МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ им. В.М. ГОРБАТОВА» РАН

На правах рукописи

Утьянов Дмитрий Александрович

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОВ В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ, АНАЛИЗ И УПРАВЛЕНИЕ РИСКОМ ИХ ОБРАЗОВАНИЯ

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Специальность 05.18.04 «Технология мясных, молочных
и рыбных продуктов и холодильных производств»,
05.02.23 «Стандартизация и управление качеством продукции»

Научный руководитель:
доктор технических наук
Кузнецова О.А.

Москва
2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 4
Актуальность темы 4
Степень разработанности 5
Цель и задачи исследований 5
Научная новизна 6
Теоретическая и практическая значимость работы 6
Положения, выносимые на защиту 7
Апробация работы 7
ГЛАВА 1. АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 8
1.1 Гетероциклические ароматические амины. Причины и механизм образования 8
1.2 Анализ риска ГАА 15
1.3 Комутагенность ГАА 17
1.4 Метаболизм ГАА 18
1.5 Исследования влияния ГАА на инфузории Tetrahymena pyriformis ... 20
1.6 Канцерогенность ГАА 25
1.7 Способы снижения количества образования ГАА в продукции 27
1.8 Снижение оказываемого воздействия 32
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 36
3.1 Идентификация и оценка риска ГАА 36
3.2 Методика определения ГАА в мясной продукции 43
3.2.2 Подбор условий хроматографической идентификации 43
3.2.3 Подбор условий экстракции ГАА 49
3.3 Построение матричной калибровки для способа подготовки проб с ТФЭ 56
3.4 Результаты проведенных исследований мясной продукции на содержание ГАА 59
3.4.1 Изучение влияния вида сырья и продолжительности термической обработки 59

3.4.2 Исследование мясной продукции промышленного производства 63

3.4.3 Исследования кулинарных изделий. 64

3.4.4 Исследования управляющих воздействий на риск образования ГАА. ……..66

3.5 Экономическая эффективность 72

ВЫВОДЫ 74

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 76

Приложение 1 87

Приложение 2 105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Разработке методов выявления, а также изучению механизмов и методов снижения образования в продуктах питания различных ксенобиотиков уделяется большое внимание со стороны мировых научных сообществ и регуляторных организаций.

При технологической (в основном тепловой) обработке сырья, могут образовываться и накапливаться потенциально опасные соединения, в частности ксенобиотики эндогенного происхождения – гетероциклические ароматические амины (ГАА) – химические соединения, имеющие в своем строении как минимум одно ароматическое кольцо и одну аминогруппу. Доказано, что ГАА образуются в пищевой продукции животного происхождения при ее высокотемпературной (от 150˚С) обработке (преимущественно жарка, жарка на открытом огне), как продукты реакции Майяра.

Ряд научных работ указывает на взаимосвязь между употреблением человеком продуктов, содержащих в своем составе ГАА, с проявлением таких заболеваний, как рак колоректальный, молочных желез и других паренхиматозных органов.

Поэтому исследования, направленные на выявление и оценку риска образования и нормирования содержания ГАА в термообработанном пищевом продукте, являются актуальными.

Интерес к данному вопросу и необходимость его изучения подтверждают работы отечественных и зарубежных исследователей: Дмитриева М.А., Солякова А.А., T. Sugimura et al., J. Ferlay et al., M. Gibis et al., M. Jagerstad et al., Maite Sanz Alaejos et al., S. Jinap et al., M. Zeng et al., K Srinivasan et al., F. Oz et al., H. Tsuchia et al., E. Sunila et al., P. Chonpathompikunlert., S. Choi et al.

Кроме того, благодаря развитию и усовершенствованию аналитических методов, появилась возможность разработки методики, позволяющей определять содержание ксенобиотиков в низких концентрациях (от нг/г).

В настоящий момент, на территории Евразийского экономического союза отсутствуют утвержденные методики определения ГАА в пищевой продукции.

Таким образом, разработка методики определения содержания ГАА в пищевой продукции позволит исследовать процесс синтеза ГАА в результате технологической обработки различных групп мясной продукции с целью дальнейшего нормирования и разработки механизмов снижения 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.

Методология разработки методики основана на работах Иванкина А.Н., Куликовского А.В., анализ рисков – на работах Чернухи И.М., Кузнецовой О.А.

Цель и задачи исследований

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

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

- на основе систематизации и анализа имеющихся 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

Научно обоснованы методологические подходы извлечения и хроматографической идентификации ГАА в мясной продукции.

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

Впервые разработана методика количественной идентификации ГАА в мясной продукции, которая обеспечивает выявление концентраций ГАА от 1 нг/г.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана методика определения ГАА в мясной продукции с использованием 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. Анализ 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, IV научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции». Краснодар, 2018, XII международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов организаций в сфере сельскохозяйственных наук «Интенсификация пищевых производств: от идеи к практике», Красково, 2018, 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.

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Гетероциклические ароматические амины. Причины и механизм образования

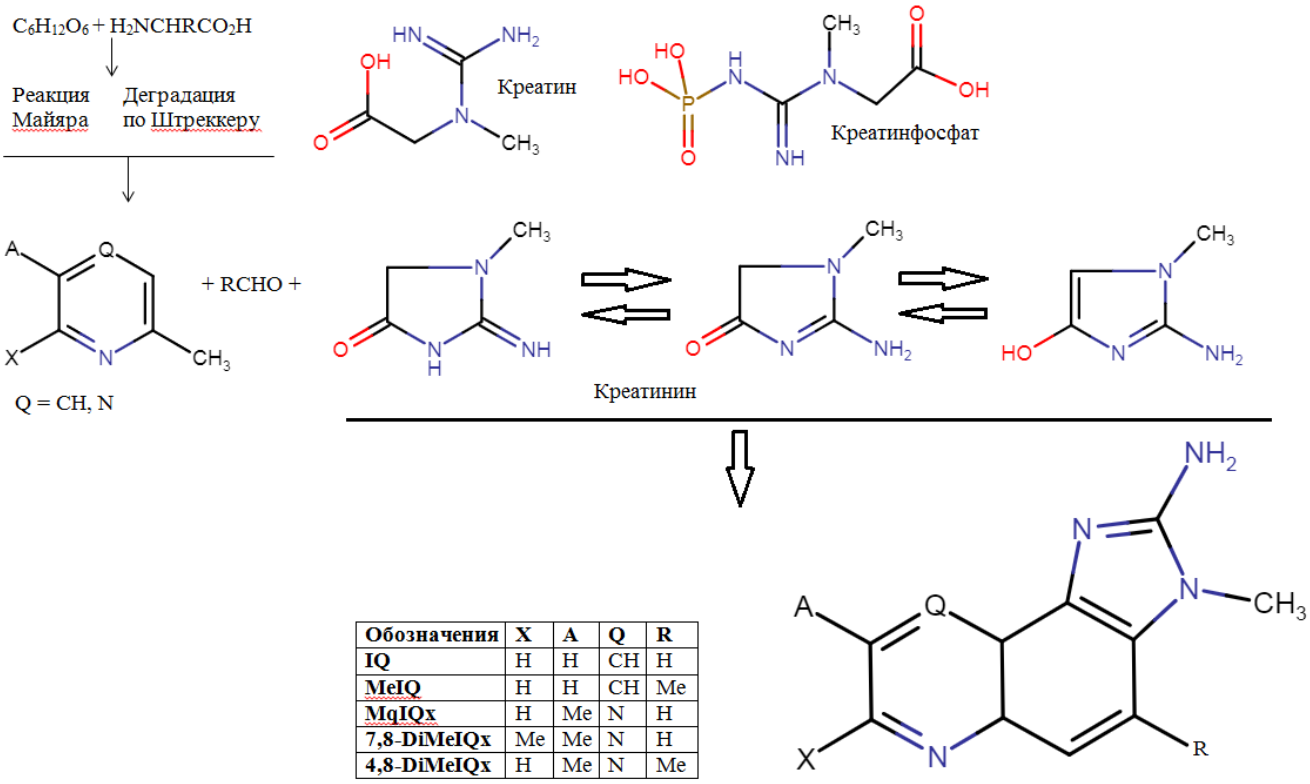
Гетероциклические соединения (гетероциклы) – органические соединения, содержащие циклы, в состав которых помимо углерода входят атомы других химических элементов.

Гетероциклические ароматические амины (ГАА) – это группа соединений, которые образуются в богатой белком пищевой продукции (такой как мясо продуктивных животных, птица, рыба) в ходе ее термической обработки под воздействием высоких температур (преимущественно жарка, жарка на открытом огне, гриль и т.п.). Предположительно эти соединения образуются из креатинина/креатина, углеводов и аминокислот в результате реакции Майяра. Рядом исследований было доказано, что ГАА являются канцерогенами и обладают мутагенными свойствами [1-6].

Группа исследователей во главе с профессором Такаши Сигимурой первыми открыли ГАА в 1977 году как вещества, образующиеся в результате обычных домашних процессов приготовления пищи. Начало работам по изучению ГАА было положено подозрениями о том, что дым, который образуется при термообработке пищевых продуктов, содержащих много животного белка, и как следствие с высоким содержанием креатина, с большой долей вероятности обладает канцерогенными свойствами. В итоге исследователи открыли более 20 химических соединений, которые не относились к рецептурным компонентам, что доказывает, что процесс их образования проходит во время термической обработке продукта, их классифицировали как ГАА [1].

Основываясь на гипотезе образования ГАА групп имидазохиноксалинов и имидазохинолинов, обладающих мутагенными свойствами, во время реакции Майяра в 80х годах XX века была предложена реакция образования ГАА (рисунок 1).

Согласно предложенной гипотезе реакция образования ГАА идет путем отщепления от креатина воды и дальнейшей циклизации его в креатинин, что формирует амино-имидазольную часть молекулы ГАА – ее основу. Затем пиразины и пиридины, образованные из свободных аминокислот и гексоз в ходе реакции Майяра, доформировывают молекулу ГАА. Также важным участником формирования молекулы ГАА является альдегид Штреккера или соответствующее ему Шиффово основание [8].



Обозначения	X	A	Q	R
IQ	H	H	CH	H
MeIQ	H	H	CH	Me
MqIQx	H	Me	N	H
7,8-DiMeIQx	Me	Me	N	H
4,8-DiMeIQx	H	Me	N	Me

Рисунок 1 – Механизм образования ГАА

Исходя из названия обязательные структурные компоненты молекулы ГАА – гетероциклическое кольцо и аминогруппа. Гетероциклическое кольцо – циклический углеводород, в котором помимо атомов углерода присутствуют атомы других неметаллов, например, азот (самый распространенный гетероатом) – в этих случаях соединение само по себе уже является амином, кислород или сера. В случаях, когда в молекуле ГАА отсутствует гетероатом азот, аминогруппа присоединена к ароматической части молекулы, но такие случаи крайне редки.

Естественные ГАА, такие как, например, группа β-карболинов (норгарман и гарман, рисунки 2 и 3 соответственно) можно широко обнаружить, начиная от растений и водорослей заканчивая витаминами и антибиотиками.

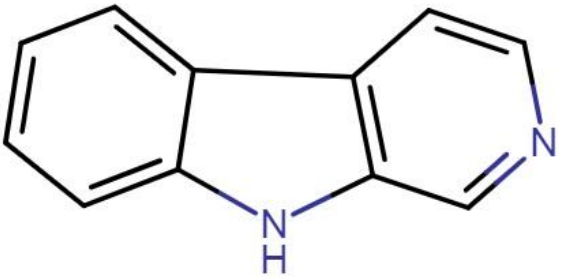


Рисунок 2 – Норгарман (9H-пиридо[3,4-b]индол)

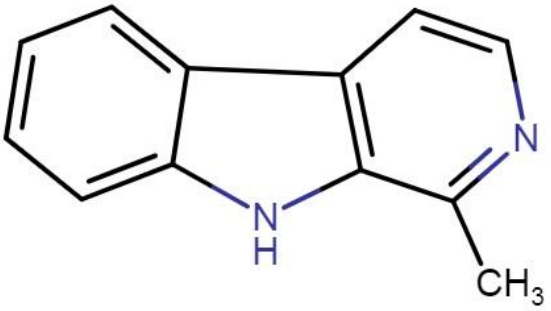
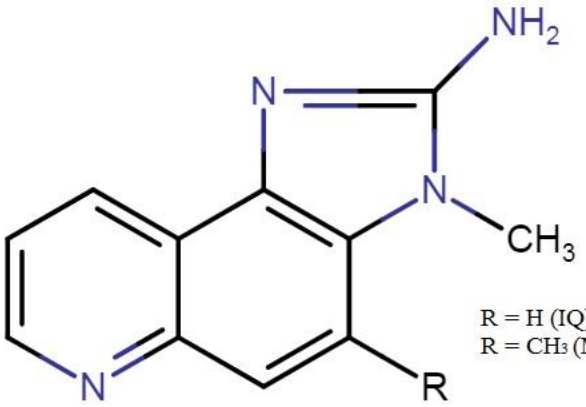


Рисунок 3 – Гарман (1-метил-9H-пиридо[3,4-b]индол)

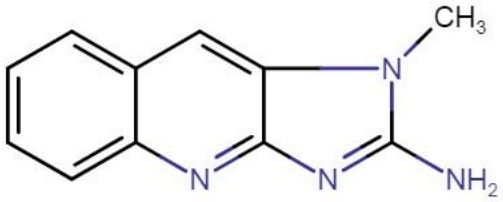
Другие ГАА, которые образуются в процессе термообработки пищи с высоким содержанием креатина, которые по подозрениям и обладают канцерогенными и мутагенными свойствами, делят на два класса:

1. Аминоимидазоарены (АИА). К Аминоимидазоаренам относят ГАА в составе молекулы которых присутствует N-метил-2-аминоимидазольная часть. Температура образования АИА варьируется от 150 до 250˚С – примерные температуры домашнего приготовления пищи. Формирование АИА происходит в результате реакции креатинина и продуктов пиролиза аминокислот мясного белка (например, пиризин и пиридин). В результате таких реакций формируются либо имидазопиридины, либо имидазохиноксалины, либо имидазохинолины (рисунок 4) [9-13].

Имидазохинолины

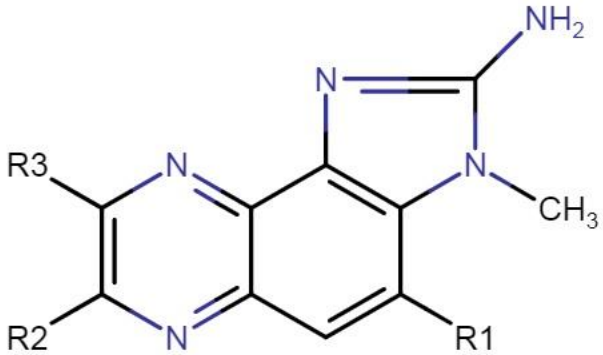


R = H (IQ)
R = CH_3 (MeIQ)

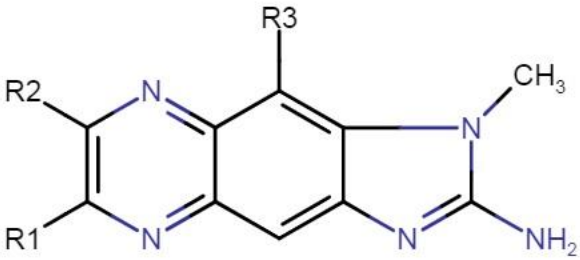


IQ[4,5-b]

Имидазохиноксалины

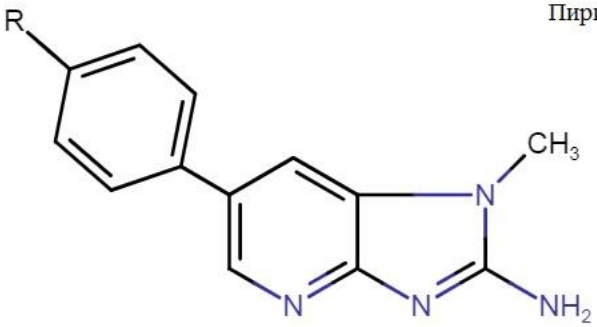


R1, R2, R3 = H (IQx)
R1, R2 = H, R3 = CH_3 (8-MeIQx)
R1 = CH_3, R2, R3 = H (4-MeIQx)
R1, R3 = CH_3, R2 = H (4,8-DiMeIQx)
R1, R2 = CH_3, R3 = H (7,8-DiMeIQx)
R1, R2, R3 = CH_3 (4,7,8-TriMeIQx)
R1 = CH_2OH, R2 = H, R3 = CH_3 (4-CH2OH-8-MeIQx)

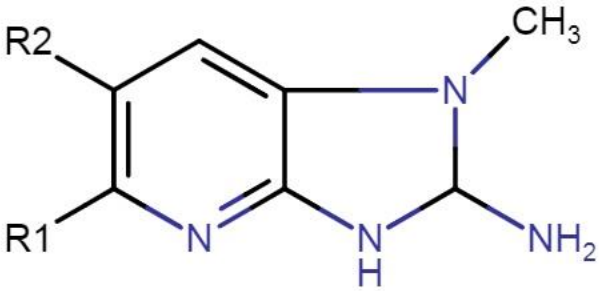


R1, R2, R3 = H (IgQx)
R1, R3 = H, R2 = CH_3 (7-MeIgQx)
R1, R2 = CH_3, R3 = H (6,7-DiMeIgQx)
R1 = H, R2, R3 = CH_3 (7,9-DiMeIgQx)

Пиридины



R = H (PhIP)
R = OH (4-OH-PhIP)



R1 = H, R2 = CH3 (1,6-DMIP)
R1, R2 = CH3 (1,5,6-TMIP)

Рисунок 4 – Графические формулы имидазохнолинов, имидазохиноксалинов и имидазопиридинов

На рисунке 5 приведен пример предположительной реакции образований имилазохинолинов и имидазохиноксалинов. АИА могут быть полярными и неполярными.

