

УДК 543.062:543.054:632.954:636.085

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИФОСАТА, ЕГО МЕТАБОЛИТА И ГЛЮФОСИНАТА В ПРОДУКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2023 г. А. В. Сорокин\*

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ВГНКИ)

Звенигородское ш., 5, Москва, 123022 Россия

\*e-mail: alex\_sorokin@list.ru

Поступила в редакцию 25.02.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 27.04.2022 г.

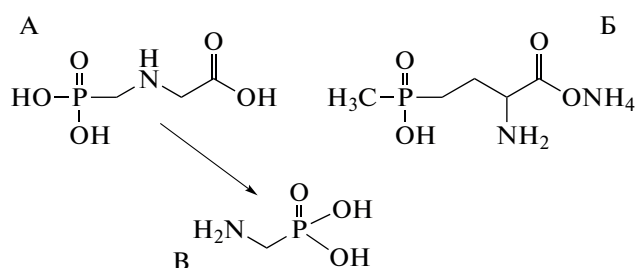
Разработана селективная методика хромато-масс-спектрометрического определения глифосата, аминокетилфосфоновой кислоты и глюфосината в сырье растительного происхождения. Предел количественного определения глифосата составляет 0.1 мг/кг, глюфосината и аминокетилфосфоновой кислоты 0.4 мг/кг. Методика основана на извлечении определяемых соединений из образца деионизованной водой, подкисленной соляной кислотой, твердофазной очистке с последующей дериватизацией 9-флуоренилметоксикарбонил хлоридом и дополнительной очистке дериватов на сорбенте со слабыми катионообменными свойствами. Оптимизированы процедуры экстракции и очистки экстрактов. Изучено влияние компонентов матрицы на хроматографическое разделение и детектирование глифосата на хромато-масс-спектрометрах различных типов. Валидация разработанной методики, показала, что относительная расширенная неопределенность лежит в диапазоне от 15 до 25%.

**Ключевые слова:** глифосат, глюфосинат, хромато-масс-спектрометрия, количественный анализ, экстракция.

**DOI:** 10.31857/S0044450222120167, **EDN:** KLABFO

Глифосат (ГФ) и глюфосинат (ГЛ) являются неселективными гербицидами, применяемыми для борьбы с сорной растительностью при выращивании сельскохозяйственных культур. Данные гербициды способны накапливаться в тканях растений и загрязнять пищевую цепочку, особенно через генетически модифицированные культуры [1, 2]. В 2017 г. Международное Агентство по изучению рака (IARC) отнесло ГФ к группе веществ “потенциально канцерогенных для человека” (группа 2A). Глифосат запрещен к применению в ряде стран из-за его устойчивости в почве и донных отложениях [3]. Сообщалось [4], что препарат Раундап, содержащий ГФ в качестве активного компонента, может вызывать проблемы во время беременности, что подтверждалось обработкой им линии клеток плаценты человека. Цитотоксический эффект, который в перспективе может привести к раку, наблюдался при обработке клеточной линии буккального эпителия [5]. Препараты на основе ГФ вызывают хронические эффекты: гепаторенальные, тератогенные, опухолевые, а также нарушение эндокринной функции [6]. В тканях растений ГФ метаболизи-

руется до аминокетилфосфоновой кислоты (АМФК) (схема 1) [3].



**Схема 1.** Структурные формулы глифосата (А), глюфосината (Б) и аминокетилфосфоновой кислоты (В).

Для контроля безопасности сырья растительного происхождения в Российской Федерации ТР ТС 015/2011 устанавливает максимально допустимые уровни (МДУ) содержания ГФ и ГЛ. МДУ ГФ: 0.3 мг/кг в подсолнечнике и кукурузе; 3.0 мг/кг в зерне хлебных злаков; 0.15 мг/кг в рисе и сое. МДУ ГЛ: 0.4 мг/кг в подсолнечнике, гречихе, просе, рапсе, зерне хлебных злаков и бобовых. Наличие установленных норм и возможная опасность от присутствия ГФ, ГЛ и АМФК в сырье

растительного происхождения предопределяют необходимость создания селективной методики для контроля их остаточного содержания. Определение данных соединений возможно методами иммуноферментного анализа (ИФА), высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ), газовой хроматографии (ГХ) с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). ИФА-методики характеризуются низким пределом обнаружения (ПО) ГФ (0.05–0.12 мкг/л) [7–9], ориентированы на анализ природных, поверхностных, питьевых вод и не позволяют проводить совместное определение ГФ, АМФК и ГЛ. Тем не менее существует способ определения ГФ тест-полосками (Glyphosate Strip Kit, Eurofins Abraxis) в экстрактах кукурузы и сои с ПО 0.04 мг/кг, а так же ИФА-набор (Glyphosate ELISA AOAC Test Kit, Eurofins Abraxis) для определения ГФ в растительном сырье с обязательным подтверждением результатов более селективным методом. В целом, применение ИФА для анализа сырья растительного происхождения затруднительно, так как присутствие микроэлементов, липидов и сахаров может приводить к ложноположительным результатам анализа [10–12].

