На правах рукописи

УТЬЯНОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

Разработка методики определения гетероциклических ароматических аминов в мясной продукции, анализ и управление риском их образования

Специальность 05.18.04 - технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

05.02.23 - стандартизация и управление качеством продукции

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук

Научный руководитель:	доктор технических наук **Кузнецова Оксана Александровна**
Официальные оппоненты:	**Ишевский Александр Леонидович**, доктор технических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», факультет пищевых биотехнологий и инженерии, доцент **Игонина Ирина Николаевна**, кандидат технических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ВНИРО), департамент технического регулирования, руководитель.
Ведущая организация:	ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

Защита диссертации состоится «26» мая 2020 г. В 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета ДМ 006.021.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д.26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им В.М. Горбатова» РАН, www.vniimp.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник А.Н. Захаров

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Разработке методов выявления, изучению механизмов образования и способов снижения содержания в продуктах питания различных ксенобиотиков, в особенности, способных оказывать канцерогенное действие уделяется большое внимание со стороны мировых научных сообществ и регуляторных организаций. В современном обществе онкологические заболевания являются одной из основных причин высокой смертности детского и взрослого населения планеты. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно от рака умирает свыше 8,2 млн человек.

Широко известно, что в результате технологической, в основном, тепловой, обработки сырья и полуфабрикатов, в готовой продуктах могут содержаться потенциально опасные соединения эндогенного происхождения – гетероциклические ароматические амины (ГАА), представляющие собой химические вещества, имеющие в своем строении, как минимум, одно ароматическое кольцо и одну аминогруппу. Как и продукты реакции Майяра, ГАА образуются в продуктах питания животного происхождения под воздействием высоких температур (от 150˚С и выше) при таких распространенных способах приготовления пищи как обжарка, жарение, жарка на открытом огне, в том числе приготовление пищи на гриле, и т.п.

В ряде научных работ была показана взаимосвязь между употреблением человеком продуктов, содержащих в себе ГАА, и проявлением таких онкологических заболеваний, как рак молочных желез, рак прямой кишки и других паренхиматозных органов.

Учитывая, что до 30% случаев смерти от рака связывают с привычками и питанием, исследования, направленные на выявление и оценку риска образования ГАА в пищевых продуктах, на изучение уровней их содержания с целью разработки подходов к нормированию ГАА в термообработанной пищевой продукции, являются актуальными и своевременными.

Важность выбранной научной проблемы и необходимость исследований подтверждают работы отечественных и зарубежных ученых: Дмитриева М.А., Солякова А.А., Sugimura T., Ferlay J., Gibis M., Jagerstad M., Alaejos M.S., Jinap S., Zeng M.., Srinivasan K., Oz F., Tsuchia H., Sunila E., Chonpathompikunlert P., Choi S. и др.

В последние годы, благодаря развитию и усовершенствованию аналитических методов, появилась возможность разработки методики, позволяющей определять содержание ксенобиотиков в очень малых концентрациях (в нанограммах на грамм пробы).

Создание и внедрение методики определения содержания ГАА в пищевой продукции позволит перейти к изучению влияния технологических параметров на процесс синтеза этих ксенобиотиков и созданию нового поколения безопасных технологий на основе их нормирования и разработки механизмов снижения их образования.

Степень разработанности. Отдельные этапы настоящей диссертационной работы выполнены в рамках плана НИР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН «Разработать методологию комплексного мониторинга показателей безопасности и качества мяса и мясных продуктов масс-селективными и хроматографическими методами и систему оценки, управления и прогнозирования технологической адекватности, качества и безопасности мясной продукции» (№ 0585-2014-0005) к государственному заданию.

Методологической основой диссертационной работы служили труды отечественных и зарубежных ученых в области разработки методов контроля безопасности пищевой продукции, анализа и управления рисками, в том числе: методология разработки аналитической методики основана на работах Иванкина А.Н. и Куликовского А.В., методология анализа рисков – на работах Чернухи И.М. и Кузнецовой О.А.

Цель и задачи исследований. Цель работы состояла в разработке методики определения ГАА в мясной продукции, проведении анализа и разработке мероприятий управления риском их образования.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- на основе систематизации и анализа имеющихся научных данных провести идентификацию риска, составить профиль риска ГАА, оценить тяжесть последствия, вероятность реализации и ранг риска;
- провести причинно-следственный анализ образования ГАА и разработать алгоритм оценки критичности технологий по образованию ГАА;
- подобрать условия идентификации ГАА в мясной продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с различным детектированием аналита, а также наиболее оптимальные условия экстракции ГАА из мясной продукции;
- провести исследования продукции, оценить мероприятия по управлению риском и подготовить проект методики определения ГАА в мясной продукции.

Научная новизна. Подобраны и научно обоснованы методологические подходы к извлечению и хроматографической идентификации ГАА в мясной продукции.

Установлены рациональные способы экстрагирования ГАА с постоянной степенью экстракции, в соответствии с которой предложены коэффициенты пересчета для соответствующих аналитов и способа пробоподготовки: для методики с твердофазной экстракции (ТФЭ) аналитов MeIQx и PhIP экспериментально подтверждены значения коэффициентов 4,8 и 2,5, соответственно, для методики с экстракцией диэтилововым эфиром – 9,2 и 3,6, соответственно.

Впервые разработана и апробирована на мясной продукции методика количественной идентификации ГАА, которая обеспечивает выявление этих химических веществ в концентрациях от 1 нанограмма на грамм пробы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана методика определения ГАА в мясной продукции с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-детектированием по технологии мониторинга множественных реакций (MRM), исключающей возможность ложнодостоверной идентификации аналитов.

Проведена оценка риска присутствия ГАА в мясной продукции и разработаны управляющие мероприятия.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методика определения ГАА в мясной продукции.

2. Результаты анализа и мероприятия управления риском образования ГАА в мясной продукции.

Апробация работы. Методологические аспекты выявления ГАА и разработанная методика их идентификации апробированы в аккредитованных испытательных центрах и лабораториях, в частности, референс-лаборатории Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры», НИЦ «Черкизово» и лаборатории биоаналитических исследований ФГБУН НЦБМГ ФМБА России.