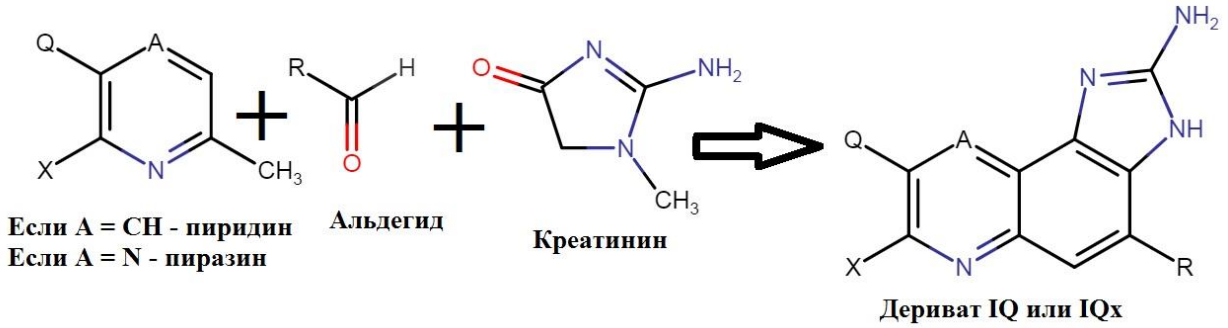


Рисунок 5 – Реакция формирования молекул имидазохиноксолинов и имидазохинолинов

2. Аминокарболины. Формирование аминокарболинов идет при более высоких температурах по сравнению с АИА – свыше 300˚С (экспериментальные температуры). В отличии от АИА формирование молекулы АИА происходит не с креатинином, а в результате теплового разрушения глютаминовой кислоты, фенилаланина, орнитина или триптофана, в результате которого получаются декарбоксильные и дезаминированные продукты, обладающими радикальными реакционноспособными фрагментами, конденсация которых приводит к образованию гетероциклических ароматических структур. К аминокарболинам относят ГАА в структуре молекулы которых присутствует один из фрагментов тетраазафлуарантена, фенилпиридина, бензимидазола, пиридоимидазола или пиридиондола (рисунок 6) [9].

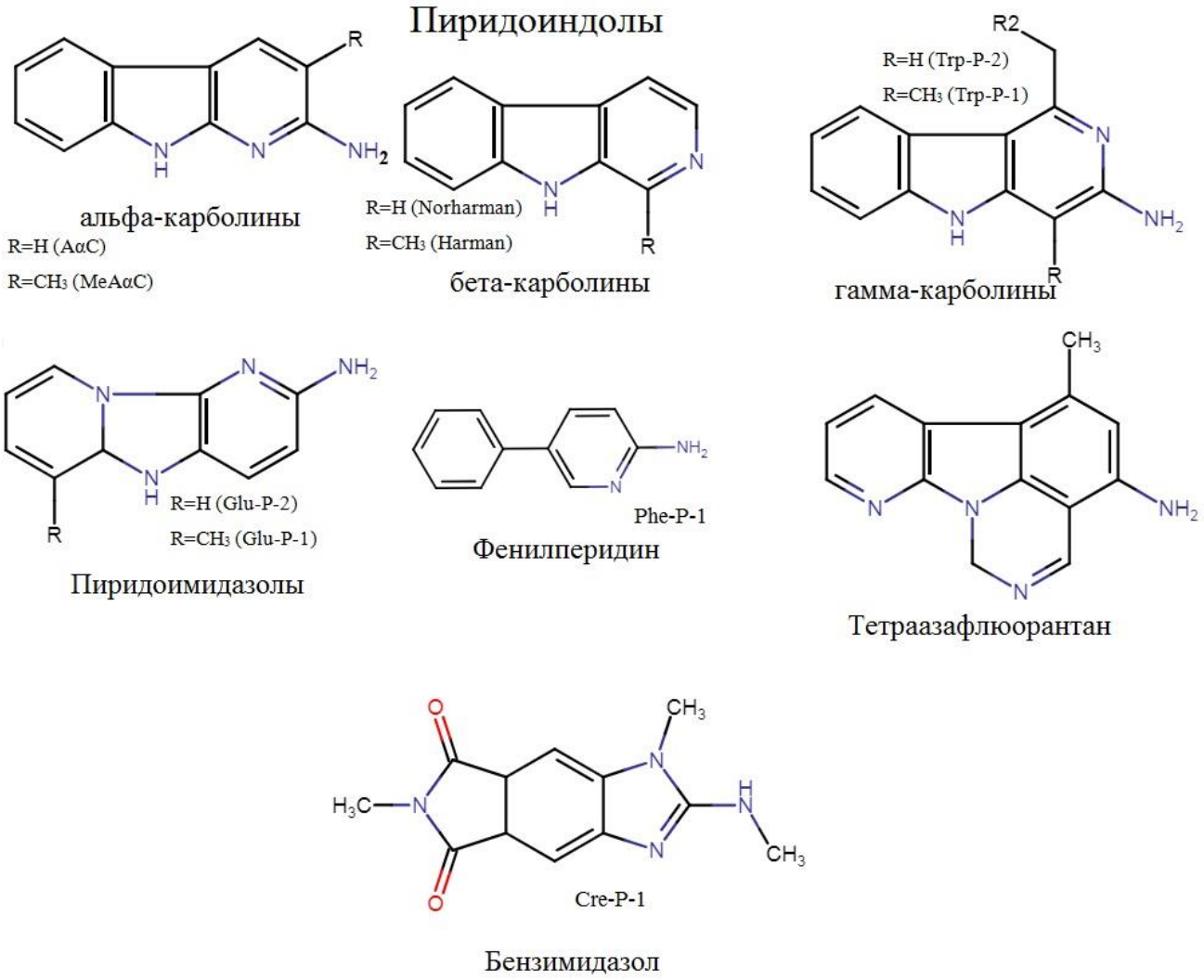


Рисунок 6 – Графические формулы аминокарболинов

Принимая во внимание, что АИА образуются при «домашних» температурах приготовления пищевых продуктов, они лучше изучены по сравнению с аминокарболинами в вопросах их мутагенных и канцерогенных свойств.

Формирование альфа- и гамма-карболинов происходит в процессе термообработки растительных белков, а их концентрации обычно в среднем в 10-100 раз меньше относительно количества образуемых бета-карболинов, таких как гарман и норгарман.

Вид термообработки, ее температура и продолжительность важный фактор, влияющий на количество и разнообразие образующихся в продукте ГАА. На рисунке 7 показана зависимость количества в нг/г образуемых ГАА в говяжьем

фарше, приготовленном на гриле, в зависимости от температуры обработки. Образцы термически обрабатывали по 10 минут с каждой стороны.

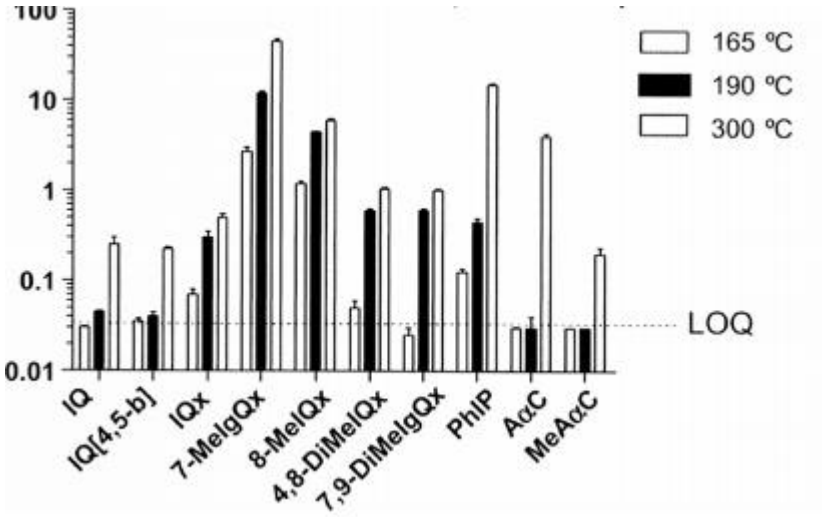


Рисунок 7 – Зависимость количества ГАА от температуры обработки

Так жарка на сковороде и гриле приводит к образованию большего количества ГАА в продукте, нежели при запекании. Отсюда следует вывод, что в основном ГАА образуются при температурах выше 150˚С. При температурах ниже также возможно образование ГАА, но здесь важную роль играет вид и, самое главное, продолжительность термообработки. Например, при копчении рыбы при температуре 80-85˚С в течение 4-6 часов в ней так же образуются некоторые количества ГАА. Помимо вида и продолжительности термообработки на количество образующихся ГАА оказывает влияние содержание в продукте антиоксидантов, прекурсоров, ингибиторов ГАА [14].

Одним из «усилителей» фактора образования ГАА в продукции являются жиры и масла. Увеличение жира в продукте приводит к увеличению количества образующихся ГАА. Немаловажную роль играет вид жира, растительный или животный, – наибольшее количество ГАА было обнаружено при термообработке мясных продуктов с использованием сливочного масла, применение же растительных масел снижает количество образующихся в процессе термообработки ГАА. Жирность продукта оказывает двоякое влияние на количества образуемых ГАА. Количество жира в продукте до 15-20%

прямопропорционально влияет на количество образуемых ГАА, т.е. чем больше жира, тем больше образуется ГАА, а вот при доле жира в продукте свыше 25% количество образуемых ГАА практически не меняется и образуется их меньше, чем в продуктах с жирностью 15-20%. Вероятнее всего при большом содержании жир предотвращает непосредственный контакт продукта с нагревающей поверхностью, что снижает количество образующихся ГАА. Было установлено, что внесение железа (Fe^{2+}, Fe^{3+}) увеличивает количество образующихся IQ и IQx почти в два раза. На концентрацию ГАА влияет также и количество влаги в мясе, возможно, из-за ее роли в качестве транспортера водорастворимых прекурсоров ГАА [4].

Согласно литературным данным, PhIP (2-амино-1-метил-6фенилимидазо[4,5b]пиридин) самый распространенный гетероциклический амин образующийся в продукте, за ним идет MeIQx (2-амино-3,8-диметилимидазо[4,5f]хиноксалин). Поэтому они были выбраны в качестве объектов мониторинга в настоящей диссертационной работе.

1.2 Анализ риска ГАА

В настоящее время ГАА химически синтезируются с целью долговременных тестирований на животных. В результате таких исследований было установлено, что ГАА являются мутагенными in vitro и in vivo для клеток млекопитающих, когда ГАА скармливают грызунам, у них развиваются злокачественные опухоли во многих органах (а именно, толстой кишке, грудной железе, предстательной железе). Так же зафиксированы случаи образования злокачественной опухоли в печени обезьян в результате добавления в их рацион ГАА [15].

В результате опытов на грызунах было установлено, что не все грызуны чувствительны к ГАА, есть и устойчивые к их воздействию виды. Это положило начало работам по поискам генов ответственных за устойчивость.

С помощью теста Эймса и исследованиях на сальмонеллах было установлено, что ГАА обладают наибольшей мутагенной и канцерогенной активностью относительно других мутагенов и канцерогенов, потребляемых человеком с пищей, однако при обычном рационе человек потребляет с пищей «недостаточное» количество ГАА для образования у него злокачественных опухолей. ГАА могут выступать своего рода усилителем воздействия оказываемых другими канцерогенами и мутагенами ксенобиотического или автобиотического типа, из-за способности вызывать нестабильность генов и повышать чувствительность к промоторам новообразований [15-17]. Данные исследований количества, потребляемых ГАА в день в Европе и в Японии, а также среднее количество ГАА, приводящее к новообразованиям, по данным исследований, проведенных в США, приведены в таблице 1 [18-21].

Таблица 1 – результаты исследований о потребляемом количестве ГАА

Примерная концентрация ГАА, потребляемая в странах ЕС, нг/день	Примерная концентрация ГАА, потребляемая в Японии, нг/день	Оценочное количество ГАА, приводящие к новообразованиям нг/день
103	62	364

Эксперименты на животных показали, что совместное назначение ГАА с другими видами канцерогенов приводит к дополнительному синергетическому действию. Кроме того, канцерогенный потенциал ГАА усиливается в присутствии промоторов новообразований и агентов, которые усиливают пролиферацию клеток. Например, в [22] опубликованы результаты исследований, где на кожу спины мышей наносили Trp-P-2, однако, согласно результатам, опухоли кожи начинали развиваться только после последовательного нанесения TPA (12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат) – промотора кожного канцерогенеза.

Учитывая вышеизложенное, нельзя с уверенностью сказать, что ГАА, присутствующие в пище, приводят к образованию основной части злокачественных опухолей у людей, так как количество проведенных

исследований этого вопроса еще недостаточно для точной оценки уровня влияния ГАА на ракообразование у людей. Но в то же время, согласно уже имеющимся данным разных исследований следует искать способы снижения образования ГАА в пищевых продуктах и способы снижения количества ГАА потребляемых человеком [23-24].

1.3 Комутагенность ГАА

Во время изучения вопроса очистки пиролизата триптофана от мутагенов была обнаружена потеря мутагенной активности на определенных этапах фракционирования, которая восстанавливалась при повторном смешивании фракций. В ходе дальнейших исследований было установлено, что некоторые из образуемых ГАА (в частности гарман и норгарман из группы бета-карболинов) обладают комутагенностью, т.е. способностью к образованию мутагенных соединений или усилению мутагенных свойств мутагенов. Например, немутагенные анилин и норгарман образовывали аминофенилноргарман, который при дальнейшем активировании смесью ферментов S9 до гидроксиаминофенилноргармана и его окончательном превращении в ацетокси производные приводил к образованию ДНК-аддуктов (рисунок 8), которые и вызывали мутации. В экспериментах над грызунами было установлено образование in vivo аминофенилноргармана из анилина и норгармана, который наравне с мутагенными обладал так же и канцерогенными свойствами [1, 25-27].

