aber sie ist nicht linear von der Konzentration abhängig und hat einen höheren Hintergrundstrom. Es gab keinen nennenswerten Unterschied im elektrochemischen Verhalten von GLY, wenn das Gegenion Isopropylamin, vorhanden war. Außerdem wurden die Experimente in einem mit Stickstoff gespülten Elektrolyten und in Gegenwart von gelöstem O_2 aus der Luft durchgeführt, aber es wurden keine Unterschiede bei den GLY-Peaks festgestellt. Glyphosat wurde auch in PBS und NaOH nachgewiesen, aber die Oxidation ist überlagert mit der Goldoxidbildung, so dass H_2SO_4 als optimaler Elektrolyt für weitere Untersuchungen gewählt wurde.

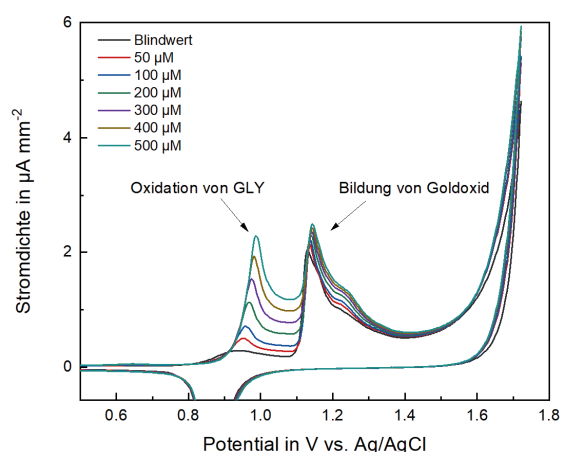


Abb. 1: Zyklische Voltammogramme verschiedener Glyphosatkonzentrationen an einer Goldelektrode in $0,5\text{ M H}_2\text{SO}_4$, wobei die Glyphosat-Oxidationspeaks deutlich zu erkennen sind.

Entwicklung der elektrochemischen Messmethode

Unter Verwendung der gewonnenen Informationen über das Verhalten von GLY mittels CV, wurden Protokolle für chronoamperometrische Messungen abgeleitet. Ein 3-Schritt-Protokoll [Abb. 2] wurde verwendet, wobei jeder Schritt 5 Sekunden dauerte, um genügend Zeit für die Oberflächenprozesse und die GLY-Oxidation bereitzustellen. Der erste Schritt wurde auf 1,5 V eingestellt, um Goldoxid zu bilden. Bei diesem Schritt ist ein hohes Stromsignal sichtbar. Dann wird der zweite Schritt bei 0,5 V festgelegt, um das Oxid aus dem vorherigen Schritt zu reduzieren und so die Elektrodenoberfläche zu erneuern. In diesem Schritt lagen die Ströme nahe bei Null. Der letzte Schritt, das Ar-

beitspotential, wurde auf 1,05 V für die GLY-Oxidation eingestellt. Die Schritte werden wiederholt, um ein stabiles Signal zu erhalten und die Oberfläche zu erneuern. Die Zeitpunkte für die beste Empfindlichkeit der GLY-Oxidation sind zu Beginn des Arbeitspotenzials. Dort ist erwartungsgemäß ein kurzer zeitlicher Abfall zu beobachten, bis sich das Signal sich nach etwa 2,5 s stabilisiert. Daher wurden die Messwerte aus den ersten 300 ms nach dem Wechsel auf das Arbeitspotential abgeleitet (3 Werte bei 10,1-10,3 s) sowie in den nächsten 300 ms (3 Werte bei 10,4-10,6 s), um die maximale Empfindlichkeit zu erreichen, während der Hintergrundstrom niedrig bleibt. Hierbei haben wir demonstriert, wie die Erkenntnisse aus dem CV in ein robustes Sensorprotokoll übertragen werden können. Mit diesem optimierten und einstellbaren chronoamperometrischen Protokoll wurde ein lineares, reversibles, stabiles GLY-Signal für Konzentrationen bis zu 1 mM erreicht [Abb. 3].