Применение метода ВЭЖХ-УФ подразумевает обязательную дериватизацию молекул ГФ, АМФК и ГЛ, так как в них отсутствуют хромофорные группы, и они плохо удерживаются на большинстве хроматографических колонок с обращенной фазой. Достигнутые ПО ГФ таким методом могут составлять 0.01–0.3 мг/кг [13–17], а АМФК – 0.05 мг/кг [18]. Описано совместное определение ГФ, АМФК и ГЛ в природных водах [19]. Однако из-за дериватизации первичных аминов, содержащихся в экстрактах совместно с определяемыми соединениями, специфичность метода снижается, а интерпретация результатов анализа усложнена. Определение ГФ и АМФК методами ГХ и ГХ-МС также предполагает проведение дериватизации. Заявляемый предел количественного определения (ПКО) ГФ и АМФК методом ГХ-МС в образцах растительного сырья может достигать 0.05 мг/кг при работе в режиме мониторинга выделенных ионов (SIM) [20]. Описан способ ГХ-определения ГФ на уровне 0.01 мг/кг в образцах почвы с азотно-фосфорным детектором [21], а также в биологических жидкостях человека [22]. Следует отметить, что ГФ и ГЛ относятся к группе В3b [23], поэтому для их количественного определения и подтверждения результатов целесообразно применять селективный метод, обеспечивающий не менее трех точек идентификации [24], например ВЭЖХ-МС/МС.

Некоторые ВЭЖХ-МС/МС-методики позволяют определять ГФ и АМФК с ПКО 0.3–0.4 мг/кг,

что существенно выше установленного в РФ МДУ. При этом определяемые соединения не дериватизируют, а хроматографическое разделение осуществляют на колонках типа Zorbax Eclipse RDB C8 [25] и Sielc Obelisc N [26]. В первом случае время выхода определяемых соединений составляет менее минуты при применении карбоната аммония в подвижных фазах. Во втором случае возможна нестабильность в работе хроматографической колонки, кроме того, ее отличают высокая стоимость и недолговечность. Описан способ определения ГФ на уровне от 0.02 мг/кг при использовании колонки Click TE–Cys с модифицированной цистеином цвиттер-ионной гидрофильной фазой (HILIC) [27]. Такой способ включает длительную стадию пробоподготовки, а хроматографическая колонка имеет высокую стоимость и требует контроля стабильности работы. Возможность определения АМФК и ГЛ авторами не изучена. Описан способ [28] совместного определения ГФ, АМФК и ГЛ в растительном сырье на уровне 0.1 мг/кг. Несмотря на достаточно низкий ПКО, сообщается о значительном подавлении сигнала АМФК компонентами матрицы. Градуировочную зависимость строили на очищенных экстрактах, полученных в ходе пробоподготовки, а не в начале процедуры, не смотря на ее простоту. В РФ разработана методика [29] определения ГФ и АМФК в растительном сырье с заявленным ПКО 0.025 мг/кг. Извлечение ГФ и АМФК из образца осуществляют метанолом, несмотря на низкую растворимость в нем данных соединений (растворимость ГФ в воде при 20°C 10–12 г/л, в метаноле <10 мг/л). Экстракт очищают вымораживанием, а хроматографическое разделение проводят на ионообменной хроматографической колонке (DIONEX IonPac AS-11-HC) с обязательной регенерацией для сохранения свойств и ресурса. Градуировочную зависимость по данной методике получают, анализируя серию чистых растворов стандартов, что может существенно искажать результаты анализа. Не предусмотрено коррекция потерь определяемых соединений в ходе пробоподготовки за счет применения их изотопно-меченного аналога. Следует отметить, что ГФ обладает способностью связываться с активными центрами стекла, что может негативно сказываться на результатах анализа при использовании несилицированных расходных материалов [30].

Цель данной работы – разработка селективной методики совместного определения ГФ, АМФК и ГЛ методом ВЭЖХ-МС/МС в сырье растительного происхождения, лишенной перечисленных выше недостатков, с применением дериватизации определяемых соединений, последующей очистки дериватов методом твердофазной экстракции (ТФЭ) и колонок с обращен-

ной фазой на стадии хроматографического разделения.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы, материалы, оборудование.** Применяли метанол 99% (CAS 67-56-1), ацетонитрил 99% (CAS 75-05-8), муравьиную кислоту 99% (CAS 64-18-6), ацетон 99% (CAS 67-64-1), ацетат аммония 99% (CAS 631-61-8), 9-флуоренилметоксикарбонил хлорид 97% (**ФМОК**) (CAS 28920-43-6), глифосат 95% (CAS 1071-83-6), глюфосинат аммония 95% (CAS 77182-82-2), АМФК 95% (CAS 1066-51-9), Глифосат-2-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N 95% (**ГФ-Ist**) (CAS 285978-24-7), изопропанол 99.5% (CAS 67-63-0) (Merck, Германия); соляную кислоту 37% (CAS 7647-01-0), натрия тетраборат гексагидрат 99.5% (CAS 1303-96-4), натрия гидроксид 97% (CAS 1310-73-2), эфир диэтиловый 99% (CAS 60-29-7), раствор аммиака 25%-ный (CAS 1336-21-6), кислоту уксусную 99% (CAS 64-19-7) (ТД "Химмед", Россия). Использовали картриджи для ТФЭ марок Oasis HLB, WCX и MCX с 60 мг сорбента объемом 3 мл (Waters, США). Для получения деионизованной воды использовали систему очистки воды Millipore (Merck, Германия); для экстракции и перемешивания – шейкеры Reax 2 и Reax Control (Heidolph, Германия); для концентрирования экстрактов и дериватизации – модуль Pierce Reacti-Therm III (Thermo, США). Для количественного определения использовали квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр Maxis (Bruker, Германия) с хроматографом ACQUITY (Waters, США), а также масс-спектрометр QTRAP 6500 (Sciex, США) с хроматографом 1290 Infinity II LC (Agilent, США).

