

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-2-I-13-22>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИФОСАТА, АМИНОМЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ГЛЮФОСИНАТА В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОВОДСТВА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

© Александр Валерьевич Сорокин*, Алексей Викторович Третьяков, Леонид Карольевич Киш

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»), Россия, 123022, Москва, Звенигородское ш., д. 5; *e-mail: alex_sorokin@list.ru

Статья поступила 7 августа 2022 г. Поступила после доработки 7 августа 2022 г. Принята к публикации 24 ноября 2022 г.

Глифосат и глюфосинат — широкодиапазонные неизбирательные гербициды, применение которых приводит к загрязнению продукции растительного происхождения, которую используют для откорма сельскохозяйственных животных. Разработана селективная методика хромато-масс-спектрометрического определения глифосата, его метаболита — аминометилфосфоновой кислоты — и глюфосината в мясе, субпродуктах и молоке с пределом количественного определения глифосата и глюфосината 0,05 мг/кг, аминометилфосфоновой кислоты — 0,4 мг/кг в мясе и субпродуктах и 0,02 и 0,05 мг/кг соответственно в молоке. Определяемые соединения извлекают из объектов исследования раствором сульфосалициловой кислоты, проводят первичную очистку экстрактов с помощью обращенно-фазового сорбента C_{18} , дериватизируют определяемые соединения 9-флуоренилметоксикарбонил хлоридом, проводят финальную очистку дериватов на сорбенте со слабыми катионообменными свойствами. Очищенный экстракт концентрируют, разбавляют смесью метанола с уксусной кислотой в воде, центрифугируют и используют для анализа. Хроматографическое разделение выполняют на колонке с обращенно-фазовым сорбентом C_{18} , а детектирование — методом тандемной масс-спектрометрии. Проведенная валидация методики показала, что относительная расширенная неопределенность в нижнем диапазоне определяемых содержаний находится в пределах от 27 до 41 % для глифосата, 25 – 29 % для аминометилфосфоновой кислоты и 25 – 34 % для глюфосината в зависимости от объекта анализа. Достигнутые значения предела определения согласуются с установленными временными максимально допустимыми уровнями в СанПиН 1.2.3685–21.

Ключевые слова: глифосат; аминометилфосфоновая кислота; глюфосинат; метаболизм; продукция животноводства; ВЭЖХ-МС/МС; анализ.

SELECTIVE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYPHOSATE, AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID, AND GLUFOSINATE IN ANIMAL PRODUCTS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (HPLC-MS/MS)

© Alexander V. Sorokin*, Aleksey V. Tretyakov, Leonid K. Kish

The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality (FGBU "VGNI"), 5, Zvenigorodskoe shosse, 123022, Moscow, Russian Federation; *e-mail: alex_sorokin@list.ru

Received August 7, 2022. Revised August 7, 2022. Accepted November 24, 2022.

Glyphosate and glufosinate are broad-range, non-selective herbicides that contaminate plant products used in fattening farm animals which in turn bears the risks of contamination of the whole food chain. The goal of this study is to develop a selective procedure for the chromat-mass spectrometric determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (glyphosate metabolite) and glufosinate in meat, offal and milk. The limit of quantitative determination of glyphosate and glufosinate in meat and offal is 0.05 mg/kg, aminomethylphosphonic acid is 0.4 mg/kg; the limit of quantitative determination of glyphosate and glufosinate in milk is 0.02 mg/kg, aminomethylphosphonic acid is 0.05 mg/kg. The compounds to be determined are extracted from the objects under study with a solution of sulfosalicylic acid, the primary purification of the extracts is carried out using a reverse-phase C_{18} sorbent, the compounds to be determined are derivatized using 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride, and the final purification of the derivatives is carried out on a sorbent exhibiting weak cation exchange properties. The purified extract is concentrated, diluted with a mixture of methanol and acetic acid in water, centrifuged and then used

for analysis. Chromatographic separation is performed on a column with a reversed-phase C_{18} sorbent. Tandem mass-spectrometry is used for detection of the compounds under study. The calibration dependences for the determined compounds are linear, the correlation coefficient (R) ≥ 0.99 . The validation of the procedure showed that the relative expanded uncertainty in the lower range of the determined contents ranged from 27 to 41% for glyphosate, from 25 to 29% for aminomethylphosphonic acid, and from 25 to 34% for glufosinate, depending on the type of object of analysis. The obtained values of the limit of quantitative determination are consistent with the temporary maximum allowable levels set in SanPiN 1.2.3685–21.

Keywords: glyphosate; aminomethylphosphonic acid; glufosinate; metabolism; animal products; HPLC-MS/MS; analysis.

Введение

В целях повышения урожайности сельскохозяйственных культур их производителям приходится прибегать к применению агрохимикатов, представителем которых является глифосат [1]. Глифосат (ГФ) — белое порошкообразное вещество без запаха с растворимостью в воде около 100 – 157 г/л при pH 7,0 и молярной массой 169,07 г/моль. ГФ слабо растворим в большинстве органических растворителей, логарифм коэффициента его распределения в системе октанол/вода составляет от –3,87 до –5,4. ГФ — широкодиапазонный гербицид — является основным действующим веществом препаратов, выпускаемых под торговыми названиями «Раундап» и др. Особенно широко ГФ стали использовать после разработки генно-модифицированных культур (соя, кукурузы и др.), имеющих к нему устойчивость. Генно-модифицированные культуры (ГМ-культуры) накапливают и передают ГФ вверх по пищевой цепи [2]. Согласно ранее проведенным исследованиям максимальное содержание ГФ в импортируемой на территорию РФ сое может достигать до 3,7 мг/кг, а его основного метаболита — аминотетрафосфоновой кислоты (АМФК) — до 2,3 мг/кг [3]. Остаточные количества ГФ могут быть обнаружены в субпродуктах сельскохозяйственных животных. Считается, что ГФ малотоксичен для млекопитающих, птиц, рыб и других гидробионтов, а также для полезных насекомых [4]. Глюфосинат (ГЛ) представляет собой кристаллическое вещество с молярной массой 198,2 г/моль со слабым запахом аммиака, слабо растворим в большинстве органических растворителей. Логарифм коэффициента его распределения в системе октанол/вода — около –4,01. ГЛ является неселективным гербицидом со слабо выраженным системным действием [4]. Его химическая структура близка к естественной аминокислоте, глутамину. В РФ глюфосинат представлен препаратом «Баста, ВР» с концентрацией 150 г/л производства ООО «Байер Кроп-Сайенс». ГЛ считается малотоксичным для млекопитающих, птиц, рыб и других гидробионтов, а также полезных насекомых: полужелудочная доза (LD_{50}) для крыс составляет 1620 – 2000 мг/кг мас-

сы тела [4]. Средняя смертельная концентрация ($СК_{50}$) для радужной форели — 580 мг/л (96 ч экспозиции) [5]. Препараты на основе ГЛ относятся к 3-му классу опасности для человека.