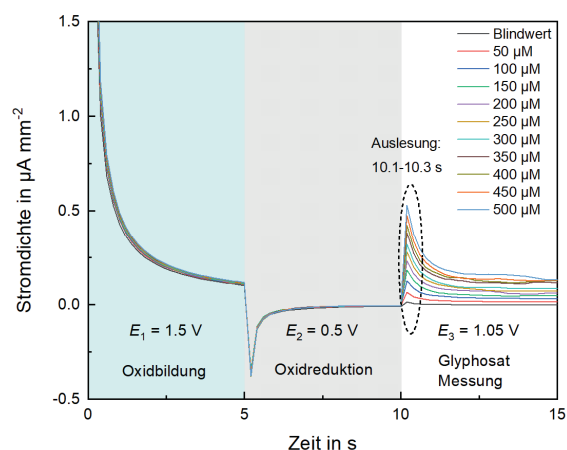


Abb. 2: Chronoamperometrisches 3-Schritt-Protokoll für Glyphosatzmessungen.

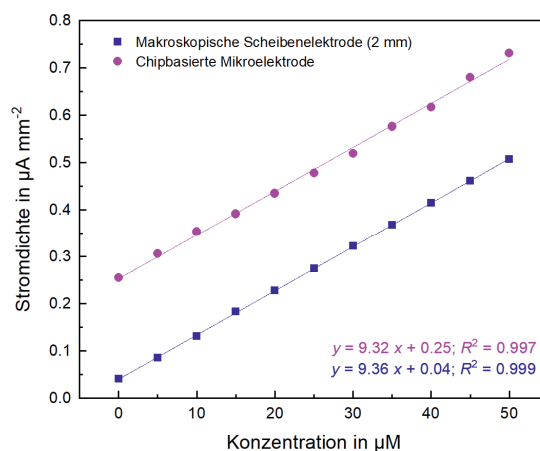


Abb. 3: Kalibrationskurven für Glyphosat an makroskopischer Goldelektrode (blau) und mit dem hergestellten chipbasierten Mikrosensor (lila).

Selektivitätsuntersuchung

Auch AMPA, das wichtigste Abbauprodukt von Glyphosat, wurde untersucht. Aufgrund der Ähnlichkeiten in der Struktur zeigte eine CV-Untersuchung, dass der Oxidationspeak von AMPA bei demselben Potential wie GLY auftritt. Außerdem wurde bei Verwendung des chronoamperometrischen Protokolls ein lineares Verhalten in Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 0,5 mM beobachtet, mit einer etwas höheren Empfindlichkeit unter 0,1 mM. Die Empfindlichkeit zwischen 0,1-0,5 mM betrug $0,15 \mu\text{A mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$. Somit ist der Nachweis von AMPA mit demselben chronoamperometrischen Protokoll möglich, weist aber eine wesentlich geringere Empfindlichkeit auf ($< 2\%$) als für GLY. Um die Selektivität der Sensormethode nachzuweisen, wurde eine chronoamperometrische Analyse durchgeführt. Abb. 4 zeigt ein transientes Signal, wenn GLY und AMPA abwechselnd mit $50 \mu\text{M}$ pro Schritt zugegeben werden. Die Zugabe von AMPA trägt nicht nennenswert zum Signal bei und ist im Vergleich zu dem von GLY vernachlässigbar.

Messung mit MIP-basierten Konzentratoren

Da der direkte Nachweis von GLY in Wasser in relevanten Konzentrationen nicht möglich ist, verwenden wir den Ansatz mit MIP-basierten Konzentratoren. Diese Konzentratoren basieren auf dem Prinzip der Festphasenextraktion (SPE), bei der die molekular geprägten Polymere (MIP) GLY aus dem Wasser eingefangen werden und dann mittels einer starken Säure GLY eluiert werden. In dieser Studie wurden Konzentratoren gemäß dem in Tabelle 1 gezeigten Protokoll verwendet. Die starke Säure $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ eignet sich sowohl sehr gut für die Messung als auch für die Elution.

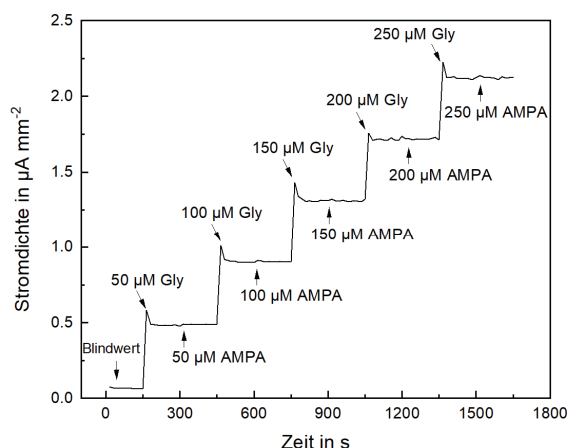


Abb. 4: Abwechselnde Zugabe von GLY und AMPA in $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ohne Querempfindlichkeit für AMPA.