**Экстракция.** Исходные растворы и смеси рабочих растворов вносимых стандартов готовили в деионизованной воде. Концентрация исходных растворов составляла 0.5 мг/мл, рабочих растворов – 0.1 и 0.01 мг/мл, рабочего раствора ГФ-Ist – 0.2 мг/мл. Перед экстракцией проводили гомогенизацию объектов исследования и отбирали по 4 г гомогенатов в полипропиленовые пробирки емк. 50 мл. В образцы вносили аликвоты рабочих растворов определяемых соединений (для построения градуировочной зависимости) и 50 мкл рабочего раствора ГФ-Ist. Экстракцию проводили 25 мл деионизованной воды в течение 30 мин на переворачивающемся встряхивателе. После этого к содержимому пробирки приливали 0.16 мл 12 М HCl и продолжали экстракцию еще в течение 30 мин. Пробирку с содержимым центрифугировали при 4750 об/мин и 20°C в течение 30 мин.

**Очистка экстрактов и дериватизация.** Сорбент картриджа для ТФЭ Oasis HLB активировали и уравнивали последовательным пропусканием 2 мл метанола и деионизованной воды. На сорбент наносили 0.8 мл полученного экстракта и позволяли стечь в слив. Помещали под картридж

приемную пробирку емк. 15 мл и вносили на слой сорбента еще 1 мл экстракта. К 1 мл очищенного экстракта добавляли 1 мл боратного буферного раствора (pH 10.5–11), перемешивали, вносили 1 мл раствора ФМОК с концентрацией 3 мг/мл в ацетоне. Пробирку закрывали крышкой, содержимое перемешивали и выдерживали при 40–50°C в течение 30 мин. После дериватизации к охлажденному до комнатной температуры раствору приливали 2 мл диэтилового эфира, встряхивали, и отбрасывали верхний органический слой после разделения фаз центрифугированием.

**Концентрирование и финальная очистка методом твердофазной экстракции.** Экстракт концентрировали до 1–1.2 мл при 45–50°C в токе воздуха. Остаток разбавляли в три раза деионизованной водой и подкисляли 10 мкл 12 М HCl. Полученный раствор перемешивали и центрифугировали при 4750 об/мин и 10°C в течение 15 мин. Сорбент картриджа для ТФЭ Oasis WCX активировали и уравнивали последовательным пропусканием 2 мл метанола и 2 мл раствора 5%-ной муравьиной кислоты в деионизованной воде. На сорбент наносили полученный экстракт и позволяли стечь в слив. После этого сорбент последовательно промывали 2 мл 5%-ной муравьиной кислоты в деионизованной воде, 1.5 мл 30%-ного метанола с 5%-ной муравьиной кислотой. Под картридж помещали приемную пробирку емк. 15 мл и вносили на слой сорбента 3 мл 9%-ной деионизованной воды с 1%-ным раствором аммиака в метаноле. Полученный элюат концентрировали при 45–50°C до 0.3 мл, разбавляли до 1 мл раствором, содержащим 20% метанола и 1% уксусной кислоты в деионизованной воде, центрифугировали при 4750 об/мин и 5–10°C в течение 10–15 мин и использовали для анализа.

**Условия хроматографического разделения и детектирования.** Использовали режим отрицательной ионизации. Подвижными фазами являлись: 20 мМ раствор ацетата аммония в деионизованной воде (А) и 20 мМ раствор ацетата аммония в метаноле (Б).

При работе на хромато-масс-спектрометре Maxis/ACQUITY хроматографическое разделение осуществляли на колонке ВЕН C<sub>18</sub> (100 мм × 1.0 мм, размер зерна сорбента 1.7 мкм) (Waters, США) в режиме градиентного элюирования: 0 мин – 10% Б, 0 – 1 мин до 20% Б, 1 – 6 мин до 95% Б, 6 – 8 мин 95% Б, в 8.1 мин переключение на 10% Б, уравнивание до 14 мин. Скорость потока элюента 0.1 мл/мин, температура 30°C. Общие параметры масс-спектрометра Maxis: температура испарителя источника 350°C, напряжение на капилляре 1.0 кВ, напряжение в источнике 400 В, напряжение заряда 300 В, давление газораспыления 400 кПа, расход газа осушения 8 л/мин, температура газа осушения 200°C, на-

**Таблица 1.** Параметры работы масс-спектрометров и время выхода определяемых соединений

Регистрируемое соединение	Исходный ион, $m/z$	Ионы-продукты/фрагменты, $m/z$	Время выхода, мин	Энергия соударений, эВ
Maxis/ACQUITY (VEN C <sub>18</sub> )				
ГФ–ФМОК	390.08	168.009/149.997/124.02	4.8	22
АМФК–ФМОК	332.08	110.001/135.981	5.6	
ГЛ–ФМОК	402.12	180.044/206.024	5.2	
ГФ-IST–ФМОК	392.08	170.0104	4.8	
QTRAP 6500/1290 Infinity (Eclipse Plus C <sub>18</sub> RRHD)				
ГФ–ФМОК	390.1	150.2/124.2	4.7	–30/–32
АМФК–ФМОК	332.1	136.2/110.2	6.3	–17/–12
ГЛ–ФМОК	402.1	180.2/206.2	5.5	–15/–4
ГФ-IST–ФМОК	392.1	152.2/126.2	4.7	–10/–12

пряжение в отсеке торможения ионов 40 В, время транспортировки ионов 30 мкс, время накопления ионов 10 мкс, скорость сканирования 2 Гц. Измерения проводили в режиме тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS/MS).

