

**Анализ вещества****Substances analysis**DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-11-5-13>**НЕЦЕЛЕВОЙ АНАЛИЗ ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОВОДСТВА И КОРМОВ НА ОСТАТОЧНЫЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПЕСТИЦИДОВ, МИКОТОКСИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ (обзор)**

© Леонид Карольевич Киш<sup>1</sup>, Ольга Игоревна Лаврухина<sup>1,2\*</sup>,  
Василий Григорьевич Амелин<sup>1</sup>, Алексей Викторович Третьяков<sup>1</sup>,  
Тимур Дмитриевич Пеньков<sup>1</sup>, Денис Юрьевич Некрасов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, 123022, Россия, Москва, Звенигородское шоссе, д. 5.

<sup>2</sup> Владимирский государственный университет им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, 600026, Россия, г. Владимир, ул. Горького, д. 87; \*e-mail: hamsster@mail.ru

*Статья поступила 18 апреля 2023 г. Поступила после доработки 8 июня 2023 г.  
Принята к публикации 24 августа 2023 г.*

Представлен обзор методик нецелевого анализа при одновременной идентификации и определении лекарственных препаратов для ветеринарного применения, пестицидов, микотоксинов, их метаболитов и продуктов трансформации в продукции животноводства с использованием жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения. Отмечен ряд ограничений подхода, таких как необходимость использования общих условий извлечения, возможность химических превращений аналитов в процессе пробоподготовки, ложноположительные результаты для изобарных и изомерных соединений и отсутствие спектральных данных для ранее не изученных веществ. Несмотря на это, метод является наиболее перспективным инструментом для определения не выявленных в рамках целевого исследования загрязнителей как в случае многокомпонентного скрининга пищевой продукции и продовольственного сырья, так и при изучении трансформации исходных соединений.

**Ключевые слова:** нецелевой анализ; масс-спектрометрия высокого разрешения; метаболиты; продукты трансформации; продукция животноводства.

**NON-TARGET ANALYSIS OF LIVESTOCK PRODUCTS AND FEED FOR RESIDUES OF DRUGS, PESTICIDES, MYCOTOXINS AND THEIR METABOLITES BY HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY (a review)**

© Leonid K. Kish,<sup>1</sup> Olga I. Lavrukhina,<sup>1,2\*</sup> Vasilii G. Amelin,<sup>1</sup> Alexey V. Tretyakov,<sup>1</sup>  
Timur D. Pen'kov,<sup>1</sup> Denis Yu. Nekrasov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 5, Zvenigorodskoye shosse, Moscow, 123022, Russia.

<sup>2</sup> Alexander G. and Nikolay G. Stoletov Vladimir State University, 87, Gor'kogo ul., Vladimir, 600026, Russia;  
\*e-mail: hamsster@mail.ru

*Received April 18, 2023. Revised June 8, 2023. Accepted August 24, 2023.*

A review of techniques of non-target analysis for simultaneous identification and determination of veterinary drugs, pesticides, mycotoxins, their metabolites, and substances of chemical transformation in livestock products using liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry is presented. Some limitations of the approach are noted, such as the necessity of using common extraction conditions, the possibility of analyte transformations during the sample preparation, false positive results for isobaric and isomeric compounds, and the lack of spectral data for previously unexplored substances. However, the method is the most promising tool for the determination of pollutants not identified in the targeted analysis, as in the case of multicomponent screening of food and raw materials, and in the study of the parent compounds transformation.

**Keywords:** non-target analysis; high-resolution mass spectrometry; metabolites; transformation products; livestock products.

## Введение

В анализе сырья животного происхождения при обеспечении безопасности пищевой продукции особое внимание уделяется контролю остаточных содержаний лекарственных препаратов для ветеринарного применения, используемых для лечения и профилактики болезней животных, а также стимуляторов роста, пестицидов и микотоксинов, попадающих в организм с кормом, и продуктов их трансформации [1 – 4]. Одновременное определение исходных загрязнителей и их метаболитов представляет наибольший интерес при реализации мониторинга их остаточных содержаний в пищевой продукции и продовольственном сырье. Получаемая в результате целевого анализа методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии с tandem-масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ- и ГХ-МС/МС) спектральная информация относится только к определяемым веществам, входящим в область применения методики [5]. В то же время другие опасные загрязнители, в том числе, метаболиты и продукты трансформации, которые также могут присутствовать в образцах, игнорируются, поскольку будут получены только те переходы в режиме МС/МС, которые выбраны для целевых аналитов [5, 6]. Поэтому перспективными являются разработка и внедрение методик нецелевого поиска для идентификации в продукции животноводства загрязнителей, не выявленных в рамках целевого исследования. Практическое применение нецелевого анализа в обеспечении безопасности пищевой продукции требует сбора предварительной информации обо всех его этапах, а именно: пробоподготовке как наиболее важной и лимитирующей стадии; выборе метода, позволяющего реализовать подход; конкретной методологии проведения исследования и интерпретации полученных результатов. Цель данного обзора заключается в выявлении ограничений методик нецелевого поиска применительно к анализу продукции животноводства для обеспечения ее безопасности и преодоления данных ограничений с использованием современных методов.

