

# Glifosat - od primjene do životinja i ljudi



Marija Denžić Lugomer\*, Damir Pavliček i Nina Bilandžić

## Sažetak

Glifosat je najprodavaniji herbicid diljem svijeta koji se koristi kao arboricid za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova, višegodišnjih zeljastih te drvenastih korova s dubokim korijenom u vinogradima, voćnjacima, šumskim nasadima, na strništima i nepoljoprivrednim površinama. U konvencionalnih biljaka i genetski modificiranih (GM) usjeva koji sadrže CP4-EPSPS modifikaciju, glavna komponenta ostataka je nepromijenjen glifosat, dok u usjevima koji sadrže glukoza oksidazu (GOX) AMPA je prisutna u jednakim ili većim količinama u usporedbi s glifosatom. Za GM biljke koje sadrže glicin N-fenilacetiltransferazu (GAT) modifikaciju, glavnu komponentu ostataka čine metaboliti N-acetilglifosat i N-acetil-AMPA. Djelovanje glifosata je jedinstveno u tome što je jedina molekula koja je izrazito efektivna u inhibiciji enzima 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfat sintaze (EPSPS)

šikiminskog puta. Kod kontrole ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla prema važećoj Uredbi u obzir se uzima isključivo koncentracija glifosata. Međutim, EFSA u svom najnovijem izvješću prilikom monitoringa preporučuje procjenu na temelju sume glifosata, AMPA i N-acetilglifosata izraženo kao glifosat, a kod procjene rizika zbroj glifosata, AMPA, N-acetilglifosata i N-acetil-AMPA izraženo kao glifosat. Budući da su acetilni spojevi specifični samo za GAT-modificirane kulture koje trenutno nisu prisutne na tržištu Europske unije, potrebno je uključivanje N-acetilglifosata u definiciju ostatka ponovno razmotriti. Zbog velike polarnosti i amfoterne prirode molekule, male molekulske mase, velike topljivosti u vodi i nedostatku kromofora kvantifikacija glifosata predstavlja veliki izazov.

**Ključne riječi:** *glifosat, AMPA, N-acetil-AMPA, N-acetilglifosat*

## Uvod

Potrošnja hrane važan je put izloženosti ljudi kemijskim kontaminantima. Kontaminanti, uključujući i pesticide, mogu ući u opskrbu hranom na različite načine. Većina se poljoprivrednih kultura tijekom uzgoja, po nekoliko puta, tretira različitim vrstama pesticida te je stoga vrlo vjerojatno da će ostatci pesticida

zaostati na tretiranim poljoprivrednim kulturama. Široka uporaba pesticida na poljoprivrednim kulturama prouzroči ostajanje pesticida u hrani čak po nekoliko mjeseci nakon uporabe, kao i kontaminaciju okoliša (zraka, površinskih voda, izvorskih voda i tla) (Knežević i sur., 2010.). Broj pesticida,

Marija DENŽIĆ LUGOMER\*, (dopisni autor, e-mail: denzic.vzk@veinst.hr), dip. ing. kemije, Damir PAVLIČEK, mag. chem., Hrvatski veterinarski institut - Veterinarski zavod Križevci, Križevci, Hrvatska; dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

odnosno aktivnih tvari koje se mogu primjenjivati u proizvodnji hrane, sve je veći te se procjenjuje da je u uporabi više od 1000 vrsta pesticida koji se mogu svrstati u 126 različitih kemijskih skupina. Prema biološkom djelovanju dijele se na: algicide, akaricide, fungicide, herbicide, insekticide, muluskicide, nematocide, regulatore rasta, rodenticide i dr. Najviše upotrebljavan herbicid je glifosat koji se koristi kao arboricid za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova, višegodišnjih zeljastih te drvenastih korova s dubokim korijenom u vinogradima, voćnjacima, šumskim nasadima, na strništima i nepoljoprivrednim površinama. Kemijski spoj prvi je put sintetiziran u maloj švicarskoj farmaceutskoj tvrtki, međutim prvi put je testiran kao herbicid od strane John E. Franza iz Monsanto grupe u 1970.-tina (Duke i Powles, 2008.). Glifosat je djelotvoran kao sol s različitim kationima, najčešće natrijem ili izopropilaminom, a u obliku izopropilaminske soli prvi je put dospio na tržište 1974. g. kao neselektivni herbicid čija je popularnost rasla te trenutno zauzima više od 60% na globalnom tržištu pružajući širok spektar djelovanja (Melo i sur., 2018.). Trenutno se nalazi u preko 750 raznih komercijalnih poljoprivrednih preparata i najprodavaniji je herbicid u SAD-u: 1992. godine utrošeno je 11,000 tona glifosata, 2007. godine utrošeno je između 82,000-84,000 tona glifosata u poljoprivrednom sektoru te 2,300-3,600 tona za ostale potrebe (šumarstvo, parkovi, javne površine, željezničke tračnice i sl.) (Šajina, 2013.). Monsanto je patent istekao 1991. godine izvan SAD-a i 2000. godine u SAD-u te ga trenutno proizvode razne kemijske industrije i nalazi se u prodaji u mnoštvu oblika i pripravaka. U Velikoj Britaniji glifosat je najkorišteniji herbicid u uzgoju žitarica i u proizvodnji voća. U Danskoj 35% svih korištenih herbicida otpada na glifosat. Procjenjuje se da se 39% poljoprivrednih

površina u Njemačkoj tretira glifosatom, a najviše u poljima uljane repice, pšenice i ječma. Francuska, Mađarska i Rumunjska tretiraju 50-60% suncokreta glifosatom prije žetve. Podatci pokazuju da je diljem svijeta u 2011. godini potrošeno preko 650,000 tona glifosata, a potrošnja je u stalnom porastu.

Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA) klasificira glifosat kao "praktički netoksičan i ne nadražujući" što se ponajprije temelji na podacima o toksičnosti i zbog jedinstvenog načina djelovanja putem biokemijskog puta koji postoji samo u malom broju organizama koji koriste put šikimske kiseline za proizvodnju aminokiselina, od kojih su većina zelene biljke (Bai i Ogbourne, 2016.). Ovu klasifikaciju podupire većina znanstvene literature o toksičnim učincima glifosata. Međutim, Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) je 2005. godine izvijestila da su glifosat i njegov glavni metabolit, aminometilfosfonska kiselina (AMPA) potencijalno toksično opasni, uglavnom kao rezultat nakupljanja ostataka u prehrambenom lancu. Istraživanja su pokazala dugu postojanost glifosata i njegovog metabolita AMPA u okolišu, a vrijeme postojanosti najvjerojatnije je rezultat različitih svojstava tla i uvjeta okoliša. Primjerice, glifosat i AMPA pokazali su poluživote do 151, odnosno 98 dana, u studiji baziranoj na glinenom tlu u Švedskoj te 10 dana u drugoj studiji na ilovastom tlu u Kini. Produženi poluživot i spora razgradnja mogu povećati rizik od dugotrajnog onečišćenja okoliša, osobito s učestalim i ponovljenim primjenama koje su tipične za poljoprivredne namjene. Studije o stabilnostima koje je objavila EFSA pokazale su da ostatci glifosata i AMPA su stabilni najmanje 2 godine do više od 3 godine u različitim vrstama uzoraka (EFSA, 2015.). N-acetilglifosat je najmanje godinu dana u jako kiselim uzorcima te uzorcima s visokim udjelom vode, proteina i škroba stabilan,

a N-acetil-AMPA je stabilan najmanje godinu dana u uzorcima s visokim udjelom vode, škroba i proteina i jedan mjesec u uljnim uzorcima. Glifosat i AMPA stabilni su u hrani životinjskog podrijetla između 14 i više od 26 mjeseci.

Budući da su životinje konzumacijom hrane indirektno izložene herbicidima javlja se zabrinutost zbog mogućih ostataka u hrani životinjskog podrijetla i potencijalnoj štetnosti na zdravlje potrošača. Stoga ovaj pregled sažima pregled mehanizma djelovanja glifosata na različite životinjske vrste i moguće rizike po ljudsko zdravlje koje prouzroči kontaminacija hrane glifosatom. Rad obuhvaća i pregled metoda određivanja ostataka glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla.

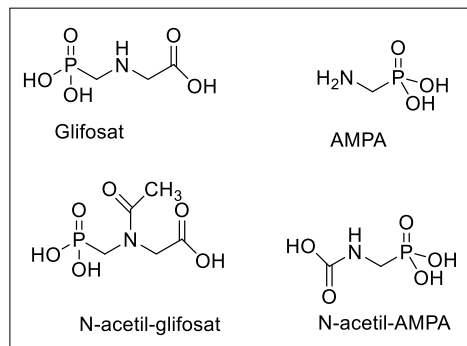
## Kemijska struktura i metabolizam

Glifosat, odnosno N-(fosfonometil)-glicin spada u skupinu amino kiselinских pesticida. Riječ je o molekuli male veličine, vrlo topive u vodi i strukturne sličnosti na mnoge prirodne biljne materijale kao što su aminoskeline i sekundarni biljni spojevi.

U životinja i biljaka, glifosat je vrlo slabo metaboliziran s glavnim metabolitom aminometilfosfonskom kiselinom

(AMPA). Ostali mogući metaboliti su acetamidometilfosfonska kiselina (N-acetil-AMPA) i N-acetil-(fosfonometil) glicin (N-acetil-glifosat). Na Slici 1. prikazane su kemijske strukture glifosata i njegovih metabolita. U konvencionalnih biljaka i genetski modificiranih (GM) usjeva koji sadrže CP4-EPSPS modifikaciju, glavna komponenta ostataka je nepromijenjen glifosat, dok u usjevima koji sadrže glukoza oksidazu (GOX) AMPA je prisutna u jednakim ili većim količinama u usporedbi s glifosatom. Za GM biljke koje sadrže glicin N-fenilacetiltransferazu (GAT) modifikaciju, glavnu komponentu ostataka čini metabolit N-acetil-glifosatom nastao djelovanjem GAT enzima. Osim toga, metabolit N-acetil-AMPA, koji nije uočen u konvencionalnim kulturama, također je identificiran kao važan metabolit. U Europskoj uniji glifosat je odobren za primjenu na širokom rasponu konvencionalnih usjeva, odobreno je svega nekoliko uvezenih GM kultura otpornih na glifosat, dok GAT-modificirane kulture trenutno nisu prisutne na tržištu EU-a (EFSA, 2018.b).

Na popisu Ministarstva poljoprivrede u Republici Hrvatskoj trenutno je registrirano 21 sredstvo za zaštitu bilja s glifosatom kao aktivnom tvari: Oxalis, Glyphogan, Comic, Ouragan system 4, Boom efekt, Cidokor max, Kyleo, Cidokor plus, Roundup rapid, Satelite, Roundup biactive, Chikara duo, Catamaran 360, Total tf, Glifokor 360 TF, Herkules, Karda, Gallup super 480, Barbarian xtra 610, Resolva 24h i Glyfoon 480. Nekim sredstvima kao što su npr. Oxalis, Kyleo ukinuta/istekla je registracija, a dopuštena je primjena zaliha do 16.6.2020.