При работе на хромато-масс-спектрометре QTRAP 6500/1290 Infinity хроматографическое разделение осуществляли на колонке Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD (50 × 2.1 мм, размер зерна сорбента 1.8 мкм) (Agilent, США). Условия градиентного элюирования: 0–3 мин 30% Б, к 8.5 мин до 5% А, 8.5–9.5 мин 5% А, к 10 мин градиент к 30% Б, до 14 мин уравнивание колонки. Скорость потока элюента 0.3 мл/мин, температура 30°C. Общие параметры масс-спектрометра QTRAP 6500: скорость сканирования 80 мкс, температура источника 500°C, напряжение в источнике 4500 В, входной потенциал 10 В. Режим сканирования – мониторинг заданных реакций (MRM). Остальные параметры работы масс-спектрометров указаны в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Детектирование и хроматографическое разделение.** Одно из преимуществ гибридного анализатора перед системой тройного квадруполя – возможность работы в режиме высокого разрешения, позволяющая корректно интерпретировать полученный результат. Недостаток таких масс-спектрометров – сравнительно низкая чувствительность. При определении ГФ с помощью хромато-масс-спектрометра Maxis/ACQUITY за основной ион-фрагмент принимали депротонированную молекулу ГФ (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>5</sub>P с  $m/z$  168.009 ± 0.005), которая образовывалась при разрушении деривата ГФ–ФМОК (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>7</sub>P – 391.082 г/моль). Ионы-фрагменты с  $m/z$  149.99 и 124.02, интенсив-

ность которых была значительно ниже, использовали для подтверждения (рис. 1).

При определении ГФ наблюдался матричный эффект в виде иона, мешавшего количественному определению. Данный эффект устраняли с помощью применения фильтров для обработки масс-хроматограмм: не грубее ± 0.005  $m/z$ . Для поддержания точности определения значений  $m/z$  проводили периодическую калибровку масс-спектрометра смесью гидроксида натрия с муравьиной кислотой в изопропанол. Пример влияния матрицы на сигнал ГФ показан на рис. 2, а результат применения фильтра на рис. 3. Подобный матричный эффект отсутствовал для ионов-фрагментов с  $m/z$  149.99, 124.02 и при определении АМФК с ГЛ.

Чувствительность масс-спектрометра QTRAP 6500 позволяет использовать в качестве основного иона-продукта для ГФ ион с  $m/z$  150.2. Такой подход позволяет преодолеть описанную выше проблему, неразрешимую на данном типе масс-спектрометра. При этом подтверждающим ионом-продуктом является ион с  $m/z$  124.02. Несмотря на это при работе на QTRAP 6500 также наблюдали значительное влияние компонентов матрицы на сигнал ГФ, однако его удалось устранить с помощью хроматографической колонки Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD, откорректировав метод разделения введением изократического участка (30% подвижной фазы Б) в течение 3 мин с момента ввода образца в инжектор. Пример масс-хроматограмм, полученных при начальном способе разделения и после его изменения, приведен на рис. 4. Дальнейшее увеличение времени изократического участка программы разделения приводило к уширению хроматографических пиков АМФК и ГЛ с потерей их высоты.

Рутинное определение ГФ, ГЛ и АМФК целесообразно осуществлять на масс-спектрометрах с

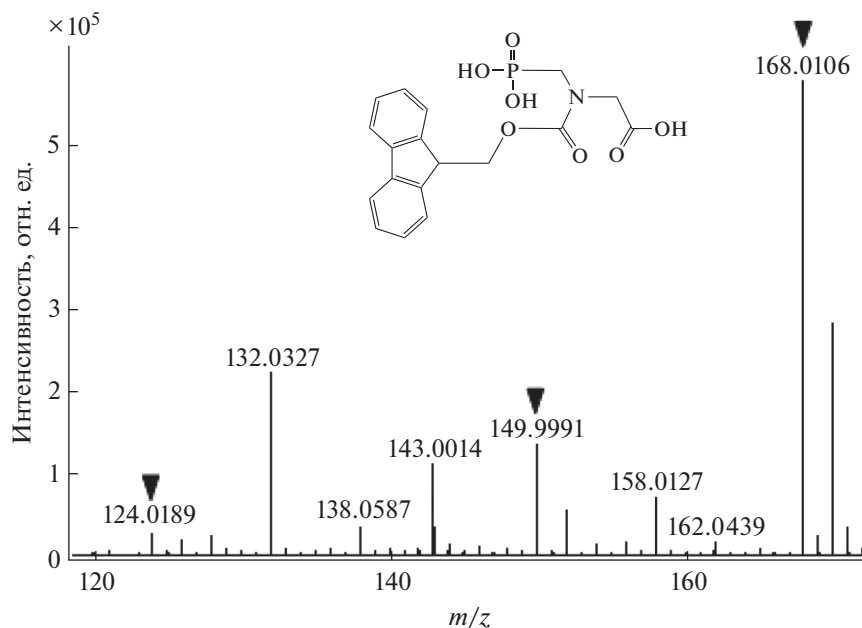


Рис. 1. Масс-спектр ионов-фрагментов глифосата.

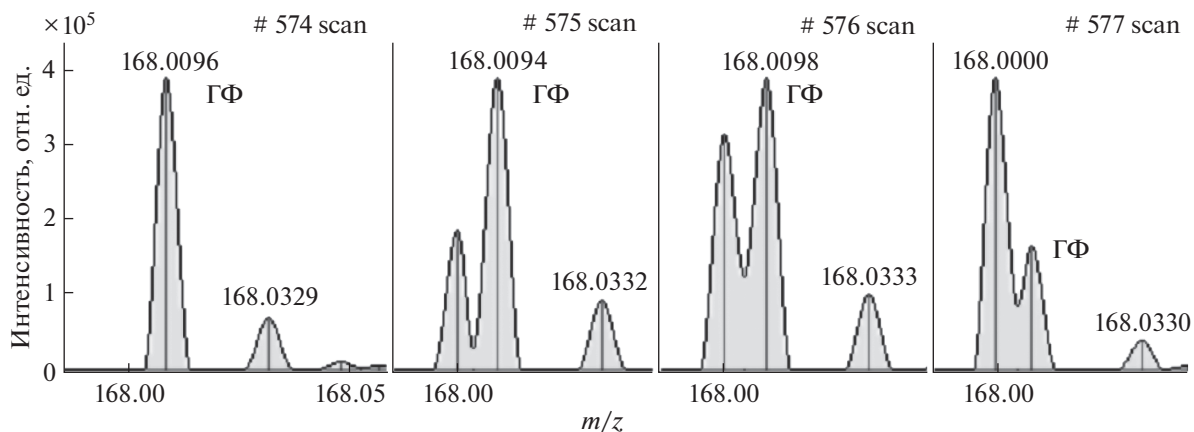


Рис. 2. Масс-спектр глифосата в присутствии компонента матрицы.