Основные результаты работы представлены на Международной научно-практической конференции «Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции», Волгоград, 2018 г.; IV Научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции», Краснодар, 2018 г.; XII Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов организаций в сфере сельскохозяйственных наук «Интенсификация пищевых производств: от идеи к практике», Красково, 2018 г.; XIII Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов «Перспективные исследования и новые подходы к производству и переработке сельскохозяйственного сырья и продуктов питания», Углич, 2019 г.

Личный вклад соискателя. Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач и интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

Публикации. Основное содержание диссертации опубликовано в 11 печатных работах, 4 из которых в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ и 2 - в журналах, индексируемых Scopus и Web of Science. Результаты работ были освещены на 5 международных и всероссийских научно-практических конференциях.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из 3 глав, в т.ч. введения, аналитического обзора научно-технической

литературы, методологической части, результатов собственных исследований, а также выводов, списка использованных информационных источников и приложений. Основное содержание диссертации изложено на 75 страницах, приложения – на 34 страницах.

Содержание работы

Во **введении** обоснованы актуальность и целесообразность проводимой работы, сформулирована цель и задачи исследований.

В **литературном обзоре** представлен анализ отечественных и зарубежных источников относительно механизма образования ГАА, факторов, влияющих на количество образуемых ГАА, а также факторах, позволяющих снизить концентрацию ГАА. Изучены данные о канцерогенных и мутагенных свойствах ГАА, установленных в ходе экспериментов на животных и инфузориях *Tetrahymena pyriformis*. Показана актуальность и необходимость разработки методики определения ГАА в пищевой продукции.

Во **второй главе** «Экспериментальная часть» представлены характеристики объектов исследований, организация и схема выполнения работы.

Работа проводилась по схеме, представленной на рисунке 1.

В соответствии с целью работы объектами исследований служили:

- обжаренные кусковые полуфабрикаты из свинины (*m. Longissimus dorsi*), говядины (*m. Longissimus dorsi*), мяса кур (*m. Pectoralis major*);
- обжаренные рубленые полуфабрикаты из свинины, говядины и мяса кур с красным молотым перцем;
- стерилизованные кусковые мясные консервы из говядины;
- готовые рубленые кулинарные изделия из говядины (бургеры), приготовленные в ресторанах быстрого питания;
- готовые вторые обеденные блюда с гарнирами (азу из говядины с рисом; азу из говядины с картофельным пюре; азу из говядины с макаронами).

Для разработки методики определения ГАА в мясной продукции в качестве стандартных образцов использовались:

- стандартный образец 2-амино-3,8-диметилимидазо[4,5-f]хиноксалин (MeIQx) производства компании Toronto Research Chemicals (Канада) с содержанием основного вещества не менее 99,0%;
- стандартный образец 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридин (PhIP) производства компании ChemCruz (США) с содержанием основного вещества не менее 95,0%.

Рисунок 1 – Схема выполнения диссертационной работы

В **третьей главе** «Результаты исследований и их обсуждение» приведены экспериментальные данные, на разных этапах выполнения работы.

Идентификация и оценка риска ГАА

В соответствии с поставленными задачами на первом этапе диссертационной работы было выполнено исследование по составлению профиля риска ГАА (рисунок 3).

Профилирование риска показало, что в связи с отсутствием установленных норм и недостаточности информации о токсических и летальных дозах, ГАА в мясной продукции относится к высокому рангу риска.

На основе анализа литературных источников был проведен причинно-следственный анализ с определением факторов, влияющих на образование ГАА в мясной продукции. Результаты представлены на рисунке 2.

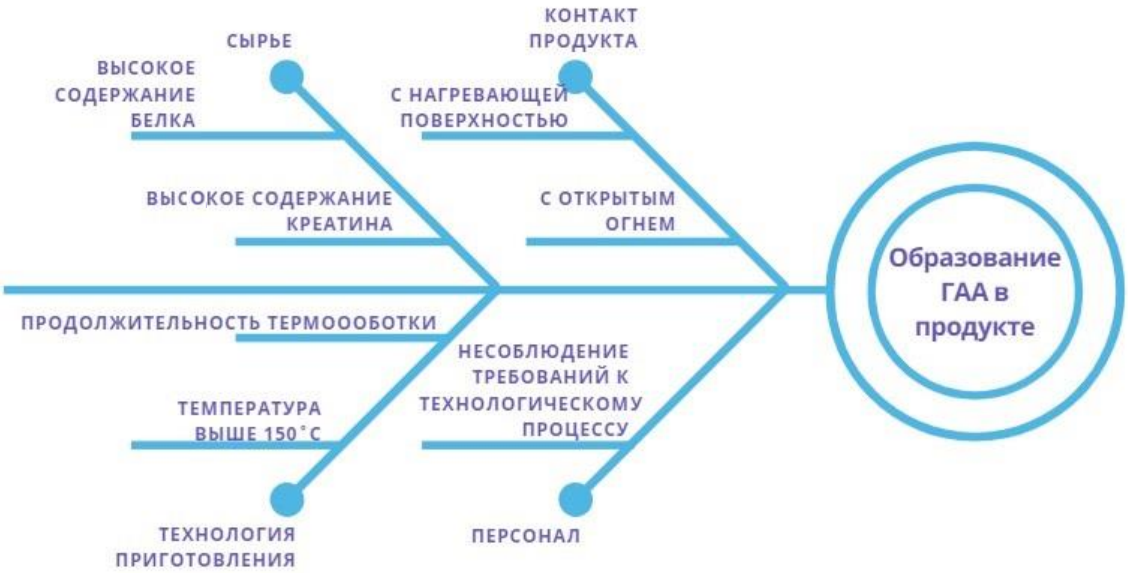

Рисунок 2 – Причинно-следственная диаграмма факторов, влияющих на образование ГАА

С учетом выявленных факторов, приводящих к образованию ГАА, был разработан алгоритм оценки критичности технологии производства мясной продукции (рисунок 4). Группа факторов «персонал» не рассматривалась, поскольку регулируется процедурами предварительных практик систем менеджмента безопасности пищевой продукции. Группа факторов «сырье» не рассматривалась, поскольку при реализации ключевых факторов «технология» и/или «оборудование» образование ГАА в мясной продукции, характеризующейся высоким содержанием белка и креатина в силу особенностей химического состава, будет происходить в любом случае, и вид и характеристики сырья будут влиять только на количество образовавшихся ГАА.