ГФ отнесен Международным Агентством по изучению рака к группе веществ, «потенциально канцерогенных для человека», что обуславливает необходимость контроля остаточного содержания ГФ и подобных ему соединений в продукции животноводства [6]. СанПиН 1.2.3685–21 устанавливает временные максимально допустимые уровни (ВМДУ) содержания ГФ в импортируемой продукции животного происхождения на уровне: 5,0 мг/кг в субпродуктах млекопитающих 0,05 мг/кг в молоке, мясе птицы и мясе млекопитающих; 0,5 мг/кг в субпродуктах свиней и птицы. Для ГЛ ВМДУ отличаются: 0,05 мг/кг в мясе млекопитающих и птицы; 0,1 мг/кг в субпродуктах млекопитающих и птицы; 0,02 мг/кг в молоке. Для АМФК не установлены ВМДУ. В ЕС содержание ГФ контролируется на уровне 0,05 мг/кг в продукции животноводства, за исключением следующих продуктов: субпродукты птицы (почки) — 0,1 мг/кг; почки говяжьи — 2,0 мг/кг; печень говяжья — 0,2 мг/кг; почки свиные — 0,5 мг/кг. В связи с этим контроль остаточных количеств данных соединений в продукции животноводства является актуальной задачей.

В настоящее время основными методами определения остаточных количеств ГФ являются высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ) и ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Метод ВЭЖХ-УФ позволяет определять ГФ и АМФК в объектах окружающей среды [7 – 10], биологических жидкостях [11, 12] и сырье растительного происхождения [13, 14]. При этом анализ ориентирован на предварительную дериватизацию молекул ГФ, АМФК и ГЛ, что позволяет определять их остаточное содержание на уровне 0,04 – 2 мг/кг ГФ, 0,1 – 0,5 мг/кг АМФК и до 3 мг/кг ГЛ. Однако данный метод не является достаточно селективным, поскольку вместе с определяемыми соединениями дериватизации подвергаются и первичные амины, что осложняет интерпретацию результатов анализа. Поэтому

для определения гербицидов целесообразно применять более селективный метод ВЭЖХ-МС/МС [15]. Публикации по данной теме чаще всего описывают анализ растительного сырья, фруктов и овощей, биологических жидкостей человека. При анализе растительного сырья определяемые соединения извлекают подкисленной деионизованной водой либо раствором ацетата натрия в присутствии динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА-Na_2) с последующей очисткой методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Такой способ предполагает определение ГФ, АМФК и ГЛ без предварительной дериватизации. Поскольку молекулы данных соединений плохо удерживаются на распространенных хроматографических колонках, используют специализированные (Acclaim Trinity Q1) [16] или колонки на основе обращенно-фазового сорбента C_{18} с длиной не менее 100 – 150 мм. Второй вариант позволяет получать хроматографические пики удовлетворительной формы в области времен удерживания 0,5 – 1 мин при максимальной рабочей температуре колонки [17]. Существует подход по определению ГФ и АМФК в злаковых культурах после дериватизации 9-флуоренилметоксикарбонил хлоридом (FMOC-Cl) с пределом определения (ПО) 0,02 мг/кг. Экстракцию осуществляют смесью метанола с деионизованной водой (1:1) в присутствии дихлорметана. Экстракт после центрифугирования концентрируют в силинизированной стеклянной емкости, перерастворяют в деионизованной воде и проводят дериватизацию [18]. Такая методика не может быть оптимальной, так как растворимость ГФ, ГЛ и АМФК максимальна в водных растворах и падает с увеличением содержания органической части в экстрагенте. В овощах и фруктах ГФ определяют, извлекая его остатки из навесок образца деионизованной водой в ходе гомогенизации. После фильтрации проводят определение, используя хроматографическую колонку типа Asahipak NH2P-50 4E. ПО составляет 5 и 50 мкг/кг для ГФ и АМФК соответственно [19]. При определении гербицидов в меде проводят его растворение в смеси 10 мМ ЭДТА- Na_2 с 50 мМ уксусной кислотой, центрифугируют полученную смесь и используют для анализа (ПО < 20 мкг/кг) [20]. При определении ГФ в молоке и моче проводят осаждение компонентов образца муравьиной кислотой и дихлорметаном с последующим центрифугированием. Определяют ГФ в свободном виде, разделяя компоненты на специализированных картриджах типа Bio-Rad (Hercules, США) [21]. Существует подход по определению ГФ на уровне 1 мкг/мл в грудном молоке после пропускания его аликвоты через фильтр с отсечением частиц крупнее 30 кДа (Amicon Ultra 168 4 Centrifugal filter,