тройным квадруполом благодаря их распространенности, доступности, широкому линейному динамическому диапазону и достаточной чувствительности.

**Экстракция.** В качестве экстрагентов образцов сырья растительного происхождения опробовали деионизованную воду, подкисленную соляной кислотой (А) и смесь метанол–вода (1 : 1), подкисленную муравьиной кислотой до содержания 1%. К навескам гомогенатов с внесенными в них аликвотами рабочих растворов и раствора ГФ-Ist добавляли по 25 мл растворов А и Б и проводили экстракцию как указано выше. После процедуры экстракции образцы очищали на картриджах Oasis HLB, дериватизировали, концен-

трировали и очищали на картриджах Oasis WCX в соответствии с описанной процедурой. По результатам данного эксперимента в качестве экстрагента выбрали деионизованную воду, подкисленную в процессе экстракции соляной кислотой, так как разница в относительной интенсивности сигналов составляла более 150 раз. Масс-хроматограммы ГФ, извлеченные деионизованной водой с соляной кислотой и подкисленной смесью метанола с водой, представлены на рис. 5. Объем 12 М HCl для подкисления экстракта подбирали экспериментально. Рассматривали следующие объемы (в скобках приведена конечная концентрация соляной кислоты в экстракте): 0.1 мл (0.05 М), 0.13 мл (0.06 М), 0.16 мл (0.076 М),

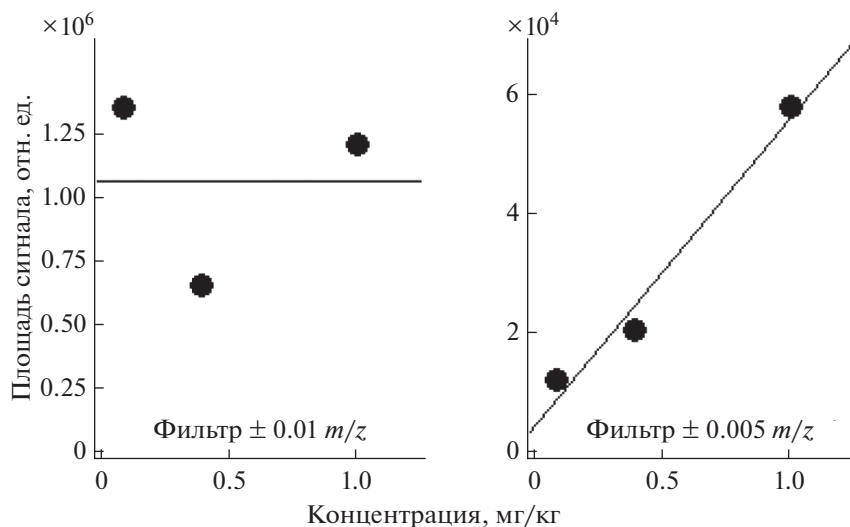


Рис. 3. Градуировочные зависимости с добавками 0.1, 0.4, 1.0 мг/кг глифосата.

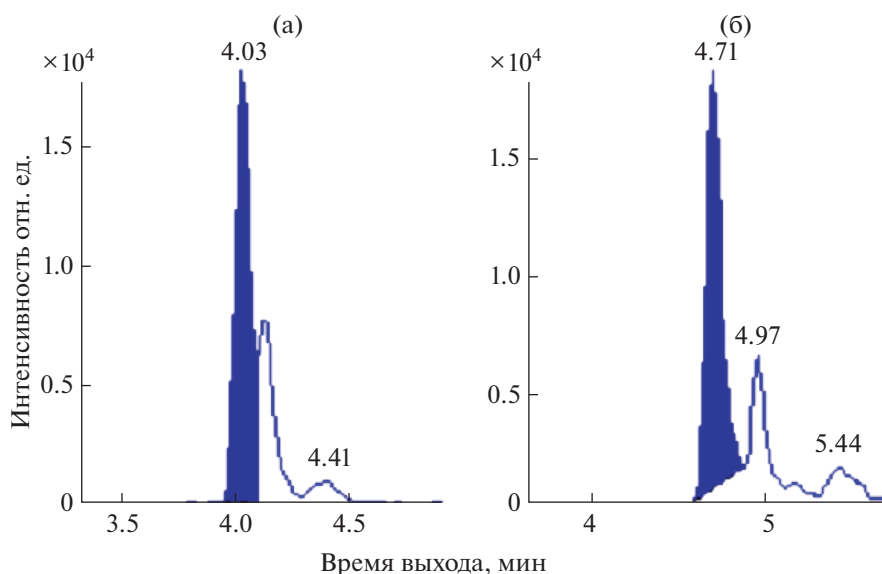


Рис. 4. Масс-хроматограммы разделения глифосата и компонента матрицы, при первоначальном способе хроматографирования (а), после его оптимизации (б).

0.18 мл (0.086 М), 0.2 мл (0.096 М) и 0.3 мл (0.14 М). Наибольшая полнота извлечения достигалась при добавлении 0.13–0.18 мл 12 М HCl с максимумом при 0.16 мл. Увеличение объема соляной кислоты приводило к образованию мелкодисперсной фракции образца, мешающей дальнейшему анализу и неотделяемой центрифугированием или фильтрацией в имеющихся условиях.