Рисунок 3 – Профиль риска ГАА

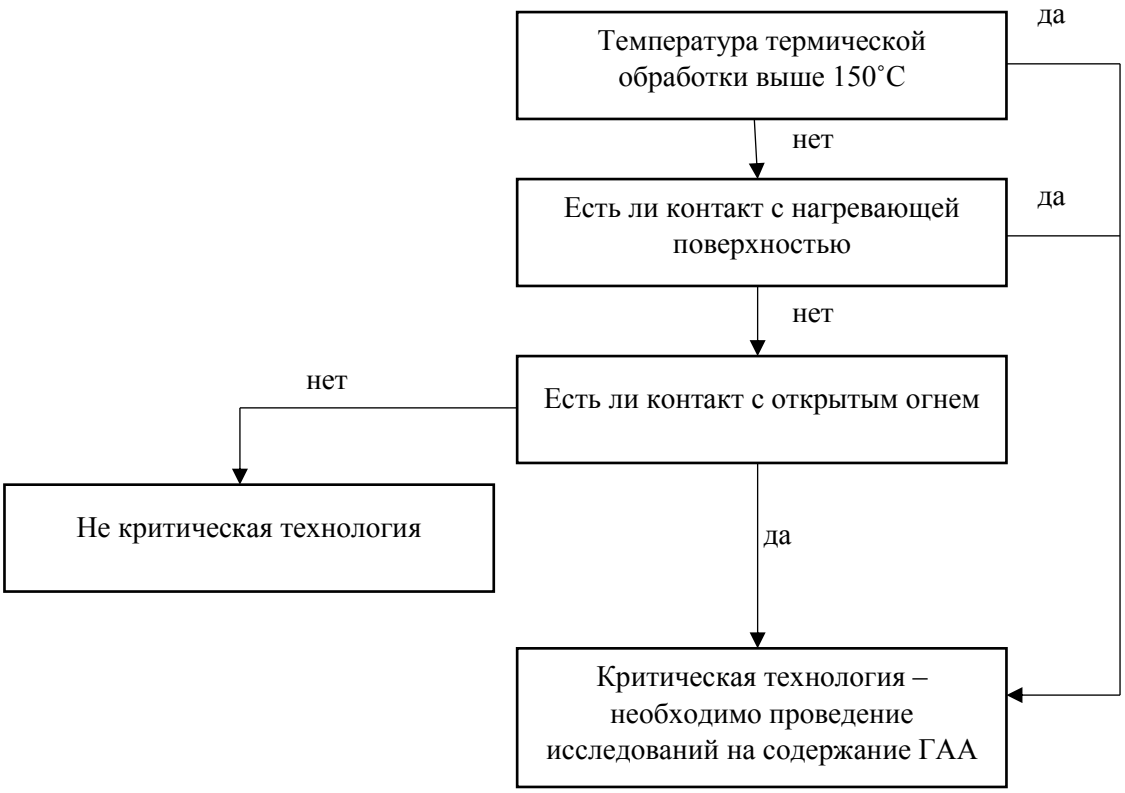

Рисунок 4 – Алгоритм оценки критичности технологии

На основании составленного профиля риска ГАА и выявленного критического технологического этапа «термическая обработка» были оценены:

- тяжесть последствия (Т) – опасный компонент в готовом продукте присутствует, но не превышает установленных нормативных значений (в случае отсутствия нормативов – не оказывает в предполагаемых концентрациях вреда здоровью) – соответствует частично, в связи с этим ранг тяжести последствия был оценен в 4 балла из 10;

- вероятность возникновения (В) – очень высокая (В = 0,10-0,50) или недостаточно научной информации – соответствует полностью, поэтому ранг вероятности возникновения был оценен в 10 баллов из 10;

- возможность выявления (ВВ) – методики выявления отсутствуют – соответствует полностью, ранг риска по критерию возможности выявления оценен в 10 баллов из 10;

Далее было рассчитано приоритетное число риска (ПЧР) по формуле:

$$ПЧР = Т \times В \times ВВ = 4 \times 10 \times 10 = 400 \quad (1)$$

Высокое значение приоритетного числа риска показало важность ГАА в обеспечении безопасности мясной продукции. Высокие значения вероятности возникновения и возможности выявления свидетельствовали о недостаточности научного изучения рассматриваемого риска.

На основе проведенного анализа и составления профиля риска ГАА одним из ключевых факторов его снижения выявлена необходимость

определения ГАА в пищевой продукции. Таким образом, отсутствие методики привело к проведению на следующем этапе работы исследований по подбору условий экстракции ГАА и их хроматографической идентификации.

Подбор условий хроматографической идентификации

Для разработки методики определения ГАА были подобраны условия для их идентификации с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

При подборе условий хроматографической идентификации в качестве реактивов использовали: ацетонитрил для ВЭЖХ, производства Panreac (Франция), муравьиную кислоту Merck (США), деионизованную воду, полученную на системе MilliQDirect 8 (Франция).

Стандартные образцы растворяли в ацетонитриле с последующим их разведением в воде для достижения концентраций 1000, 100, 10 и 1 нг/см^3.

Анализ проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent1200 (США) с трехквадрупольным масс-спектрометром Agilent 6410B.

Для определения ГАА использовали хроматографическую колонку C18, 4,6 x 50 мм, 1,8 мкм (Agilent, США).

Разделение проводили в режиме градиентного элюирования (двухкомпонентная подвижная фаза);

объем вводимой пробы – 0,01 см^3;

скорость потока подвижной фазы – 0,4 см^3/мин;

температура термостата колонки - 35 ºС.

Разработанные условия детектирования аналитических сигналов в режиме MRM представлены в таблице 1.

Таблица 1 – параметры воздействия на ионы в режиме *MRM* и условия ионизации распылением в электрическом поле (*ESI*) с регистрацией положительных (+) и отрицательных (-) ионов

Аналит	Молекулярный ион, *m/z*	Дочерние ионы, *m/z*	Напряжение фрагментора *(Frag)*, В	Энергия диссоциации (*CE*), В
MeIQx	214,6 (+)	199,5	130	30
PhIP	225,6 (+)	210,5	130	30

Подобранные условия и время выхода аналитов, которое представлено на рисунке 5 (хроматограмма наложения общего ионного тока /красный цвет/ на MRM дочерних ионов PhIP /зеленый цвет, время выхода ≈5,9 мин/ и MeIQx /синий цвет, время выхода ≈4,5 мин/) показали, что вещество MeIQx вымывалось с хроматографической колонки при соотношении ацетонитрил:вода, равном 60:40, а вещество PhIP – при соотношении 90:10.

