

УДК 543

ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИФОСАТА, АМИНОМЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ГЛЮФОСИНАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОРИСТОГО ГРАФИТИРОВАННОГО СОРБЕНТА HUPERCARB

Е.Н. Гончарова¹, М.А. Статкус¹, Г.И. Цизин¹, Р.Н. Селимов²

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии; ² ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»; e-mail: mstatkus@gmail.com)

Предложен способ ВЭЖХ-определения глифосата, аминометилфосфоновой кислоты и глюфосината с использованием градиентного разделения анализов на пористом графитированном углеродном сорбенте Нурегсарб и водного раствора формиата аммония / аммиака в качестве подвижной фазы. Аналиты детектировали с помощью квадрупольного и трехквадрупольного масс-спектрометров. Для увеличения удерживания аналитов проводили промывку хроматографической колонки водой перед инъекцией раствора образца. Этот прием позволяет увеличить коэффициенты удерживания аналитов в 3–4 раза по сравнению с описанными в литературе аналогами.

Ключевые слова: жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, пористый графитированный углеродный сорбент Нурегсарб, глифосат, глюфосинат, аминометилфосфоновая кислота.

Глифосат (N-(фосфометил)глицин, Gly, рис. 1), будучи широко применяемым неселективным гербицидом, ингибирует так называемый «шикиматный путь» – синтез ароматических соединений в растениях, промежуточным метаболитом которого является шикимовая кислота. По заявлению разработчика, Gly представляет собой гербицид с низкой токсичностью, однако уже с конца 90-х годов известны данные о возможном канцерогенном воздействии этого пестицида на человека и животных [1]. Международное агентство

по исследованию раковых заболеваний (IARC) отнесло глифосат к группе веществ, канцерогенных для человека. Данный пестицид активно применяется в сельском хозяйстве, в особенности для обработки генно-модифицированных линий сои и кукурузы, имеющих встроенный ген устойчивости к глифосату [2]. В природных условиях Gly легко разлагается до аминометилфосфоновой кислоты (AMPA, рис. 1), следовательно, для контроля за применением этого пестицида необходимо определять и продукт его трансформации.

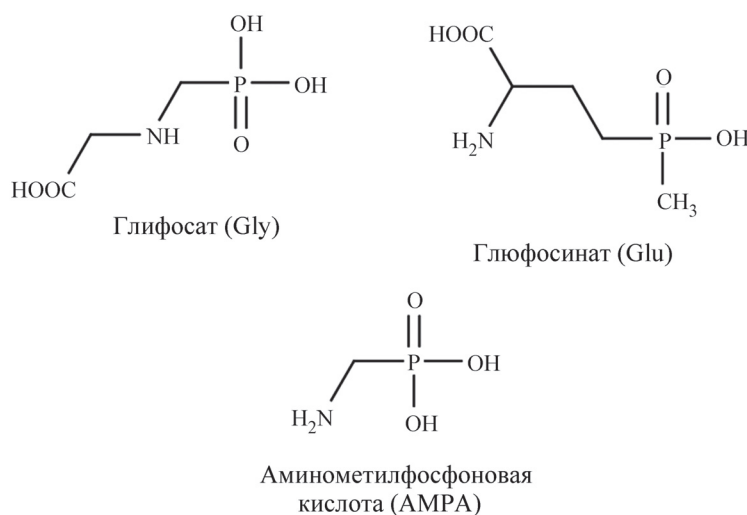


Рис. 1. Структуры Gly, AMPA и Glu [6, 7]

В разных странах установлены различные нормативы по предельно допустимому содержанию глифосата в объектах окружающей среды и пищевых продуктах, диапазон составляет от 0,05 до 500 мг/кг [3]. В России, согласно Гигиеническим нормативам содержания пестицидов в объектах окружающей среды [4], ПДК глифосата в почве составляет 0,5 мг/кг, в воде – 0,2 мг/дм³, а для пищевых продуктов ПДК установлены в диапазоне от 0,05 до 40 мг/кг в зависимости от вида продукции.