## Пробоподготовка в нецелевом анализе

С каждым годом количество разрабатываемых и вновь регистрируемых лекарственных препаратов и пестицидов увеличивается. Для контроля постоянно растущего числа соединений необходима оперативная разработка методик их идентификации и определения. Принимая во внимание различия физико-химических свойств препаратов (антибиотики различных групп, НПВС, кортикостероиды,  $\beta$ -агонисты, пестициды и т.д.), природных загрязнителей (зоо-, фито-

и микотоксины) и, соответственно, их метаболитов и продуктов трансформации, необходимо использовать общие условия извлечения для дальнейшего анализа.

Учитывая, что аналиты могут отличаться полярностью, кислотностью, летучестью и гидрофильностью, подобрать единый метод пробоподготовки крайне сложно, а в некоторых случаях невозможно [6]. Самый простой способ подготовки образцов для дальнейшего анализа при наличии современного хроматографического оборудования с возможностью высокочувствительного детектирования методом масс-спектрометрии высокого разрешения (МС-ВР) — экстракция и разбавление [5]. При разбавлении снижаются матричные эффекты, однако для поддержания воспроизводимости результатов анализа необходимы частая регенерация колонки и очистка ионного источника.

При разработке метода пробоподготовки в нецелевом анализе можно взять за основу подходы, предложенные для многокомпонентного анализа, а именно, QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe — быстрый, простой, дешевый, эффективный, точный и надежный) — на начальном этапе извлечения и дисперсионную жидкость-жидкостную микроэкстракцию (ДЖЖМЭ) — для дополнительной очистки экстрактов [7 – 9].

Базовая процедура QuEChERS не подходит для образцов с низким содержанием воды и высоким содержанием жиров, а также для определения аналитов, чувствительных к рН и высокополярных соединений [10, 11]. Однако, с учетом вариантов его модификации, метод можно использовать как для неполярных, так и для полярных аналитов, поэтому он подходит для нецелевого скрининга [6, 12 – 14]. На практике может быть эффективна комбинация нескольких операций экстракции с использованием различных сорбентов [15]. Например, в пробоподготовке образцов пищевых продуктов с высоким содержанием жира и белков на стадии очистки сорбент на основе циркония Z-Sep обеспечивает эффективное извлечение и более чистые экстракты, чем PSA/C18 [8].

Использование «мягких» растворителей в процедуре ДЖЖМЭ, а именно, супрамолекулярных (СПМР) и глубоких эвтектических (ГЭР), может существенно повысить эффективность извлечения и снизить влияние матрицы благодаря удалению мешающих компонентов. Ионные, водородные и гидрофобные взаимодействия обеспечивают эффективность экстракции аналитов с помощью СПМР [16], а образование на молекулярном и наноструктурном уровне амфифильных агрегатов в процессе самосборки может предотвратить гидролиз соединений и, кроме того,

обеспечить эффективное извлечение летучих веществ. ГЭР уже хорошо зарекомендовали себя в качестве экстрагентов при определении пестицидов (ФОП, триазинов, пиретроидов и бензилатов) в биологических жидкостях [17], а также антибиотиков (пенициллинов, тетрациклинов, макролидов) в продукции животноводства [18 – 20].

Источниками ложноотрицательных результатов на этапе подготовки образцов могут стать потеря анализов, неэффективная экстракция, неполные целевые химические реакции (дериватизация, деконъюгация) [21]. Необходимо также уделить особое внимание возможным химическим превращениям анализов в процессе пробоподготовки и последующего определения, так как эти реакции могут привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам [12]. Для их исключения варьируют условия подготовки проб, при этом проверяют и/или изменяют критерии идентификации. Буферирование для поддержания pH на уровне 5 позволяет достичь удовлетворительного извлечения чувствительных к кислотам химических веществ без разложения [8]. В биологических матрицах трансформация анализов неизбежна (ферментативные реакции), поэтому для остановки этих процессов используют замораживание образцов или добавляют холодные растворители [21]. Таким образом, в нецелевом анализе продукции животноводства, необходима минимальная, «мягкая» пробоподготовка, позволяющая избежать трансформации определяемых соединений, но при этом извлекать большое количество предполагаемых анализов с различными физико-химическими свойствами.

### Методики нецелевого поиска

За последнее десятилетие применение высокоэффективной и ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с MS-VP (например, Time-of-Flight (TOF), Quadrupole-TOF (Q-TOF) и Orbitrap) продемонстрировало свою эффективность при скрининге образцов пищевых продуктов на наличие большого количества полярных органических соединений [5, 6, 22, 23]. При этом для технологии Q-Orbitrap лучшее разрешение по массе установлено при низких значениях  $m/z$ , в то время как для Q-TOF — при высоких [24]. Превосходные характеристики MS-VP обусловлены возможностью получения полного спектра с точными массами и достаточной чувствительностью, что позволяет определить множество соединений в рамках одного анализа без необходимости их выбора до получения масс-спектра [5, 24, 25]. Соответственно, всегда возможен ретроспективный анализ, так как получен набор данных по всем соединениям, при-

сутствующим в пробе при условии достаточного отклика детектора.

Существует вероятность получения ложноотрицательных результатов, обусловленная сдвигом по массе («призрачные» пики), и ложноположительных — вследствие помех изобарных соединений или выбора слишком широкого окна извлекаемых масс [6, 24]. Для повышения надежности идентификации и минимизации отклонения по массе до допустимого значения ( $<10 \cdot 10^{-6}$  Да) используют внешнюю или внутреннюю калибровку.