30000 NMWL) при центрифугировании [22]. По определению гербицидов в мышечных тканях и субпродуктах методом ВЭЖХ-МС/МС опубликовано ограниченное количество статей. Так, коллектив авторов предлагает определять ГФ и АМФК в широком спектре объектов исследования на уровне 0,05 мг/кг [23]. Для этого проводят экстракцию из 10 г навески 100 мл деионизованной воды в присутствии 50 мл дихлорметана, повторяют экстракцию с 50 мл деионизованной воды и объединяют водные части экстракта. Аликвоту экстракта очищают на картридже с катионообменной смолой AG 50W-X8. После элюирования и концентрирования pH раствора стабилизируют боратым буферным раствором. Дериватизацию проводят раствором FMOC-Cl в течение ночи при комнатной температуре, а фильтрат полученной смеси используют для анализа. Данный способ неудобен для рутинного анализа поскольку пробоподготовка основана на применении больших объемов экстрагентов и специфических катионообменных смол, а стадия дериватизации чересчур длительна. Определение ГЛ в данной работе не рассмотрено. Другая работа [24] описывает определение ГФ в тканях субпродуктов с ПО 0,025 мг/кг. Для этого проводят экстракцию смесью метанола с водой (1:4) и центрифугируют. К 20 мл экстракта добавляют 5 мл дихлорметана и 0,02 мл уксусной кислоты, встряхивают, центрифугируют и используют 10 мл полученного раствора для повторной жидкость-жидкостной экстракции с 2,5 мл дихлорметана. Проводят ТФЭ на сорбенте со слабыми анионообменными свойствами, концентрируют очищенный экстракт досуха, перерастворяют в деионизованной воде и дериватизируют ГФ раствором FMOC-Cl при комнатной температуре в течение 45 мин. Избыток реагента удаляют дихлорметаном, раствор фильтруют и используют для анализа. Такой подход является наиболее выигрышным при работе со сложными объектами анализа, однако в работе не описана возможность совместного определения АМФК и ГЛ, не оценена полнота удержания ГФ на сорбенте картриджа ТФЭ и не приведены параметры дериватизации.

Цель работы — разработка методики совместного определения ГФ, АМФК и ГЛ методом ВЭЖХ-МС/МС в продукции животного происхождения (субпродукты, мышечная ткань, молоко) с дериватизацией определяемых соединений и очисткой дериватов методом ТФЭ перед разделением на колонках с обращенной фазой.

Экспериментальная часть

Реактивы, материалы, оборудование. В работе использовали 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), ФМОС-Cl 97 % (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- ^{13}C , ^{15}N 95 % (далее — ГФ-ISt, CAS 285978-24-7) производства Merck (Германия), а также соляную кислоту 37 % (CAS 7647-01-0), натрия тетраборат десятиводный 99,5 % (CAS 1303-96-4), сульфосалициловую кислоту 95 % (CAS 304851-84-1), гидроксид натрия 97 % (CAS 1310-73-2), диэтиловый эфир 99 % (CAS 60-29-7), гидрооксид аммония 25 % (CAS 1336-21-6), уксусную кислоту 99 % (CAS 64-19-7), трихлоруксусную кислоту 90 % (CAS 76-03-9) производства ТД Химмед (Россия). Для ТФЭ применяли картриджи марок Oasis HLB, WCX с 60 мг сорбента объемом 3 мл (Waters, США). Деионизованную воду получали из системы очистки воды Millipore (Merck, Германия). Для экстракции и перемешивания использовали шейкеры Reax 2 и Reax Control (Heidolph, Германия). Концентрирование экстрактов и дериватизацию проводили с использованием модуля Pierce Reacti-Therm III (Thermo, США). Для определения использовали масс-спектрометр QTRAP 6500 (Sciex, США) с хроматографом 1290 Infinity II LC (Agilent, США). Исходные растворы стандартов имели концентрацию 0,5 мг/мл, рабочие смеси — 0,1 и 0,01 мг/мл в деионизованной воде. Концентрация рабочего раствора ГФ-ISt составляла 0,2 мг/мл. Градуировочные зависимости строили путем внесения аликвот рабочих растворов в гомогенаты образцов с проведением через все этапы пробоподготовки. Боратный буферный раствор для дериватизации готовили смешиванием 0,1 М гидроксида натрия и 0,05 М раствора тетрабората натрия в соотношении 49,9:50,1.

Экстракция из образцов молока. В полипропиленовую пробирку вместимостью 15 мл помещали 4 г молока и вносили аликвоту рабочего раствора ГФ-ISt. Содержимое пробирки перемешивали на встряхивателе и добавляли 1 мл 5 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Дальнейшую пробоподготовку проводили в соответствии с общей схемой экстракции.

Экстракция из образцов мяса и субпродуктов. В полипропиленовую пробирку вместимостью 15 мл помещали 1 г гомогенного образца и вносили аликвоту рабочего раствора ГФ-ISt. Содержимое перемешивали на встряхивателе и добавляли 4 мл 1–1,5 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Дальнейшую пробоподготовку проводили в соответствии с общей схемой экстракции.

Общая схема экстракции и первичной очистки. Пробирку с содержимым встряхивали для размягчения навески экстрагентом и оставляли в

горизонтальном положении в течение 5–10 мин, после чего устанавливали в вертикальный встряхиватель и проводили экстракцию в течение 30 мин с последующей дополнительной обработкой в УЗБ в течение 10 мин при комнатной температуре. Пробирку с содержимым центрифугировали при 4750 мин⁻¹ и 5–10 °С в течение 15–20 мин. Для очистки, предшествующей дериватизации, использовали картридж ТФЭ Oasis HLB. Сорбент картриджа активировали и уравнивали метанолом, деионизованной водой и 0,5 мл экстракта последовательно. После уравнивания под картридж подставляли приемные пробирки вместимостью 15 мл, а на сорбент наносили 1 мл экстракта, давая ему протечь без применения вакуума в пробирку.

Дериватизация и финальная очистка. В пробирку с 1 мл очищенного экстракта вносили 1 мл боратного буферного раствора и перемешивали, после чего добавляли 1 мл раствора ФМОС-Cl (3 мг/мл) в ацетоне. Пробирку тщательно закрывали, встряхивали и оставляли при 50 °С для дериватизации. По прошествии 30 мин пробирку охлаждали до комнатной температуры и вносили в нее 2 мл диэтилового эфира. Однократно проводили жидкость-жидкостную экстракцию избытка ФМОС-Cl, центрифугировали и отсасывали органический слой компрессором. Оставшийся объем концентрировали в токе азота при 40–50 °С до 1–1,2 мл, подкисляли 10 мкл соляной кислоты и доводили общий объем до 3–3,5 мл деионизованной водой. Пробирку с содержимым центрифугировали при 4750 мин⁻¹ и 10 °С в течение 15 мин и очищали экстракт на картридже ТФЭ Oasis WCX. Для этого сорбент активировали и последовательно уравнивали метанолом и раствором 5 %-ной муравьиной кислоты. Экстракт полностью наносили на картридж и позволяли протечь в слив без применения вакуума. Сорбент последовательно промывали 2 мл 5 %-ной муравьиной кислоты, 1,5 мл раствора 30 %-ного метанола с 5 % муравьиной кислоты. После прохождения растворов их остатки продавливали воздухом, а под картридж подставляли приемную пробирку вместимостью 15 мл. Определяемые компоненты смывали с сорбента 3 мл смеси 90 %-ного метанола с 1 % гидроксида аммония и 9 % деионизованной воды. Полученный элюат концентрировали в токе азота до 0,2–0,3 мл при 40–50 °С. Конечный объем экстракта доводили до 1 мл раствором 20 %-ного метанола с 1 % уксусной кислоты в деионизованной воде и перемешивали. Экстракт центрифугировали при 15 000 мин⁻¹ и 5–10 °С в течение 15–20 мин и использовали для анализа.