Slika 1. Kemijske strukture glifosata i njegovih metabolita

## Način djelovanja

Kako bi bio efikasan, glifosat se mora pošpricati na lišće bilja s kojih se apsorbira i tada započinje destruktivno djelovanje unutar biljke. To je sasvim drukčiji mehanizam od insekticida koji

ostaju na površini te se mogu isprati s biljaka ili njihovih plodova. Glifosat satire biljke tako da interferira sa sintezom aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana koji su sastavni blokovi proteina. Bez proteina izgradnja biljne stanice je nemoguća, ona ugiba, listovi se suše i dolazi do propadanja cijele biljke. Zanimljivo, univerzalni prekursor za sintezu ovih triju aminokiselina je šikiminska kiselina koja se u živom svijetu nalazi u bakterijama i gljivicama. Stoga je logično očekivati negativni učinak glifosata na ove mikroorganizme. Djelovanje glifosata je jedinstveno u tome što je jedina molekula koja je izrazito efektivna u inhibiciji enzima 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfat sintaze (EPSPS) šikiminskog puta (Duke i Powles, 2008.).

Glifosat je prijelazno stanje analoga fosfoenilpiruvata, jednog od supstrata za EPSPS. Inhibicija EPSPS-a dovodi do smanjenja povratne inhibicije metaboličkog puta, što rezultira masivnim protokom ugljika u šikimat-3-fosfat, koji se pretvara u visoke razine šikimata. Kako glifosat inducira inhibiciju šikiminskog puta koji zapravo ubija biljke nije posve jasno. Mnogi pretpostavljaju da je njegov primarni učinak nedovoljna proizvodnja aromatske amino kiseline za održavanje potrebne sinteze proteina, a to je u skladu sa sporim razvojem simptoma. Druga istraživanja potvrđuju stajalište da povećanje protoka ugljika šikiminskog puta deregulacijom metaboličkog puta inhibicijom EPSPS-a rezultira nedostatkom ugljika za druge bitne metaboličke putove. Brz prestanak fiksacije ugljika u glifosat-tretiranoj šećernoj repi bolje je objašnjen ovim mehanizmom nego redukcijom aromatskih amino kiselina.

Čini se da je EPSPS svih viših biljaka inhibiran glifosatom, što ga čini neselektivnim herbicidom, aktivnim u vrlo širokom rasponu vrsta biljaka. Ustvrđeno je da je samo glifosat odličan

EPSPS inhibitor, bez komercijalnog analoga ili alternativnog kemijskog spoja koji djeluje na taj enzim. To svojstvo, zajedno s mnogim drugim poželjnim svojstvima, čine glifosat jedinstvenim, idealnim herbicidom (Duke i Powles, 2008.).

## Utjecaj pesticida na ljudsko zdravlje

Zabrinutost u vezi sigurnosti herbicida na bazi glifosata izrazili su i znanstvenici i ekolozi. Novija istraživanja govore, naime, kako ga ima u hrani u našim tanjurima, u kruhu, pivu, zraku, vodi, našoj krvi i urinu, čjepivima. Koliko je sveprisutan, možda najzornije dočarava nedavno istraživanje grupacije Zelenih/ESS-a među zastupnicima u Europskom parlamentu. Testiranjem uzoraka urina na prisutnost glifosata dokazali su njegovu prisutnost u mokraći svih 48 zastupnika iz 13 država članica EU, koji su dobrovoljno sudjelovali u provedenom istraživanju, među kojima je bio i hrvatski zastupnik (Krüger i sur., 2015.). Kao četvrti na toj listi i jedini iz RH koji se testirao, imao je 2,46 µg/L, četiri Talijana najviše - u prosjeku 2,84, dok je najniža razina zabilježena u zastupnika iz Češke Republike, Finske, Irske i Velike Britanije - manje od 1. U prosjeku, svih 48 eurozastupnika u testiranom je urinu imalo 1,7 µg/L što je 17 puta viša razina od europske norme za pitku vodu (0,1 µg/L) što je vjerojatno posljedica nekontrolirane primjene glifosata.

Na temelju nezavisnog istraživanja ostataka glifosata u mlijeku dojlja u SAD-u koje je ukazalo na prisutnost glifosata u koncentracijama od 76 do 166 µg/L u 3 od 10 uzoraka, provedeno je detaljnije istraživanje u Njemačkoj na čak 114 uzoraka mlijeka dojlja, a niti u jednom uzorku nije detektiran glifosat (Honeycutt i Rowlands, 2014., Steinborn i sur., 2016.). U istraživanju Krüger i sur. (2014.) pronađena je srednja koncentracija

glifosata u urinu (oko 1 µg/L) u ljudi koji konzumiraju pretežito organsku hranu koncentracija je bila znatno niža nego u urinu ljudi koji konzumiraju konvencionalnu hranu. Također, glifosat u mokraći općenito zdrave populacije bio je znatno niži nego u urinu kronično oboljele populacije.

Kao što je već rečeno, glifosat djeluje sprječavanjem metaboličkog puta šikiminske kiseline koja je dio procesa važnoga za opstanak biljaka. Smatralo se da ovaj mehanizam ne postoji u ljudi. Međutim, sada je poznato da šikimatski put postoji i u ljudi u regulaciji bakterija u crijevima, a ove crijevne bakterije su od vitalnog značenja za ljudski imunološki sustav. Istraživanja pokazuju povezanost glifosata s velikim brojem ljudioboljelih od raka, uključujući i ne-Hodgkinovog limfom i multipli mijelom (Grisonogo, 2014.). Pokazalo se da utječe i na ljudske receptore estrogena te da prouzroči proliferaciju hormonski ovisnog raka dojke u ljudi. Osim potrošača ili potencijalnih potrošača, postoji posebna zabrinutost za one koji rukuju pesticidima. Pokazalo se da je glifosat endokrini disruptor u stanicama ljudske posteljice. Istraživanje triju generacija vodenih puževa pokazalo je da kod treće generacije glifosat imao štetne učinke na reprodukciju i razvoj, što bi također moglo imati implikacije i za ljude. Istraživanje o ljudskim bukalnim epitelnim stanicama (uzetim iz unutrašnjosti usta) pokazalo je da glifosat i Cidokor imaju citotoksična svojstva te da oštećuju DNK.