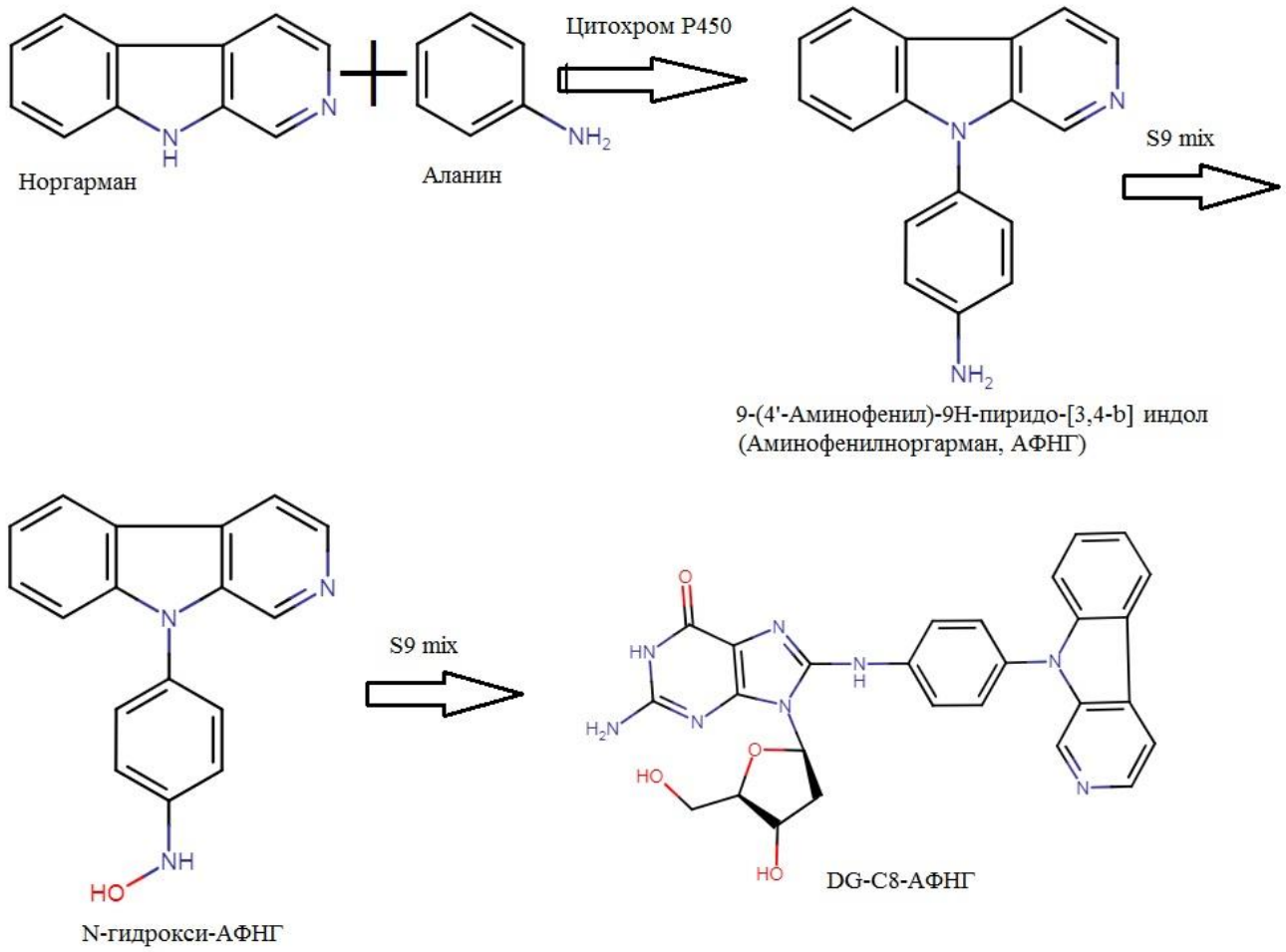


Рисунок 8 – Реакция образования аминофенилноргармана с последующим образоваем ДНК-аддуктов из него

1.4 Метаболизм ГАА

ГАА у людей, как и у грызунов, метаболизируются цитохромом P450 CYP1A2. Помимо этого, метаболизм может проходить с участием и других молекулярных разновидностей P450 (например, CYP1A1, 1B1 и 3A4). В процессе метаболизма ГАА окисляются до производных гидроксиаминов с последующим превращением в эфирные формы с помощью N(O)-ацетилтрансферазы и сульфотрансферазы. N(O)-ацетилтрансфераза у людей, как и у крыс, обладает двумя изозимами: NAT1 и NAT2. Первый изозим, в большинстве своем,

присутствует во внепеченочных тканях, в то время как второй изозим – в печени и эпителии кишечника. N-гидроксил метаболиты большинства ГАА (в том числе MeIQx и PhIP) являются «слабоактивными» субстратами человеческого NAT1. NAT2 же катализирует O-ацетилирование N-гидроксильных производных ГАА. Стоит отметить, что существует зависимость между скоростью ацетилирования у NAT2 и риском возникновения злокачественных опухолей толстой и прямой кишок, а именно, чем быстрее проходит процесс ацетилирования, тем выше риск возникновения злокачественных опухолей [1, 25-28].

В итоге образуются ДНК-аддукты (рисунок 9) путем образования N-C связей на гуаниновых основаниях. В сравнение с крысами у людей цитохром P450 показал большую активность для MeIQx и меньшую PhIP. Так же в исследованиях [1] отмечено, что у людей при метаболизме ГАА цитохром P450 обладает меньшей активностью для детоксикации путем гидроксилирования.

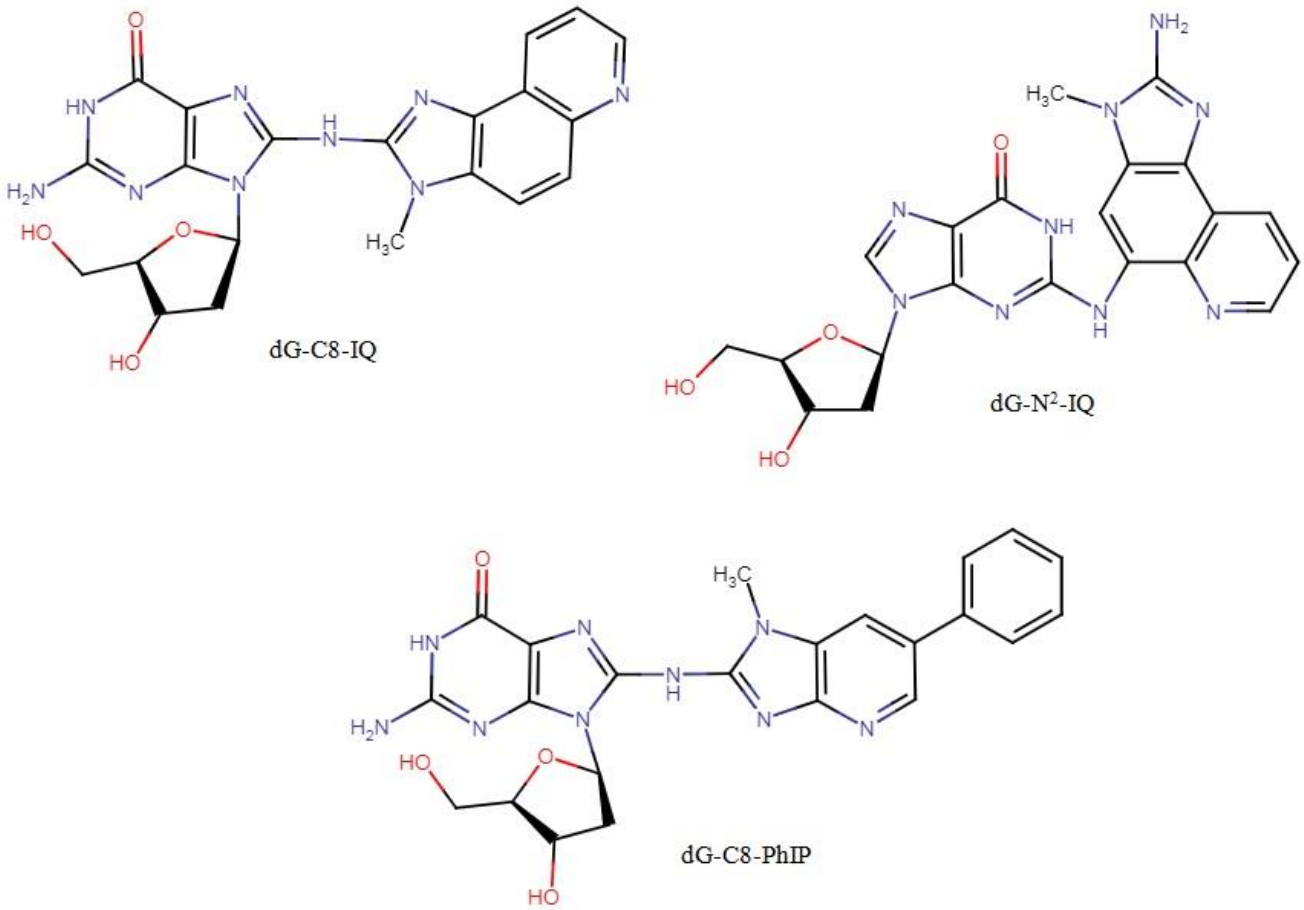


Рисунок 9 – Основные ДНК-аддукты, образующиеся при метаболизме ГАА [29-31]

Помимо аддуктов с ДНК, ГАА так же могут присоединятся к белкам. Это подтверждают результаты по обнаружению аддуктов PhIP в человеческом молоке. В [32] сообщается о положительной корреляции между дозами PhIP в рационе крыс и образующихся из них аддуктов в сывороточном альбумине и гемоглобине. Однако стоит отметить, что большинство аддуктов ГАА и белков не обладают такой стабильностью, как ДНК-аддукты.

1.5 Исследования влияния ГАА на инфузории Tetrahymena pyriformis

Исследования уровня мутагенности и канцерогенности ГАА проводились на различных видах живых организмов (начиная с микроорганизмов типа культур инфузорий заканчивая крысами и приматами). Так в работе [8] проведены исследования влияния ГАА на рост культуры инфузория Tetrahymena pyriformis. Работа проводилась в три этапа:

1. Оценка действия модельных растворов на инфузории.
2. Оценка действия жареного мясного продукта на инфузории.
3. Аналитическое определение количества ГАА в модельных растворах и жареном мясном продукте.

На первых двух этапах подсчитывались количества инфузорий и визуально оценивалось изменение формы их клеток.

В первую очередь было создано 4 модельных раствора, содержащих:

1. 0,014 мМ креатина, 0,07мМ глюкозы и 50 $см^3$
2. L-цистеин
3. Глютатион
4. триптофан

Основы растворов обоснованы их растворимостью в воде, так как сама исследуемая система – это водный раствор. Добавки вводили в модельные растворы в концентрации 0,3 мМ, после чего их нагревали в течение одного часа

при температуре 145 ˚С. Нагревание необходимо как одно из основных условий реакции Майяра во время которой и происходит образование ГАА.

Для первого этапа на 50 см^3 каждого модельного раствора приготовили среду для культивирования инфузорий. Так же был создан контрольный раствор на дистиллированной воде. Далее по 5 см^3 среды ввели в 10 пробирок, которые закрыли марлевыми пробками и поместили в автоклав при давлении 0,5 атм на один час. После остывания внесли инокулят инфузорий.

Количество инфузорий подсчитывали через каждые 24 часа в течение 10 дней. Результаты по росту культуры инфузорий в пяти разных средах представлены в таблице 2 и на рисунке 10

Таблица 2 – результаты оценки количества инфузорий

Экспозиция, час	Среднее кол-во инфузорий в модельной среде ГАА без добавок (раствор 1)	Среднее кол-во инфузорий в модельной среде ГАА с добавлением L-цистеина (раствор 2)	Среднее кол-во инфузорий в модельной среде ГАА с добавлением глютатиона (раствор 3)	Среднее кол-во инфузорий в модельной среде ГАА с добавлением триптофана (раствор 4)	Среднее кол-во инфузорий в контрольном растворе (раствор 5)
0	5	5	5	5	5
24	1,1±0,1	3,1±0,08	2,8±0,05	1±0,1	4,3±0,9
48	42±4,9	108±5,6	235±5,8	24±7,8	352±26,7
72	220±15,8	319±22,5	808±48,6	195±34,8	779±49,2
96	867±42,4	1108±67,0	1473±66,3	610±42,9	1673±79,0
120	1013±35,8	1739±44,4	2438±63,8	860±37,3	2938±64,6
144	1387±76,7	2961±59,1	3806±71,3	1023±29,0	3765±95,3
168	1413±48,7	3307±73,9	3709±64,9	998±42,2	3722±89,3
192	1467±56,2	3459±43,0	3625±87,3	854±132,0	3789±112,0
216	1393±34,9	3398±67,3	3778±75,9	679±32,4	3720±142,9
240	891±64,1	3402±85,1	3700±107,2	503±69,3	3724±108,1

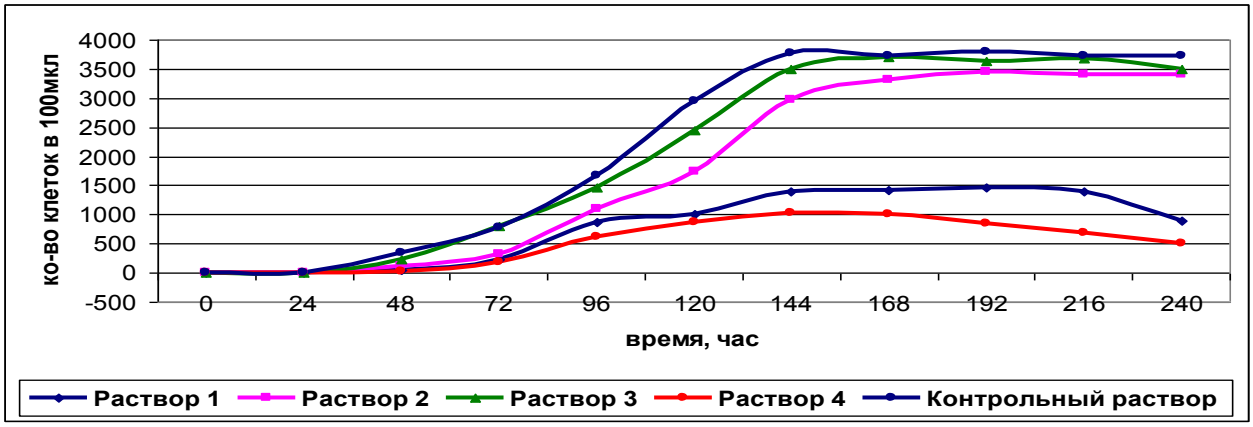


Рисунок 10 – Динамика роста культуры инфузорий Tetrahymena pyriformis в модельных растворах ГАА

Как видно из результатов проведенных исследований наибольшее количество инфузорий растет в модельном растворе с добавление глютатиона. В то время как добавка триптофана оказывает наиболее негативное влияние. К 10 суткам экспозиции в модельном растворе без добавок и в модельном растворе с добавлением триптофана обнаружено снижение количества инфузорий по отношению к максимальным количествам в этих пробах, что говорит о том, что жизненный цикл культуры сократился.

Как было отмечено ранее, помимо подсчета количества инфузорий, оценивалась морфология клеток. Изменения формы регистрировались уже на третий день эксперимента в растворе 1. В растворах 2 и 3 изменения в форме были зарегистрированы на 7 день эксперимента. Характер изменений в растворе 1 и растворах 2 и 3 также отличался. В работе так же отмечено, что в растворе 1 была сильно снижена подвижность инфузорий, в то время как в трех других растворах изменений этой функции не наблюдалось.

Таким образом, различие в количестве клеток и разница в морфологии инфузорий в разных растворах доказывает наличие токсического и, скорее всего, мутагенного воздействия ГАА в модельной системе на жизнедеятельность инфузорий. А добавление антиоксидантов (в данном случае глютатиона цистена) говорит о снижении такого воздействия.

Следующим этапом эксперимента в работе [8] по изучению воздействия ГАА на инфузории было установление влияния ГАА, но уже не модельных систем, а ГАА образованных в жареном мясном продукте.

На этом этапе было 2 наблюдаемые серии:

1. 10 пробирок по 0,1 г жареного мясного продукта;
2. 10 пробирок по 0,1 г нежареного мясного продукта.