Chronoamperometrische Messungen mit einer makroskopischen Elektrode wurden durchgeführt, um die Wiederfindungsraten der vorgeschlagenen Methode zu testen. Kalibrierungsexperimente wurden durchgeführt, indem bekannte Mengen GLY zum Eluat gegeben und die Stromantwort ausgewertet wurde. Das Hintergrundsignal von H_2SO_4 am Ende der Vorwäsche wurde gemessen und vom endgültigen Eluatsignal subtrahiert. Die Empfindlichkeit, aus unabhängigen Experimenten betrug $11,59 \mu\text{A mm}^{-2} \text{ mM}^{-1} \pm 0,3 \mu\text{A mm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ ($n=8$) mit einer ausgezeichneten Linearität bis zu $50 \mu\text{M}$, so dass die GLY-Detektion in Kombination mit den Konzentratoren möglich ist.

Die verwendete Methode ergibt Wiederfindungsraten von $70,6 \pm 6,7 \%$ ($n=8$), was gut mit den vom Hersteller angegebenen 80% übereinstimmt. Außerdem wurden die Konzentratoren wiederverwendet, ohne dass es zu einem signifikanten Verlust der Rückgewinnungseffizienz kam, obwohl sie als Einwegkonzentratoren gekennzeichnet sind. Die Methode wurde erfolgreich auf den mikrofluidischen Chip angewendet. Auch hier wurden Wiederfindungsraten von etwa 70% bei Verwendung des mikrofluidischen Systems nach den Konzentratoren erzielt, was zeigt, dass die chipbasierte Methode ebenso gut funktioniert. Weitere Vorteile des Systems und der Methode sind die Verwendung kleinster Volumina sowie die kontinuierliche und reversible Möglichkeit der Messung, um so das Hintergrundsignal und die tatsächlichen GLY-Konzentration des Eluats zu bestimmen.

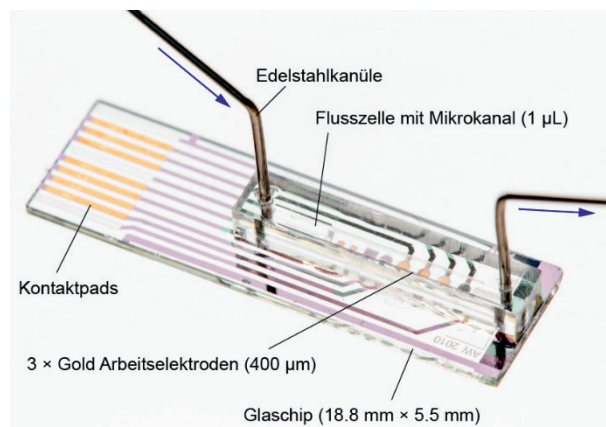


Abb. 5: Foto des hergestellten mikrofluidischen Systems mit auf dem Glaschip integrierten Goldmikroelektroden und einer PMMA-Durchflusszelle mit Mikrokanal und Ein- und Auslassöffnungen.