Внедрение в практику рутинного анализа масс-спектрометрии высокого разрешения, позволяющей получать для всех присутствующих в образце анализов полный спектр с точными массами, ограничивается последним десятилетием. В настоящее время немного работ посвящено нецелевому анализу продукции животноводства, так как он подразумевает поиск в образцах любых потенциальных загрязняющих веществ, а это непростая задача. Во многом затруднения при разработке таких методик обусловлены сложностью самих матриц и отсутствием стандартизированных библиотек для ранее неизученных соединений [14].

В случае небольшого числа анализов возможен нецелевой анализ и хроматографическими методами с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Например, разработан ВЭЖХ-МС/МС-методика определения тиаметоксама, лямбда-цигалотрина, дельтаметрина и металаксила и их метаболитов в дайконе [26]. Нецелевой поиск загрязнителей выявил присутствие метаболитов лямбда-цигалотрина и дельтаметрина в растениях, подвергшихся воздействию пестицидов в условиях эксперимента, а кроме того, были обнаружены неспецифические (лейцин и тирамин) и специфические (адреналин, дофамин, триптамин и серотонин) маркеры воздействия на растения указанных соединений.

Для устранения помех совместно элюирующихся соединений (изобарных и изомерных) возможно использование двумерной хроматографии, как, например, в случае с ГХ × ГХ-МС определением хлорорганических пестицидов, диоксинов, полихлорированных бифенилов и дибензофуранов или определением пептидов методом ВЭЖХ × ВЭЖХ-МС-VP [27].

Однако преимущества, предоставляемые MS-VP (TOF — времяпролетная масс-спектрометрия, MS-VP и Orbitrap) по сравнению с классической tandemной масс-спектрометрией очень существенны [23, 25]. Во-первых, это сбор полноспектральных данных с высокой точностью измеряемых масс, что делает возможными скрининг большого количества соединений и их идентификацию. Во-вторых, появляется возможность рет-

роспективного анализа данных, так как присутствие соединений в образцах исследуют после выполнения анализа и получения полных спектральных данных, без предварительного выбора аналитов. И в-третьих, возможно выяснение структуры неизвестных или предполагаемых соединений. Из недостатков можно отметить равную или меньшую чувствительность по сравнению, например, с МС/МС с тройным квадруполом, однако в случае решения задач предварительного скрининга образцов и идентификации аналитов в ней зачастую нет необходимости [23, 24, 28]. Кроме того, сверхвысокое разрешение, как правило, не влияет на значение пределов обнаружения/определения, даже если является ключевым параметром для повышения селективности или выявления точного распределения изотопов и химического состава [24]. Большая же чувствительность приборов с тройным квадруполом может быть и результатом интенсивного развития приборостроения (более эффективные линзы, ионные направляющие и т.д.), а не результатом применения самой технологии. Нецелевой скрининг долгое время применялся преимущественно в экологическом мониторинге, как правило, для нецелевого анализа водных источников [29]. Но в последнее время растет число исследований, использующих его для изучения более сложных матриц, а именно, биологических образцов, пищевой продукции и кормов для животных [24, 30]. Мешающее влияние матрицы, даже сложной (мясо, яйца, продукция, содержащая растительные и животные компоненты), можно устранить разбавлением пробы, так как чувствительности современных МС-ВР-приборов будет достаточно для надежного скрининга [5].

Наиболее важная для идентификации информация — это масс-спектральные данные. Большинство современных коммерческих программных продуктов Compound Crawler (Bruker, США) и Thermo SIEVE (Thermo Fisher Scientific, США) имеет доступ к химическим базам данных CAS, PubChem и ChemSpider для онлайн-поиска точных моноизотопных масс молекул [15]. Библиотеки масс-спектров являются основными источниками спектральной информации о соединениях. Они содержат масс-спектры ЭИ-МС<sup>1</sup> (электронная ионизация) многих летучих соединений, а также полученные в тандемном режиме преимущественно для нелетучих веществ МС<sup>2</sup> и МС-ВР<sup>2</sup> (электрораспылительная ионизация). Наиболее крупные из них: Wiley Registry, NIST 20, METLIN, MassBank of North America (MONA), mzCloud, The Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) и MassBank [6, 14, 21]. Однако для удобства работы на их основе могут быть созданы и использованы собственные коллекции, более узкоспециализиро-

ванные. В настоящее время отмечена необходимость модернизации и улучшения качества библиотек тандемных масс-спектров.