## Distribucija glifosata i njegovih metabolita u životinjskim tkivima

U stoke je proučavan metabolizam u koza i kokoši pomoću glifosata i AMPA označenih na fosfometil-skupinama (EFSA, 2018.c). U ovim studijama, glifosat je identificiran kao glavna komponenta

radioaktivnih ostataka, čineći 21-99% TRR (ukupne radioaktivne rezidue) u svim životinjskim matriksima, dok je AMPA nađena u znatnim udjelima u jetri (do 36% TRR), mišićima i masti (do 19% TRR) i žumanjcima (14% TRR). Provedene su dodatne studije koje zbog loše metodologije koja se koristila za identifikaciju radioaktivnih ostataka ne pružaju mnogo informacija. Međutim, potvrđeno je da se glifosat ne metabolizira značajno u preživača i peradi te čini 88-91% TRR. Kako bi se istražio metabolizam u životinja koje se hrane genetski modificiranim usjevom, proučavani su metabolizmi koza i kokoši pomoću <sup>14</sup>C-N-acetil-glifosata. U tim studijama, N-acetil-glifosat je identificiran kao glavni sastojak radioaktivnih ostataka, čineći 17-77% TRR. Razgradnja u N-acetil-AMPA je uočena u mastima (10-15% TRR), u glifosat u jetri (15% TRR), masti peradi (37% TRR) i bjelanjku (11% TRR), a u AMPA u mišića peradi i masti (11-17% TRR).

N-acetil-glifosat je primijenjen oralno dvaput dnevno kao vodena otopina u mliječnim krava tijekom 28 uzastopnih dana (EFSA, 2009.). Doziranje je provedeno na razinama liječenja od 1,25 (dozna skupina 1), 3,75 (dozna skupina 2), 12,5 (dozna skupina 4) i 37,5 mg/kg tjelesne težine (dozna skupina 5). Dodatno su dvije krave dozirane s 37,5 mg/kg tjelesne težine, nakon čega je uslijedilo 7-dnevno razdoblje čišćenja. Uzorci mlijeka prikupljeni su tijekom cijelog razdoblja doziranja. Nakon žrtvovanja, tkiva i mlijeko analizirani su na ostatke N-acetil-glifosata, glifosata, AMPA i N-acetil-AMPA. U mlijeku nisu otkriveni ostatci ni u jednoj doznoj skupini. U jetri su ostatci N-acetil-glifosata otkriveni samo u doznoj skupinama 4 i 5 (srednja koncentracija N-acetil-glifosata bila je 0,07 mg/kg za doznu skupinu 4, odnosno 0,43 mg/kg za skupinu 5). AMPA je detektiran

u niskim koncentracijama (0,028 mg/kg) u skupini s najvećom dozom nakon perioda čišćenja. U bubrezima ostatci N-acetil-glifosata detektirani su u svim skupinama u rasponu od 0,082 mg/kg u skupini s najnižom dozom do 2,8 mg/kg za pokusnoj skupini 5. Kod viših doziranja također su pronađeni ostaci glifosata, AMPA i N-acetil-AMPA u niskim koncentracijama (0,21 mg/kg, 0,063 mg/kg, odnosno 0,077 mg/kg). U masti, koncentracije N-acetil-glifosata iznad LOQ-a od 0,05 mg/kg izmjerene su samo kod veće primijenjene doze (maksimalna vrijednost 0,12 mg/kg u skupini 5). Drugi srodni spojevi (glifosat, AMPA ili N-acetil-AMPA) nisu detektirani iznad LOQ od 0,05 mg/kg. U mišiću N-acetil-glifosat i njegovi srodni spojevi nisu detektirani, uz LOQ od 0,025 mg/kg.

Prijenos N-acetil-glifosata u životinjske proizvode ispitivan je u tri skupine kokoši nesilica koje su dozirane s 1,5; 5,0; 15 i 50 mg po kg tjelesne težine tijekom 35 uzastopnih dana (EFSA, 2009.). Tijekom cijelog vremenskog razdoblja skupljana su jaja. Od skupine s najvećom primjenjenom dozom neke su životinje držane radi čišćenja dodatnih 19 dana tijekom kojih su sakupljana jaja. Kod žrtvovanja analizirana su tkiva i jaja na ostatke N-acetil-glifosata, glifosata, AMPA i N-acetil-AMPA. U jajima su detektirani ostatci N-acetil-glifosata u svim doznim skupinama. Stalna razina postignuta je nakon 14 do 24 dana. Maksimalne koncentracije u različitim doznim skupinama bile su 0,037 mg/kg (nakon doziranja od 1,5 mg/kg tjelesne težine) do 0,66 mg/kg u skupini s najvećom dozom. Tijekom perioda čišćenja, koncentracije ostataka su smanjene i nakon 10 dana nije bilo ostataka iznad LOD. Glifosat je izmjeren samo na jedan dan uzorkovanja pri najvišoj primijenjenoj dozi u koncentraciji od 0,036 mg/kg, dok ostatci AMPA i N-acetil-AMPA nisu detektirani iznad

LOQ u bilo kojem uzorku. U jetri, masti i mišiću N-acetil-glifosat pronađen je u svim doznim skupinama. U skupini s najnižom primijenjenom dozom, srednje koncentracije iznosile su 0,19 mg/kg u jetri, 0,11 mg/kg masti peradi i 0,031 mg/kg za mišiće. Ostali analiti (glifosat, AMPA i N-acetil-AMPA) nisu bili detektirani ni u jednom matriksu.