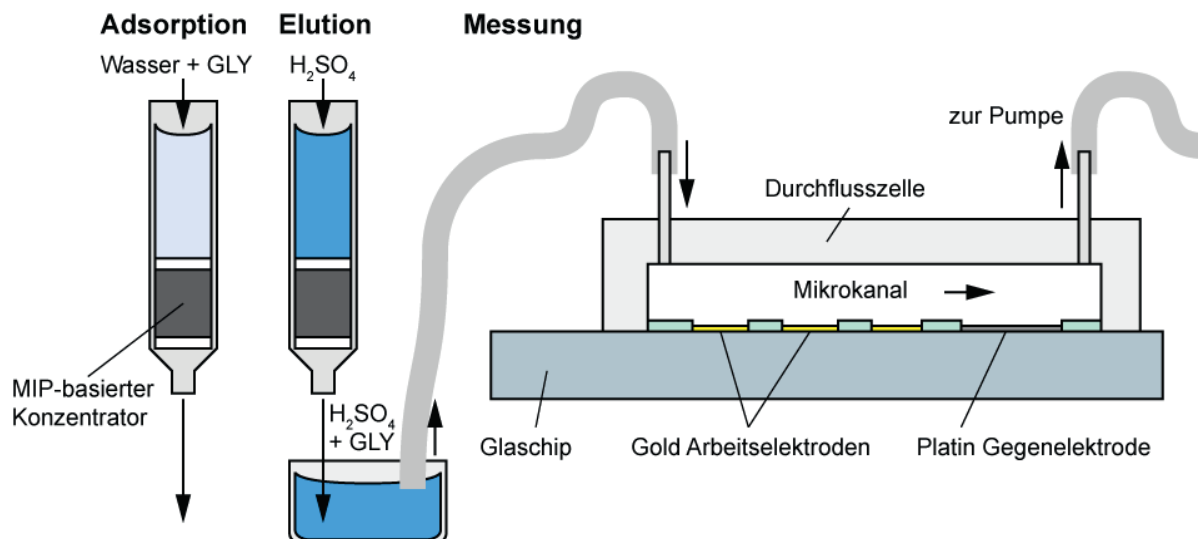


Abb. 6: Prinzip und Aufbau der GLY-Aufkonzentration aus Trinkwasser mittels MIP-basierter Konzentratoren und Festphasenextraktion sowie Querschnitt des mikrofluidischen elektrochemischen Sensorsystems.

Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die grundlegende Elektrochemie von Glyphosat (GLY) mittels zyklischer Voltammetrie eingehend untersucht. Die entwickelte chronoamperometrische Methode liefert eine stabile, lineare Messung von GLY. Außerdem wurde ein chipbasierter Sensor für kontinuierliche, empfindliche und selektive GLY-Messungen erfolgreich hergestellt. Zum ersten Mal wurden MIP-basierte Konzentratoren und Festphasenextraktion mit elektrochemischen in-line Messungen zum GLY-Nachweis kombiniert [10]. Dabei wurde unbehandeltes Leitungswasser mit einer Einwegkartusche aufkonzentriert. Die Messung kann dann in sauren Medien mit idealer Sensorleistung durchgeführt werden. Wir haben das Protokoll für Aufkonzentration und Elution so optimiert, dass GLY direkt im Eluat nachgewiesen werden kann, ohne dass eine zusätzliche Probenbehandlung erforderlich ist. Ein schneller, zuverlässiger, chipbasierter Nachweis der US-Grenzwerte ($700 \mu\text{g L}^{-1}$, $4,1 \mu\text{M}$) von GLY in Trinkwasser wurde mithilfe des Konzentrators erreicht.

Literatur

- [1] DUKE, S. O.; POWELS, S. B.: Glyphosate: A Once-in-a-Century Herbicide. In: *Pest Manage. Sci.* (2008), Nr. 64, S. 319-325.
- [2] BENBROOK, C. M.: Trends in Glyphosate Herbicide Use in the United States and Globally. In: *Environ. Sci. Eur.* (2016), Nr. 28, S. 1-15.
- [3] VERECKEN, H.: Mobility and leaching of Glyphosate: A Review. In: *Pest Manage. Sci.* (2005), Nr. 61, S. 1139-1151.

- [4] COUPE, R. H.; KALKHOFF, S. J.; CAPEL, P. D.; GREGOIRE, C.: Fate and Transport of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Surface Waters of Agricultural Basins. In: *Pest Manage. Sci.* (2012), Nr. 68, S. 16-30.
- [5] GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R.: Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. In: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* (2000) Nr. 167, S. 35-120.
- [6] GAUGLITZ, G.; WIMMER, B.; MELZER, T.; HUHN, C.: Glyphosate Analysis Using Sensors and Electromigration Separation Techniques as Alternatives to Gas or Liquid Chromatography. In: *Anal. Bioanal. Chem.* (2018), Nr. 410, S. 725.
- [7] HUHN, C.: More and Enhanced Glyphosate Analysis is Needed. In: *Anal. Bioanal. Chem.* (2018), Nr. 410, S. 3041-3045.
- [8] CLARK, L. C.; LYONS, C.: Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. In: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1962), Nr. 102, S. 29-45.
- [9] HANRAHAN, G.; PATIL, D. G.; WANG, J.: Electrochemical Sensors for Environmental Monitoring: Design, Development and Applications. In: *J. Environ. Monit.* (2004), Nr. 6, S. 657-664.
- [10] UKA, B.; KIENINGER, J.; URBAN, G. A.; WELTIN, A.: Electrochemical Microsensor for Microfluidic Glyphosate Monitoring in Water using MIP-Based Concentrators. In: *ACS Sens.* (2021), Nr. 6, S. 2738-2746.

Danksagung

Wir danken der Europäischen Union für die Förderung im Programm INTERREG-Oberrhein, Projekt WaterPollutionSensor. Wir danken B. Wyrwol und Prof. S. Kubik, TU Kaiserslautern, für das Aufreinigen von Glyphosat. Wir danken Dr. H. Flamm, für die Abscheidung von Gold.