### Нецелевой анализ продукции животноводства

В скрининговой методике, основанной на ВЭЖХ-МС-ВР, ключевыми параметрами идентификации являются время удерживания и точные массы иона-предшественника (прекурсора) и дочерних ионов [22]. В настоящее время для получения одновременно спектров МС и МС/МС всех компонентов пробы в одном аналитическом цикле используют два основных режима. Первый — режим сбора, зависящий от данных (DDA — Data-Dependent Acquisition mode): в определенном диапазоне масс все молекулы фрагментированы, на первом этапе масс-спектрометр выбирает наиболее интенсивные ионы, выполняя сканирование ионов-предшественников с высоким разрешением, а затем на втором этапе эти ионы подвергают фрагментации и анализируют при сопоставлении с базами данных МС/МС, содержащими все теоретические спектры, т.е. реализуется подход тандемной масс-спектрометрии. Зависимый от данных характер эксперимента ограничивает динамический диапазон метода, т.е. преимущественно будут отобраны аналиты, присутствующие в высоких концентрациях, а информация о веществах с низкой концентрацией может быть неполной. Второй режим сбора — не зависящий от данных (DIA — Data-Independent Acquisition mode): для каждого цикла прибор фокусируется на узком «окне» масс и получает МС/МС данные для всех обнаруженных прекурсоров, затем это «окно» проходит через весь диапазон масс, систематически собирая данные МС/МС для каждой массы и всех обнаруженных прекурсоров. Оба режима сбора данных используют для скрининга остаточных содержаний пестицидов, лекарственных препаратов для животных и микотоксинов в различных матрицах.

В целом DDA подходит для скрининга целевых соединений, а DIA — для нецелевых, но высока вероятность ложноположительных результатов [22]. DIA не требует предварительной информации об ионах-предшественниках, так как все ионы в пределах выбранного диапазона масс подвергаются фрагментации, а DDA может эффективно идентифицировать целевые аналиты. Поэтому для идентификации продуктов разложения и метаболитов лекарственных препаратов, пестицидов и микотоксинов предпочтителен подход DIA. ВЭЖХ- и УВЭЖХ-МС-ВР в сочетании с комбинацией этих двух режимов могут быть использованы для получения полной информации о загрязнителях пищевой продукции. Полуколи-

чественное определение возможно при использовании стандартов со сходной структурой или при оценке относительной чувствительности методик к различным соединениям [21].

Метод ВЭЖХ-МС-ВР (Orbitrap) в сочетании с режимом сбора данных DIA предложен в рамках нецелевого анализа для определения в кормах для животных 150 лекарственных препаратов для ветеринарного применения [30] (таблица). Программное обеспечение TraceFinder (Thermo Scientific), использованное для идентификации аналитов, включает несколько основных параметров: точная масса иона-предшественника и его изотопная структура (при полном сканировании), фрагментарные ионы (специфичные для соединения) и время удерживания. Критериями для идентификации и дальнейшей оценки данных являются: обнаружение иона-предшественника с точностью по массе  $\pm 5 \cdot 10^{-6}$ , как минимум один характеристический фрагментарный ион с той же точностью и интенсивностью выше 5000; оценка изотопной структуры иона-предшественника [6, 30]. Результаты показали, что доля подтвержденных в режиме DIA препаратов с добавками может достигать 96 %. Подход также показал более «чистые» спектры дочерних ионов и позволил обнаружить и подтвердить порядка 85 % соединений в концентрации ниже  $5 \cdot 10^{-9}$ , что свидетельствует о специфичности и чувствительности анализа.

В работе [29], напротив, отмечены преимущества DDA при сопоставлении спектров с базой данных mzCloud™ (масс-спектральные данные для идентификации малых молекул с помощью тандемной масс-спектрометрии, более 18 500 соединений и 7 миллионов масс-спектров с высокими разрешением и точностью) [31]. Первоначальный сбор данных в режиме полного сканирования проводили с разрешением 140 000 (максимально возможным для Q-Exactive Orbitrap™, Thermo Scientific), определенным на FWHM при  $m/z$  200 в диапазоне от 80 до 1075  $m/z$ . Использование этого подхода позволило осуществить целевой поиск в кормовой перьевой муке соединений из списка предполагаемых загрязнителей, основанный на изменении точных масс и времени удерживания. В то же время он дал возможность обнаруживать неожиданные соединения без предварительной информации. Было проведено пилотное исследование. Три из четырнадцати идентифицированных антибиотиков, а именно, азитромицин, гатифлоксацин и левофлоксацин, не были включены в список предполагаемых загрязнителей.

Исследование метаболитов и продуктов трансформации пестицидов, микотоксинов и лекарственных препаратов представляет собой сложную аналитическую задачу. Нецелевой ана-

лиз может быть сосредоточен одновременно на поиске ранее зарегистрированных метаболитов («известные неизвестные») и неизвестных соединений («неизвестные неизвестные») [21, 24]. В последнем случае могут быть применены различные стратегии, в которых особое внимание уделяется исследованию общих фрагментарных ионов между исходным пестицидом и его метаболитами [15].

Методики УВЭЖХ-МС-ВР (времяпролетный детектор) разработаны для нецелевого анализа продуктов термической трансформации малахитового и лейкомалахитового зеленого в форели и креветках [32], биodeградации сульфацида и сульфатиазола [33] и метаболизма диацетокси-скирпенола *in vitro* микросомами печени крысы, курицы, свиньи, козы, коровы и человека [34] (см. таблицу). В первой работе предварительно идентифицированы три продукта трансформации, образующиеся в результате расщепления конъюгированной структуры и деметилирования. Отмечено, что для оценки риска здоровью потребителей необходимы дальнейшие исследования. Во второй работе в экспериментах *in vivo* и *in vitro* идентифицировано восемь промежуточных продуктов разложения сульфацида, поскольку его десульфонирующая часть является наиболее часто обнаруживаемой, и в общей сложности пять продуктов сульфатиазола. В третьем исследовании обнаружено десять метаболитов диацетокси-скирпенола, из них идентифицировано лишь шесть, отмечены качественные различия в метаболических профилях микотоксина между культурами клеток пяти видов животных и человека.