Условия хроматографического разделения и детектирования. Определение дериватов ГФ, ГЛ и АМФК осуществляли в режиме регистра-

Таблица 1. Параметры работы масс-спектрометра Sciex 6500**Table 1.** Operation parameters of a Sciex 6500 mass-spectrometer

Определяемое соединение	Ион-предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	DE, В	CE, В	CXP, В
Глифосат	390,1	150,2/124,2	–95/–40	–30/–32	–10/–8
Глифосат IS	392,1	152,2/126,2	–95/–114	–30/–41	–10/–12
Глюфосинат	402,1	180,2/206,2	–55/–73	–17,3/–20	–15/–4
АМФК	332,1	136,2/110,2	–111/–107	–20/–11	–17/–12

ции отрицательных ионов. Режим сканирования — мониторинг заданных реакций (MRM). Скорость сканирования составляла 80 мкс; температура источника (TEM) — 500 °C; напряжение ионного источника — 4500 В; газ завеса (CUR) — 25; газ источника (GS1/GS2) — 60/60; потенциал входа (EP) — 10 В. Параметры работы масс-спектрометра в режиме MRM соответствовали указанным в табл. 1.

При хроматографическом разделении в качестве подвижных фаз использовали 20 мМ раствор ацетата аммония в деионизованной воде (А) и 20 мМ раствор ацетата аммония в метаноле (Б). Параметры работы жидкостного хроматографа с колонкой Eclipse Plus C₁₈ RRHD (Agilent, США) с диаметром зерна сорбента 1,8 мкм, внутренним диаметром 2,1 мм и длиной 50 мм указаны в табл. 2.

При проведении хроматографического разделения температура колонки составляла 30 °C, объем вводимой пробы — 10 мкл, температура в отсеке устройства ввода проб — 15 °C. Время выхода определяемых соединений: глифосат — 4,77 мин; глифосат IS — 4,77 мин; глюфосинат — 5,57 мин; АМФК — 6,34 мин.

Обсуждение результатов

Выбор способа хроматографического разделения. В существующей аналитической практике ГФ, ГЛ и АМФК определяют методом ВЭЖХ-МС/МС либо напрямую, либо после дериватизации. В первом случае используют ионообменные и цвиттер-ионные хроматографические колонки, а во втором наиболее часто — колонки на основе обращенно-фазового сорбента.

При выборе способа хроматографического разделения сравнили эффективность работы цвиттер-ионной колонки SeQuant Zic-cHILIC (с диаметром зерна сорбента 3 мкм, внутренним диаметром 2,1 мм и длиной 100 мм (Merk, Германия) и колонки Eclipse Plus C₁₈ RRHD при разделении модельных смесей определяемых соединений. При разделении ГФ, ГЛ и АМФК на цвиттер-ионной колонке использовали подвижную фазу А — 50 мМ раствор ацетата аммония в ацетонитриле с 0,5 %-ной муравьиной кислотой и

Таблица 2. Условия хроматографического разделения**Table 2.** Chromatographic separation conditions

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %	Скорость потока, мл/мин
0	70	30	0,3
3	70	30	0,3
8,5	5	95	0,3
9,5	5	95	0,3
10	70	30	0,3
14	70	30	0,3

фазу Б — смесь 20 % ацетонитрила и 30 % метанола в 0,5 %-ной муравьиной кислоте. Скорость потока элюента составляла 0,4 мл/мин, температура колонки — 35 °C. Детектирование проводили в режиме мониторинга выделенных ионов (SIM): ГФ — 168 m/z , ГЛ — 180 m/z , АМФК — 110 m/z . Удовлетворительное разделение ГФ и АМФК удалось получить по следующей программе: в начальный момент времени — 100 % А, к 5 мин — градиент к 100 % Б, до 7 мин — 100 % Б, к 8 мин — градиент к 100 % А, уравнивание колонки до 12 мин. При этом получить хроматографический пик правильной формы для ГЛ не удалось. Отмечались также нестабильность времен удерживания при работе с модельными смесями, содержащими экстракты образцов, и непостоянная интенсивность аналитического сигнала. При изменении программы разделения удалось сформировать хроматографический пик ГЛ, однако это произошло в ущерб ГФ и АМФК (рис. 1). Программа разделения была следующей: в начальный момент времени — 100 % А, с 1 по 4 мин, градиент к 30 % Б, к 5 мин, градиент к 95 % Б, с 5 до 7 мин 95 % Б, в 7,1 мин переключение на 100 % А, уравнивание колонки до 12 мин.

На колонке Eclipse Plus C₁₈ RRHD проводили хроматографическое разделение дериватов определяемых соединений в режиме MRM. Начальная программа: градиент от 1 мин и 20 % Б к 6 мин и 95 % Б с удержанием до 7 мин и переключением на начальные условия в 7,1 мин. Колонку уравнивали в течение 4 – 5 мин. Ско-

рость потока элюента составляла 0,3 мл/мин, температура — 30 °С. Такая программа позволяла получать подходящие для определения пики АМФК и ГЛ, однако для иона-продукта ГФ наблюдалось наложение пика-«наездника». После изменения программы градиента в соответствии с табл. 1 интерференция была устранена (рис. 2). В результате проведенных экспериментов установлено, что использование хроматографической колонки Eclipse Plus C₁₈ RRHD позволяет обеспечить стабильность значений времен удерживания и интенсивности аналитического сигнала, что и определило выбор колонки.