Пробирки также автоклавировали в течение 1 часа при давлении 0,5 атм, после чего стерильно вносили инфузории. Далее через каждые 24 часа отбирали по 1 пробирке из каждой серии и производили подсчет прироста инфузорий. Результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 11

Таблица 3 – результаты определения количества инфузорий в средах с жареным и нежареным мясными продуктами

Экспозиция, час	Среднее количество инфузорий в среде с жареным продуктом	Среднее количество инфузорий в среде с нежареным продуктом
0	5	5
24	113±21,9	67±28,1
48	1563±141,0	1098±183,0
72	3038±202,7	1746±211,4
96	5522±189,2	3485±260,1
120	5009±169,7	4827±251,3
144	5129±221,1	4900±190,2
168	4629±210,9	4867±200,1
192	4349±176,1	4931±152,7
216	2072±206,8	4831±193,4
240	1532±56,7	4751±111,0

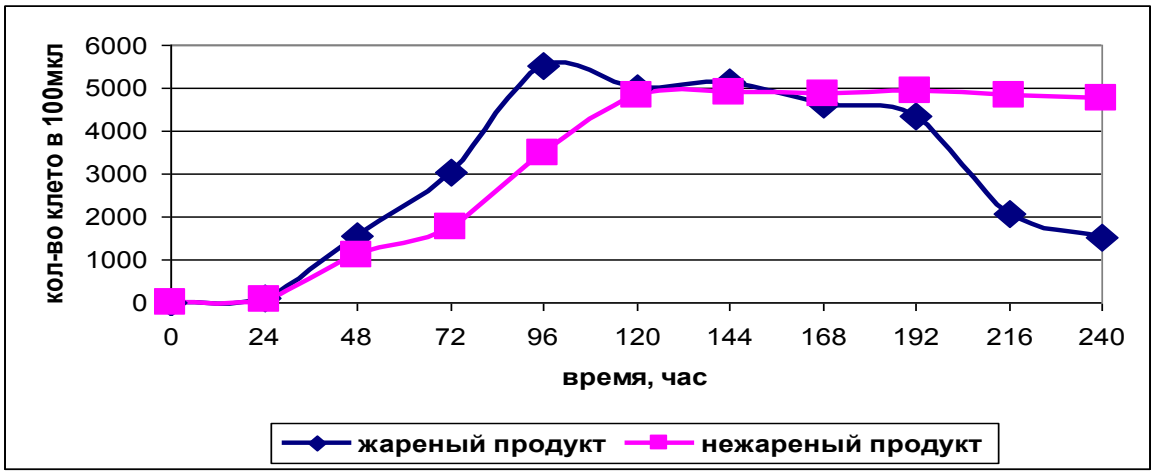


Рисунок 11 – Динамика роста культуры инфузорий Tetrahymena pyriformis в средах с жареным и нежареным мясными продуктами

Как видно из приведенных данных, в среде с жаренным мясным продуктом наблюдается ускоренный рост концентрации клеток инфузорий. Максимальная концентрация клеток была достигнута спустя 96 часов экспозиции, после чего наблюдается снижение концентрации. Спустя 216 часов экспозиции наблюдается резкое снижение концентрации клеток инфузорий, что говорит о том, что цикл жизни культуры в замкнутой системе с жареным мясным продуктом укорочен. В серии же с нежареным мясным продуктом максимальная концентрация клеток инфузорий немного меньше, но кривая имеет характерную форму для контрольной среды без токсических элементов. Максимум концентрации в обеих сериях выше, чем в среде для культивирования инфузорий (вода, соль, глюкоза, пептон, дрожжевой экстракт). Это объясняется наличием в мясе легкодоступных питательных веществ, что и приводит к быстрому росту культуры, а в серии с жареным мясом укороченный жизненный цикл говорит о наличии токсических компонентов.

На данном этапе морфология клеток так же оценивалась. Так, в среде с жареным мясным продуктом уже на третьи сутки культивирования были отмечены неподвижные клетки с симметричными темными образованиями, которые, вероятнее всего, свидетельствуют о последней стадии «болезни» инфузорий перед их гибелью.

1.6 Канцерогенность ГАА

Ряд исследований по вопросу канцерогенного действия ГАА на органы животных (мыши, крысы, обезьяны), в основном проведены в Японии [33-55].

Дневные дозы, приводящие к образованию раковых опухолей у 50% животных при стандартных экспериментальных условиях, различных ГАА для крыс и мышей приведены в таблице 4.

Таблица 4 – дневные дозы ГАА для крыс и мышей

	Количество ГАА, приводящее к образованию раковых опухолей, мг на кг веса в день	
	Крысы	Мыши
PhIP	2.2	64.6
MeIQx	0.7	11
IQ	0.7	14.7
MeIQ	0.1	8.4
AαC	Не установлено	15.8
MeAαC	6.4	5.8

Канцерогенная активность ГАА может быть, как усилена, так и подавлена различными факторами, в частности диетарными. Для примера, высокожирный рацион с относительно небольшим содержанием PhIP, назначенный крысам F344, значительно усиливает канцерогенез у них в толстой кишке [53]. Похожая ситуация наблюдается у самок крыс SD, а именно небольшие концентрации PhIP в высокожирном рационе вызывают опухоли молочной железы [54]. Добавление в рацион крыс PhIP совместно с кофеином так же приводило к увеличению образования опухолей толстой кишки [55].

Так же в ходе некоторых исследований было установлено, что ДНК-аддукты ГАА или предполагаемые ДНК-аддукты ГАА были обнаружены в различных тканях и органах человека, включая грудь, толстую кишку и простату, что подтверждает утверждение об уязвимости человеческих тканей к воздействию

ГАА, и, следовательно, их воздействие будет увеличивать риск развития рака. [18, 56-70].

За последние два десятилетия довольно много исследований было посвящено изучению связи между потреблением красного мяса и возникновением рака у людей. Одними из наиболее значимых работ являются [18, 57, 59-66], в которых приведены доказательства связи между потреблением мяса степени готовности well-done и возникновением рака толстой кишки, причем риск его возникновения в перечисленных работах варьируется от 30 до 300%

В ряде исследований была установлена связь между потреблением мяса степени готовности well-done и образованием в организме человека аденоматозных полипов, которые в свою очередь являются прекурсорами рака толстой кишки [59,75]. Но в то же время в работах [68-69] такая взаимосвязь обнаружена не была, однако такие данные нельзя считать наиболее достоверными, нежели работы эту связь установившие, ввиду того, что аденоматозные полипы появляются в человеческом организме без каких-либо симптомов, а оценка рациона респондентов проводилась без диагностирования полипов. Но в целом результаты исследований полипов сопоставимы с результатами исследований, посвященных вопросу колоректального рака, что в очередной раз подтверждает негативное влияние ГАА на организм человека.

Так же проведено большое количество исследований, посвященных изучению взаимосвязи потребления мяса и рака груди. Такая взаимосвязь была установлена в [69-73]. Согласно работе [70] у женщин, систематически употребляющих в пищу мясо степени готовности well-done, риск возникновения рака груди увеличивается почти в 5 раз. Основным ГАА вызывающим рак груди является PhIP, по сравнению с другими ГАА. В ходе дальнейших исследований сформулировано предположение, что такое влияние PhIP на образование рака груди можно изменить генетическими полиморфизмами в SILT1A1, GSTT1, GSTM1, NAT1 и NAT2, т.е. в генах, которые кодируют ферменты, отвечающие за детоксикацию и активацию ГАА [72].

Ряд исследований установил риск возникновения рака простаты с потреблением мяса [74]. В [75] проделана большая работа по изучению этого вопроса: среди 29 000 взрослых мужчин в США было выявлено 868 случаев заболевания раком простаты. Хотя прямая взаимосвязь между повышением риска заболевания и потреблением красного или белого мяса не была установлена, была обнаружена четкая зависимость в системе доза-отклик при потреблении мяса степени готовности well-done и воздействия на организм PhIP. В работе [76], проведенной также в США такая связь уже установлена. Здесь стоит отметить, что почти во всех этих исследованиях устанавливали связь между именно потреблением мяса и раком, а не влияние именно ГАА.

Немало исследовательских работ по вопросу изучения влияния потребления красного мяса и ГАА на повышение риска заболевания раком поджелудочной железы, ввиду того, что данный вид рака относится к наиболее смертельным злокачественным опухолям у человека [77-79].

1.7 Способы снижения количества образования ГАА в продукции

В связи с риском онкозаболеваний из-за ГАА существует необходимость контроля формирования ГАА с использованием разных способов и методов. Например, концентрация химических канцерогенов может быть значительно снижена, если избегать контакта поверхности мяса с огнем, или использование микроволнового излучения в качестве предварительной обработки, или непрерывным переворачиванием мяса во время его приготовления [80]. Также концентрация ГАА может быть снижена при помощи использования разных специй, трав, экстрактов фруктов и овощей.

Применение экстрактов растений и специй для снижения концентрации ГАА в мясной продукции хорошо подходит в комбинировании с применением маринадов – широкоприменяемый процесс предварительной обработки мясной продукции перед их термической обработкой с применением барбекю или гриля.

Применение маринадов само по себе является управляющим мероприятием по уменьшению итоговой концентрации ГАА в мясных продуктах. Во-первых, маринад при термической обработке будет барьером, предотвращающим непосредственный контакт продукта с нагревающей поверхностью. Во-вторых, органические кислоты, присутствующие в маринадах являются ингибитором в реакции образования ГАА. Работы с использованием маринадов для снижения образующихся ГАА уже ведутся. Например, в ходе разных исследований была установлена связь между различными сахарами в маринадах (белый сахар, тростниковый сахар, мед) и итоговым количеством ГАА, образованных в курице [81].

Основными компонентами в реакции образования ГАА являются Шиффовы основания, которые получаются в результате деградации Штреккера и перегруппировки Амадори – изомеризация N-гликозидов альдоз в 1-амино-1-дезоксикетозы – из аминокислот и карбонильных групп. Кислотность среды – важный параметр реакции образования Шиффовых оснований. Чем ниже кислотность среды, т.е. ее значение pH, тем более протонированы аминогруппы аминокислот, что в свою очередь снижает их реакционную способность с карбонильными группами. Такое предположение и положило начало работам по снижению итоговых концентраций ГАА в мясной продукции с помощью органических маринадов. Но в то же время, работы, установившие связь между значением pH и количеством ГАА, в настоящее время отсутствуют.

Такое предположение доказывает работа [82], в результате которой установлено, что маринование курицы лимонным соком перед ее приготовлением с помощью гриля снижает образование PhIP на 92-99%, что, вероятно, происходит из-за входящей в состав сока лимонной кислоты.

В работе [83] проведены исследования, посвященные вопросу влияния маринадов, как источников органических кислот, на итоговые концентрации ГАА в жареной на гриле курице. В работе использовалась лимонная кислота, источниками которой являлись лимон, лайм и цитрофортунелла. Помимо лимонной кислоты было исследовано влияние винной кислоты на количество

образуемых ГАА, в качестве источника которой использовался тармаринд. В маринады также были добавлены разные источники сахара: мед, тростниковый сахар и белый сахар. Маринады содержали органические кислоты в трех концентрациях – высокий, средний и низкий. Филе куриной грудки нарезалось на кусочки размером 1x1 см и мариновалось в течение суток. После маринования кусочки курицы подвергали термической обработке на электрическом гриле при температуре 300˚С в течение четырех минут с каждой стороны. В таблице 5 представлены результаты проведенной работы.

Таблица 5 – результаты проведенной работы влияния органических кислот на концентрацию ГАА в готовом мясном продукте

№ п/п	Источник органической кислоты	Концентрация PhIP, нг/г			Концентрация MeIQx, нг/г		
		нк*	ск*	вк*	нк	ск	вк
Белый сахар							
1	Контрольный образец	6,78			12,9		
2	Тармаринд	5,78	5,23	7,87	10,3	9,62	9,31
3	Лимон	4,43	4,21	6,91	9,73	7,57	4,42
4	Лайм	5,00	4,29	4,42	7,65	6,36	4,08
5	Цитрофортунелла	5,34	4,85	4,48	11,7	1,77	2,38
Тростниковый сахар							
6	Контрольный образец	6,74			6,24		
7	Тармаринд	3,61	1,32	1,2	4,48	3,83	8,17
8	Лимон	6,51	3,92	3,63	4,98	2,32	2,38
9	Лайм	7,09	4,50	3,36	6,31	3,17	2,39
10	Цитрофортунелла	5,16	3,38	2,45	3,58	3,46	9,01
Мед							
11	Контрольный образец	9,87			8,05		
12	Тармаринд	7,17	4,19	2,34	3,83	1,61	2,66
13	Лимон	4,66	3,19	1,76	5,11	3,21	2,04

Продолжение таблицы 5

14	Лайм	8,27	5,15	3,27	4,65	2,17	1,44
15	Цитрофортунелла	5,39	3,38	2,26	5,66	2,77	1,54
* - низкая концентрация органической кислоты в маринаде *- средняя концентрация органической кислоты в маринаде *- высокая концентрация органической кислоты в маринаде							

Результаты проведенных исследований показали, что комбинация в маринаде «лимон+мед» оказывает наибольшее ингибирующее воздействие на концентрации ГАА в готовом продукте, снижая при этом количество MeIQx, примерно, в 4 раза, а PhIP, примерно, в 5 раз. Если отдельно выделять источники сахара, то наименьшие количества ГАА формируются в продукте при использовании тростникового сахара.

Как было отмечено ранее, специи и экстракты растений могут быть сильными ингибиторами процесса образования ГАА в пищевой продукции. Одним из таких является алкалоид перечных сортов растений – пиперин.

В [84] исследователи провели работу по изучению влияния количества черного перца и соответствующей такому количеству концентрации пиперина на процесс образования ГАА в мясной продукции. Пиперин и, соответственно, черный перец были выбраны благодаря обладанию многими свойствами типа снижения перекисного окисления липидов и защита от окислительной порчи [85]. Эксперимент заключался в изучении добавления в говяжий фарш черного перца в количествах 0,5г, 1г и 1,5г на 100г фарша и соответствующие этим количествам концентрации пиперина – 0,005г, 0,010г и 0,015г на 100г фарша. Из фарша формировали котлеты диаметром 6 см и толщиной 1,5 см, вес одной котлеты составлял в среднем 40г. Также были подготовлены контрольные образцы. Котлеты подвергали термической обработке в течение 20 минут (по 10 минут с каждой стороны) при температуре 225˚С в сушильном шкафу. После термической обработки, образцы охлаждали при комнатной температуре, измельчались и подвергались сублимационной сушке. До анализа образцы хранились при температуре -20˚С.

Результаты показали, что контрольные образцы суммарно содержали 13,05 нг/г ГАА. Большая часть из которых составил PhIP, его количество равно 7,11 нг/г, количество MeIQx – 1,88 нг/г. В экспериментальных образцах было установлено, что добавление черного перца снижает количество образующихся ГАА на 12-100%. Это подтвердило результаты работы [86], где в говяжьем фарше с концентрацией черного перца 1г/100г, приготовленном во фритюре в течение 7,5 минут при температуре 225˚С снижение концентрации PhIP и 4,8-DiMeIQx составило 100%. В работе [84] снижение упомянутых ранее ГАА составило 49% и 63%, соответственно. Снижение ингибирующего воздействия можно объяснить отличными друг от друга способами термической обработки в разных экспериментах. Но в ходе работы было установлено и другое: концентрация таких ГАА как норгарман и гарман в готовом продукте увеличилась. Это можно объяснить тем, что ГАА группы β-карболинов присутствуют в растительном сырье, что означает их вероятное наличие в черном перце [87].

Пиперин – алкалоид, придающий остроту черному перцу, обладающий многими свойствами, как защита от когнитивных нарушений и нейродеградации, противоопухолевым свойствам, резистентности к инсулину, антимикробные свойства, антиоксидантные свойства, защита от стеатоза печени [88-91]. Результаты добавления пиперина в аналогичных черному перцу концентрациях показали больший ингибирующий эффект нежели черный перец. Содержание PhIP в готовом изделии было снижено на 73%, 72% и 68% , а содержание MeIQx на 69%, 23% и 20% при внесении 0,005%, 0,01% и 0,015% пиперина, соответственно, в сравнение со снижением в 43%, 52%, 57% и 57%, 66%, 75% PhIP и MeIQx, соответственно, при внесении соответствующего 0,5г/100г, 1,0г/100г и 1,5г/100г черного перца. Такие отличия можно объяснить тем, что в перце помимо пиперина есть и другие химические соединения, которые могут быть катализаторами в процессе образования ГАА, но, очевидно, либо их количество меньше, чем пиперина, либо их катализирующее воздействие много слабее ингибиторных свойств пиперина [81]. Результаты влияния внесенного черного перца и пиперина в мясные изделия на количество образуемых PhIP и

MeIQx приведены в таблице 6, результаты о влиянии на концентрации других ГАА можно увидеть в работе [84].