Методика УВЭЖХ-МС-ВР разработана для нецелевого скрининга неожиданных загрязнителей в молоке, предел обнаружения — 25 мкг/кг [28]. Использовали колонку с обращенно-фазным сорбентом и электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительных ионов. Для имитации неизвестного загрязнения в образцы молока добавлено 19 химически разнообразных модельных соединений. Для оценки данных использовали программное обеспечение TraceMass 2, целевой поиск конкретных загрязнителей не осуществляли. На уровне предела обнаружения идентифицировано 17 из 19 соединений (в форме интактных ионов-предшественников, фрагментарных ионов или аддуктов).

В связи с противоречивостью информации о применимости режимов сбора данных DIA и DDA необходимы интегрированные подходы, сочетающие оба режима. Для преодоления их ограничений предложен интегрированный метод сбора данных с использованием УВЭЖХ-МС-ВР (Orbitrap) [22]. Методика применена для определения 180 ветеринарных препаратов в молоке,

220 пестицидов в томатах и 50 микотоксинов в кукурузе. Предложенный подход определения характеристик соединений за один аналитический цикл обеспечивает более высокую воспроизводимость идентификации и меньшее количество ложных результатов для целевых соединений, а кроме того, лучшие характеристики идентификации нецелевых соединений, таких как метаболиты и продукты разложения. При подготовке образцов для определения лекарственных ветеринарных препаратов в молоке предварительно осуществляли преципитацию белков, а затем проводили твердофазную экстракцию (ТФЭ) с помощью картриджей Oasis HLB. Гидрофильно-липофильный балансный сорбент (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) селективен и эф-

фективен при выделении полярных соединений [37]. Пестициды извлекали методом QuEChERS, для повышения эффективности извлечения (благодаря эффекту высаливания) использовали безводные сульфат магния и ацетат натрия, последующую очистку проводили добавлением сорбентов PSA и C18 (в присутствии  $MgSO_4$ ). Преимущества метода в его простоте, высокой производительности и меньших объемах органических растворителей на этапе экстракции [38]. Для извлечения микотоксинов применяли одностадийную твердофазно-жидкостную экстракцию ацетонитрилом с добавлением воды и уксусной кислоты. Цикл сканирования в интегрированном методе сбора данных состоял из полного сканирова-

Определение пестицидов, микотоксинов и лекарственных препаратов, их метаболитов и продуктов трансформации в пищевой продукции и биологических образцах в рамках нецелевого анализа методами ВЭЖХ- и УВЭЖХ-МС-ВП

Determination of pesticides, mycotoxins and veterinary drugs, their metabolites and transformation products in food and biological samples within non-targeted analysis by HPLC- and UHPLC-MS-VP

Аналит	Матрица/пробоподготовка	Метод определения, детектор, колонка, подвижная фаза	Предел обнаружения	Литература
11 СА	Мед/QuEChERS	ВЭЖХ-МС-ВП (Orbitrap), Hypersil Gold C18 (100 × 2,1 мм, 1,9 мкм), $H_2O$ + 0,1 % МК + 5 мМ ФА – 0,1 % МК + 5 мМ ФА + АЦН	0,02 – 0,12 мкг/кг	[13]
220 препаратов, 180 пестицидов и 50 микотоксинов	Молоко, томаты, кукуруза/Осаждение белков — ТФЭ, QuEChERS, ТЖЭ	УВЭЖХ-МС-ВП (Orbitrap)	1 мкг/кг	[22]
19 загрязнителей	Молоко/ЖЖЭ	УВЭЖХ-МС-ВП, Acclaim RSLC 120 C18 (100 × 2,1, 2 мкм), $H_2O$ + 5 мМ ФА + 0,02 % МК + метанол (11 – 100 %)	25 мкг/кг	[28]
150 препаратов	Корма/ТЖЭ (метанол)	ВЭЖХ-МС-ВП (Orbitrap), Accucore™ C8 (100 × 2,1 мм, 2,6 мкм), 0,01 % МК + $H_2O$ – 0,01 % МК + АЦН	$<5 \cdot 10^{-9}$	[30]
Продукты термической трансформации МЗ и ЛМЗ	Форель и креветки/QuEChERS	УВЭЖХ-МС-ВП, Poroshell 120 (100 × 3,0, 2,7 мкм), $H_2O$ + 0,1 % МК – АЦН и 0,05 М АА – АЦН	0,3 – 0,9 нг/г	[32]
Продукты биодegradации СП и СТЗ	Грибковые гранулы и КГ/Фильтрация питательной среды	УВЭЖХ-МС-ВП, Acquity VEN C18 column (10 × 2,1 мм, 1,7 мкм), $H_2O$ + 10 мМ МК – АЦН + 10 мМ МК	—	[33]
Метаболиты ДАС	КК/ЖЖЭ	УВЭЖХ-МС-ВП, Acquity VEN RP18 (50 × 2,1 мм, 1,7 мкм), 0,005 мМ аммиак – АЦН	—	[34]
Продукты трансформации пестицидов и препаратов	Мед, мясо, корма и продукты из гинкго билоба, сои, маточного молочка и зеленого чая/QuEChERS, ТЖЭ — разбавление	УВЭЖХ-МС-ВП (Orbitrap), Hypersil GOLD aQ C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм), 0,1 % МК + 4 мМ ФА – 0,1 % МК + 4 мМ ФА + метанол	—	[35]
Пестициды и афлатоксины	Детское питание/QuEChERS	УВЭЖХ-МС-ВП (Orbitrap), Zorbax Eclipse plus C18 (100 × 2,1 мм, 1,8 мкм), 0,1 % МК + 4 мМ ФА – 0,1 % МК + 4 мМ ФА + метанол	0,02 – 4,0 мкг/кг	[36]