Глюфосинат аммония (Glu, рис. 1), также как и близкий ему по структуре Gly, относится к неселективным гербицидам, воздействующим на многие виды сорняков. Glu (D, L-2-амино-4-(гидрокси(метил)фосфоноил)бутановая кислота) представляет собой химически синтезированный рацемат D- и L-стереоизомеров природного соединения L-фосфинотрицина [5, 6]. В России установлены [4] следующие ПДК этого пестицида: в почве 0,02 мг/кг, в воде – 0,1 мг/дм³, а для пищевых продуктов ПДК установлены в диапазоне от 0,02 до 5 мг/кг в зависимости от вида продукции [4]. Одновременное определение всех трех упомянутых выше аналитов (Gly, АМРА, Glu) представляет собой сложную задачу, так как они являются сильно полярными соединениями (рис. 1). Эти соединения хорошо растворимы в воде и плохо в большинстве органических растворителей. Они слабо удерживаются в обращенно-фазном режиме на колонках C18 для жидкостной хроматографии. Газохроматографическое определение этих аналитов затруднено и требует дериватизации. Дериватизацию нередко проводят и перед началом ВЭЖХ-определения в целях повышения гидрофобности. Очевидно, что стадия дериватизации повышает трудоемкость и длительность анализа, снижает его воспроизводимость. Поэтому важна разработка прямых методов определения Gly и родственных ему соединений [3].

Опубликованы методики разделения методом ВЭЖХ Gly, АМРА и Glu на колонке Нуперcarb и на ионообменной колонке; определение проводили с использованием масс-спектрометрического детектора [8]. Однако эти методики не позволили полностью разделить аналиты, а время их удерживания было близко к мертвому времени [8]. Для улучшения метрологических характеристик анализа необходим поиск путей увеличения времени удерживания этих полярных аналитов.

Мы предлагаем решить эту проблему за счет использования градиента концентрации формиата аммония / аммиака в подвижной фазе при разделении веществ на углеродном сорбенте Нуперcarb.

Настоящая работа посвящена разработке методики прямого определения глифосата, аминометилфосфоновой кислоты и глюфосината в водных растворах с использованием пористого графитированного углеродного сорбента Нуперcarb, градиентного ВЭЖХ-разделения и масс-спектрометрического детектирования.

Экспериментальная часть

Реагенты. Для приготовления растворов и элюентов использовали деионизованную воду, которую получали на установке «Millipore Simplicity» («Millipore», США), удельное сопротивление воды составляло 18,2 МОм×см. Для приготовления элюентов использовали формиат аммония (97%, «Sigma-Aldrich») и водный раствор аммиака (28–30 мас.%), степень чистоты «for analysis» («Panreac», Испания).

Исходные растворы аналитов с концентрацией 0,5 мг/мл готовили растворением точных навесок сухих стандартных образцов глифосата (99,50%; «Sigma-Aldrich»), аминометилфосфоновой кислоты (99%; «Sigma-Aldrich») и глюфосината аммония (97,90%; «Sigma-Aldrich») в воде. Все растворы хранили в стеклянной посуде с притертыми пробками. Исходные растворы хранили в темноте при +4 °С.

Аппаратура. Для ВЭЖХ-разделения и масс-спектрометрического определения использовали жидкостной хромато-масс-спектрометр производства «Shimadzu» (Япония), состоящий из следующих модулей:

квадрупольный масс-спектрометр «LCMS-2020» с ионизацией аналитов электрораспылением (ESI);

два ВЭЖХ-насоса «LC-20»,
термостат «СТО-20А»,
дегазатор «DGU-20А2»,
автосамплер «SIL-20АС».

Для построения градуировочной зависимости и оценки пределов обнаружения использовали жидкостной хромато-масс-спектрометр производства «Agilent Technologies» (США) и «AB Sciex» (Канада), состоящий из следующих модулей:

жидкостной насос «Agilent 1290»,
автосамплер «Agilent 1290»,
термостат «Agilent 1290»,
трехквадрупольный масс-спектрометр «AB SCIEX QTRAP 5500».

ВЭЖХ-разделение осуществляли на колонке с пористым графитированным углеродным сорбентом Нуперcarb 30×2,1 мм («Thermo Scientific», США), диаметр частиц 5 мкм.

Условия хроматографического разделения.

В качестве элюента использовали 0,05 М водный раствор аммиака с добавкой формиата аммония (0,79 мМ). Скорость потока составляла 0,2 мл/мин, температура колонки 40 °С.

Для детектирования аналитов использовали параметры МС-детектора и интерфейса «Shimadzu LCMS-2020», указанные в табл. 1. Эти параметры не оптимизировали, использовали рекомендованные производителем оборудования значения.