Таблица 6 – результаты влияния внесения черного перца и пиперина на количество образуемых в котлетах из мяса говядины PhIP и MeIQx.

образец	Содержание MeIQx, нг/г	Содержание PhIP, нг/г	Общее количество, нг/г
Контрольный образец	1,88	7,11	13,05
0,5% черного перца	0,81	3,02	7,51
1% черного перца	0,89	3,61	8,59
1,5% черного перца	0,91	4,04	9,77
0,005% пиперина	0,58	1,89	4,99
0,01% пиперина	0,62	2,01	5,2
0,015% пиперина	0,65	2,27	5,79

Еще одна интересная деталь, которую нельзя оставить без внимания это то, что чем больше концентрация перца или пиперина, тем меньше их ингибирующее воздействие. Так же влияние специй и их фенольных составляющих на образование ГАА изучалось в [91-92].

1.8 Снижение оказываемого воздействия

Учитывая, что количество образуемых ГАА в мясной продукции напрямую зависит от температуры и продолжительности термообработки, то в первую очередь снизить количество их образования можно путем регулирования этих параметров. Соответственно необходимо избегать длительной термообработки мясной продукции и подавлять прямое воздействие открытого огня на нее. Для примера, переворачивание рубленных полуфабрикатов каждую минуту в течение 7 минут приводит к образованию ГАА в 10 раз меньших концентрациях по сравнению с однократным переворачиванием при термообработке в течение 9 минут [93-95].

Кроме того, можно уменьшить количество потребляемых человеком ГАА, например, путем удаления поджаренной части (поверхностной корки) мясного продукта, удаления кожи у жареной птицы или рыбы [95].

Для обеспечения безопасности пищевой продукции помимо путей снижения уровней образования ГАА, возможно так же снижение их воздействия на организм, снижение их канцерогенной активности.

Для примера, докозагексаеновая полиненасыщенная омега-3 жирная кислота значительно снижает канцерогенез PhIP в прямой кишке крыс [96]. Индол-3-карбинол (натуральный антиоксидант, присутствующий в крестоцветных овощах) подавляет образование опухолей прямой кишки крыс, которым в рацион добавляли PhIP и IQ. По всей видимости, это связано с его модификацией путей метаболической активации ГАА [14, 97-98]. Основную роль в метаболизме ГАА играет фермент CYP1A2, уровень которого существенно увеличился при потреблении кофеина с питьевой водой в концентрациях от 500 до 1000 мг в течение двух недель. Лиофилизированные культуры Bifidobacterium longum в йогуртах ингибируют канцерогенез, вызванный IQ в толстой кишке, молочной железе и печени [99]. Хлорофиллин понижает абсорбцию ГАА из кишечника, тем самым увеличивая прохождение неметаболизированных ГАА в фекалии, соответственно подавляя канцерогенез, вызванный у крыс PhIP и IQ [100-101].

Проведённый анализ научно-технической литературы показал, что вопросам изучения роли ГАА в онкогенезе человека уделяется все больше внимания ввиду доказанности опасного эффекта для здоровья. Однако отсутствие утверждённых методик измерения рассматриваемого токсиканта в мясной продукции не позволяет однозначно провести анализ риска для здоровья человека при употреблении белковой продукции и установить нормируемые пределы по безопасности. В связи с этим, цель и задачи поставленные в данной работе являются актуальными и подтверждают научную новизну данной научной работы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В соответствии с целью работы объектами исследований служили:

- обжаренное мясо птицы бескостное (куриная грудка – M. pullum pectus);

- обжаренная свинина жилованая (M. longissimus dorsi);

- обжаренная говядина жилованая (M. longissimus dorsi);

- обжаренные рубленые полуфабрикаты из свинины, говядины и курицы с внесенным красным молотым перцем;

- стерилизованные консервы мясные кусковые из говядины;

- полуфабрикаты рубленые из говядины, приготовленные в ресторанах быстрого питания (три образца, отобранные в разных ресторанах);

- кулинарные изделия:

- блюдо второе обеденное с гарниром азу из говядины с рисом;
- блюдо второе обеденное с гарниром азу из говядины с пюре;
- блюдо второе обеденное с гарниром азу из говядины с макаронами.

В настоящее время на территории Российской Федерации отсутствуют утвержденные методы определения ГАА в пищевой продукции, в связи с чем разработка такой методики являлась одной из задач настоящей диссертационной работы.

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%;

Схема экспериментальных исследований приведена на рисунке 12.

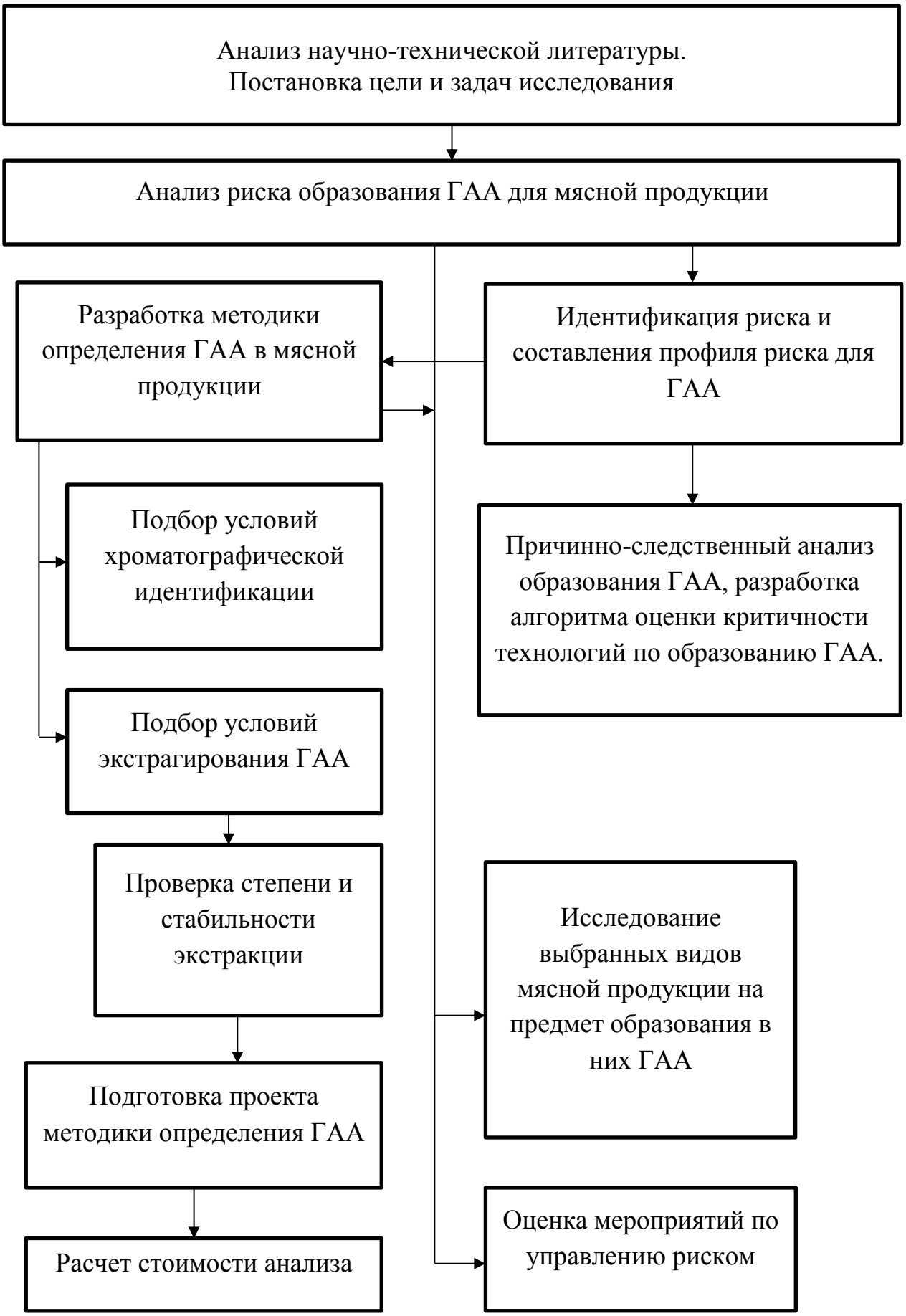


Рисунок 12 – Схема экспериментальных исследований

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Идентификация и оценка риска ГАА

На первом этапе анализа риска на основе литературного анализа была проведена идентификация риска, в результате чего определены гетороциклические ароматические амины. В настоящее время известно более тридцати соединений, которые относят к ГАА [5]: 2-амино-1,6-диметилимидазо[4,5-b]-пиридин (DMIP), 2-амино-1,5,6-триметилимидазо[4,5-b]-пиридин (1,5,6-TMIP), 2-амино-3,5,6-триметилимидазо[4,5-b]-пиридин (3,5,6-TMIP), 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]-пиридин (PhIP), 2-амино-1-метил-6-(4'-гидроксифенил)-имидазо[4,5-b]-пиридин (4’-OH-PhIP), 2-амино-1,6-диметил-фуро[3,2-e]имидазо[4,5-b]-пиридин (IFP), 2-амино-1-метил-имидазо[4,5-f]-хинолин (iso-IQ), 2-амино-3-метил-имидазо[4,5-f]-хинолин (IQ), 2-амино-3,4-диметил-имидазо[4,5-b]-хинолин (MeIQ), 2-амино-1-метил-имидазо[4,5-f]-хинолин (IQ[4,5-b]), 2-амино-3-метил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (IQ), 2-амино-3-метил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (IQx), 2-амино-3,4-диметил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (4-MeIQx), 2-амино-3,8-диметил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (8-MeIQx), 2-амино-3,7,8-триметил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (7,8-DiMeIQx), 2-амино-3,4,8-триметил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (4,8-DiMeIQx), 2-амино-4-гидроксиметил-3,8-диметил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (4-CH2OH-8-MeIQx), 2-амино-3,4,7,8-тетраметил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (TriMeIQx), 2-амино-1-метил-имидазо[4,5-g]-хиноксалин (IgQx), 2-амино-1,7-диметил-имидазо[4,5-g]-хиноксалин (7-MeIgQx), 2-амино-1,6,7-триметил-имидазо[4,5-g]-хиноксалин (6,7-DiMeIgQx), 2-амино-1,7,9-триметил-имидазо[4,5-g]-хиноксалин (7,9-DiMeIgQx), 2-амино-5-фенилпиридин (Phe-P-1), 2-амино-9H-пиридо[2,3-b]индол (AαC), 2-амино-3-метил-9H-пиридо[2,3-b]индол (MeAαC), 1-метил-9H-пиридо[3,4-b]индол (Гарман), 9H-пиридо[3,4-b]индол (Норгарман), 3-амино-1-метил-5H-пиридо[4,3-b]индол (Trp-P-2), 3-амино-1,4-диметил-5H-пиридо[4,3-b]индол (Trp-P-1), 2-аминодипиридо-[1,2-a:3’,2’-d]имидазол (Glu-P-2), 2-амино-6-метилдипиридо-[1,2-

a:3’,2’-d]имидазол (Glu-P-1), 4-амино-6-метил-1H-2,5,10,10b-тетраазафлюорантан (Orn-P-1), 4-амино-1,6-диметил-2-метиламино-1H,6H-пирроло-[3,4-f]бензимидазол-5,7-дион (Cre-P-1), 3,4-циклопентено-пиридо[3.2-a]карбазол (Lys-P-1).

По результатам проведенного анализа литературы из всего перечня перечисленных гетероциклических ароматических аминов, вещества 2-амино-3,8-диметилимидазо[4,5-f]хиноксалин (MeIQx) и 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридин (PhIP) составляют не менее 85% от всех ГАА, образующихся в продукте в процессе термообработки, в связи с чем они были выбраны маркерами присутствия ГАА в мясной продукции и использовались в экспериментальной части настоящей диссертационной работы.

На следующем этапе был составлен профиль риска ГАА в соответствии методикой профилирования рисков, предложенных в [102]. Профиль риска ГАА представлен в таблице 7.

Таблица 7 – профиль риска ГАА

Профиль риска ГАА		
1	Название компонента	Гетероциклические ароматические амины
2	Название отдельных веществ подгруппы, выделяемых как химическая опасность	- 2-амино-3,8-диметилимидазо[4,5-f]хиноксалин (MeIQx) - 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридин (PhIP)
3	Описание	Циклические амины, образуются в высокобелковой пищевой продукции в процессе ее термической обработки
4	Источники риска	Жареная мясная продукция
5	Значимые технологические этапы	Тепловая обработка с температурами выше 150ºС, предусматривающая контакт продукта с нагревающей поверхностью
6	Факторы риска	- Температура обработки - Продолжительность обработки - Контакт продукта с нагревающей поверхностью
7	Сочетанные риски	Другие экзогенные ксенобиотики (ПАУ, акриламид, фуран, пропандиол)
8	Влияние на здоровье человека	Являются канцерогенными и мутагенными соединениями, приводящими к образованию у

		человека раковых опухолей

Продолжение таблицы 7

9	Наличие нормативных требований	В настоящее время нормативные требования и нормы содержания ГАА в продукции отсутствуют как на территории РФ, так и за рубежом

Гетероциклические ароматические амины – химические соединения, имеющие в своих молекулах ароматические кольца. Наличие ароматических колец в составе делает молекулу сильно стабильной и делает практически невозможным ее разрушение, что приводит к невозможности удаления образовавшегося ГАА из пищевого продукта путем технологических приемов.

Источниками ГАА является термически обработанная пищевая продукция, для которой характерно высокое содержание креатина или креатинина, так как они являются основой для молекулы ГАА. К такой продукции относится по большей части мясная продукция. Однако существует ряд работ, показывающих наличие ГАА в хлебобулочных изделиях, но в количествах много меньших, чем в мясной продукции [103] и даже в воздухе [104].

Значимыми технологическими этапами в анализе риска ГАА была в данной работе определена термическая обработка температурами выше 150˚С, т.е. это жарка, жарка на открытом огне, запекание, барбекю и т.п. Исходя из обозначенных важных технологических этапов и на основе проведенного анализа были установлены следующие факторы риска:

- Температура обработки – выбрана ввиду того, что ГАА образуются при температурах выше 150˚С;
- Продолжительность обработки имеет прямопропорциональное влияние на количество образующихся ГАА;
- Контакт продукта с нагревающей поверхностью (или с огнем) – ряд исследований показал, что именно теплообмен путем теплопередачи

имеет важное влияние на количество образующихся ГАА, нежели теплообмен, например, конвекционным способом.

Основной риск ГАА при употреблении их человеком - способность вызывать нестабильность генов и повышать чувствительность к промоторам новообразований, из-за чего важно их изучение и нормирование с другими сочетанными рисками, как, например, ПАУ, акриламид, фураны и другие ксенобиотики экзогенной природы.

Помимо способности ГАА вызывать нестабильность генов, ГАА сами обладают канцерогенными и мутагенными свойствами и могут являться причиной новообразований у человека, если поступают в организм в достаточных для этого концентрациях.

Однако в настоящее отсутствуют какие-либо нормативные требования к предельно допустимым концентрациям ГАА в продукте ни на территории РФ, ни за рубежом, что говорит о необходимости проведения клинических испытаний о влиянии ГАА на живые организмы, об их метаболизме, накоплении и способности к выведению из организма, для установления в будущем норм по допустимому потреблению ГАА с продуктами питания.

На основе анализа литературных источников был проведен причинно-следственный анализ с определением факторов влияющих на образование ГАА в мясной продукции. Результаты представлены на рисунке 13.

Рисунок 13 – причинно-следственная диаграмма факторов, влияющих на образование ГАА

Как видно на диаграмме, основными причинами образования ГАА рассматривались сырье, технология приготовления, контакт продукта с поверхностью и персонал.

Для образования ГАА в готовом продукте сырье должно быть богато белком и содержать большие количества креатина или креатинина. Таким требованиям отвечает сырье из сельскохозяйственных животных, мяса птицы и рыба.