**Очистка экстрактов.** При выборе способа очистки экстракта перед дериватизацией сравнивали осаждение компонентов матрицы ацетонитрилом и пропускание экстракта через картридж Oasis HLB. Для этого в подкисленные экстракты

вводили аликвоты растворов стандартов и ГФ-Ist и перемешивали. В первом случае к 1 мл экстракта приливали 1 мл ацетонитрила и перемешивали, центрифугировали при 4750 об/мин и 10°C в течение 15 мин; 1 мл очищенного экстракта использовали для дериватизации. Во втором случае активировали и уравнивали сорбент картриджа, наносили 1 мл экстракта и позволяли ему протечь в приемную пробирку для дериватизации. Дериватизацию проводили по описанной выше схеме. Применение ацетонитрила положительно сказалось на чистоте образцов, однако относительная интенсивность сигнала была в четы-

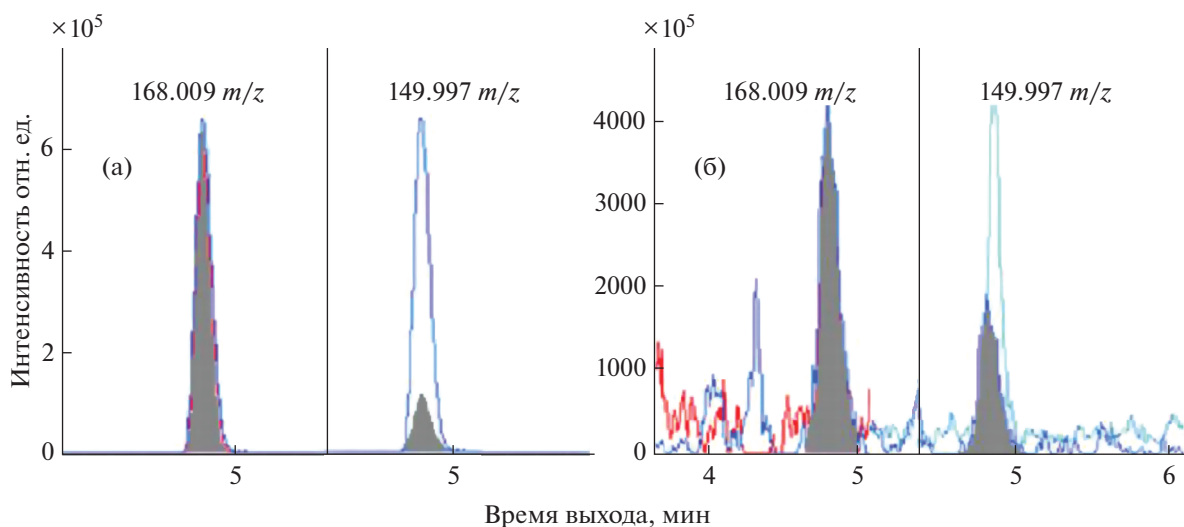


Рис. 5. Масс-хроматограммы глифосата, извлеченного деионизованной водой с соляной кислотой (а) и смесью метанола, воды и муравьиной кислоты (б).

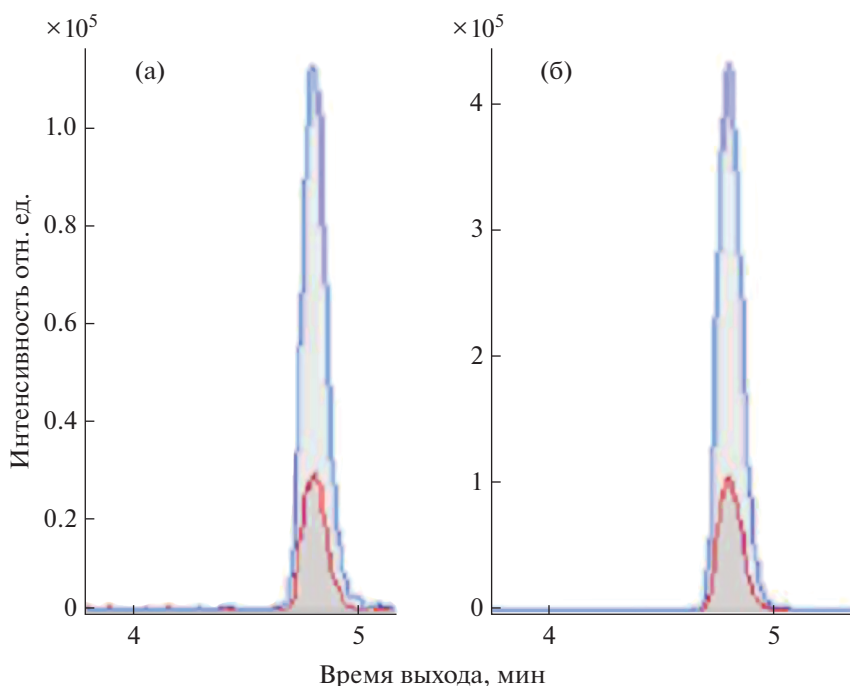


Рис. 6. Масс-хроматограммы глифосата, прошедшего очистку ацетонитрилом (а); с помощью картриджа Oasis HLB (б).

ре раза ниже, чем при использовании Oasis HLB (рис. 6). Дериватизация определяемых соединений без очистки приводила к снижению относительной интенсивности сигнала в среднем на 40–50%.