Регистрировали аналиты в виде молекулярных ионов вида $[M-H]^-$ в режиме SIM-регистрации отрицательных ионов. С учетом строения аналитов выбрали следующие величины m/z для регистрации масс-хроматограмм: 168 а.е.м. для Gly, 110 а.е.м. для АМРА и 180 а.е.м. для Glu.

Результаты и обсуждение

Gly, АМРА и Glu, будучи высокополярными соединениями, слабо удерживаются на большинстве коммерчески доступных фаз в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ, что затрудняет их определение. Известно, что в обращенно-фазном режиме на пористом графитированном углеродном сорбенте Нурегсарб удерживание полярных соединений существенно выше, чем на октадецилсиликагеле. В немногочисленных работах предложено использовать колонку Нурегсарб (50×2,1 мм, 5 мкм) в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ для разделения Gly, АМРА и Glu [7, 8]. В качестве подвижной фазы использованы растворы муравьиной и других карбоновых кислот в воде и органических растворителях (метаноле и ацетонитриле). Однако по приведенным хроматограммам [7] (рис. 2) видно, что время удерживания АМРА близко к

«мертвому», у пиков АМРА и Glu заметно сильное размытие правого фронта. Авторам не удалось полностью разделить все три аналита на колонке Нурегсарб (2,1×100 мм, 5 мкм).

Ранее нами был предложен способ разделения алкилфосфоновых кислот на сорбенте Нурегсарб с использованием в качестве элюента раствора муравьиной кислоты в воде и уравниванием колонки водой перед инъекцией пробы, что позволило увеличить время и коэффициенты удерживания, улучшить разрешение пиков и снизить пределы обнаружения [9]. Мы предположили, что уравнивание колонки водой перед инъекцией и проведение элюирования с использованием градиента концентрации формиата аммония и аммиака в воде позволит решить проблему слабого удерживания глифосата и родственных соединений. Для проверки этого предположения использовали градиентную программу, представленную в табл. 2. Первая часть градиента (15 мин до ввода образца, так называемая «промывка») необходима для установления равновесия хроматографической колонки с водой, при этом из колонки удаляются формиат аммония и аммиак, оставшиеся после предыдущего разделения. Затем вводят 10 мкл образца и одновременно повышают концентрацию формиата аммония в элюенте до 0,79 мМ, а аммиака до 0,05 М.

Данный градиент позволяет увеличить время удерживания Gly, АМРА и Glu, улучшить их разделение, уменьшить ширину пиков и снизить их асимметрию по сравнению с изократическим элюированием 0,79 мМ формиатом аммония в 0,05 М растворе аммиака (рис. 3). Ширина пиков на полувысоте, коэффициенты удерживания,

Таблица 1

Параметры МС-детектора и интерфейса «Shimadzu LCMS-2020»

Параметр	Значение параметра
Время накопления сигнала на выбранной массе (SIM event time)	0,2 с
Напряжение на детекторе (Detector voltage)	1,1 кВ
Напряжение на интерфейсе (Interface voltage)	-4,5 кВ
Напряжение на линии десольватации (DL voltage)	0 В
Температура интерфейса (Interface temperature)	350 °С
Температура линии десольватации (DL temperature)	250 °С
Поток газа-распылителя (Nebulizing gas flow)	1,5 л/мин
Температура блока нагревателя (Heat Block)	400 °С
Поток газа-осушителя (Drying gas flow)	15 л/мин
Режим ионизации (Ionisation mode)	ESI