Studija je provedena na svinjama kojima su davani glifosat i AMPA u omjeru 9:1 u dozi od 400 mg/kg (Eenennaam i Young, 2017.). Maksimalni ostatci od 0,72 mg/kg glifosata pronađeni su u jetri, 9,1 mg/kg u bubregu i 0,06 mg/kg u mišićima. Ostatci u masti tijekom pokusa i u svim tkivima 28 dana nakon zaustavljenog pristupa treniranoj hrani bili su u koncentracijama <0,05 mg/kg. Sličan pokus proveden je na kokošima nesilicama koje su bile izložene glifosatu i AMPA u omjeru 9:1 na ukupnoj dnevnoj prehrambenoj razini od 40, 120 i 400 mg/kg tijekom razdoblja od 28 dana što je rezultiralo s 0,12 mg/kg glifosata u jajima kod primjene najveće doze hranjenja, dok kod primjene manjih doza nisu pronađeni ostatci glifosata.

Znanstvenici su u istraživanju učinka glifosata na pčele koristili iste one doze glifosata koje se koriste u poljoprivrednoj proizvodnji, na zelenim površinama i duž prometnica (Motta i sur., 2018.). Tri dana nakon kontakta pčela s glifosatom primijećeno je da glifosat znatno smanjuje crijevni mikrobiom što potencijalno može voditi uginuću pčela. U 14 uginulih medonosnih pčela određivani su ostatci glifosata i njegovog metabolita AMPA. U svega jednom uzorku koncentracije glifosata bile su oko LOQ vrijednosti, dok je AMPA primijećena u tragovima (Kasiotis i sur., 2018.). Rezultati ukazuju na potrebu razvoja osjetljivije metode što bi moglo rezultirati detektiranjem više pozitivnih uzoraka.

## Kontrola ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla

Glifosat šprican na konvencionalne kulture ostaje kemijski nepromijenjen, a u GM kulturama se metabolizira u razgradne produkte: AMPA i N-acetil-AMPA čija se pojava i koncentracija moraju uzeti u obzir kod toksikoloških ispitivanja i utvrđivanja ostataka. Jednom kada je primijenjen glifosat i njegovi razgradni produkti prenose se cijelom biljkom u listove, zrna (žito) i plodove (voće, povrće); ne mogu se isprati vodom, niti se mogu uništiti kuhanjem. Ostaci glifosata su stabilni u hrani: smrzavanje, sušenje i industrijska prerada neće ih smanjiti. Naprotiv, neki načini obrade kao što su izdvajanje mekinja, još i koncentriraju ostatke. Kada se životinje hrane stočnom hranom u kojima je

glifosat „u granicama“ dopuštenog mlijeko i jaja mogu sadržavati ostatke glifosata. Ostaci su pronađeni u jetri i bubrezima stoke, a kosti također bioakumuliraju glifosat. Karakteristika glifosata je bioakumulacija u sisavcima i sveprisutna infiltracija u okoliš. Smanjuje bioraznolikost u blizini poljoprivrednih površina, smanjuje zalihe hrane za ptice i kukce, otiče u tla i rijeke, zagađuje potoke i podzemne vode. Glifosat u sprezi s neonikotinoidima upleten je u odumiranje tisuća kolonija medonosnih pčela.

S obzirom na kontrolu ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla prema trenutnoj važećoj Uredbi komisije br. 293/2013 o maksimalnim razinama ostataka u hrani životinjskog podrijetla postavljene su najveće dopuštene koncentracije (NDK) koje su prikazane

**Tabela 1.** Najveće dopuštene koncentracije ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla prema važećoj Uredbi 293/2013 i predložene vrijednosti (EFSA, 2018.a)

Vrsta	Životinjska vrsta	Postojeći EU NDK prema Uredbi 293/2013 (mg/kg)	Predloženi NDK prema EFSA (mg/kg)
Mišić	Svinja, govedo, ovca, koza, konj, perad	0,05	0,2
Masno tkivo	Svinja, govedo, konj, perad	0,05	0,2
	Ovca, koza	0,05	0,3
Jetra	Svinja,	0,05	0,4
	govedo	0,2	0,7
	Ovca, koza	0,05	0,9
	konj	0,05	0,7
Bubreg	perad	0,05	0,2
	svinja	0,5	3
	govedo	2	7
	Ovca, koza	0,05	10
Mlijeko	Konj	0,05	7
	Ovca, koza, ovca, konj	0,05	0,1
Jaja	ptice	0,05	0,1
Med		0,05	bez preporuka

u Tabeli 1 (EC, 2013.). Pri tome se uzima u obzir isključivo koncentracija glifosata, dok EFSA u svom najnovijem izvješću preporučuje prilikom monitoringa procjenu na temelju sume glifosata, AMPA i N-acetil-glifosata izraženo kao glifosat, a kod procjene rizika zbroj glifosata, AMPA, N-acetilglifosata i N-acetil-AMPA izraženo kao glifosat (EFSA, 2018.c). Budući da su acetilni spojevi specifični samo za GAT-modificirane kulture koje trenutno nisu prisutne na tržištu EU-a, uključivanje N-acetil-glifosata u definiciju ostatka potrebno je ponovno razmotriti. Preporučene NDK vrijednosti također su prikazane u Tabeli 1.

Zoller i sur. objavili su rad o ostatcima glifosata na švicarskom tržištu hrane (2017.). Pri tome su, među ostalim, obuhvatili uzorke mlijeka (3), meda (16), jaja (1) i mesa i ribe (13). Kod meda je čak 15 uzoraka bilo iznad granice kvantifikacije (LOQ) od 0,001 mg/kg za glifosat, s najvećom izmjerenom koncentracijom od 0,0159 mg/kg, dok su 23% pretražena uzoraka mesa i ribe imala koncentraciju iznad LOQ. U svim navedenim uzorcima izmjerene koncentracije za metabolit AMPA bile su ispod LOQ od 0,0025 mg/kg.