После стадии дериватизации, путем жидкость-жидкостной экстракции диэтиловым эфиром и последующего концентрирования, удается уда-

лить из раствора дериватов остатки ацетона. За счет этого определяемые соединения лучше удерживаются на сорбенте на второй стадии ТФЭ, кроме того, повышается относительная интенсивность сигнала в среднем на 5–10%. В случае отказа от этапа концентрирования, после жидкость-жидкостной экстракции следует доводить экстракт до 4 мл деионизованной водой, подкислять 10 мкл раствора

12 М НСl, перемешивать и центрифугировать при 4750 об/мин и 5–10°C в течение 15–20 мин. После этого полученный раствор можно наносить на активированный и уравновешенный сорбент картриджа ТФЭ для продолжения процедуры пробоподготовки.

При выборе способа очистки экстракта после дериватизации сравнивали сорбенты картриджей Oasis WCX, Oasis MCX и Oasis HLB (вторичное применение). Протокол очистки состоял из активации сорбента метанолом и уравнивания водой с 5% муравьиной кислоты, нанесения экстракта, промывки 5%-ной муравьиной кислотой, элюирования смесью 9%-ной деионизованной воды с 1%-ным аммиаком в метаноле. Относительная интенсивность сигналов, полученных при очистке на Oasis WCX, выше, чем на MCX в 2.1 раза для АМФК, в 1.25 раза для ГЛ и в 2.5 раза для ГФ. Вторичное применение Oasis HLB позволяет количественно определять ГФ, АМФК и ГЛ, однако значение коэффициента вариации, рассчитанное для площади пика внутреннего стандарта серии образцов, достигает 30–40%.

Изучали возможность дополнительной промывки картриджей с нанесенными на сорбент определяемыми соединениями раствором метанола в деионизованной воде с 5% муравьиной кислоты перед стадией элюирования. Для этого на сорбент картриджей после прохождения экстракта и 2 мл раствора 5%-ной муравьиной кислоты в деионизованной воде наносили по 1.5 мл 10, 20, 30, 40 и 50%-ных растворов метанола в деионизованной воде с 5% муравьиной кислоты. После этого определяемые соединения элюировали и завершали пробоподготовку, как указано выше. Установлено, что определяемые соединения надежно удерживаются на сорбентах вплоть до применения 30–40%-ного метанола в деионизованной воде с 5% муравьиной кислоты на стадии промывки.

**Валидацию** разработанной методики выполняли на хромато-масс-спектрометре QTRAP 6500/1290 Infinity. Валидируемая схема пробоподготовки соответствовала описанной выше и включала в себя этап очистки экстрактов на Oasis HLB перед дериватизацией, устранение остатка ацетона концентрированием, а также очистку дериватов на Oasis WCX. В качестве матрицы для проведения валидации использовали смесь молотой сои, шрота и пшеничной муки 1 : 1 : 1, не содержащих определяемых соединений; 4 г на каждый градуировочный уровень. Всего провели четыре эксперимента с изменяющимися факторами 1) время, 2) оператор. Аналитическая серия каждого эксперимента состояла из чистого образца (холостой опыт), шести уровней градуировки (0.1/0.4/1.0/2.0/5.0/10.0 мг/кг), двух образцов контроля качества (QC) с добавкой, эквивалент-

ной третьему градуировочному уровню ( $G_3$ ), и шести образцов с добавками, соответствующими градуировочным уровням, выполненных в параллели. Критерии, подтверждающие пригодность разработанной методики для решения поставленной задачи: достигнутый коэффициент корреляции  $R \geq 0.99$ ; значения правильности для каждого градуировочного уровня не более  $\pm 15\%$ ; разброс результатов анализа образцов QC не более 15% по отношению к  $G_3$ . Предел обнаружения ГФ по данной методике составил 0.01 мг/кг, ГЛ и АМФК – 0.04 мг/кг. Предел количественного определения: ГФ – 0.1 мг/кг, ГЛ и АМФК – 0.4 мг/кг. Специфичность методики проверяли в ходе валидации путем анализа 20 образцов соевого шрота и пшеничной муки. Мешающих влияний компонентов матрицы на сигнал не обнаружили. Значения относительного среднеквадратического отклонения повторяемости для ГФ, АМФК и ГЛ не превышали 10%. Показатель воспроизводимости находился в диапазоне от 8 до 15%; предел повторяемости от 11 до 22%. Значения относительной расширенной неопределенности  $U$  при  $P = 0.95$  достигали 25% на первых уровнях добавок с последующим уменьшением до 15–17% по мере увеличения определяемой концентрации соединений. Градуировочные зависимости описываются линейными уравнениями: для ГФ  $y = 0.496x + 0.0269$  ( $R = 0.9998$ ); для АМФК  $y = 4.77x + 0.0124$  ( $R = 0.9967$ ); для ГЛ  $y = 29.6x + 1.58$  ( $R = 0.998$ ).

\*\*\*

Разработана селективная методика определения ГФ, АМФК и ГЛ, основанная на применении экстрагента, учитывающего свойства аналитов, дериватизации и применении двухэтапной ТФЭ. Методика воспроизводима в большинстве лабораторий, оснащенных хромато-масс-спектрометром с хроматографической колонкой на основе обращенно-фазового сорбента ( $C_{18}$ ). Достигнутые ПКО ГФ, АМФК и ГЛ в сырье растительного происхождения ниже МДУ, установленных ТР ТС 015/2011. Описанная методология позволяет количественно определять ГФ, АМФК и ГЛ и с более низкими ПКО, вплоть до 0.02–0.05 мг/кг. Однако при этом необходимо применять функцию “взвешивание” при построении градуировочных зависимостей с использованием соответствующего программного обеспечения и смещать содержания аналитов в градуировочных растворах в область более низких концентраций, концентрировать образец перед анализом до меньшего объема. Разработанную методику применили для контроля импортного сырья из стран Латинской Америки. Установили, что среднее содержание ГФ в генномодифицированной сое превышает установленный МДУ в 20 и более раз. В целом содержание ГФ и АМФК в таких об-