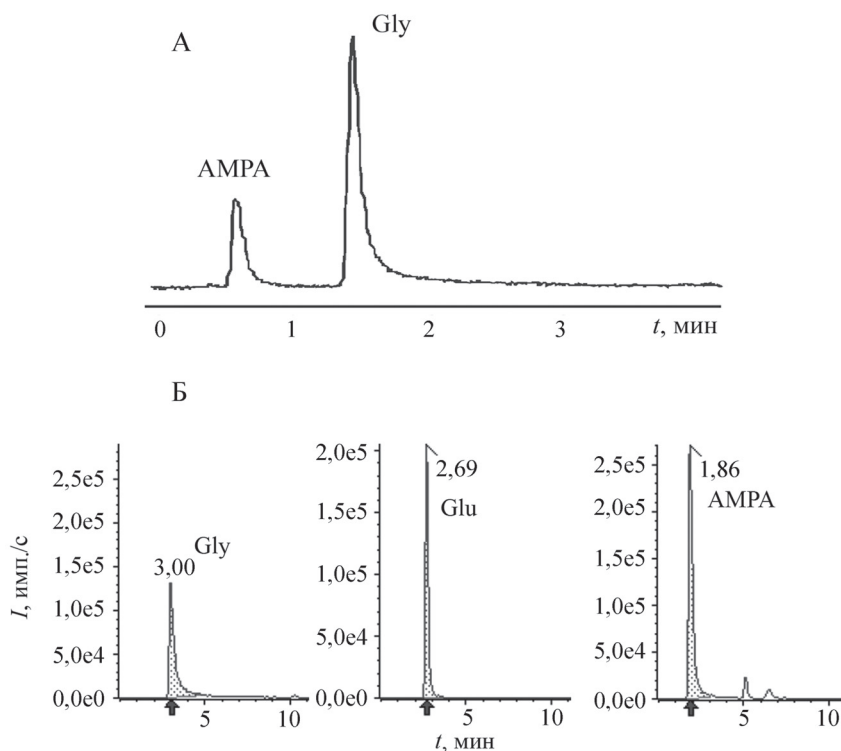


Рис. 2. ВЭЖХ-разделение Gly, АМРА и Glu на колонке Нурегcarb [7, 8]: А – колонка Нурегcarb (2,1×50 мм, 5 мкм). Подвижная фаза (А) – 0,1%-я муравьиная кислота в воде. Подвижная фаза (Б) – 0,1%-я муравьиная кислота в ацетонитриле. Изменение концентрации фазы Б от 5 до 100% за 10 мин. Скорость потока: 0,3 мл/мин [7]. Б – колонка Нурегcarb (2,1×100 мм, 5 мкм). Подвижная фаза (А) – 1%-я уксусная кислота в 5%-м метаноле; подвижная фаза (Б) – 1%-я уксусная кислота в 100%-м метаноле. Изменение концентрации подвижной фазы (Б) от 0 до 30% за 10 мин. Скорость потока 0,2 мл/мин [8]

время удерживания и разрешение пиков аналитов приведены в табл. 3.

Для выбора оптимальных условий разделения нами изучена зависимость коэффициентов емкости и разрешения аналитов от концентрации формиата аммония и аммиака в элюенте. При фиксированной концентрации формиата аммония снижение концентрации аммиака в подвижной фазе ниже 0,05 М приводит к исчезновению пиков аналитов на хроматограмме, вероятно, за счет резкого увеличения удерживания. При концентрации аммиака >0,05 М вид хроматограммы

не меняется существенным образом. Аналогичным образом изучали влияние концентрации формиата аммония при фиксированной концентрации аммиака, равной 0,05 М. Зависимость величины разрешения и коэффициентов удерживания аналитов от концентрации формиата аммония представлена на рис. 4. Наилучшее разрешение достигается при концентрации формиата аммония в подвижной фазе, равной 0,79 ммоль/л. При более низких концентрациях происходит сильное размывание пиков, что ухудшает разделение.

Таблица 2

Градиент для разделения аналитов

Время элюирования, мин	Состав элюента
-15-0 (до инъекции)	деионизованная вода
инъекция образца	
0-10	Водный раствор 0,05 М аммиака и 0,79 мМ формиата аммония