Экстракция. Основываясь на природе определяемых соединений и виде объектов исследования, проводили серию экспериментов по извлече-

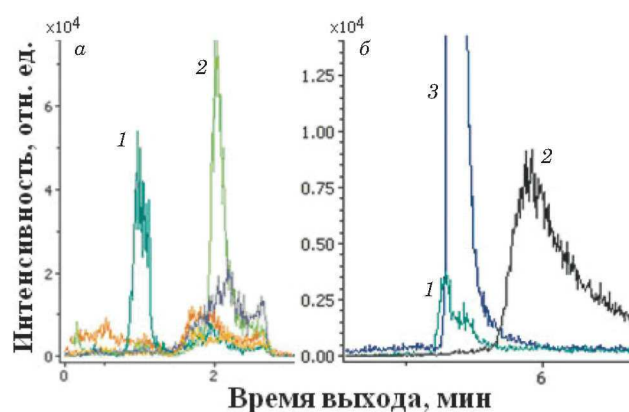


Рис. 1. Разделение смеси аналитов на колонке SeQuant Zic-chHILIC при начальном градиенте (а) и после его оптимизации (б): 1 — аминометилфосфоновая кислота; 2 — глифосат; 3 — глюфосинат

Fig. 1. Separation of the mixture of analytes on a SeQuant Zic-chHILIC column at the initial gradient (a) and after its optimization (b): 1 — aminomethylphosphonic acid; 2 — glyphosate; 3 — glufosinate

нию ГФ, ГЛ и АМФК из молока, мышечных тканей и тканей субпродуктов (почки, сердце). В качестве экстрагентов, способных одновременно извлечь определяемые соединения, разрушить ткани образцов и осадить белки с пептидами, рассматривали растворы сульфосалициловой, 2 %-ной трихлоруксусной и 0,1 М соляной кислоты, а также метанол, подкисленный до 0,1 % муравьиной кислотой. Концентрацию кислот подбирали таким образом, чтобы емкость боратного буферного раствора позволяла сохранить оптимальное для дериватизации значение pH. К навескам образцов после внесения аликвот рабочего раствора стандартов добавляли по 4 мл экстрагентов. Пробирки тщательно встряхивали и оставляли в горизонтальном положении на несколько минут, после чего проводили экстракцию как описано выше. 0,1 М раствор соляной кислоты хорошо разрушал ткани, однако образованные взвешенные частицы были плохо устранимы в ходе центрифугирования и первой ТФЭ, что существенно увеличивало время проведения данных этапов, а отказ от ТФЭ приводил к существенному ухудшению результатов дериватизации. Применение смеси метанола с муравьиной кислотой приводило к характерному для липидов легкому окрашиванию экстрактов, которое не устранялось на стадии ТФЭ. Метанол также оказывал негативное воздействие на процедуру дериватизации. В ходе подбора экстрагента для образцов молока было установлено, что оптимальное объемное соотношение образец/экстрагент при применении 5 %-ной сульфосалициловой кислоты составляет 4:1. Такой подход позволяет получить концентрацию кислоты в экстракте на уровне 1 % и увеличить аналитический сигнал за счет большего количества образца. Следует отметить, что в случае субпродуктов целесообразно

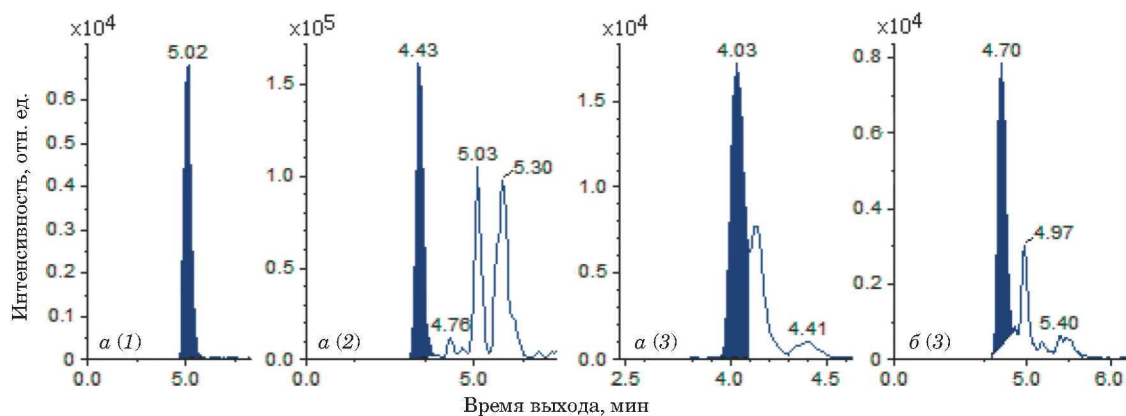


Рис. 2. Разделение смеси аналитов на колонке Eclipse Plus C₁₈ RRHD при начальном градиенте (а) и после его оптимизации (б): 1 — аминометилфосфоновая кислота; 2 — глюфосинат; 3 — глифосат

Fig. 2. Separation of the mixture of analytes on an Eclipse Plus C₁₈ RRHD column at the initial gradient (a) and after its optimization (b): 1 — aminomethylphosphonic acid; 2 — glufosinate; 3 — glyphosate

применять 1,5 %-ную сульфосалициловую кислоту. Сравнение сумм площадей пиков ГФ, ГЛ и АМФК, полученных при применении различных экстрагентов, представлено на рис. 3.

Дериватизация. Стадия дериватизации является неотъемлемой частью пробоподготовки, поэтому подбор условий ее проведения важен для получения объективного результата анализа. Для этой цели готовили 4 серии модельных образцов мышечной ткани согласно описанной выше процедуре. Каждая серия состояла из 5 образцов с добавками смеси растворов ГФ, ГЛ и АМФК в концентрациях, соответствующих середине рабочего диапазона методики. Условия эксперимента приведены в табл. 3.

После дериватизации избыток FMOC-Cl удаляли диэтиловым эфиром, а неорганическую часть концентрировали и подвергали очистке методом ТФЭ на картриджах Oasis WCX по стандартному протоколу, предложенному производителем. При интерпретации результатов анализа рассчитывали значение десятичного логарифма для суммы площадей пиков масс-хроматограмм каждого соединения в серии (табл. 4). Полученные значения сравнивали между сериями. В результате выбрали условия проведения дериватизации: $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, концентрация раствора FMOC-Cl — 3 мг/мл (в табл. 4).