Технология приготовления играет важную роль в процессе образования ГАА, самые главные факторы — это температура, более 150˚С, а также продолжительность термообработки, которая так же прямопропорционально влияет на концентрацию ГАА.

Способ теплообмена играет важную роль в процессе образования ГАА, поэтому при анализе риска важен факт контакта пищевого продукта с нагревающей поверхностью либо же с открытым огнем.

Существенную роль при оценке риска ГАА отводится персоналу осуществляющему операции термообработки продукта. Несмотря на то, что

сегодня оборудование делается максимально автоматизированным, несоблюдение технологических параметров со стороны персонала может привести к увеличению продолжительности термообработки либо увеличению ее температуры, что в конченом итоге приведет к увеличению концентрации ГАА в готовом продукте.

Из рассмотренных факторов образования ГАА, наиболее контролируемыми являются персонал, поскольку используется в основном максимально автоматизированное оборудование и внедренная на многих предприятиях система менеджмента безопасности пищевой продукции, определяющая целый комплекс процедур по работе с персоналом.

Фактор сырья является слабоуправляемым, поскольку наличие в мясном сырье креатина и креатенина, обуславливается естественным содержанием и формируется на стадии выращивания животного.

Таким образом значимыми для управления факторами были определены: технология приготовления и контакт продукта с поверхностью.

На основе этого разработан алгоритм оценки критичности технологии (рисунок 14) на основании которого принимается решение о необходимости проведения исследований на содержание в продукте ГАА. Алгоритм применим к мясной продукции, при приготовлении которой выполняется одно из следующих условий:

- Температура термической обработки выше 150 ˚С;
- Есть контакт пищевого продукта с нагревающей поверхностью;
- Есть контакт пищевого продукта с открытым огнем;

Технология признается критичной, а продукцию, приготовленную по ней необходимо исследовать на содержание ГАА.

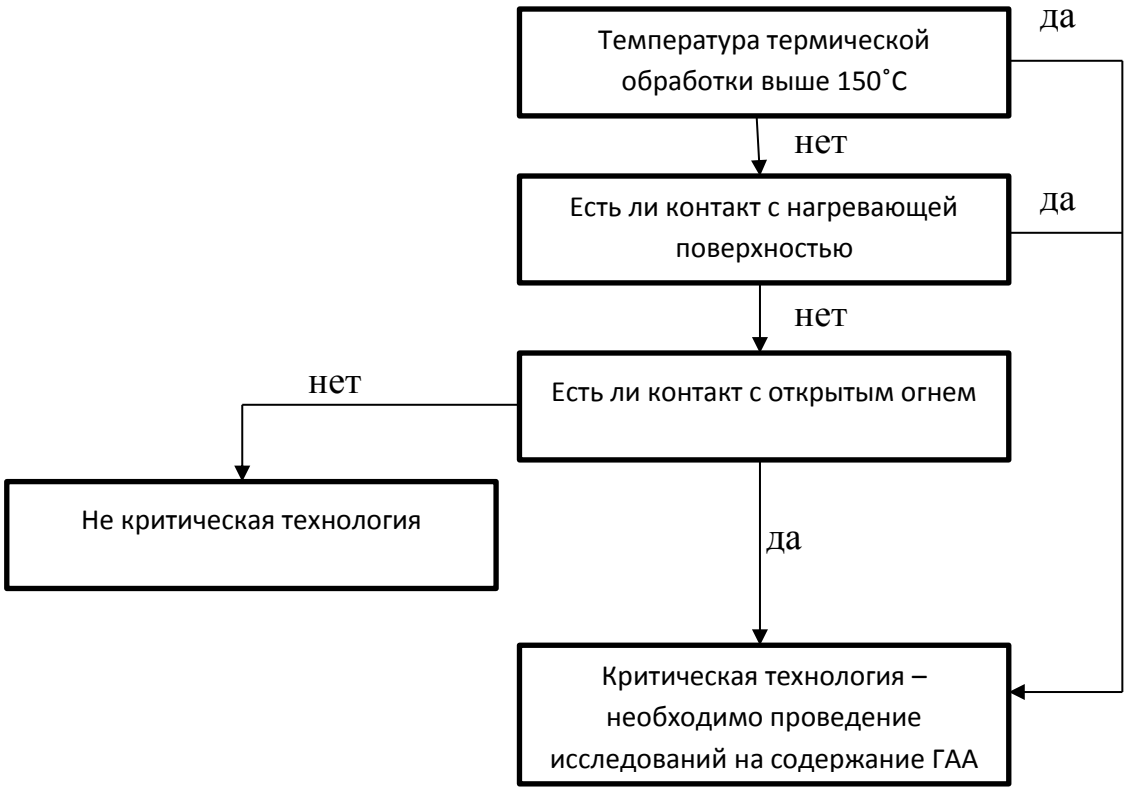


Рисунок 14 – Алгоритм оценки критичности технологии

На основании составленного профиля риска ГАА и выявленного критического технологического этапа «термическая обработка» было оценено приоритетное число риска (ПЧР) в соответствии с [89]:

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 как – 4.

Вероятность возникновения (В) – Очень высокий (В = 0,10-0,50) или недостаточно научной информации – соответствует полностью, поэтому ранг вероятности возникновения был оценен как 10.

Возможность выявления (ВВ) – Методики выявления отсутствуют – соответствует полностью, ранг риска по критерию возможности выявления оценен как– 10.

Такими образом ПЧР был рассчитан как:

ПЧР = Тп х Вр х ВВ=4 х 10 х 10 = 400.

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

На основе проведенного анализа и составления профиля риска ГАА одним из ключевых факторов при оценке рисков является возможность их определения. Поскольку стандартизированный метод на настоящий момент отсутствует, на следующем этапе были проведены работы по подбору условий экстракции ГАА и их хроматографической идентификации для последующей разработки методики.

3.2 Методика определения ГАА в мясной продукции

3.2.2 Подбор условий хроматографической идентификации

На данном этапе выполнения работы была исследована возможность идентификация ГАА с помощью ВЭЖХ с детектированием в ультрафиолетовом спектре.

При подборе условия идентификации ГАА с помощью ВЭЖХ с детектированием в ультрафиолетовом спектре в качестве реактивов использовали: ацетонитрил для ВЭЖХ, деионизованную воду.

В качестве стандартных образцов использовали: MeIQx, и PhIP. Стандарты растворяли в ацетонитриле для достижения концентраций 1000, 100, 10 и 1 нг/мл.

Анализ проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1260 (США) УФ-детектором Agilent 1260 DAD WR (США).

Для определения ГАА использовали хроматографическую колонку Acclaim PolarAdvantage II C18, 4,6 х 150 мм, (Thermo).

Условия хроматографического деления:

объем вводимой пробы – 0,03 $см^3$/мин;

скорость потока подвижной фазы – 0,5 $см^3$/мин;

температура термостата колонки - 35 ºС.

подвижная фаза – ацетонитрил/вода 4:1.

Описанные выше условия позволили обнаружить MeIQx и PhIP в концентрациях 1 нг/мл, но не позволили разделить их при концентрациях менее 10 нг/мл. На рисунках 15-18 представлены хроматограммы стандартных образцов в концентрациях 1000, 100 10 и 1 нг/мл соответственно.

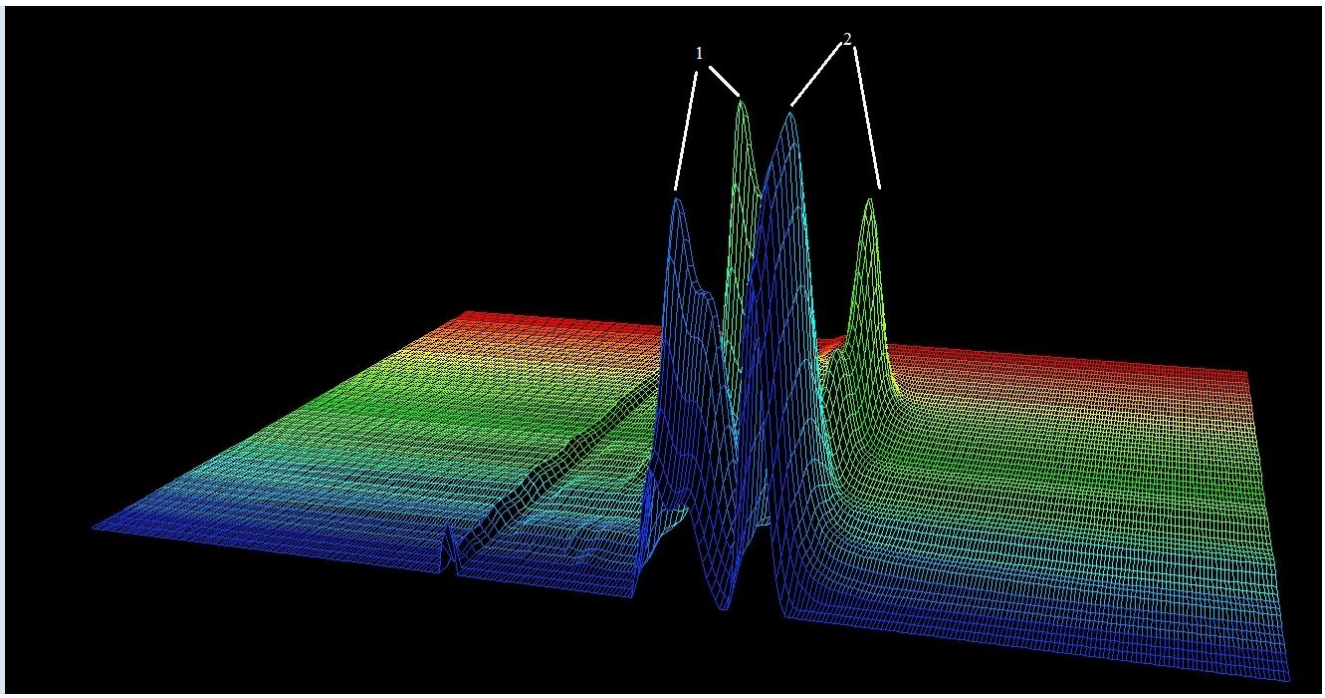


Рисунок 15 – Хроматограмма стандартных образцов MeIQx и PhIP в концентрации 1000 нг/мл в диапазоне длин волн от 190 до 400 нм. Вещество MeIQx (1) выходит на 4,34 мин, вещество PhIP (2) выходит на 4,877 мин

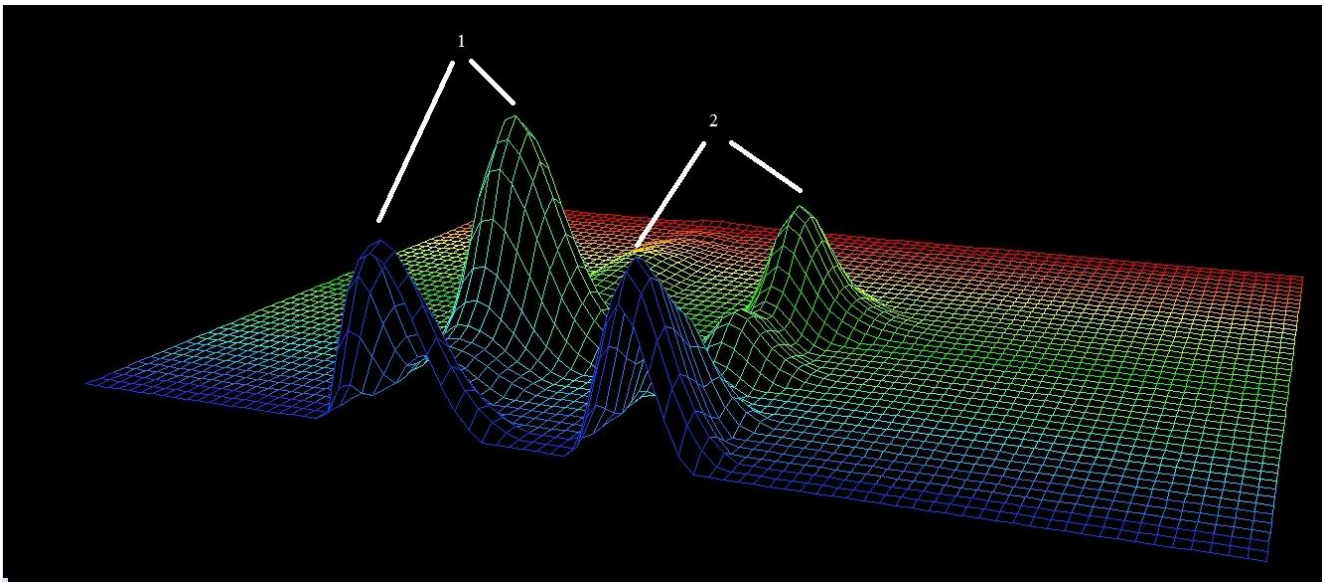


Рисунок 16 – Хроматограмма стандартных образцов MeIQx и PhIP в концентрации 100 нг/мл в диапазоне длин волн от 190 до 400 нм. Вещество MeIQx (1) выходит на 4,52 мин, вещество PhIP (2) выходит на 4,999 мин

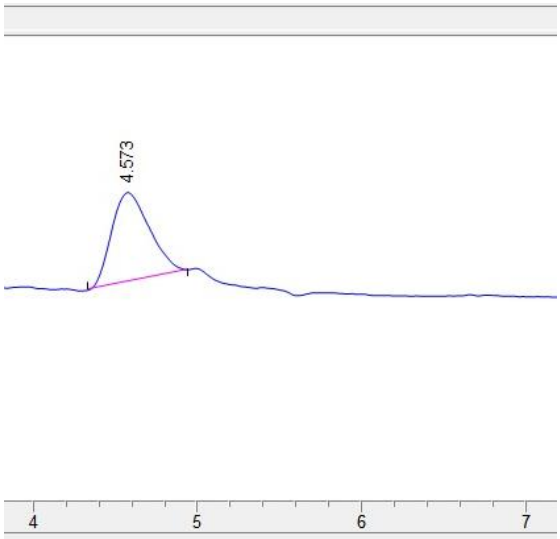


Рисунок 17 – Хроматограмма стандартных образцов MeIQx и PhIP в концентрации 10 нг/мл. Вещества MeIQx и PhIP выходят одним пиком на 4,573 мин

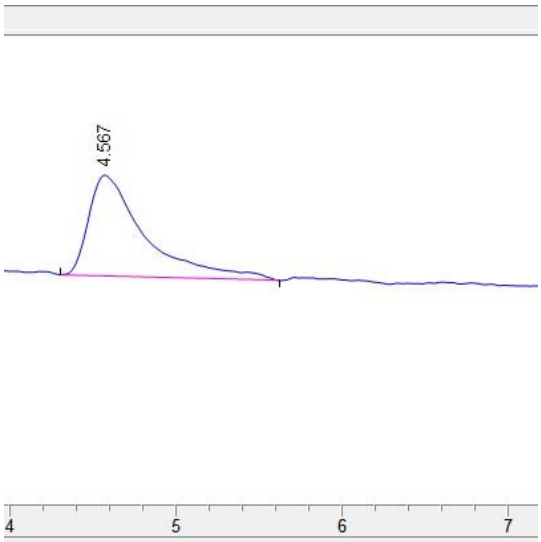


Рисунок 18 – Хроматограмма стандартных образцов MeIQx и PhIP в концентрации 1 нг/мл. Вещества MeIQx и PhIP выходят одним пиком на 4,567 мин

Кроме того, на данном этапе работы было установлено, что наибольшей интенсивностью сигнал MeIQx обладает при длине волны 272 нм, а PhIP при длине волны 222 нм (рисунки 19, 20).