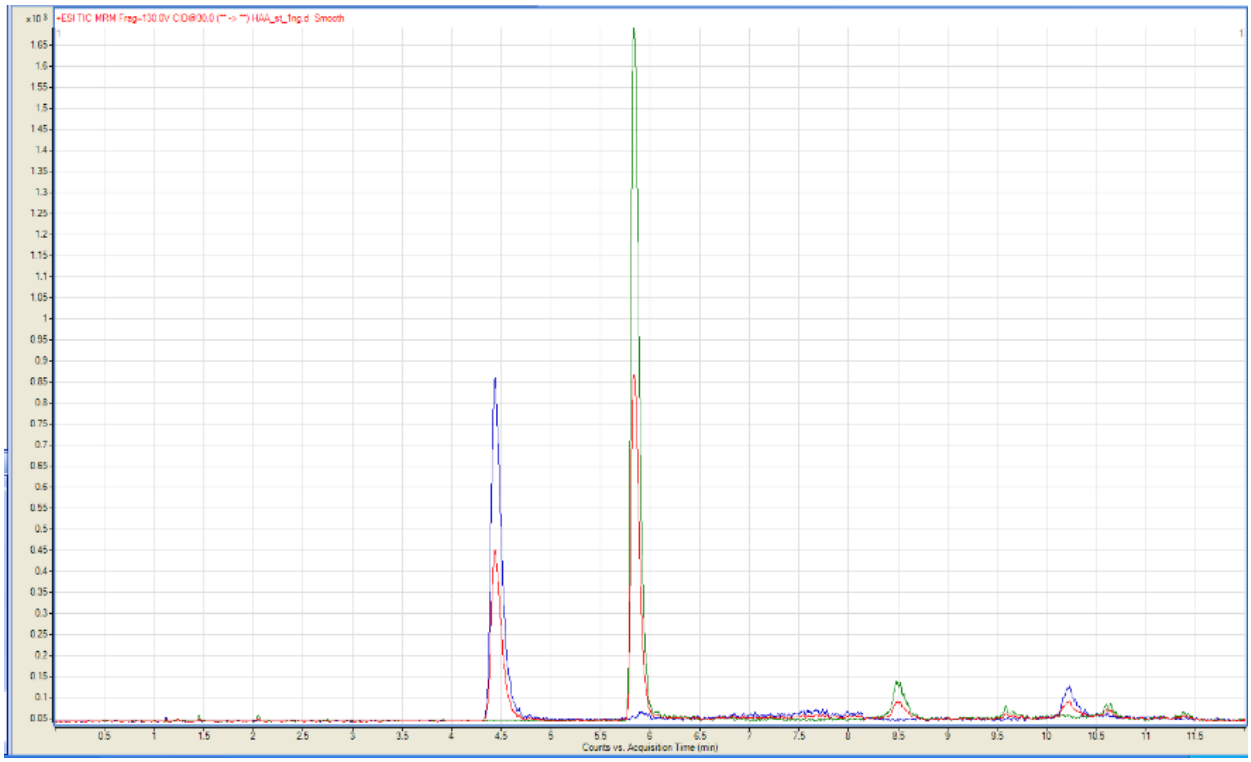

Рисунок 5 – Хроматограмма наложения общего ионного тока на дочерние ионы PhIP и MeIQx

Проведенные исследования показали, что подобранные хроматографические условия позволяют обнаружить ГАА в концентрациях от 1 нг/см^3, что соответствовало возможным концентрации ГАА в реальных пробах пищевой продукции.

Подбор условий экстракции ГАА

Следующим этапом выполнения работы был подбор условий экстрагирования определяемых аналитов из реальных проб пищевой продукции. Были опробованы разные способы пробоподготовки: высаливание с вымыванием ацетонитрилом, высаливание с вымыванием метанолом, кислотный гидролиз, щелочной гидролиз с последующей жидкостной экстракцией гексаном и пр., но они не обеспечивали необходимую степень экстракции ГАА из пищевого матрикса.

Наилучшие результаты были достигнуты после разработки следующих способов пробоподготовки, пригодных для исследований мясной продукции:

- щелочной гидролиз образца с последующей экстракцией ГАА из гидролизата органическим растворителем (в качестве растворителя был выбран диэтилововый эфир); выявленная степень экстракции аналитов составила ≈10,9% и ≈29,4% для MeIQx и PhIP, соответственно.

- щелочной гидролиз с последующей твердофазной экстракцией (ТФЭ); выявленная степень экстракции аналитов составила ≈21% и ≈40,5% для MeIQx и PhIP, соответственно.

Проведены работы по изучению стабильности степени экстракции разработанных способов пробоподготовки, на основании которых

предложены коэффициенты пересчета для аналитов и способа пробоподготовки (таблица 2).

Таблица 2 – коэффициенты пересчета

Определяемый аналит	Коэффициент пересчета для метода с ТФЭ	Коэффициент пересчета для метода с экстракцией диэтилововым эфиром
MeIQx	4,8	9,2
PhIP	2,5	3,4

При подборе условий определения ГАА в мясной продукции с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием было обнаружено сильное влияние матричного эффекта пробы на результаты анализа, что выражалось в смещении времени удерживания определяемых веществ в большую сторону, при этом абсолютная величина смещения составляла до 2,5 минут.

Проблема с подавлением сигнала пищевым матриксом была решена через построение матричной линейной калибровки в диапазонах концентраций от 6 до 600 нг/см^3 и от 5,5 до 550 нг/см^3 для PhIP и MeIQx, соответственно. Для этого в проанализированные ранее пробы, не содержащие определяемых веществ, добавили раствор стандартных образцов до достижения концентраций 6, 10, 15, 30, 60, 100, 150, 300, 600 нг/см^3 и 5.5, 9.1, 13.75, 27.5, 55, 91, 137.5, 275, 550 нг/см^3 для MeIQx и PhIP, соответственно. Такие концентрации были выбраны на основании анализа научной литературы с информацией о количествах, образующихся в мясной продукции ГАА.