Финальная очистка. Для доработки стандартного протокола очистки экстрактов на картриджах Oasis WCX проводили серию экспериментов по изменению содержания метанола во втором промывочном растворе 5 %-ной муравьиной кислоты, применяемого после нанесения экстрактов. Подбирали такое содержание метанола в растворе, при котором определяемые соединения надежно удерживаются сорбентом, а компоненты образца удаляются в слив. Для этого готовили модельные смеси на основе экстрактов мышечной ткани с добавками ГФ, ГЛ и АМФК в концентрациях, соответствующих середине рабочего диапазона методики. Проводили дериватизацию и последующую подготовку дериватов к ТФЭ как описано выше. Последующая очистка методом ТФЭ включала: активацию сорбента

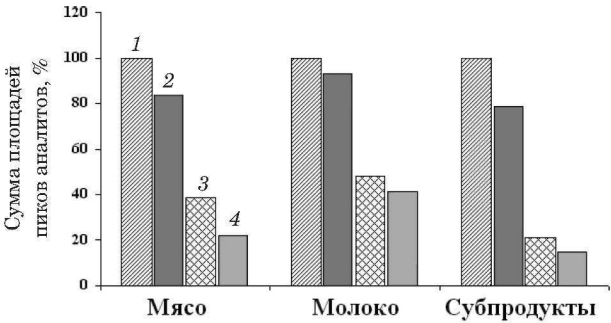


Рис. 3. Сравнение сумм площадей пиков аналитов в зависимости от вида экстрагента: 1 — сульфосалициловая кислота; 2 — 2 %-ная трихлоруксусная кислота; 3 — 0,1 М соляная кислота; 4 — метанол с 1 %-ной муравьиной кислотой

Fig. 3. Comparison of the sum of analyte peak areas depending on the type of the extraction mixture: 1 — sulfosalicylic acid; 2 — 2 % trichloroacetic acid; 3 — 0.1 N hydrochloric acid; 4 — methanol with 1 % formic acid

2 мл метанола, уравнивание 2 мл 5 %-ной муравьиной кислоты, нанесение модельной смеси, промывку 2 мл 5 %-ной муравьиной кислоты, промывку 2 мл промывочного раствора (10–60 % метанола с 5 %-ной муравьиной кислотой) с шагом содержания метанола 10 %, сушку и элюирование.

Для оценки результатов эксперимента рассчитывали значение lg суммы площадей пиков масс-хроматограмм ГФ, ГЛ и АМФК в каждом эксперименте и сравнивали полученные значения для разных экспериментов. В качестве наилучшего промывочного раствора был выбран 30 %-ный метанол с 5 % муравьиной кислоты (рис. 4). Объем нанесения промывочного раствора был уменьшен до 1,5 мл для снижения вероятности потерь определяемых соединений.

Валидация. Валидируемая схема пробоподготовки соответствовала описанной выше. В качестве образцов для проведения валидации (матриц) использовали пастеризованное молоко, гомогенат мышечной ткани, гомогенат тканей субпродуктов (почки, сердце), не содержащие определяемых соединений. Для каждой матрицы проводили 4 эксперимента с двумя изменяющимися факторами: время и оператор. Серия каждо-

Таблица 3. Параметры проведения эксперимента по дериватизации

Table 3. Parameters for derivatization experiment

Номер серии эксперимента	Изменяемые параметры		
	$T, ^{\circ}\text{C}$	Время, мин	Концентрация FMOC-Cl, мг/мл
1	50	30	3
2	30	30	3
3	Комнатная	30	3
4	30	30	1

Таблица 4. Результаты проведения эксперимента по дериватизации

Table 4. Results of the derivatization experiment

Соединение	Номер серии эксперимента			
	1	2	3	4
Глифосат	6,901	6,800	6,848	6,555
АМФК	6,745	6,584	6,645	6,389
Глюфосинат	7,929	7,880	7,937	7,639



Рис. 4. Сравнение сумм площадей пиков аналитов в зависимости от содержания метанола в промывочном растворе при очистке методом ТФЭ

Fig. 4. Comparison of the sums of analyte peak areas depending on the methanol content in a washing solution during purification at SPE stage

го эксперимента состояла из чистого образца (бланк), 5 образцов для построения градуировочной зависимости, двух образцов контроля качества (QC) и 5 образцов с добавками, соответствующими уровням градуировочной зависимости (выполняли по два параллельных определения). Все образцы проходили пробоподготовку с предварительным внесением аликвот рабочих растворов стандартов. Таким образом, один эксперимент включал анализ 18 образцов. Критерии

надлежащего выполнения каждого эксперимента были следующими: полученные значения корреляции градуировочных зависимостей $R \geq 0,99$; значения правильности для каждого градуировочного уровня не более $\pm 20\%$; разброс результатов анализа образцов QC не более 20 % по отношению к истинному значению. Для оценки специфичности методики проводили анализ 20 образцов матрицы каждого вида, интерференции отсутствовали. Значения относительного среднеквадратического отклонения повторяемости, соответствующие нижнему рабочему диапазону методики, не превышали 20,8 и 26 % в мышечных тканях, молоке и субпродуктах соответственно. Показатель воспроизводимости для данного диапазона методики находился в пределах от 12 до 28 % в зависимости от матрицы и определяемого соединения. Рабочий диапазон методики и значения относительной расширенной неопределенности U приведены в табл. 5.