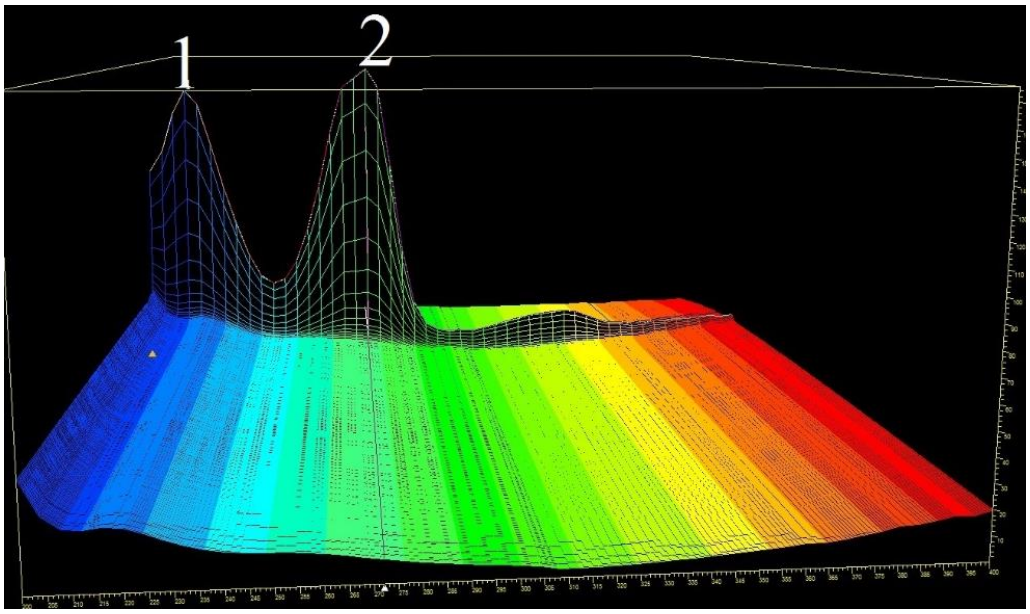


Рисунок 19 – Хроматограмма вещества MeIQx в ультрафиолетовом спектре в диапазоне длин волн от 190 до 400 нм. На рисунке отмечены два наиболее интенсивных пика: 1 – вещество на длине волны 212 нм с интенсивностью 158,66 относительных единиц, 2 – вещество на длине волны 272 нм с интенсивностью 171,4 относительных единиц

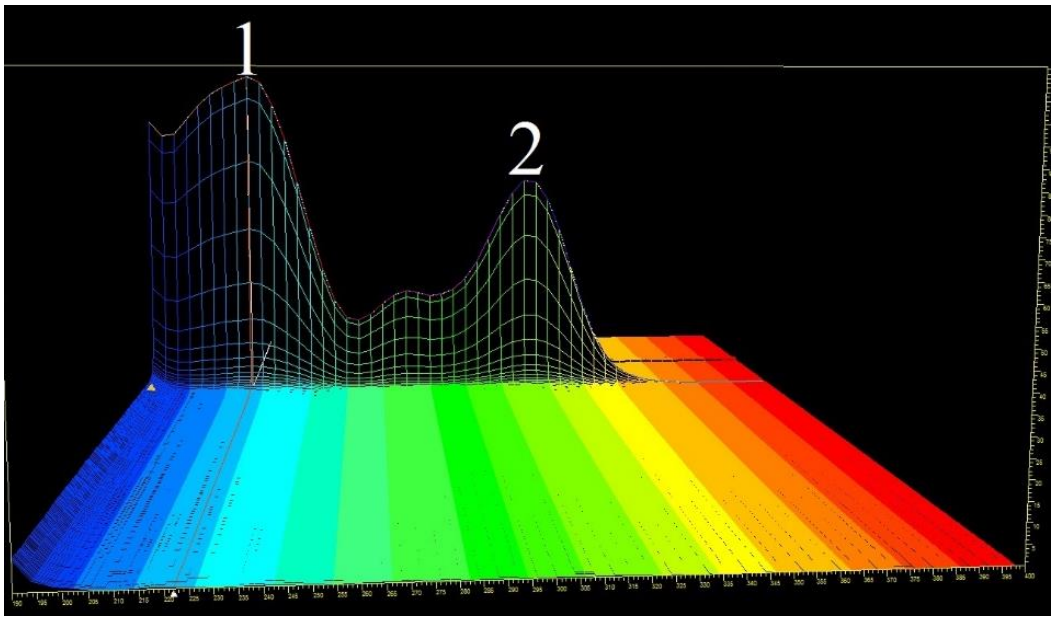


Рисунок 20 – Хроматограмма вещества PhIP в ультрафиолетовом спектре в диапазоне длин волн от 190 до 400 нм. На рисунке отмечены два наиболее интенсивных пика: 1 – вещество на длине волны 222 нм с интенсивностью 112,31 относительных единиц, 2 – вещество на длине волны 318 нм с интенсивностью 74,59 относительных единиц

Определяемые аналиты в концентрациях ниже 10 нг/мл не удалось хроматографически разделить путем изменения хроматографической колонки, или подбором градиентов элюента. На следующем этапе работы были подобраны условия для идентификации ГАА с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием – метод идентификации аналита, позволяющий определять их концентрацию. Основой для измерения служит ионизация молекул, позволяющая физически различать компоненты на основе характеризующего их отношения массы к заряду и, измеряя интенсивность ионного тока, производить отдельный подсчёт доли каждого из компонентов (получать масс-спектр вещества).

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/см3.

Анализ проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent1200 (США) с трех квадрупольным 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 7.

Таблица 7 – 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

При исследовании было выявлено, что при ионизации оба аналита теряют в своей молекулярной массе 15,1 а.е.м., это свидетельствует о том, что молекулы ГАА, как и все циклические соединения, очень стабильны, а использование MRM технологии возможно только благодаря удалению метилового радикала у них при электронном ударе.

На следующем этапе подбирались условия градиентного элюирования для хроматографического разделения веществ, данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – условия градиентного элюирования

Время, мин	Ацетонитрил, %	Вода, %	Скорость потока, мкл/мин
0	10	90	400
3	40	60	400
4	60	40	400
6	90	10	400
8	90	10	400
8,1	10	90	400
12	10	90	400

Подобранные условия и время выхода аналитов, которое видно на рисунке 21 (на котором представлена 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)) показывают, что вещество MeIQx вымывается с хроматографической колонки при соотношении ацетонитрил:вода равном 60:40%, а вещество PhIP – при соотношении 90:10%.

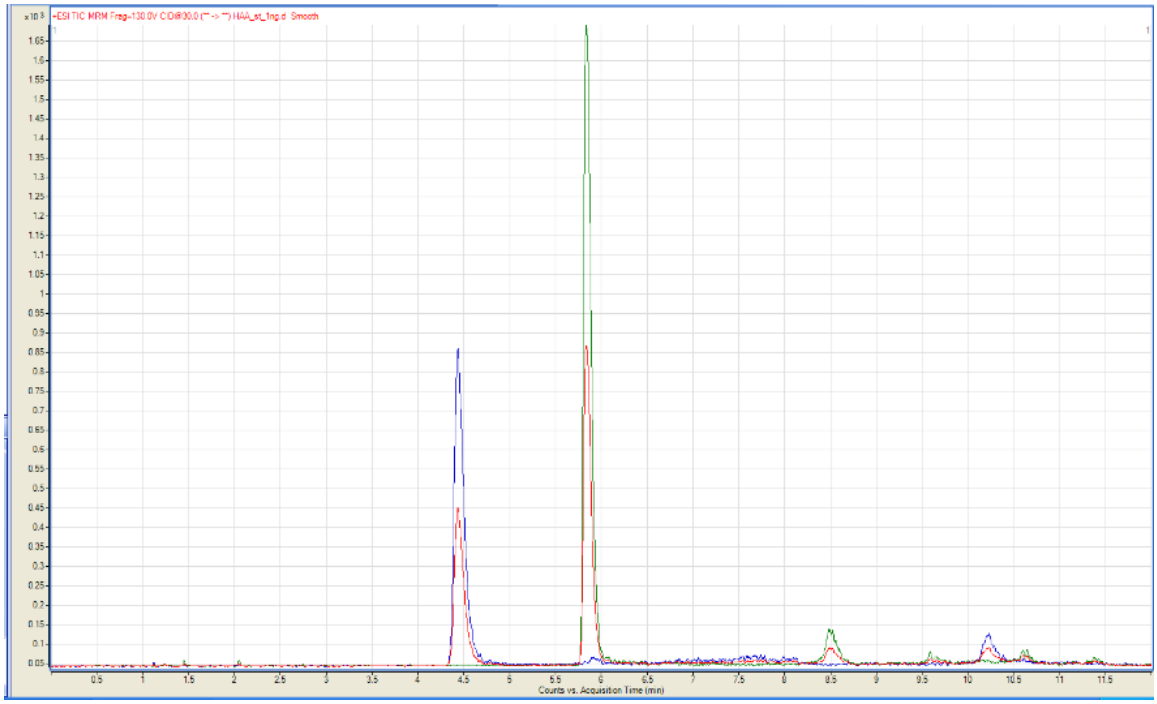


Рисунок 21 – Хроматограмма наложения общего ионного тока на дочерние ионы PhIP и MeIQx

Подобранные и описанные хроматографические условия позволяют обнаружить ГАА в концентрациях от 1 нг/см^3, т.е. наиболее оптимальные концентрации для определения ГАА в реальной пробе.

Следующим этапом становится необходимым подбор условий экстрагирования определяемых аналитов из реальной пробы.

3.2.3 Подбор условий экстракции ГАА

В ходе выполнения работы 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 экстрагировали ГАА в необходимых количествах.

Для исследований мясной продукции были разработаны следующие способы пробоподготовки:

- **щелочной гидролиз образца с последующей экстракцией ГАА из гидролизата органическим растворителем**, который заключается в следующем:

Пробу анализируемого продукта массой (3,00±0,01) г, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см^3. Добавляют 50 см^3 раствора 1 М гидроксида натрия в этаноле. Колбу соединяют с обратным холодильником, помешают в водяную баню и нагревают при температуре (80±2) °С в течение 30 мин или до полного растворения образца, периодически перемешивая палочкой из боросиликатного стекла содержимое колбы. После этого содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры. Полученный гидролизат переносят в делительную воронку объемом не менее 250 см^3 и добавляют 10-15 см^3 дистиллированной воды для охлаждения. Затем в делительную воронку добавляют 25 см^3 диэтилового эфира, дают отстояться 1-5 минут до разделения слоев. После нижний слой сливают и переливают в другую делительную воронку объемом не менее 250 см^3 для повторной экстракции. К нему добавляют 25 см^3 диэтилового эфира и оставляют до разделения слоев. После чего, нижний слой сливают, а к верхнему эфировому слою добавляют эфировый слой, полученный после первой экстракции. Полученный эфир промывают 2-5 раз дистиллированной водой порциями по 25-30 см^3 для очищения пробы от щелочи. Затем эфировый слой пропускают через мембранный фильтр с 15-20 г сернокислого натрия для обезвоживания. Полученный эфир выпаривают до сухого остатка при температуре не более 40 ºС. К сухому остатку приливают 1 см^3 ацетонитрила. Ставят на 5 мин на ультразвуковую баню до полного растворения остатка. Раствор пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в хроматографическую виалу вместимостью 2 см^3 для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Подобранные условия позволили экстрагировать ГАА из реальной пробы, поэтому на следующем этапе были проведены работы по оценке степени экстракции предложенным способом.

Чтобы установить степень экстракции, к пробе, изначально не содержащей ГАА добавляли растворы стандартных образцов ГАА. В качестве образца, не содержащего ГАА использовали вареное мясо говядины, так как матрица пробы, полученная из него приближенно похожа на матрицу, полученную из образцов, содержащих ГАА. Процесс приготовления пробы с заданной концентрацией ГАА заключался в следующем: к измельченному вареному мясу добавляли растворы стандартных образцов до достижения концентраций 10 нг/г.

Согласно результатам, в пробах содержалось 1,09 нг/г MeIQx и 2,94 нг/г PhIP. Таким образом, степень экстракции составила ≈10,9 % и ≈29,4 % для MeIQx и PhIP соответственно. Так как такая степень экстракции не может считаться удовлетворительной, было решено провести работы по определению стабильности степени экстракции.

Чтобы установить стабильность экстракции, к пробе, изначально не содержащей ГАА добавляли растворы стандартных образцов ГАА. В качестве образца, не содержащего ГАА использовали так же вареное мясо говядины. Было подготовлено 9 образцов: 3 образца с добавлением растворов стандартов ГАА для достижений концентрации 10 нг/г, 3 образца – 25 нг/г и 3 образца – 50 нг/г.

Проведенные исследования образцов показали, что все полученные значения находились в пределах погрешности методики определения ГАА, в связи с чем принято решение считать степень экстракции ГАА из реальной пробы способом жидкостной экстракции стабильной. В связи с этим предложены коэффициенты пересчета для получения достоверных результатов содержания ГАА в пробе - 9,2 и 3,4 для MeIQx и PhIP, соответственно.

- **щелочной гидролиз с последующей твердофазной экстракцией (ТФЭ)**, который заключается в следующем:

Пробу анализируемого продукта массой (3,00±0,01) г, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см^3. Добавляют 50 см^3

раствора 1 М гидроксида натрия в этаноле. Колбу соединяют с обратным холодильником, помешают в водяную баню и нагревают при температуре (80±2) °С в течение 30 мин или до полного растворения образца, периодически перемешивая палочкой из боросиликатного стекла содержимое колбы. После этого содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры. Гидролизат смешивают с 6 г диатомита и переносят в делительную воронку вместимостью 500 $см^3$. Добавляют 10 $см^3$ этилацетата, тщательно перемешивают и дают отстояться. После расслаивания верхний этилацетатный слой переносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$. Экстракцию повторяют 10 $см^3$ этилацетата, объединяя этилацетатный слой. После этого пробу центрифугируют 10 мин с центробежным ускорением 5000 g. Отбирают 10 $см^3$ полученного супернатанта и используют для ТФЭ.

Картриджи ТФЭ предварительно активируют, пропуская 6 $см^3$ метанола, затем 6 $см^3$ 0,1 М соляной кислоты в деионизованной воде. Анализируемый раствор наносят на картридж со скоростью 1 $см^3$/мин, собирая этилацетатный экстракт. Картридж промывают, пропуская 6 $см^3$ 0,1М соляной кислоты в деионизованной воде и 6 $см^3$ метанола, отбрасывая смывы. Аналиты элюируют 6 $см^3$ смеси метанол-аммиак в соотношении 19:1 со скоростью 1 $см^3$/мин и переносят в круглодонную колбу объединяя с этилацетатным экстрактом. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. К сухому остатку приливают 1 $см^3$ ацетонитрила. Ставят на 5 мин на ультразвуковую баню до полного растворения остатка. Раствор пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в хроматографическую виалу вместимостью 2 $см^3$ для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Подобранные условия так же позволили экстрагировать ГАА из реальной пробы, поэтому на следующем этапе были проведены работы по оценке степени экстракции способом ТФЭ, а также ее стабильности.

Определение степени и стабильности экстракции способом ТФЭ проводилось по аналогии с такими же работами для способа с жидкостной экстракцией.

Согласно результатам в пробах, подготовленных способом с ТФЭ, содержалось 2,1 нг/г MeIQx и 4,05 нг/г PhIP. Таким образом, степень экстракции у этого способа составила ≈21% для MeIQx и ≈40,5% для PhIP. Данный способ показал лучшую степень экстракции по сравнению с экстракцией диэтилововым эфиром.

Проведенные исследования в области определения стабильности экстракции ГАА способом ТФЭ показали, что все полученные значения так же находились в пределах погрешности методики определения ГАА, в связи с чем принято решение считать степень экстракции ГАА из реальной пробы способом ТФЭ стабильной. В связи с этим предложены коэффициенты пересчета для получения достоверных результатов содержания ГАА в пробе – 4,8 и 2,5 для MeIQx и PhIP, соответственно.

Предложенные коэффициенты пересчета для аналитов и способа пробоподготовки представлены в таблице 9.

Таблица 9 – коэффициенты пересчета

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

Способ подготовки проб с жидкостной экстракцией обладает меньшей степенью экстракции по сравнению со способом с ТФЭ, но он дешевле и проще в выполнении, поэтому в дальнейшем в ходе выполнения настоящей диссертационной работы использовался способ подготовки проб с жидкостной экстракцией.