При приготовлении растворов для построения калибровки к 800 мкл пробы, не содержащей ГАА, добавляли по 200 мкл растворов установленных концентраций для достижения концентраций 6, 10, 15, 30, 60, 100, 150, 300, 600 нг/см^3 и 5.5, 9.1, 13.75, 27.5, 55, 91, 137.5, 275, 550 нг/см^3 для MeIQx и PhIP, соответственно. Проведенный хроматографический анализ полученных растворов показал сильное уменьшение подавления сигнала из-за матричного эффекта, а полученные результаты позволили построить линейную матричную калибровку.

Полученное при построении линейной калибровки уравнение линейной регрессии имело следующий вид:

- для MeIQx:

$$y = 6048.379788*x – 60190.588646 \quad (2)$$

- для PhIP:

$$y = 14433.213689*x + 21370.000524 \quad (3),$$

где:

y – концентрация аналита, нг/см^3;

x – площадь пика, усл. ед.

Коэффициент корреляции линейной регрессии R составил 0.99. Графики калибровок приведены на рисунках 6 и 7 для MeIQx и PhIP, соответственно.

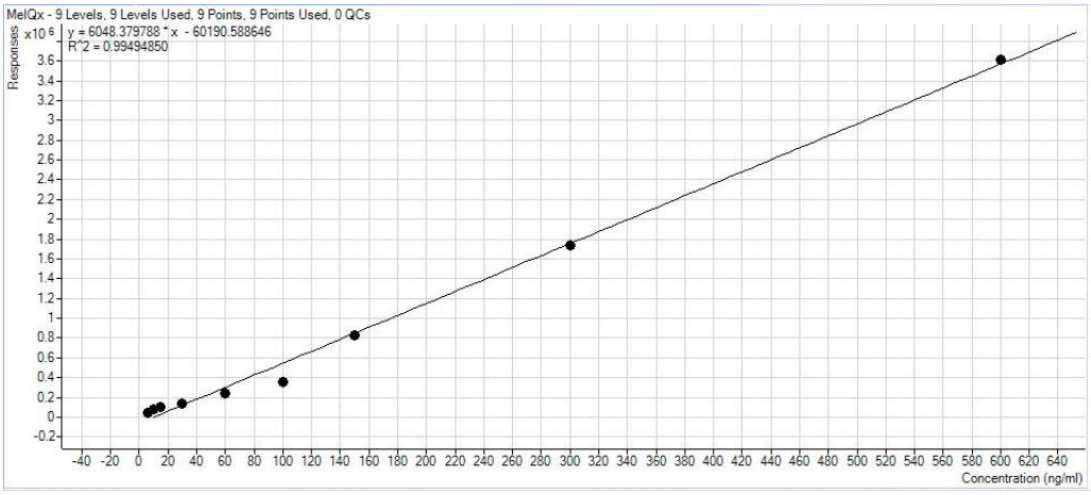

Рисунок 6 – График линейной калибровки для MeIQx

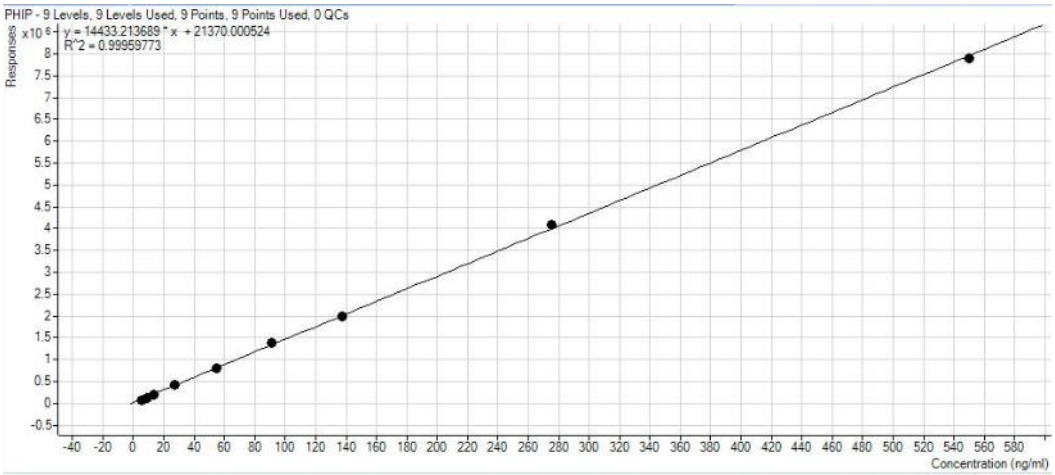

Рисунок 7 – График линейной калибровки для PhIP

Установленный в калибровке диапазон значений концентрации аналита оптимален для исследований ГАА, так как диапазоны обнаруживаемых концентраций составляли в среднем от 5,5 нг/г и от 6,0 нг/г для MeIQx и PhIP, соответственно.

По результатам работ определены предел обнаружения, предел количественного обнаружения и степень извлечения.

Предел обнаружения (LOD) и предел количественного обнаружения (LOQ) определяли как соотношение сигнал/шум (S/N) для дочерних ионов не менее 1:3 для LOD и не менее 1:10 для LOQ. Результаты измерений получены с использованием 12 проб мясного продукта с внесенными MeIQx и PhIP в концентрации 0,1 нг/г; 0,5 нг/г; 1,0 нг/г; 10,0 нг/г. Предел обнаружения (LOD) составил для MeIQx и PhIP 0,5 нг/г. Предел количественного обнаружения (LOQ) составил для MeIQx и PhIP 5 нг/г.

Аналогичные исследования по построению матричной калибровки, определения предела обнаружения, предела количественного обнаружения были проведены и для способа подготовки проб с ТФЭ.

Результаты выполненных исследований показали пригодность подобранных условий хроматографической идентификации и экстракции аналитов из пробы для анализа мясной продукции на содержание в ней ГАА.

Изучение влияния вида сырья и продолжительности термической обработки

На данном этапе работы определяли влияния вида сырья и продолжительности термической обработки на количество ГАА, образующихся в готовой продукции.