Закключение

Разработанная методика позволяет определять ГФ, ГЛ и АМФК в продукции животного происхождения на уровне, установленном Сан-ПиН 1.2.3685–21, и предназначена для организа-

Таблица 5. Метрологические характеристики методики, полученные в ходе ее валидации
Table 5. Values of the relative expanded uncertainty obtained during validation of the developed procedure

Соединение	Диапазон определяемых содержаний, мг/кг	U при P = 0,95, %	Уравнение градуировочной зависимости	R
Мышечная ткань				
Глифосат	От 0,05 до 1,0 вкл.	41	$y = 0,259x + 0,000294$	0,999
	Св. 1,0 до 10	18		
АМФК	От 0,4 до 2,0 вкл.	28	$y = 0,559x + 0,106$	0,995
	Св. 2,0 до 20	23		
Глюфосинат	От 0,05 до 1,0 вкл.	29	$y = 3x + 0,038$	0,992
	Св. 1,0 до 10	28		
Молоко				
Глифосат	От 0,02 до 0,2 вкл.	27	$y = 0,892x + 0,00849$	0,999
	Св.0,2 до 2,5	16		
АМФК	От 0,05 до 0,2 вкл.	25	$y = 0,445x - 0,000821$	0,999
	Св.0,2 до 2,5	17		
Глюфосинат	От 0,02 до 0,2 вкл.	25	$y = 55,6x + 0,502$	0,999
	Св.0,2 до 2,5	16		
Субпродукты				
Глифосат	От 0,05 до 1,0 вкл.	28	$y = 0,191x + 0,0268$	0,997
	Св. 1,0 до 10	22		
АМФК	От 0,4 до 2,0 вкл.	29	$y = 1,43x + 0,252$	0,999
	Св. 2,0 до 20	23		
Глюфосинат	От 0,05 до 1,0 вкл.	34	$y = 59,2x + 1,51$	0,999
	Св. 1,0 до 10	18		

ций, занимающихся контролем безопасности пищевой продукции. Методика основана на селективном хромато-масс-спектрометрическом определении с использованием хроматографических колонок с обращенно-фазовым сорбентом, что делает ее воспроизводимой в большинстве испытательных лабораторий. Разработанная методика аттестована и включена в реестр методик измерений РФ (№ ФР.1.31.2021.39543), а также включена в область аккредитации Испытательного центра ФГБУ «ВГНКИ» и применяется для контроля безопасности сырья АПК РФ и импортируемой продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спиридонов Ю. Я., Ларина Г. Е., Шестаков В. Г. Методическое руководство по изучению гербицидов, применяемых в растениеводстве. — М.: Печатный Город, 2009. — 252 с.
2. Arregui M. C., Lenardyn A., Sanchez D., et al. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean / *Pest. Manag. Sci.* 2003. Vol. 60. P. 163 – 166. DOI: 10.1002/ps.775
3. Сорокин А., Некрасов Д., Батов И. и др. Глифосат в сырье растительного происхождения и кормах / *Комбикорма*. 2022. № 3. С. 58 – 60. DOI: 10.25741/2413-287X-2022-03-4-171
4. Жариков М. Г., Спиридонов Ю. Я. Изучение влияния глифосатсодержащих гербицидов на агроценоз / *Агрохимия*. 2008. № 8. С. 1 – 9.
5. Мельников Н. Н., Новожилов К. В., Белан С. Р. Пестициды и регуляторы роста растений: справочник. — М.: Химия, 1995. — 576 с.
6. Gupton K. Z., Loomis D., Grosse Y., et al. Carcinogenicity of Tetrachlorvinphos, Parathion, Malathion, Diazinon, and Glyphosate / *Lancet Oncol.* 2015. Vol. 16. P. 490 – 491. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8
7. Qian K., Tang T., Shi T., et al. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride / *Anal. Chim. Acta*. 2009. Vol. 635. N 2. P. 222 – 226. DOI: 10.1016/j.aca.2009.01.022
8. Delmonico E., Janksyn B., Nilson S., et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC / *Acta Sci. Technol.* 2014. Vol. 36. P. 513 – 519. DOI: 10.4025/actascitechnol.v36i3.22406
9. Sun L., Kong D., Gu W., et al. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography / *J. Chromatogr. A*. 2017. Vol. 1502. P. 8 – 13. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.018
10. Pires N., Passos C., Morgado M., et al. 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. Vol. 55. N 9. P. 794 – 802. DOI: 10.1080/03601234.2020.1784668
11. Polyiem W., Hongsibsong S., Chantara S., et al. Determination and Assessment of Glyphosate Exposure Among Farmers from Northern Part of Thailand / *J. Pharmacol. Toxicol.* 2017. Vol. 12. N 2. P. 97 – 102. DOI: 10.3923/jpt.2017.97.102
12. Karolyne M., Siomara J., Célia G., et al. Determination of Glyphosate in human urine from farmers in Mato Grosso-BR / *InterAm. J. Med. Health*. 2020. Vol. 3. P. 1 – 10. DOI: 10.31005/iajmh.v3i0.124
13. Sharma O. P., Polphana N., Rangkadilok N., et al. Development of simple and sensitive HPLC method for determination of glyphosate residues in soybean / *Nepal J. Environ. Sci.* 2015. Vol. 3. P. 21 – 26. DOI: 10.3126/njes.v3i0.22731
14. Wang F. X., Pan F., Zhang S., et al. Determination of Glyphosate Residue in Genetically Modified Soybean by Protein Precipitator Clean-up and HPLC with OPA Post-column Derivatization: International Conference on Environmental Research and Public Health / *ICERP*. 2017. P. 124 – 136. DOI: 10.1515/9783110559040-016
15. 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. L* 221. 2002. P. 8 – 36.
16. 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. Vol. 408. N 18. P. 4995 – 5004. DOI: 10.1007/s00216-016 – 9597 – 6
17. Kaczyński P., Lozowicka B. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection / *Open Chem.* 2015. Vol. 13. N 1. P. 1011 – 1019. DOI: 10.1515/chem-2015-0107
18. Goscinnny S., Unterluggauer H., Aldrian J., et al. Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS / *Food Anal. Methods*. 2012. Vol. 5. N 5. P. 1177 – 1185. DOI: 10.1007/s12161-011-9361-7
19. Chen M. X., Cao Z. Y., Jiang Y., et al. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry / *J. Chromatogr. A*. 2013. Vol. 1272. P. 90 – 99. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.11.069
20. Chamkasem N., Vargo J. D. Development and independent laboratory validation of an analytical method for the direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / *J. Reg. Sci.* 2017. Vol. 5. N 2. P. 1 – 9. DOI: 10.21423/jrs-v05n02p001
21. Jensen P. K., Wujcik C. E., McGuire M. K., et al. Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS / *J. Environ. Sci. Health B*. 2016. Vol. 51. N 4. P. 254 – 259. DOI: 10.1080/03601234.2015.1120619
22. Steinborn A., Alder L., Michalski B., et al. Determination of glyphosate levels in breast milk samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS / *J. Agric. Food Chem.* 2016. Vol. 64. N 6. P. 1414 – 1421. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05852
23. Li B., Deng X., Guo D., et al. Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Residues in Foods Using High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / *Mass Spectrometry / Chin. J. Chromatogr.* 2007. Vol. 25. P. 486 – 490. DOI: 10.1016/S1872-2059(07)60017-0
24. Szternfeld P., Malysheva S. V., Hanot V., et al. Robust Transferable Method for the Determination of Glyphosate Residue in Liver After Derivatization by Ultra-high Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / *Food Anal. Methods*. 2016. Vol. 9. P. 1173 – 1179. DOI: 10.1007/s12161-015-0293-5