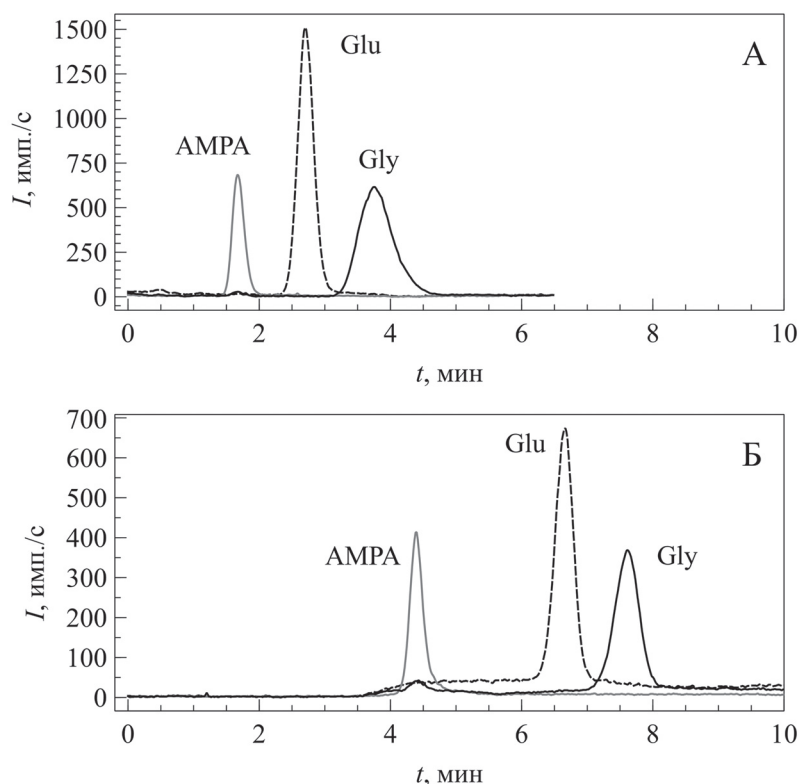


Рис. 3. ВЭЖХ-разделение Gly, АМРА и Glu (концентрация каждого аналита $c = 0,5$ мкг/мл, вводили 10 мкл образца). Колонка: Нурегcarb $30 \times 2,1$ мм, температура колонки 40°C . А – изократический режим, элюент: водный раствор $0,05$ М аммиака и $0,79$ мМ формиата аммония. Б – градиентное элюирование, согласно табл. 3

Изучена зависимость коэффициентов емкости и величины разрешения пиков аналитов от длительности промывки колонки водой (рис. 5). Элюирование проводили водным раствором, содержащим $0,79$ мМ формиата аммония и $0,05$ М аммиака.

Увеличение длительности промывки до 15 мин приводит к увеличению удерживания аналитов и коэффициентов емкости; дальнейшее увеличение этого параметра не вызывает существенного изме-

нения коэффициентов емкости. Поэтому для дальнейшей работы в качестве оптимальной выбрана продолжительность промывки 15 мин.

Изучена зависимость коэффициентов емкости и разрешения аналитов от температуры колонки при предварительной промывке колонки деионизованной водой в течение 15 мин (рис. 6). При увеличении температуры колонки выше 40°C наблюдается снижение коэффициентов удерживания и разрешения аналитов.

Т а б л и ц а 3

Параметры ВЭЖХ-разделения аналитов

Аналит	Градиентное элюирование			Изократическое элюирование		
	$\omega_{1/2}$, мин	t_R , мин	k'	$\omega_{1/2}$, мин	t_R , мин	k'
Gly	0,416	3,68	7,51	0,577	7,60	3,19
АМРА	0,217	1,65	3,94	0,211	4,38	0,88
Glu	0,310	2,68	6,47	0,280	6,65	2,03
R_s						
АМРА–Glu	4,53			2,05		
Glu–Gly	1,2			1,17		