В качестве объектов исследования были выбраны мясо кур, свинина и говядина. Из каждого вида сырья формировали по три партии кусковых полуфабрикатов массой 150 г, толщиной 2,5 см. Кусковые полуфабрикаты обжаривали на гриле при температуре 230 ºС. Первую партию обжаривали в течение 5 минут с каждой стороны, вторую партию – в течение 7,5 минут с каждой стороны, третью – в течение 10 минут. Результаты исследования приведены в таблице 3.

Таблица 3 – содержание ГАА в продуктах из различных видов сырья при разной продолжительности термической обработки

Вид сырья	Время обжарки с каждой стороны, мин	Количество обнаруженных ГАА, нг/г		
		MelQx	PhIP	Сумма
Мясо кур	5,0	3,84±1,34	18,61±6,51	22,45±7,86
Свинина		12,02±4,21	35,07±12,27	47,09±16,48
Говядина		6,20±2,17	36,36±12,72	42,55±14,89
Мясо кур	7,5	5,99±2,10	29,77±10,42	35,76±12,52
Свинина		18,63±6,52	55,05±19,27	73,69±25,79
Говядина		9,92±3,47	51,99±18,20	61,90±21,67
Мясо кур	10,0	9,11±3,19	45,25±15,84	54,36±19,03
Свинина		29,26±10,24	83,13±29,10	112,39±37,34
Говядина		15,27±5,35	76,94±26,93	92,21±32,27

Анализ результатов исследования готовых продуктов не выявил большой разницы в суммарной концентрации ГАА, образующихся при жарке свинины и говядины. Однако было установлено, что в жареном мясе кур, сумма ГАА в 1,5-2 раза меньше, чем в жареной свинине или говядине, при

различной продолжительности термической обработки. Очевидно, это было связано с особенностями химического состава мяса птицы.

Увеличение продолжительности термообработки на 2,5 минуты с каждой стороны приводило к возрастанию содержания ГАА в продукте примерно в 1,5 раза. Кроме того, анализ результатов показал, что в свинине образовывалось как наибольшее количество MeIQx, так и наибольшее суммарное количество ГАА.

Проведенные исследования позволили установить, что вид мясного сырья в меньшей степени влиял на содержание ГАА в готовом продукте, чем увеличение продолжительности термической обработки.

Исследования мясной продукции промышленного производства

С целью разработки управляющих мероприятий риска образования ГАА в мясной продукции были проведены исследования по выявлению критических технологий в мясной промышленности. Для этого были проанализированы технологические процессы технология производства основных видов мясной продукции: вареных, варено-копченых, полукопченых и сырокопченых колбасных изделий, мясных стерилизованных консервов.

Проведённый анализ показал, что при промышленном производстве отсутствуют критические технологии образования ГАА. Наиболее приближенная к критическим параметрам технология стерилизованных консервов, в связи с чем далее консервы были исследованы на наличие ГАА.

Для эксперимента были отобраны образцы мясных кусковых консервов из говядины, изготовленные по режимам, соответствующим технологической инструкцией, и образцы, изготовленные с увеличенной продолжительностью стерилизации. Результаты исследований показали, что во всех образцах консервов ГАА содержались в концентрациях ниже предела качественного обнаружения методики.

Проведённый анализ технологий и аналитические исследования мясных кусковых консервов показали, что мясная продукция промышленного производства, изготовленная по традиционным технологиям, не представляла опасности в отношении ГАА, и ее дальнейшее исследование в рамках диссертационной работы было нецелесообразно.

Исследования кулинарных изделий

Кулинарные изделия были выбраны в качестве объектов исследования ввиду того, что их изготовление на предприятиях общественного питания, как правило, проводится при более высоких температурах по сравнению с режимами, используемыми в промышленном производстве мясной продукции. Результаты мониторинговых исследований приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – результаты исследований мясной составляющей вторых обеденных блюд с гарниром

Наименование продукта	Количество обнаруженных ГАА, нг/г мясной составляющей готового изделия		
	MelQx	PhIP	Сумма
Азу из говядины с макаронами	11,50±4,02	Менее 1,0	11,50±4,02
Азу из говядины с картофельным пюре	3,17±1,11	Менее 1,0	3,17±1,11
Азу из говядины с рисом	2,43±0,85	Менее 1,0	2,43±0,85

Как показано в таблице 4, ГАА были обнаружены во всех образцах вторых обеденных блюд. Это свидетельствовало о том, что их употребление потенциально может оказывать негативное воздействие на здоровье человека, причем в образце Азу из говядины с макаронами концентрация ГАА была в 3-5 раз выше относительно других образцов.

В таблице 5 представлены результаты исследования содержания ГАА в бургерах – рубленых кулинарных изделиях из говядины. Образцы были отобраны в трех ресторанах быстрого питания: образец 1 и образец 2 в точках, куда готовые кулинарные изделия доставляли в замороженном виде и подогревали перед подачей потребителю. Образец 3 был отобран в точке, где охлажденный полуфабрикат доводили до кулинарной готовности обжаркой при температуре 250˚С в течение четырех минут с каждой стороны непосредственно перед подачей потребителю.

Таблица 5 – результаты исследований рубленых полуфабрикатов, приготовленных в ресторанах быстрого питания

Наименование продукта	Количество обнаруженных ГАА, нг/г готового изделия		
	MelQx	PhIP	Сумма
Бургер из говядины (образец 1)	0,94±0,33	Менее 1,0	0,94±0,33
Бургер из говядины (образец 2)	1,75±0,61	Менее 1,0	1,75±0,61
Бургер из говядины (образец 3)	7,57±2,65	2,72±0,95	10,29±3,60

Результаты исследования показали, что во всех образцах содержались ГАА. В первых двух образцах было выявлено примерно одинаковые количества ГАА. В третьем образце ГАА были обнаружены в количестве, десятикратно превышающем их содержание в двух первых образцах.

Проведенные на данном этапе выполнения диссертационной работы исследования показали, что кулинарные изделия, реализуемые в сети общественного питания, являются серьезным источником риска ГАА.

Исследования управляющих воздействий на риск образования ГАА

С целью снижения содержания ГАА в пищевой продукции, в особенности кулинарных изделий, были определены и оценены возможные технологические управляющие воздействия, в частности, использование молотых пряностей, богатых биофлавоноидами.