U istraživanju provedenom u među različitim država svijeta koncentracije glifosata iznad LOQ metode (15 ng/g) pronađene su u 59% uzoraka obuhvaćajući koncentracijski raspon od 17 do 63 ng/g (Rubio i sur., 2014.). Koncentracije glifosata u među određivane su u među Havajskog otočja pri čemu je u 27,1% analiziranih uzoraka pronađena koncentracija glifosata iznad LOQ od 15 ng/g, s najvećom izmjerenom koncentracijom od 342 ng/g (Berg i sur., 2018.).

Istraživanja provedena na kravljem mlijeku i hrani za djecu koja uključuje mlijeko nisu pokazala nikakvu prisutnost glifosata i njegovog metabolita AMPA (Ehling i Reddy, 2015., Liao i sur., 2018.). Tijekom 2016. godine 26 država provelo

je monitoring hrane na glifosat što je uključivalo 6761 različitih uzoraka hrane od čega 76 uzoraka je bilo životinjskog podrijetla (EFSA, 2018.c). Među analiziranim uzorcima, u 19 uzoraka ili 0,28% pronađen je glifosat iznad NDK, a među njima 5 uzoraka meda i drugih pčelinjih proizvoda iz Njemačke.

## Metodologija određivanja glifosata

Analizu pesticida u hrani otežava raznolikost i složenost vrste hrane koje je potrebno analizirati kao i niske koncentracije u kojima su pesticidi obično prisutni u hrani. Kontrola ostataka pesticida u hrani postaje sve veći problem kako za institucije koje su zadužene za sigurnost hrane tako i za proizvođače hrane. U zadnjih nekoliko godina analitika pesticida u hrani suočena je s različitim problemima zbog implementacije novih i strožijih zakonskih propisa koji se odnose na pesticide i njihove maksimalno dopuštene količine koje se smiju naći u hrani. U svrhu očuvanja ljudskog zdravlja potrebno je osigurati stalno praćenje njihove koncentracije u hrani životinjskog podrijetla (masno tkivo, mlijeko i mliječni proizvodi, riba i proizvodi od ribe, meso i mesne prerađevine). Veliki broj aktivnih tvari koje se mogu koristiti u proizvodnji hrane te kemijska različitost aktivnih supstanci, različita funkcionalnost i različita fizikalno-kemijska svojstva, s analitičkog gledišta otežavaju ispitivanje zdravstvene ispravnosti hrane s obzirom na prisutnost ostataka pesticida u hrani.

Kvantifikacija glifosata predstavlja veliki izazov zbog velike polarosti i amfoterne prirode molekule, male molekulske mase, velike topljivosti u vodi i nedostatku kromofora. Iz tih razloga, glifosat nije moguće obuhvatiti multimetodama koje se primjenjuju u analizama pesticida. Određivanje glifosata u okolišnim uzorcima, uključujući vodu, je dobro istraženo. Međutim, informacije o



njegovom određivanju u kompleksnim uzorcima, kao što je hrana životinjskog podrijetla, su limitirane. Analize se temelje na direktnim analizama tekućinskom kromatografijom uz detektor s nizom dioda ili tekućinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (LC-MS) ili indirektnom analizom nakon derivatizacije uz primjenu plinske kromatografije s plamenim fotodetektorom, plinskom kromatografijom s masenom spektrofotometrijom (GC-MS). Nekoliko ekstrakcijskih procedura je objavljeno u radovima, a uključuju ekstrakciju s vodom, smjesom vode-metanola ili vode-acetonitrila. Pregled analitičkih metoda za analizu glifosata i AMPA objavljen je u radu Raina-Fulton (2014.). Od strane Europskog referentnog laboratorija razvijena je nova multimetoda za ekstrakciju polarnih analita, tzv. brza metoda za polarne pesticide (engl. *Quick Polar Pesticides Method, QuPPE*) (Anastassiades i sur., 2016.). Metoda se bazira na ekstrakciji kiselim metanolom bez pročišćavanja. Premda je metoda podobna za širi raspon polarnih analita, ekstrakti mogu sadržavati visoke koncentracije matriks koekstraktiva koji mogu kontaminirati instrument. Metode analize glifosata i njegovog metabolita AMPA uključuju derivatizaciju s heptafluorobutanolom i trifluoroacetnim anhidridom, praćeno pročišćavanjem ionskom izmjenom prije GC-MS analize ili korištenje 9-fluoroenilmetil kloroformata prije LC-MS analize. Derivatizacija može biti vremenski dugotrajan proces te nije prikladan za širok raspon različitih uzoraka hrane. Kromatografsko razdvajanje uz MS/MS detekciju u ESI negativnom modu moguće je postići bez korištenja derivatizacije. Polarna priroda glifosata i njegovog metabolita AMPA otežava njihovu ekstrakciju, pogotovo kod niskih koncentracijskih razina. Tipične kolone sa silikatnim C18 obrnutim fazama predstavljaju problem s retencijom takvih polarnih spojeva što rezultira nerazdvojenim, koeluirajućim pikovima s polarnim

analitima koji eluiraju u mrtvom volumenu kolone. Najčešće korištene kolone kod LC-MS/MS analiza za određivanje nederivatiziranih polarnih spojeva u hrani su kolone anionske izmjene, HILIC kolone (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), Hypercarb i kolone mješovitog djelovanja koje kombiniraju svojstva obrnute faze i slabe anionske i/ili kationske izmjene u jednome (Chankasem i sur., 2015., Adams i sur., 2017.). Hypercarb kolona je napravljena od 100% poroznog grafitiziranog ugljika te se koristi kod analitike izrazito polarnih spojeva pri čemu izbor mobilne faze ima znatnu ulogu: 1% mravlja kiselina značajnije poboljšava izgled pika glifosata i osjetljivost u odnosu na 0,1% mravlju kiselinu (Lee i sur., 2017.). Korištenje navedenih kolona često ukazuje na problem nakon nekoliko injektiranja uzoraka, pikovi za glifosat postaju širi sa pretjeranim razvlačenjem što ukazuje na jače zadržavanje analita