Примечание. АА — ацетат аммония; АЦН — ацетонитрил; ВП — времяпролетный детектор; ДАС — диацетокси-скирпенол; ЖЖЭ — жидкость-жидкостная экстракция; КГ — культура грибов; КК — культура клеток; ЛМЗ — лейкома-лахитовый зеленый; МЗ — малахитовый зеленый; МК — муравьиная кислота; СА — сульфаниламиды; СП — сульфами-ридин; СТЗ — сульфатиазол; ТЖЭ — твердофазно-жидкостная экстракция; ФА — формиат аммония.

ния (разрешение на уровне 70 000 FWHM при  $m/z$  200 в диапазоне  $m/z$  от 100 до 1000), за которыми следовали DDA и DIA. Точная масса и элементный состав 450 аналитов были определены заранее. Для обработки и анализа данных использовали программное обеспечение Trace-Finder 3.0 (Thermo). Предложенным интегрированным методом были получены времена удерживания, а также точные массы ионов-предшественников и основных фрагментарных ионов для каждого соединения, а информация была импортирована в базу данных. Идентификацию и скрининг целевых и нецелевых аналитов проводили на основе SANTE/12682/2019 или соответствующего документа FDA [22]. Параметры определяли для двух уровней концентраций — 1 и 10 мкг/кг. К ложноотрицательным результатам в связи с отсутствием фрагментации приводит низкое содержание ионов-предшественников, отсутствующих в предварительно интегрированной базе данных. Разработанный подход позволил не только идентифицировать заранее внесенные в базу данных зеараленон и  $\alpha$ -зеараленон в образцах кукурузы, но и нецелевые замаскированные формы микотоксинов, а именно, их метаболиты зеараленон-14-глюкозид и  $\alpha$ -зеараленон-глюкозид.

На данный момент в рамках нецелевого (ретроспективного) анализа безопасности пищевой продукции в меде обнаружен ангидроэритромицин (метаболит эритромицина), в кормах — 3,5,6-трихлор-2-пиридиол (продукт трансформации хлорпирифоса) [35], в детском питании на мясной и овощной основе, кроме десяти пестицидов (аллетрин, хлорантранилипрол, изопрокарб, промекарб, пропоксур, дизтофенкарб, додин, пропамокарб, тринексапак-этил и пиперонилбутоксид), идентифицирован альдикарб сульфоксид (метаболит альдикарба) [36].

В настоящее время более 100 млн структур соединений зарегистрировано в ChemSpider (бесплатная база данных по химической структуре веществ), пять лет назад их было в два раза меньше. В рамках одной процедуры нецелевого анализа невозможно определить их все. При обнаружении и выяснении структуры новых, не описанных ранее соединений («известные неизвестные»), в дополнение к MS-VP целесообразно использование ЯМР-спектроскопии [14, 21]. Но существующая информация о возможных метаболитах лекарственных препаратов, пестицидов и микотоксинов («известные неизвестные») в рамках решения практических задач при обеспечении пищевой безопасности позволит провести их приоритизацию и существенно сузить область поиска при проведении ретроспективного анализа, тем самым обеспечив его надежность и эффективность. Современные стратегии монито-

ринга с использованием ВЭЖХ- и УВЭЖХ-МС-VP нацелены на ограниченное число заранее известных веществ, но при этом позволяют обнаружить неожиданные, потенциально опасные для животных и человека вещества.

## Заключение

Современная система обеспечения пищевой безопасности и в России, и за рубежом фокусируется на веществах, содержание которых регулируется законодательством и которые, как ожидается, будут обнаружены в конкретных пищевых продуктах. Существующие хроматографические методики с tandemным масс-спектрометрическим детектированием не способны идентифицировать и определить в рамках целевого анализа продовольственного сырья и пищевой продукции неожиданные загрязнители. Сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения (Orbitrap и QTOF) позволяет провести не только поиск исходных загрязнителей в сложных матрицах, но и продуктов их трансформации, что в перспективе поможет решить задачу поиска «иголки в стоге сена», т.е. обнаруживать потенциально опасные, не идентифицированные ранее контаминанты.

При внедрении методик нецелевого поиска в рутинную практику анализа продукции животноводства область поиска можно ограничить «известными неизвестными». Это возможно не только благодаря уже имеющимся сведениям о метаболитах лекарственных препаратов, пестицидов и микотоксинов, но и на основании собственных экспериментальных данных, полученных в экспериментах *in vivo*. Так как режимы DDA и DIA по отдельности имеют ограничения, для решения практических задач в рамках реализации риск-ориентированного подхода при обеспечении безопасности продукции животноводства необходим интегрированный подход сбора данных с использованием УВЭЖХ-МС-VP (Orbitrap). Применение УВЭЖХ-МС-VP для широкого спектра аналитов потребует разработки унифицированной пробоподготовки, позволяющей избежать разложения чувствительных к агрессивным средам аналитов и одновременно извлекать соединения различных групп с существенно различающимися свойствами.