разцах может достигать 3.7 и 2.8 мг/кг соответственно [31]. Разработанную методику применили для анализа пищевых продуктов, реализуемых на территории РФ, и выявили проблемы, связанные с содержанием ГФ в таких объектах, как гречка (до 2.78 мг/кг), крупы бобовых (до 4 мг/кг) и сложносоставные товары (до 0.54 мг/кг).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Arregui M.C., Lenardón A., Sanchez D., Maitre M.I., Scotta R., Enrique S.* Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean // *Pest. Manag. Sci.* 2004. V. 60. P. 163.
2. *Bai S.H., Ogbourne S.M.* Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. № 19. P. 18988.
3. *Singh S., Kumar V., Datta S., Wani A.B., Dhanjal D.S., Romero R., Singh J.* Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: A review // *Environ. Chem. Lett.* 2020. V. 18. P. 663.
4. *Richard S., Moslemi S., Sipahutar H., Sipahutar H., Benachour N., Seralini G.* Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase // *Environ. Health Perspect.* 2005. V. 113. № 6. P. 716.
5. *Koller V.J., Fürhacker M., Nersesyan A., Mišák M., Eisenbauer M., Knasmueller S.* Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells // *Arch. Toxicol.* 2012. V. 86. № 5. P. 805.
6. International Agency for Research on Cancer. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2017. V. 112.
7. *Mörthl M., Németh G., Juracsek J., Darvas B., Kamp L., Rubio F., Székács A.* Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay // *Microchem. J.* 2013. V. 107. P. 143.
8. *Byer J.D., Struger J., Klawunn P., Todd A., Sverko E.* Low cost monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method: An evaluation // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 16. P. 6052
9. *Rubio F., Veldhuis L.J., Clegg B.S., Fleeker J.R., Hall C.J.* Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. № 3. P. 691.
10. *Shan G.* Immunoassays in Agricultural Biotechnology. John Wiley & Sons, 2011. 350 p.
11. *Singh G., Velasquez L., Brady B., Koerner T., Huet A.C., Delahaut P.* Development of an indirect competitive ELISA for analysis of alternariol in bread and bran samples // *Food Anal. Methods.* 2018. V. 11. № 5. P. 1444.
12. *Vicini J.L., Jensen P.K., Young B.M., Swarthout J.T.* Residues of glyphosate in food and dietary exposure // *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.* 2021. V. 20. № 5. P. 5526.
13. *Nedelkoska. T.V., Low G.K.C.* High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 511. P. 145.
14. *Fitri F., Muhamad H., Omar D., Asib N.* A rapid liquid chromatography method for determination of glyphosate in crude palm oil with fluorescence detection // *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 2017. V. 8. № 1. P. 346.
15. *Sun L., Kong D., Gu W., Guo X., Tao W., Shan Z., Wang Y., Wang N.* Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1502. P. 8.
16. *Sharma P.O., Pholphana N., Rangkadilok I N.* Development of simple and sensitive HPLC method for determination of glyphosate residues in soybean // *Nep. J. Environ. Sci.* 2015. V. 3. P. 21.
17. *Hernandez F., Hidalgo C., Sancho J.V.* Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection // *J. AOAC Int.* 2000. V. 83. № 3. P. 728.
18. *Kaczyński P., Lozowicka B.* Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection // *J. Open Chem.* 2015. V. 13. № 1. P. 1011.
19. *Pires N., Passos C., Morgado M., Mello D., Infante C., Caldas E.* Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection in waters of the Santarém Plateau, Brazilian Amazon // *J. Environ. Sci. Health B.* 2020. V. 55. № 9. P. 794.
20. *Alferness P.L., Iwata Y.* Determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection // *J. Agric. Food Chem.* 1994. V. 42. № 12. P. 2751.
21. *Hu J.Y., Chen C.L., Li J.Z.* A simple method for the determination of glyphosate residues in soil by capillary gas chromatography with nitrogen phosphorus // *J. Anal. Chem.* 2008. V. 63. № 4. P. 371.
22. *Hori Y., Fujisawa M., Shimada K., Hirose Y.* Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. A case of poisoning by Roundup herbicide // *J. Anal. Toxicol.* V. 27. № 3. P. 162.
23. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044) // *Official J.* 2002. V. 221. P. 36.
24. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC // *Official J.* 1996. V. 125. P. 10.
25. *Helio A.M., Lebre D.T., Wang A.Y., Pires M.A.F., Bustillos O.V.* An alternative and fast method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid

- (AMPA) residues in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009. V. 23. № 7. P. 1029.
26. *Botero-Coy A.M., Ibáñez M., Sancho J.V., Hernández, F.* Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1313. P. 157.
27. *Junjie D., Gehui J., Gaowa J., Aijin S., Zhimou G., Bing Y., Yang J., Jingyu Y., Xinmiao L.* Determination of underivatized glyphosate residues in plant-derived food with low matrix effect by solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Food Anal. Methods.* 2016. V. 9. № 10. P. 2856.
28. *Chamkasem N., Harmon T.* Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 18. P. 4995.
29. МИ-ВЛ-1-03-2018. Методика измерений массовой доли глифосата, его метаболита аминометилфосфоновой кислоты и малеинового гидрозида в продукции растительного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. М.: Федеральный центр оценки безопасности и качества зерна и продуктов его переработки, 2019. 19 с.
30. *Gosciny S., Unterluggauer H., Aldrian J., Vincent H., Masselter S.* Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS // *Food Anal. Methods.* 2012. V. 5. № 5. P. 1177.
31. *Сорокин А., Некрасов Д., Батов И., Петров А., Куш Л.* Глифосат в сырье растительного происхождения и кормах // *Комбикорма.* 2022. № 3. С. 58.