Hrana životinjskog podrijetla predstavlja veliki izazov prilikom analize budući se radi o kompleksnoj prirodi uzoraka. U slučaju mlijeka, riječ je o vodenoj otopini smjese ugljikohidrata, proteina i masti što zahtijeva dodatan korak pročišćavanja koji uključuje uklanjanje proteina i masti. Organska otapala i/ili kiseline koriste se za efektivnu precipitaciju proteina primjenom specifičnih interakcija koje djeluju na strukturu proteina. Organsko otapalo smanjuje dielektričnu konstantu otopine proteina plazme i također razmješta molekule vode oko hidrofobnih regija na površini proteina, pri čemu prvo pojačava elektrostatičke atrakcije između nabijenih molekula proteina što minimizirala hidrofobne interakcije između proteina. Kiseli reagensi formiraju netopljive soli s pozitivno nabijenim amino skupinama proteina kod pH vrijednosti ispod njihove izoelektrične točke. U radu Chankasem i sur. (2015.) za pročišćavanje su korišteni acetonitril i metanol, sa i bez 0,1% octene ili mravlje kiseline, međutim iskorištenje

glifosat bilo je manje od 50%. Mogući razlog niskog iskorištenja je ionska interakcija između analita i komponenti mlijeka. Mlijeko sadrži visok udio polivalentnih metalnih kationskih iona kao što su: kalcij, magnezij i željezo. Ovi minerali mogu tvoriti kelate s glifosatom što rezultira gubitkom tijekom procesa taloženja proteina. Dodatkom Na<sub>2</sub>EDTA u ekstrakcijsko otapalo, iskorištenje glifosata znatno je poboljšano. Fosfolipidi su glavna komponenta prisutna u mlijeku i mogu se ekstrahirati zajedno s analitima. Prilikom korištenja izrazito vodenih mobilnih faza taloženjem na analitičkoj koloni mogu prouzročiti degradaciju njenih performansi i zbog toga je potrebno ubaciti korak pročišćavanja uzoraka, npr. korištenjem OASIS HLB kolonice kako bi se uklonili fosfolipidi i drugi nepolarni spojevi.

Prilikom zadnjeg EFSA izvješća razmatrana je HPLC-MS/MS metoda za praćenje glifosata, AMPA i N-acetilglifosata s kombiniranim LOQ od 0,1 mg/kg, odnosno 0,025 mg/kg za svaki pojedini analit u mesu, mlijeku i jajima te 0,2 mg/kg (odnosno 0,05 mg/kg za svaki pojedini analit) u jetri, bubrezima i masti (EFSA, 2018.a). Potvrдна metoda plinske kromatografije sa spektrometrijom mase (GC-MS) prikladna je samo za određivanje glifosata u mlijeku, jajima i mesu. Stoga potvrдна metoda za određivanje glifosata u masti, jetri i bubrezima te potvrдна metoda za određivanje AMPA i N-acetilglifosata u svim matriksima i dalje nedostaju.

## Literatura

- ADAMS, S., J. GUEST, M. DICKINSON, R. J. FUSSEL, J. BECK and F. SCHOUTSEN (2017): Development and validation of ion chromatography tandem spectrometry based method for the multi-residue determination of polar ionic pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7294-7304.
- ANASTASSIADES, M., D. KOLBERG, A. BENKENSTEIN, S. ZECHMANN, D. MACK, A. BARTH, CHR. WILDGRUBE and D. DÖRK (2016): Quick method for the analysis of residue of numerous highly polar pesticides in food commodities involving simultaneous extraction with methanol and determination via LC-MS/MS (QuPPe-AO-Method), II Food of animal origin, version 2 ([http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurISRM/meth\\_QuPPe\\_AO.pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurISRM/meth_QuPPe_AO.pdf), pristupljeno 27.11.2018.)
- BAI, S. H. and S. H. OGBOURNE (2016): Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 18988-9001
- BERG, C. J., H. P. KING, G. DELENSTARR, R. KUMAR, F. RUBIO and T. GLAZE (2018): Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site bees. *PLoS ONE* 13, 1-18.
- CHAMKASEM, N., C. MORRIS and T. HARMON (2015): Direct determination of glyphosate, glufosinate and AMPA in milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *JRS* 02, 20-26.
- DUKE, S. and S. B. POWELS (2008): Mini-review glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest. Manag. Sci.* 64, 319-325.
- EC (2013): Uredba komisije br.293/2013 od 20.ožujka 2013. o izmjeni priloga II. i III. Uredbi (EZ) br. 396/2005 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu maksimalnih razina ostataka za emamektin benzoat, etofenproks, etoksazol, flutriafol, glifosat, fosmet, piraklostrobin, spinosad i spirotetramat u ili na određenim proizvodima. *Sl. L. EU* L96/1, 252-281.
- EENENNAAM, A. L. and A. E. YOUNG (2017): Detection of dietary DNA, protein, and glyphosate in meat, milk, and eggs. *J. Anim. Sci.* 95, 3247-3269.
- EFSA (2009): Modification of the residues definition of glyphosate in genetically modified maize grain and soybeans, and in products of animal origin. *EFSA Journal* 7, 1310.
- EFSA (2015): Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 13, 4302.
- EFSA (2018a): Review of the existing MRLs for glyphosate. *EFSA Journal* 16, 5263.
- EFSA (2018b): Evaluation of the impact of glyphosate and its residues in feed on animal health. *EFSA Journal* 16, 5283.
- EFSA(2018c): The 2016 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 16, 5348.
- EHLING, S. and T. M. REDDY (2015): Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in nutritional ingredients and milk by derivatization with fluorenylmethylxycarbonyl chloride and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10562-10568.
- GRISONOGO, V. (2014): Herbicidi na bazi glifosata. Dostupno na: <http://www.eco-hvar.com/hr/zivotinje/90-herbicidi-na-bazi-glifosata>. Pristupljeno 21.2.2019.
- HONEYCUTT, Z. and H. ROWLANDS (2014): Glyphosate testing report: Findings in American mothers' breast milk, urine and water. Neobjavljen izvještaj, dostupno na: [https://d3n8a8pro7vhmx.cloudfront.net/yesmaam/pages/774/attachments/original/1396803706/Glyphosate\\_Final\\_in\\_the\\_breast\\_milk\\_of\\_American\\_women\\_Draft6\\_.pdf?1396803706](https://d3n8a8pro7vhmx.cloudfront.net/yesmaam/pages/774/attachments/original/1396803706/Glyphosate_Final_in_the_breast_milk_of_American_women_Draft6_.pdf?1396803706). Pristupljeno 23.1.2019.
- KASIOTIS, K. M., Z. D. TZOUGANAKI and K. MACHERA (2018): Direct determination of