## Финансирование

Работа выполнена на базе отдела безопасности пищевой и кормовой продукции ФГБУ «ВГНКИ».

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. **Frenich A. G., Romero-González R., del Mar Aguilera-Luiz M.** Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS / *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2014. Vol. 63. P. 158 – 169. DOI: 10.1016/j.trac.2014.06.020
2. **Medina D. A. V., Borsatto J. V. B., Maciel E. V. S., Lanças F. M.** Current role of modern chromatography and mass spectrometry in the analysis of mycotoxins in food / *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2021. Vol. 135. 116156. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116156
3. **Nácher-Mestre J., Ibáñez M., Serrano R., et al.** Investigation of pharmaceuticals in processed animal by-products by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry / *Chemosphere.* 2016. Vol. 154. P. 231 – 239. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.03.091
4. **Jongedijk E., Fifeik M., Arrizabalaga-Larrañaga A., et al.** Use of high-resolution mass spectrometry for veterinary drug multi-residue analysis / *Food Control.* 2023. Vol. 145. 109488. DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109488
5. **Pérez-Ortega P., Lara-Ortega F. J., García-Reyes J. F., et al.** A feasibility study of UHPLC-HRMS accurate-mass screening methods for multiclass testing of organic contaminants in food / *Talanta.* 2016. Vol. 160. P. 704 – 712. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.08.002
6. **Knolhoff A. M., Croley T. R.** Non-targeted screening approaches for contaminants and adulterants in food using liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry / *J. Chromatogr. A.* 2016. Vol. 1428. P. 86 – 96. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.059
7. **Lavrukhina O. I., Amelin V. G., Kish L. K., et al.** Determination of pesticide residues in environment and food — A review / *Khim. Bezopasnost'.* 2022. Vol. 6. N 2. P. 81 – 116 [in Russian]. DOI: 10.25514/chs.2022.2.23006
8. **Baduel C., Mueller J. F., Tsai H., Ramos M. J. G.** Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices / *J. Chromatogr. A.* 2015. Vol. 1426. P. 33 – 47. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.040
9. **Steiner D., Sulyok M., Malachová A., et al.** Realizing the simultaneous liquid chromatography-tandem mass spectrometry based quantification of >1200 biotoxins, pesticides and veterinary drugs in complex feed / *J. Chromatogr. A.* 2020. Vol. 1629. 461502. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461502
10. **Musarurwa H., Chimuka L., Pakade V. E., Tavengwa N. T.** Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis / *J. Food Compos. Anal.* 2019. Vol. 84. 103314. DOI: 10.1016/j.jfca.2019.103314
11. **Eyring P., Tienstra M., Mol H., et al.** Development of a new generic extraction method for the analysis of pesticides, mycotoxins, and polycyclic aromatic hydrocarbons in representative animal feed and food samples / *Food Chem.* 2021. Vol. 356. 129653. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129653
12. **Milman B. L., Zhurkovich I. K.** Summarized criteria of chemical compounds identification by chromatography-mass spectrometry / *Analitika Kontrol'.* 2020. Vol. 24. N 3. P. 164 – 173 [in Russian]. DOI: 10.15826/analitika.2020.24.3.003
13. **Kirkan E., Tahir A. O., Bengü A. Ş., et al.** Rapid determination of sulfonamide residues in honey samples using non-targeted liquid chromatography-high resolution mass spectrometry / *Sep. Sci. plus.* 2020. Vol. 3. N 10. P. 451 – 459. DOI: 10.1002/sscp.202000051
14. **López-Ruiz R., Romero-González R., Frenich A. G.** Metabolomics approaches for the determination of multiple contaminants in food. *Curr. Opin. Food Sci.* 2019. Vol. 28. P. 49 – 57. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.08.006
15. **Milman B. L., Zhurkovich I. K.** The chemical space for non-target analysis / *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2017. Vol. 97. P. 179 – 187. DOI: 10.1016/j.trac.2017.09.013
16. **Musarurwa H., Tavengwa N. T.** Supramolecular solvent-based micro-extraction of pesticides in food and environmental samples / *Talanta.* 2021. Vol. 223. Part 1. 121515. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121515
17. **Jouyban A., Farajzadeh M. A., Mogaddam M. R. A.** Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of deep eutectic solvent droplets for analysis of pesticides in farmer urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry / *J. Chromatogr. B.* 2019. Vol. 1124. P. 114 – 121. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.06.004
18. **Shahi M., Javadi A., Mogaddam M. R. A., et al.** Extraction of some antibiotics from propolis samples using homogenous liquid-liquid extraction coupled with deep eutectic solvent-based hollow fibre protected preconcentration / *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2022. Vol. 102. N 18. P. 6422 – 6434. DOI: 10.1080/03067319.2020.1811261
19. **Saei A., Javadi A., Mogaddam M. R. A., et al.** Development of homogeneous liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating droplets of a ternary component deep eutectic solvent for the analysis of antibiotic residues in sausage samples prior to ion mobility spectrometry / *Anal. Methods.* 2020. Vol. 12. N 34. P. 4220 – 4228. DOI: 10.1039/d0ay01282c
20. **Saei A., Javadi A., Mogaddam M. R. A., et al.** Determination of three antibiotic residues in hamburger and cow liver samples using deep eutectic solvents-based pretreatment method coupled with ion mobility spectrometry / *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2022. Vol. 102. N 12. P. 2714 – 2728. DOI: 10.1080/03067319.2020.1759564
21. **Milman B. L., Zhurkovich I. K.** Present-Day Practice of Non-Target Chemical Analysis / *J. Anal. Chem.* 2022. Vol. 77. P. 537 – 549. DOI: 10.1134/S1061934822050070
22. **Sun F., Tan H., Li Y., et al.** An integrated data-dependent and data-independent acquisition method for hazardous compounds screening in foods using a single UHPLC-Q-Orbitrap run / *J. Hazard. Mater.* 2021. Vol. 401. 123266. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123266
23. **Campo J., Picó Y.** Chapter 10 — Emerging Contaminants. Ed. Y. Picó. *Comprehensive Analytical Chemistry.* — Elsevier, 2015. Vol. 68. P. 515 – 578. DOI: 10.1016/B978-0-444-63340-8.00010-8
24. **Rochat B.** From targeted quantification to untargeted metabolomics: Why LC-high-resolution-MS will become a key instrument in clinical labs / *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2016. Vol. 84. Part B. P. 151 – 164. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.009
25. **Ibáñez M.** Chapter 13 — Multiresidue methods for pesticides and related contaminants in food. *Liquid Chromatography (Second Edition)* / Eds.: S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, M.-L. Riekkola. — Elsevier, 2017. P. 381 – 400. DOI: 10.1016/B978-0-12-805392-8.00013-X
26. **Danek M., Plonka J., Barchanska H.** Metabolic profiles and non-targeted LC-MS/MS approach as a complementary tool to targeted analysis in assessment of plant exposure to pesticides / *Food Chem.* 2021. Vol. 356. 129680. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129680
27. **Ortiz-Almirall X., Pena-Abaurrea M., Jobst K. J., Reiner E. J.** Chapter 14 — Nontargeted Analysis of Persistent Organic Pollutants by Mass Spectrometry and GC × GC / Eds.: S. Pérez, P. Eichhorn, D. Barceló / *Comprehensive Analytical Chemistry.* — Elsevier, 2016. Vol. 71. P. 405 – 431. DOI: 10.1016/bs.coac.2016.01.013
28. **Kunzelmann M., Winter M., Åberg M., et al.** Non-targeted analysis of unexpected food contaminants using LC-HRMS / *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. Vol. 410. N 22. P. 5593 – 5602. DOI: 10.1007/s00216-018-1028-4
29. **Jansen L. J. M., Nijssen R., Bolck Y. J. C., et al.** Systematic assessment of acquisition and data-processing parameters in the suspect screening of veterinary drugs in archive matrices using LC-HRMS / *Food Addit. Contam., Part A.* 2022. Vol. 39. N 2. P. 272 – 284. DOI: 10.1080/19440049.2021.1999507
30. **Zhou Z., Jiang Z.** Evaluation of Variable Data Independent Acquisition (vDIA) Approach for Nontarget Screening of Veterinary Drugs in Animal Feed / *Thermo Fisher Scientific Inc.*