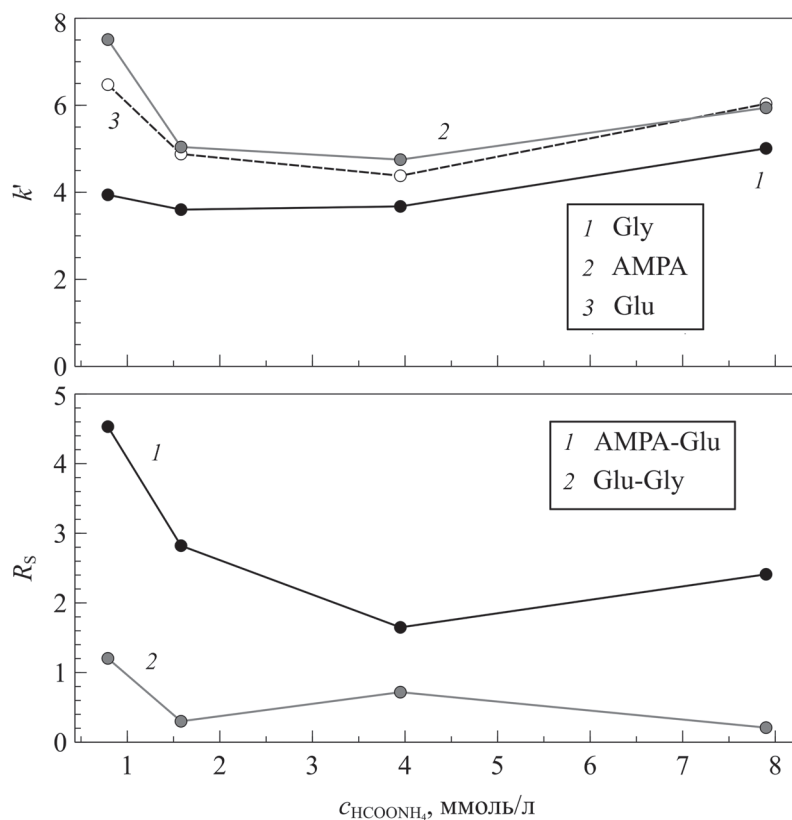


Рис. 4. Зависимость коэффициентов удерживания и разрешения пиков анализов от концентрации формиата аммония в подвижной фазе

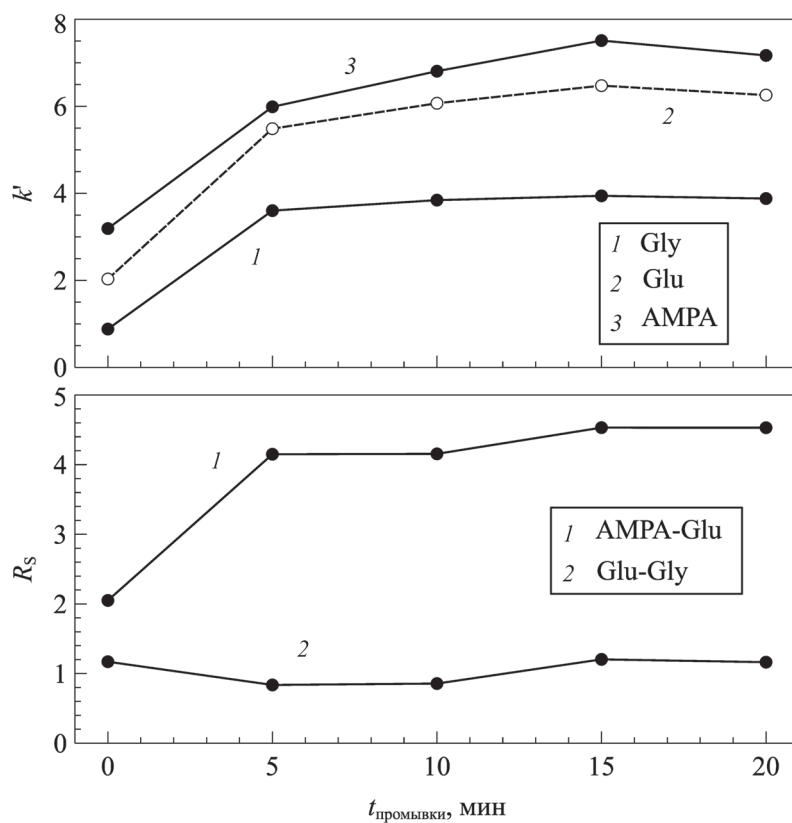


Рис. 5. Зависимость коэффициентов емкости и разрешения пиков анализов от длительности предварительной промывки колонки деионизованной водой

Т а б л и ц а 4

Метрологические характеристики определения Gly, АМРА и Glu с помощью хромато-масс-спектрометра «Shimadzu»

Аналит	Градиентное разделение			Изократическое разделение		
	уравнение градуировочной зависимости	R^2	$c_{\text{мин}}$, мкг/мл	уравнение градуировочной зависимости	R^2	$c_{\text{мин}}$, мкг/мл
АМРА	$y = 10013x + 79$	0,9999	0,09	$y = 4788x + 81$	0,9993	0,27
Gly	$y = 12224x + 51$	0,9999	0,12	$y = 10204x + 80$	0,9999	0,48
Glu	$y = 19566x + 199$	0,9999	0,09	$y = 14942x - 130$	0,9941	0,41

Т а б л и ц а 5

Параметры регистрации ионов на трехквadrupольном масс-спектрометре «AB SCIEX QTRAP 5500»

Аналит	MRM-переход Q1/Q3	DP, В	CE, В
Gly	168/79	-110	-54
	168/63		-26
	168/150		-13
	168/124		-17
	168/81		-20
АМРА	110/79	-90	-36
	110/63		-24
	110/81		-17
Glu	180/63	-90	-66
	180/95		-25
	180/85		-25
	180/136		-23

Т а б л и ц а 6

Метрологические характеристики определения пестицидов с помощью трехквadrupольного хромато-масс-спектрометра «Agilent Technologies / AB Sciex»