В качестве объектов исследования были выбраны кулинарные изделия, приготовленные без добавления и с добавлением красного перца. Для этого были подготовлены три вида фарша из свинины, говядины и мяса кур с внесением 0% (контрольный образец) , 0,5%, 1,0% и 1,5% молотого красного перца. Из фарша были сформованы котлеты массой по 100 г, которые затем доводили до кулинарной готовности жарением при температуре 180ºС в течение 10 минут – по 5 минут с каждой стороны, переворачивая один раз. Результаты исследований приведены в таблице 6.

Таблица 6 – содержание ГАА в рубленых мясных полуфабрикатах с добавлением молотого красного перца

Вид сырья	Доза внесения красного перца, %	Количество обнаруженных ГАА, нг/г готового изделия			Снижение Σ относительно контрольного образца, %
		MeIQx	PhIP	Сумма (Σ) ГАА	
Свинина	-	3,98±1,59	10,69±4,27	14,67±5,86	-
	0,5	1,69±0,67	4,48±1,79	6,17±2,46	57,94
	1,0	2,07±0,83	5,59±2,24	7,66±3,07	47,78
	1,5	2,15±0,86	6,01±2,40	8,16±3,26	44,38
Говядина	-	3,01±1,20	11,31±4,52	14,32±5,72	-
	0,5	1,24±0,50	4,71±1,88	5,95±2,38	58,44
	1,0	1,72±0,69	5,64±2,26	7,36±2,95	48,60
	1,5	1,95±0,78	5,98±2,39	7,93±3,17	44,62
Мясо кур	-	3,42±1,37	11,97±4,79	15,39±6,16	-
	0,5	1,41±0,56	4,88±1,95	6,29±2,51	59,12
	1,0	1,98±0,79	5,87±2,35	7,85±3,14	48,99
	1,5	2,09±0,84	6,12±2,45	8,21±3,29	46,65

Установлено, что добавление красного перца в мясной рубленый полуфабрикат приводило к снижению содержания ГАА в продукте после доведения его до кулинарной готовности на 45-60%. Наибольшее снижение было зафиксировано при добавлении 0,5 % красного перца к массе фарша.

В связи с широким использованием при приготовлении пищи мясных полуфабрикатов в маринадах, на следующем этапе было проведено исследование по выявлению влияния такой дотермической обработки мяса

на количество ГАА в готовом кулинарном изделии. Для исследований были выбраны готовые маринады, поставляемые на предприятия общественного питания. С использованием таких маринадов было подготовлены кусковые полуфабрикаты из свинины: образец 1 (состав маринада - смесь растительных масел, паприка, чеснок, лук, черный перец), образец 2 (состав маринада - вода, паприка, черный перец, красный перец, чеснок, кориандр и горчица). Также было подготовлено еще два образца путем натирки сухой посолочной смесью: образец 3 – посолочная смесь с красным перцем, образец 4 – посолочная смесь с паприкой. Посол и маринование проводили при температуре 4±2°С в течение 24 часов. После этого кусковые полуфабрикаты были подвергнуты термической обработке на гриле при температуре 230ºС в течение 10 минут, в процессе термообработки изделия переворачивали один раз. Результаты исследований по определению содержания ГАА приведены в таблице 7. За контрольный образец был принят полуфабрикат из аналогичного мяса, не подвергавшийся маринованию и посолу, доведенный до кулинарной готовности при тех же режимах термической обработки.

Таблица 7 – влияние маринования и посола мяса на содержание ГАА в готовых кулинарных изделиях

№ п/п	Образец	Количество MeIQx, нг/г	Изменение относительно контрольного образца	Количество PhIP, нг/г	Изменение относительно контрольного образца
1	Контроль	10,59±3,71	-	18,70±6,55	-
2	Образец 1	3,31±1,16	↓* 3,2	3,88±1,36	↓ 4,82
3	Образец 2	40,39±14,14	↑** 3,81	10,68±3,74	↓ 1,75
4	Образец 3	37,11±9,49	↑ 3,50	45,70±15,99	↑ 2,44
5	Образец 4	86,94±30,43	↑ 8,21	68,27±23,90	↑ 3,65
* уменьшает в…; ** увеличивает в…					

Проведенные исследования показали, что предварительная длительная обработка мяса маринованием и посолом приводила как к снижению, так и к увеличению содержания ГАА в готовом кулинарном изделии. В опытном образце 1 (с использованием маринада на масляной основе) было выявлено относительно контрольного образца снижение количества MeIQx и PhIP в 3,2 и 4,82 раза, соответственно. Использование маринада на водной основе снизило в готовом изделии количество PhIP в 1,75 раза, но увеличило количество MeIQx в 3,81 раза. Обработка мяса с использованием сухой посолочной смеси с красным перцем (образец 3) привела к увеличению в готовом изделии количество MeIQx и PhIP в 3,50 и 2,44 раза, соответственно. Максимальное увеличение образования ГАА в кулинарном изделии в процессе его термической обработки было зафиксировано в образце 4, обработанном сухой посолочной смесью с паприкой – по сравнению с

контрольным образцом количество MeIQx возросло в 8,21 раза, а количество PhIP - в 3,65 раза.

Проведенные исследования показали, что управление риском ГАА возможно путем подбора вариантов дотермической обработки мяса, например маринадами на основе растительных масел. Предложенная обработка позволила достичь снижения суммарного количества ГАА более чем в 4 раза относительно контрольного образца. Напротив, результаты исследования кулинарных изделий, подвергнутых длительной обработке сухими посолочными смесями, продемонстрировали их возможное катализирующее воздействие в реакциях образования ГАА.

Оценка данных управляющих воздействий показала возможность снижения количества ГАА, однако достигнутые результаты не могли повлиять на вероятность образования ГАА и на оценку тяжести последствия, поскольку не установлены предельно допустимые концентрации ГАА в продукте, а также их токсические и летальные дозы.

Полученные результаты показали, что промышленная продукция, произведенная по традиционным технологиям, не является источником риска ГАА. Напротив, кулинарные изделия из мяса идентифицированы в качестве источника риска ГАА. В ходе работы доказана возможность управления риском образования ГАА путем введения в состав продукта различных рецептурных компонентов, и также путем разработки рекомендаций об исключении отдельных ингредиентов как возможных катализаторов в реакциях образования ГАА. Разработанная в рамках выполненной диссертационной работы методика количественного определения ГАА позволит при проведении дальнейших исследований снизить информационную неопределенность в отношении ГАА как по группам продукции, так и по нормированию в ней ГАА, в целях обеспечения безопасности для здоровья человека.