- <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CMD/posters/PN-64426-MS-vDIA-Veterinary-Drugs-Animal-Feed-ASMS2015-PN64426-EN.pdf> (accessed 17.03.2023).
31. mzCloud™. Advanced Mass Spectral Database. <https://www.mzcloud.org> (accessed 28.02. 2023).
  32. **Baesu A., Audet C., Bayen S.** Application of non-target analysis to study the thermal transformation of malachite and leucomalachite green in brook trout and shrimp / *Curr. Res. Food Sci.* 2021. N 4. P. 707 – 715. DOI: 10.1016/j.crfs.2021.09.010
  33. **Rodríguez-Rodríguez C. E., García-Galán M. J., Blázquez P., et al.** Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole / *J. Hazard. Mater.* 2012. Vol. 213 – 214. P. 347 – 354. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.02.008
  34. **Yang S., De Boevre M., Zhang H., et al.** Unraveling the *in vitro* and *in vivo* metabolism of diacetoxyscirpenol in various animal species and human using ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry / *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. Vol. 407. P. 8571 – 8583. DOI: 10.1007/s00216-015-9016-4
  35. **Gómez-Pérez M. L., Romero-González R., Vidal J. L. M., Frenich A. G.** Identification of transformation products of pesticides and veterinary drugs in food and related matrices: Use of retrospective analysis / *J. Chromatogr. A.* 2015. Vol. 1389. P. 133 – 138. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.052
  36. **Prata R., López-Ruiz R., Petrarca M. H., et al.** Targeted and non-targeted analysis of pesticides and aflatoxins in baby foods by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry / *Food Control.* 2022. Vol. 139. 109072. DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109072
  37. **Szymańska U., Wiergowski M., Sołtyszewski I., et al.** Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives / *Microchem. J.* 2019. Vol. 147. P. 729 – 740. DOI: 10.1016/j.microc.2019.04.003
  38. **Perestrelo R., Silva P., Porto-Figueira P., et al.** QuEChERS — Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends / *Anal. Chim. Acta.* 2019. Vol. 1070. P. 1 – 28. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.036