- glyphosate and aminomethylphosphonic acid in honeybees. HPPJ 11, 40-46.
18. KNEŽEVIĆ, Z., N. BILANDŽIĆ i M. SEDAK (2010): Sigurnost hrane i pesticidi. Vet. stn. 41, 303-309
  19. KRÜGER, M., P. SCHLEDORN, W. SCHRÖDL, H.-W. HOPPE, W. LUTZ and A. A. SHEHATA (2014): Determination of glyphosate residues in animals and humans. J. Environ. Anal. Toxicol. 4, 1-5.
  20. KRÜGER, M., A. LINDNER and J. HEIMRATH (2015): Members of the EU parliament excrete glyphosate with their urines. Dostupno na [https://www.greens-efa.eu/legacy/fileadmin/dam/Documents/Studies/Environment\\_health/EUMP-results.pdf](https://www.greens-efa.eu/legacy/fileadmin/dam/Documents/Studies/Environment_health/EUMP-results.pdf). Pristupljeno 23.1.2019.
  21. LIAO, Y., J.-M. BERTHION, I. COLET, M. MERLO, A. NOUGADERE and R. HU (2018): Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1549, 31-38.
  22. LEE, H. J., H. N. PARK, H.-J. PARK, S. HEO, S. S. PARK, S.-K. PARK and S. Y. BAEK (2017): Development and validation of LC-MS/MS and LC-Q-Orbitrap/MS methods for determination of glyphosate in vaccines. Chromatographia 80, 1741-1747.
  23. MELO, K. G., G. DE NUCCI, A. Z. TRAPE, S. R. F. JACOBUCCI, C. R. GARLIPP and P. C. P. ROSA (2018): Brief review analytical methods for the determination of glyphosate. MOJ Toxicol. 4, 39-42.
  24. MOTTA, E. V. S., K. RAYMANN and N. A. MORAN (2018): Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey. PNAS 115, 10305-10310.
  25. RAINA-FULTON, R. (2014): A review of methods for the analysis of orphan and difficult pesticides: glyphosate, glufosinate, quaternary ammonium and phenoxy acid herbicides, and dithiocarbamate and phthalimide fungicides. J. AOAC Int. 97, 965-977.
  26. RUBIO, F., E. GUO and L. KAMP (2014): Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. J. Environ. Anal. Toxicol. 5, 1-8.
  27. STEINBORN, A., L. ALDER, B. MICHALSKI, P. ZOMER, P. BENDING, S. ALESON MARTINEZ, H. G. J. MOL, T. CLASS and N. COSTA-PINHEIRO (2016): determination of glyphosate levels in breast milk samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 64, 1414-1421.
  28. ŠAJINA, M. (2013): Glifosat u nama. Dostupno na <https://nutricionizam.com/glifosat-u-nama>. Pristupljeno 17.1.2019.
  29. ZOLLER, O., P. RHYN, H. RUPP, J. A. ZARN and C. GEISER (2017): Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. Food Addit. Contam. part B 11, 83-91.

## Glyphosate - from applications to animals and humans

Marija DENŽIĆ LUGOMER, Grad. Eng. Chem., Damir PAVLIČEK, Mag. Chem., Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Križevci, Križevci, Croatia; Nina BILANDŽIĆ, BSc, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Glyphosate is the world's best-selling herbicide that is used as an arboricide to suppress annual and perennial woody plants and broadleaf weeds, long-haired and hard-weeds with deep roots in vineyards, orchards, forests, farm and non-farm lands. For conventional plants and genetically modified (GM) crops containing the CP4-EPSPS modification, the major component of the residues is unchanged glyphosate, while in crops containing the glucose oxidase (GOX) modification, AMPA is present in equal or greater amounts compared to glyphosate. For GM plants containing the glycine N-phenylacetyltransferase (GAT) modification, the main components of the residues are represented by N-acetyl-glyphosate and N-acetyl-AMPA metabolites. The effect of glyphosate is unique in that it is the only molecule that is highly effective in inhibiting the enzyme 5-enolpyruvyl-chicac-3-phosphate synthetase (EPSPS) of the shikimate pathway. As regards glyphosate

residue control in foods of animal origin, in accordance with the current Regulation, only concentrations of glyphosate are taken into account. However, in its most recent report, the EFSA recommends monitoring the sum of glyphosate, AMPA and N-acetyl-glyphosate expressed as glyphosate, and the sum of glyphosate, AMPA, N-acetyl glyphosate and N-acetyl-AMPA expressed as glyphosate for risk assessment. It is highlighted that, since the acetyl compounds are specific for GAT-modified crops only and GAT-modified crops are currently not present on the European Union market, the inclusion of N-acetyl-glyphosate in the residue definition for enforcement may be reconsidered. Quantification of glyphosate is a major challenge due to the great polarity and amphoteric nature of the molecule, its small molecular mass and high solubility in water, and the lack of chromophores.

**Key words:** *glyphosate; AMPA; N-acetyl-AMPA; N-acetyl-glyphosate*