Аналит	Наиболее интенсивный MRM-переход Q1/Q3	Уравнение градуировочной зависимости	R^2	$c_{\text{мин}}$, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл
АМРА	110/63	$y = 15038x$	0,9998	12	12–500
Glu	180/95	$y = 6063,7x$	0,9999	6	6–500
Gly	168/63	$y = 6813,2x - 23814$	0,9997	13	13–500

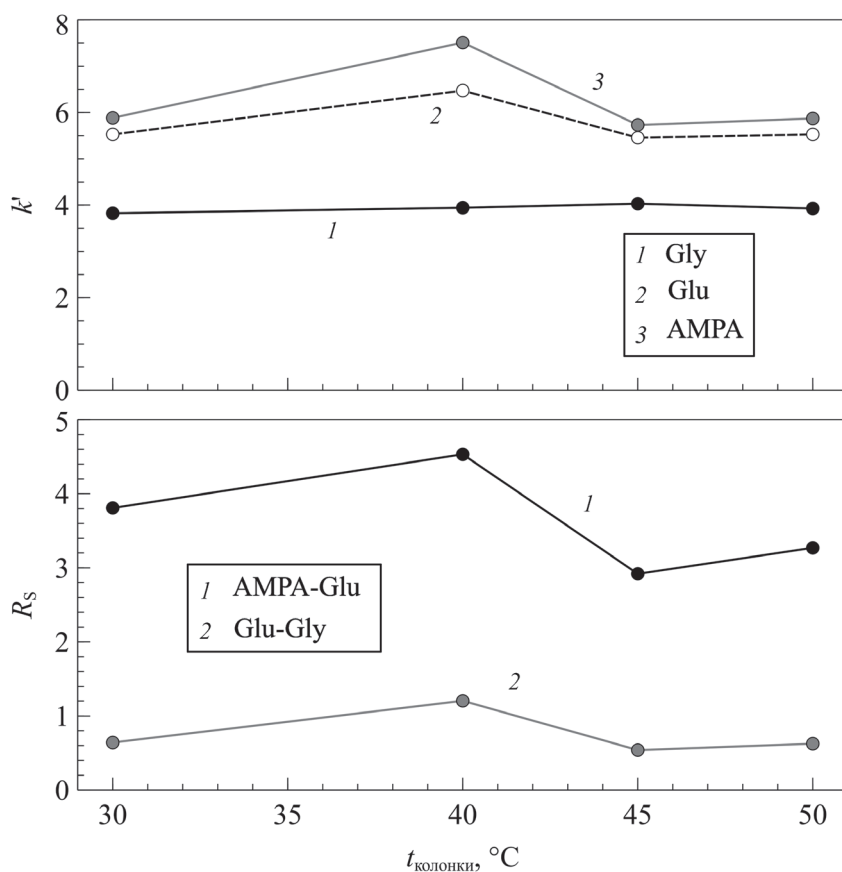


Рис. 6. Зависимость коэффициентов емкости и разрешения пиков анализов от температуры колонки

Таким образом, наилучшие характеристики разделения анализов достигаются при следующих условиях: фаза А – деионизованная вода, фаза Б – водный раствор, содержащий 0,79 мМ формиата аммония и 0,05 М аммиака. Градиентное элюирование проводится согласно табл. 2. Время промывки колонки 15 мин. Температура колонки 40 $^\circ\text{C}$. В выбранных условиях для каждого определяемого вещества были построены градуировочные зависимости по образцам (концентрация каждого аналита составляла 100, 500, 1000, 2000, 4000 и 8000 нг/мл) и рассчитаны пределы обнаружения (табл. 4).

Диапазоны линейности для АМРА и Glu составили от 90 до 8000 нг/мл, а для Gly – от 120 до 8000 нг/мл. Видно, что тангенсы углов наклона градуировочных зависимостей для каждого определяемого вещества примерно одинаковы в градиентном и изократическом режимах, однако градиентное элюирование позволяет уменьшить пределы обнаружения в 3–4 раза за счет улучшения воспроизводимости площадей пиков анализов, что, на наш взгляд, связано с увеличением времени удерживания