REFERENCES

1. Spiridonov Yu. Ya., Larina G. E., Shestakov V. G. Methodological guide for the study of herbicides used in crop production. — Moscow: Pechatnyi Gorod, 2009. — 252 p. [in Russian].
3. Sorokin A., Nekrasov D., Batov I., et al. Glyphosate in raw materials of plant origin and feed / *Kombikorma*. 2022. N 3. P. 58 – 60 [in Russian]. DOI: 10.25741/2413-287X-2022-03-4-171
4. Zharikov M. G., Spiridonov Yu. Ya. Studying the Effect of Glyphosphate Herbicides on an Agrocenosis / *Agrokhimiya*. 2008. N 8. P. 1 – 9 [in Russian].

5. **Mel'nikov N. N., Novozhilov K. V., Belan S. R.** Pesticides and Plant Growth Regulators: A Handbook. — Moscow: Khimiya, 1995. — 576 p. [in Russian].
6. **Guyton K. Z., Loomis D., Grosse Y., et al.** Carcinogenicity of Tetrachlorvinphos, Parathion, Malathion, Diazinon, and Glyphosate / *Lancet Oncol.* 2015. Vol. 16. P. 490 – 491. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8
7. **Qian K., Tang T., Shi T., et al.** Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride / *Anal. Chim. Acta.* 2009. Vol. 635. N 2. P. 222 – 226. DOI: 10.1016/j.aca.2009.01.022
8. **Delmonico E., Janksyn B., Nilson S., et al.** Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC / *Acta Sci. Technol.* 2014. Vol. 36. P. 513 – 519. DOI: 10.4025/actascitechnol.v36i3.22406
9. **Sun L., Kong D., Gu W., et al.** Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography / *J. Chromatogr. A.* 2017. Vol. 1502. P. 8 – 13. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.018
10. **Pires N., Passos C., Morgado M., et al.** 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. Vol. 55. N 9. P. 794 – 802. DOI: 10.1080/03601234.2020.1784668
11. **Polyiem W., Hongsibsong S., Chantara S., et al.** Determination and Assessment of Glyphosate Exposure Among Farmers from Northern Part of Thailand / *J. Pharmacol. Toxicol.* 2017. Vol. 12. N 2. P. 97 – 102. DOI: 10.3923/jpt.2017.97.102
12. **Karolyne M., Siomara J., Célia G., et al.** Determination of Glyphosate in human urine from farmers in Mato Grosso-BR / *InterAm. J. Med. Health.* 2020. Vol. 3. P. 1 – 10. DOI: 10.31005/iajmh.v3i0.124
13. **Sharma O. P., Pholphana N., Rangkadilok N., et al.** Development of simple and sensitive HPLC method for determination of glyphosate residues in soybean / *Nepal J. Environ. Sci.* 2015. Vol. 3. P. 21 – 26. DOI: 10.3126/njes.v3i0.22731
14. **Wang F. X., Pan F., Zhang S., et al.** Determination of Glyphosate Residue in Genetically Modified Soybean by Protein Precipitator Clean-up and HPLC with OPA Post-column Derivatization: International Conference on Environmental Research and Public Health / *ICERP* 2017. P. 124 – 136. DOI: 10.1515/9783110559040-016
15. 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. L* 221. 2002. P. 8 – 36.
16. **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. Vol. 408. N 18. P. 4995 – 5004. DOI: 10.1007/s00216-016 – 9597 – 6
17. **Kaczyński P., Lozowicka B.** Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection / *Open Chem.* 2015. Vol. 13. N 1. P. 1011 – 1019. DOI: 10.1515/chem-2015-0107
18. **Goscinyński S., Unterluggauer H., Aldrian J., et al.** Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS / *Food Anal. Methods.* 2012. Vol. 5. N 5. P. 1177 – 1185. DOI: 10.1007/s12161-011-9361-7
19. **Chen M. X., Cao Z. Y., Jiang Y., et al.** Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry / *J. Chromatogr. A.* 2013. Vol. 1272. P. 90 – 99. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.11.069
20. **Chamkasem N., Vargo J. D.** Development and independent laboratory validation of an analytical method for the direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / *J. Reg. Sci.* 2017. Vol. 5. N 2. P. 1 – 9. DOI: 10.21423/jrs-v05n02p001
21. **Jensen P. K., Wujcik C. E., McGuire M. K., et al.** Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS / *J. Environ. Sci. Health B.* 2016. Vol. 51. N 4. P. 254 – 259. DOI: 10.1080/03601234.2015.1120619
22. **Steinborn A., Alder L., Michalski B., et al.** Determination of glyphosate levels in breast milk samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS / *J. Agric. Food Chem.* 2016. Vol. 64. N 6. P. 1414 – 1421. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05852
23. **Li B., Deng X., Guo D., et al.** Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Residues in Foods Using High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / *Mass Spectrometry / Chin. J. Chromatogr.* 2007. Vol. 25. P. 486 – 490. DOI: 10.1016/S1872-2059(07)60017-0
24. **Szternfeld P., Malysheva S. V., Hanot V., et al.** Robust Transferable Method for the Determination of Glyphosate Residue in Liver After Derivatization by Ultra-high Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / *Food Anal. Methods.* 2016. Vol. 9. P. 1173 – 1179. DOI: 10.1007/s12161-015-0293-5