Экономическая эффективность

Результаты расчёта экономической эффективности (в ценах 2019 года) показали, что суммарные затраты на проведение аналитических исследований «Определение гетероциклических ароматических аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» составили 2937,47 рублей для методики с использованием подготовки проб ТФЭ и 1112,85 рублей для методики с использованием подготовки проб жидкостной экстракцией.

Полученные данные позволяют рекомендовать методику с использованием подготовки проб ТФЭ для проведения рутинных исследований, а методику с использованием подготовки проб жидкостной экстракцией для арбитражного определения ГАА в готовой мясной продукции.

ВЫВОДЫ

1. Проведена идентификация 30 ГАА, составлен профиль риска ГАА, оценены: тяжесть последствия - на 4 балла, вероятность возникновения – 10 баллов, возможность выявления - 10 баллов. Приоритетное число риска составило 400, что подтвердило значимую роль ГАА в обеспечении безопасности мясной продукции.
2. В результате проведенного причинно-следственного анализа установлены основные факторы, влияющие на количество образования ГАА в мясной продукции – температура термической обработки выше 150˚С и контакт продукта с нагревающей поверхностью. Предложена схема оценки критичности технологий.
3. Подобранны условия (напряжение фрагментора – 130 В, энергия диссоциации – 30 В, хроматографическая колонка, градиентное элюирование) хроматографической идентификации ГАА в мясной продукции, позволяющие определять ГАА в очень малых концентрациях от 1 нанограмма на грамм пробы.
4. Подобраны и апробированы рациональные способы экстрагирования ГАА с постоянной степенью экстракции - способ жидкостной экстракции и способ ТФЭ.
5. Оценены управляющие воздействия риска образования ГАА в мясной продукции, а именно показано влияние дотермической обработки мясной продукции острым красным перцем и маринадами на основе растительных масел на снижение образования ГАА. Одновременно показан каталитический эффект длительной обработки сухими посолочными смесями и обработки маринадами на водной основе на образование ГАА.
6. Экономическая эффективность при исследовании мясной продукции на содержание ГАА составят 2937,47 рублей для методики с использованием подготовки проб ТФЭ и 1112,85 рублей для методики с использованием подготовки проб жидкостной экстракцией (в ценах 2019 года).
7. Подготовлен проект методики определения ГАА в мясной продукции МИ-01-2020 «Определение гетероциклических ароматических аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

Перечень публикаций

Статьи в изданиях из перечня рецензируемых ВАК:

1. Подходы к анализу химических рисков на предприятиях мясной промышленности / Кузнецова О.А., Юрчак З.А., **Утьянов Д.А. //** Все о мясе. 2015. № 5. С. 22-23.
2. Механизм образования гетероциклических ароматических аминов в пищевой продукции / **Утьянов Д.А.,** Куликовский А.В., Вострикова Н.Л., Кузнецова О.А. // Птица и птицепродукты. 2019. № 4. С. 26-29.
3. Products of chemical reactions that occur during high-temperature heat treatment of the meat products / **Utyanov D.A.**, Kulikovskii A.V., Vostrikova N.L., Kuznetsova O.A. // Theory and practice of meat processing. 2019. №4 (4). P. 17-22.
4. Факторы, влияющие на образование канцерогенов при высокотемпературной термической обработке мясной продукции / **Утьянов Д.А.**, Куликовский А.В., Вострикова Н.Л., Чиковани К.Г., Кузнецова О.А. // Все о мясе. 2020. № 1. С. 42-47.

Статьи в международных базах данных и рецензируемых изданиях:

5. The Relationship Of Nano-Microcomponent Composition Of Smoke And The Content Of Polyaromatic Hydrocarbons In Smoked Food Products / Andrey V Kulikovskii, Natalya L Vostrikova, Oksana A Kuznetsova, **Dmitry A Utyanov**, Andrey N Ivankin // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2019. №10 (2). P. 905-911 (Scopus, Web of Science)
6. Investigations of polycyclic aromatic hydrocarbons and strategies of their decrease in smoked meat products / Andrey Kulikovskii, Ivan Gorlov, Marina Slozhenkina, Oksana Kuznetsova, **Dmitriy Utyanov** // Journal of Animal Science. 2019. Т. 97. № 3. P. 296 (Scopus, Web of Science)

Статьи в прочих изданиях:

7. Гетероциклические ароматические амины в мясе и мясной продукции. причины их образования и воздействие на человека / **Утьянов Д.А.**, Куликовский А.В., Вострикова Н.Л. // В сборнике: Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции Сборник статей по материалам IV научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Ответственный за выпуск А.А. Нестеренко. 2018. С. 11-15.
8. Факторы, влияющие на образование гетероциклических ароматических аминов в мясной продукции / **Утьянов Д.А.**, Кузнецова О.А., Куликовский А.В. // В сборнике: Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции Материалы Международной научно-практической конференции. Под общ. ред. И.Ф. Горлова. 2018. С. 355-359.
9. Безопасность и качество продуктов на основе животного сырья при длительном хранении / Иванкин А.Н., Вострикова Н.Л., Куликовский А.В., Бабурина М.И., **Утьянов Д.А.** // В сборнике: Безопасность и качество

товаров Материалы XII Международной научно-практической конференции. Под ред. С.А. Богатырева. 2018. С. 84-92.

10. Гетероциклические ароматические амины в мясной продукции / **Утьянов Д.А.,** Куликовский А.В. // В сборнике: «Интенсификация пищевых производств: от идеи к практике» Сборник научных трудов XII международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов организаций в сфере сельскохозяйственных наук. 2018. С. 386-390.

11. Метод определения гетероциклических ароматических аминов в мясной продукции с помощью ВЭЖХ с УФ детектированием / **Утьянов Д.А**., Князева А.С. // В сборнике: Перспективные исследования и новые подходы к производству и переработке сельскохозяйственного сырья и продуктов питания Сборник научных трудов XIII Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов организаций в сфере сельскохозяйственных наук. 2019. С. 353-355.