анализов. Такой подход позволяет определять необходимые концентрации пестицидов в воде на уровне ПДК и ниже. Для снижения пределов обнаружения была проведена адаптация методики к трехквадрупольному хромато-масс-спектрометру «Agilent Technologies / AB Sciex». Параметры регистрации ионов анализов с помощью трехквадрупольного масс-спектрометра «Agilent Technologies AB SCIEX QTRAP 5500» представлены в табл. 5. Детектирование проводили в режиме MRM-регистрации отрицательных ионов. Для выявления оптимальных условий детектирования выбирали значения потенциала декластеризации (DP) в диапазоне от –300 до 0 В и энергии соударений (CE) в диапазоне от –180 до 0 В. Выбранные оптимальные значения величин DP и CE представлены в табл. 5. Для расчета пределов обнаружения анализов были выбраны наиболее интенсивные MRM-переходы ионов – 180/95, 110/63 и 168/63 для Glu, АМРА и Gly соответственно (табл. 6). После адаптации методики определения пестицидов к трехквадрупольному масс-спектрометру «Agilent Technologies / AB Sciex» строили градуировоч-

ную зависимость по образцам с концентрацией каждого аналита 1, 5, 10, 50, 100 и 500 нг/мл. Метрологические характеристики представле-

ны в табл. 6. Как видно, пределы обнаружения удалось снизить в 7,5–15 раз за счет использования более селективного масс-детектора.

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду (проект № 14-23-00012) за финансовую поддержку при выполнении исследований с использованием квадрупольного масс-спектрометра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cox C. Herbicides Fact Sheet. Glyphosate (Roundup) // J. Pesticide Reform 1998. Vol. 18. P. 3.
2. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides, 20 March 2015.
3. Yang L.-Z., Man Z., Zhou X. Direct Analysis of Glyphosate and Similar Pesticides in Oatmeal by UHPLC-MS/MS // Application note 2016. P. 1.
4. Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень) ГН 1.2.3111-13. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 21.10.2013 N 55.
5. Van Alfen K.N. Encyclopedia of Agriculture and Food System. Academic Press 2014. P. 96.
6. Schwartz D., Berger S., Heinzelmann E., Muschoko K., Welzel K., Wohlleben W. Biosynthetic Gene Cluster of the Herbicide Phosphinothricin Tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 // App. Envir. Microbiol. 2004. Vol. 70. N 12. P. 7093.
7. Pereira L. LC/MS of Glyphosate and AMPA / Thermo Fisher Scientific 2006. Application Note # 20029. P. 1.
8. Anastassiades M., Kolberg D. I., Eichhorn E., Benkenstein A., Lukačević S., Mack D., Wildgrube C., Sigalov I., Dörk D., Barth A. Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method) // EU Ref. Lab. Recid. Pes. 2015. Vol. 8. P. 1.
9. Гончарова Е.Н., Семенова И.П., Статкус М.А., Цизин Г.И. Градиентное ВЭЖХ-разделение алкилфосфоновых кислот на пористом графитированном сорбенте Hypercarb с использованием водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия. 2017. Т. 58. № 6. С. 275.

Поступила в редакцию 10.11.17

HPLC DETERMINATION OF GLYPHOSATE, AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID AND GLUFOSINATE USING A POROUS GRAPHITIZED HYPERCARB SORBENT

E.N. Goncharova¹, M.A. Statkus^{1*}, G.I. Tsizin¹, R.N. Selimov²

(¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry; ² FGBU «Russian State Center for the Quality and Standardization of Veterinary Medicines and Feeds»; *e-mail: mstatkus@gmail.com)

A HPLC method for the determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate is proposed using a gradient separation of analytes on a porous graphitized carbon sorbent Hypercarb and an aqueous solution of ammonium formate / ammonia as a mobile phase. Analytes were detected using quadrupole and triple-quadrupole mass spectrometers. To increase the retention of the analytes, the chromatographic column was washed with water before injecting the sample solution. This method makes it possible to increase the retention coefficients of analytes by 3–4 times in comparison with the analogs described in the literature.

Key words: liquid chromatography, mass spectrometry, porous graphitized carbon sorbent Hypercarb, glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid.

Сведения об авторах: Гончарова Елизавета Николаевна – аспирант химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (goncharovae.n@mail.ru); Статкус Михаил Александрович – ст. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (mstatkus@gmail.com); Цизин Григорий Ильич – глав. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (tsizin@analyt.chem.msu.ru); Селимов Ренат Наилевич – зам. зав. отдела безопасности пищевых продуктов ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», отдел безопасности пищевых продуктов (Renat-selimov@yandex.ru).