Подобрав условия определения ГАА в мясной продукции с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием было обнаружено сильное влияние матричного эффекта пробы на результаты анализа, а именно время удерживания определяемых веществ смещалось в большую сторону (смещение составляло до 2.5 минут). Для решения данной проблемы был изменен тип

хроматографической колонки на Poroshell 120. Преимуществом данной колонки является двукратное увеличение числа теоретических тарелок по сравнению с традиционным размером частиц 3,5 мкм, снижение фонового давления ниже, чем на сорбентах 1,8 мкм, более высокая устойчивость к загрязненным пробам, за счет размера пор, характерных для сорбента 1,8 мкм. Однако смена хроматографической колонки не позволила устранить матричный эффект, в связи с чем следующим шагом стало построение матричной линейной калибровки в диапазонах концентраций от 6 до 600 нг/мл и от 5,5 до 550 нг/мл 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/мл и 5.5, 9.1, 13.75, 27.5, 55, 91, 137.5, 275, 550 нг/мл для MeIQx и PhIP, соответственно. Такие концентрации были выбраны на основании проанализированной 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/мл и 5.5, 9.1, 13.75, 27.5, 55, 91, 137.5, 275, 550 нг/мл 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. Коэффициент корреляции линейной регрессии R составил не менее 0.99. Полученное при построении линейной калибровки уравнение линейной регрессии для MeIQx:

$$y = 6048.379788*x – 60190.588646 \quad (1)$$

Полученное при построении линейной калибровки уравнение линейной регрессии для PhIP:

$$y = 14433.213689*x + 21370.000524 \quad (2),$$

где y – концентрация аналита

x – площадь пика

Графики калибровок приведены на рисунках 22 и 23 для MeIQx и PhIP соответственно.

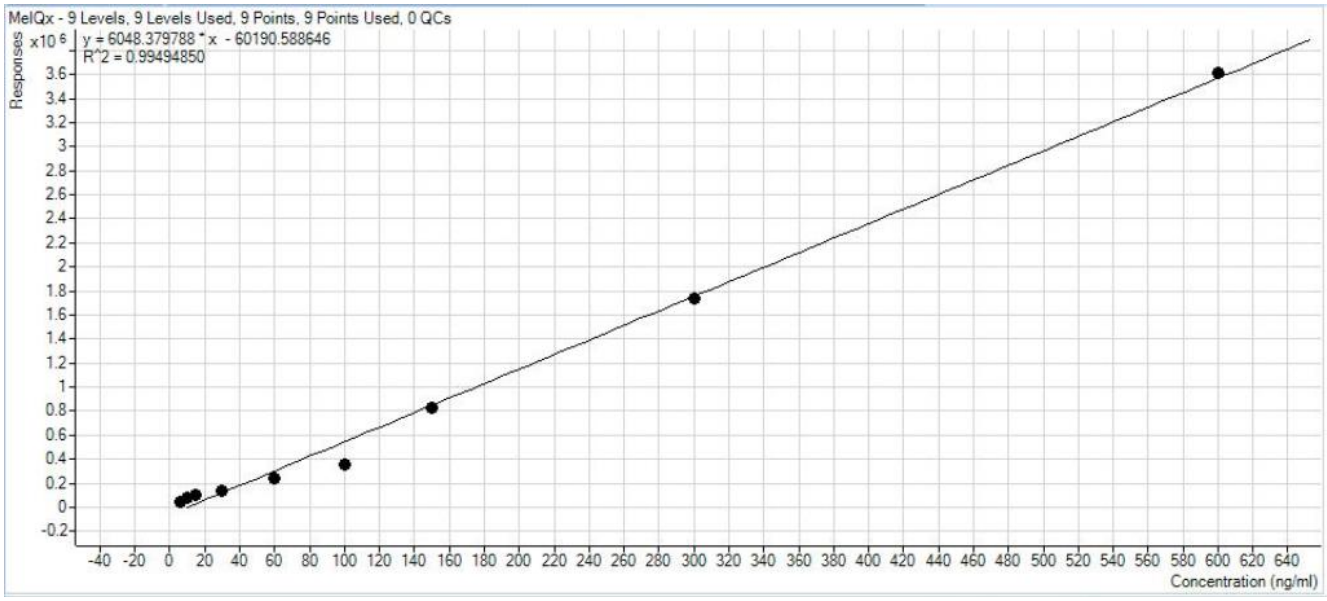


Рисунок 22 – График линейной калибровки для MeIQx

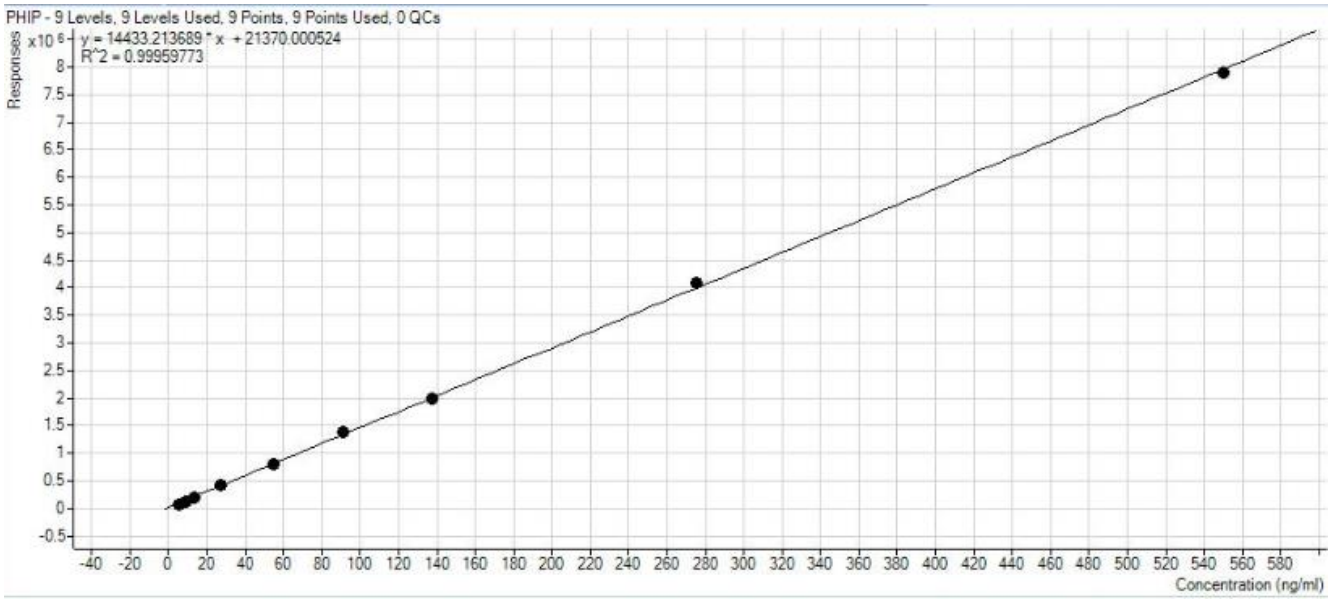


Рисунок 23 – График линейной калибровки для PhIP

Установленный в калибровке диапазон значений оптимален для исследований ГАА, так как диапазоны обнаруживаемых концентраций составляют в среднем от 5,5 до 550 нг/г и от 6,0 до 600 нг/мл для MeIQx и PhIP, соответственно.

По результатам работ определены предел обнаружения, предел количественного обнаружения, степень извлечения. Проведена валидация методики со способом подготовки проб жидкостной экстракции и установлены

показатели точности и специфичности. Валидацию методики проводили в соответствии с Регламентом Комиссии ЕС 2002/657. Для выполнения валидации методики получали и обрабатывали результаты по следующим параметрам: специфичность; линейность; правильность (степень извлечения); предел обнаружения (LOD), предел количественного обнаружения (LOQ). Для подтверждения специфичности методики исследовали 10 образцов мясных продуктов, не содержащих MeIQx и PhIP. Во всех 10 образцах отсутствовали хроматографические пики, мешающие определению MeIQx и PhIP. Методика позволит достоверно определять MeIQx и PhIP в присутствии посторонних примесей и системных пиков подвижной фазы. Коэффициент линейной корреляции полученных градуировочных зависимостей составил не менее 0.96 в диапазоне концентраций 1,0 – 1000,0 нг/мл. 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.

Таким образом, можно говорить о пригодности подобранных условий хроматографической идентификации и экстракции аналитов из пробы для анализа мясной продукции на содержание в ней ГАА.

На следующем этапе были проведены аналогичные работы по построению матричной калибровки для способа подготовки проб с ТФЭ.

3.3 Построение матричной калибровки для способа подготовки проб с ТФЭ

Несмотря на то, что способ подготовки пробы с жидкостной экстракцией был выбран в качестве рабочего для выполнения настоящей диссертационной работы, способ с ТФЭ так же необходимо было доработать, для возможности его

использования. Способ с ТФЭ приведен в разработанной в рамках выполнения настоящей диссертационной работы методики измерений по определению ГАА в мясной продукции (приложение 1) ввиду большей степени экстракции аналитов и наилучшей очистке пробы. Поэтому для него так же была построена матричная калибровка.

Приготовление растворов для построения матричной калибровки для способа подготовки проб с ТФЭ осуществлялось аналогично, как и для способа с жидкостной экстракцией, а именно к 800 мкл пробы, не содержащей ГАА, добавляли по 200 мкл растворов установленных концентраций для достижения концентраций 1,0; 5,0; 15,0; 25,0 нг/мл, т.е. матрица пробы была разбавлена на 20%. Однако, при проведении хроматографического анализа полученных растворов, было установлено, что подавление сигнала все так же велико из-за влияния матрицы пробы, из-за чего не представляется возможным построить линейную калибровку. Для решения проблемы, приготовленные растворы разбавили стандартными образцами еще на 10%. В результате получены растворы следующих концентраций 1,82, 9,09, 18,18, и 27,27 нг/мл. Проведенный хроматографический анализ вновь полученных растворов показал сильное уменьшение подавления сигнала из-за матричного эффекта, а полученные результаты позволили построить линейную матричную калибровку. Коэффициент корреляции линейной регрессии R составил не менее 0.96. Полученное при построении линейной калибровки уравнение линейной регрессии для MeIQx:

$$y = 170{,}079494*x - 444{,}562489 \quad (3)$$

Полученное при построении линейной калибровки уравнение линейной регрессии для PhIP:

$$y = 373{,}023046*x - 558{,}803313 \quad (4),$$

где y – концентрация аналита

x – площадь пика

Коэффициенты корреляции при этом составили 0,96996817 и 0,99759663 для MeIQx и PhIP, соответственно.

Графики калибровок приведены на рисунках 24 и 25 для MeIQx и PhIP соответственно.

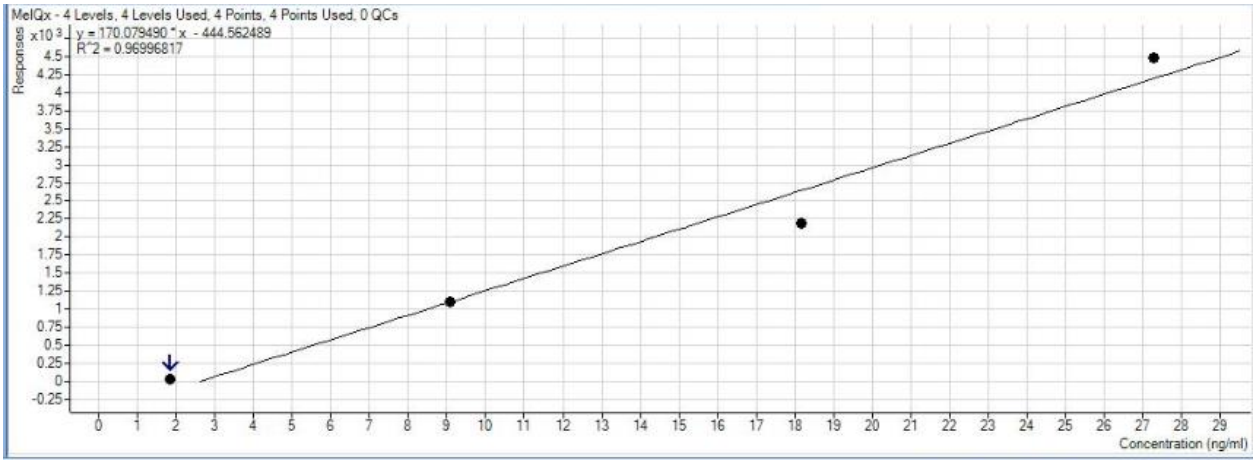


Рисунок 24 – График линейной калибровки для MeIQx при подготовке проб с ТФЭ.

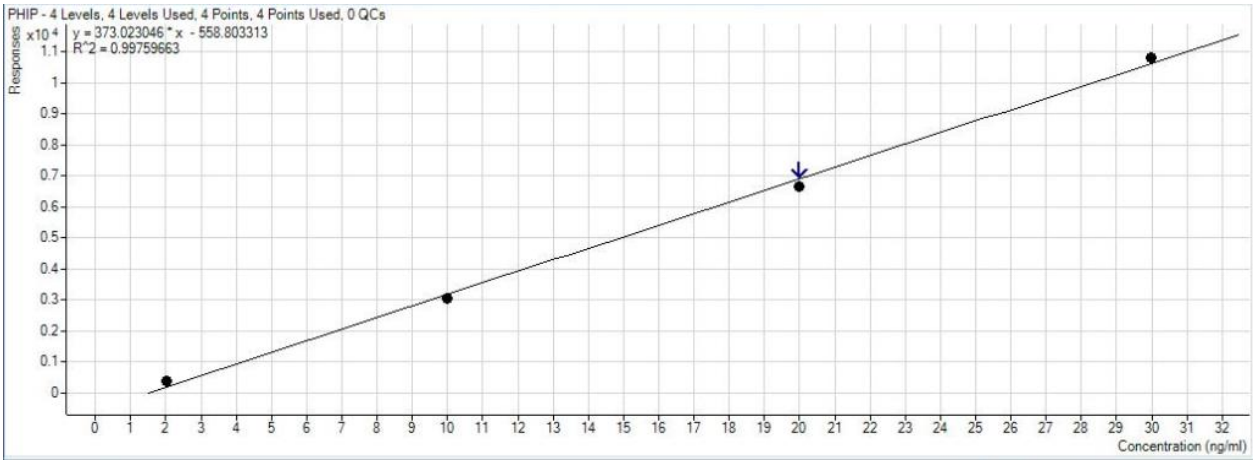


Рисунок 25 – График линейной калибровки для PhIP при подготовке проб с ТФЭ

По результатам работ определены предел обнаружения, предел количественного обнаружения, степень извлечения. Проведена валидация методики и установлены показатели точности и специфичности. Валидацию методики проводили в соответствии с Регламентом Комиссии ЕС 2002/657. Для выполнения валидации методики получали и обрабатывали результаты по следующим параметрам: специфичность; линейность; правильность (степень извлечения); предел обнаружения (LOD), предел количественного обнаружения (LOQ). Для подтверждения специфичности методики исследовали 10 образцов мясных продуктов, не содержащих MeIQx и PhIP. Во всех 10 образцах

отсутствовали хроматографические пики, мешающие определению MeIQx и PhIP. Методика позволит достоверно определять MeIQx и PhIP в присутствии посторонних примесей и системных пиков подвижной фазы. Коэффициент линейной корреляции полученных градуировочных зависимостей составил не менее 0.96 в диапазоне концентраций 1,0 – 1000,0 нг/мл. 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 0,1 нг/г. Предел количественного обнаружения (LOQ) составил для MeIQx и PhIP 1 нг/г.

Подобранные условия хроматографической идентификации и экстрагирования ГАА позволяют провести экспериментальные исследования мясной продукции по вопросу накопления в ней ГАА. Что в свою очередь позволит начать работы по изучению управляющих мероприятий образования риска ГАА в мясной продукции.

3.4 Результаты проведенных исследований мясной продукции на содержание ГАА

3.4.1 Изучение влияния вида сырья и продолжительности термической обработки

На данном этапе проведены исследования по определению влияния вида сырья и продолжительности термической обработки на количество образующихся ГАА. В качестве объектов были выбраны наиболее широко применяемые в промышленности виды мяса - мясо птицы (курица), свинина и говядина.

Из каждого вида сырья формировали по три партии кусковых полуфабрикатов массой 150 г, толщиной 2,5 см, после чего 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 10 и на рисунке 24.

Таблица 10 – результаты проведенных исследований образования ГАА в мясной продукции, полученной от разных видов сельскохозяйственных животных и птицы

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

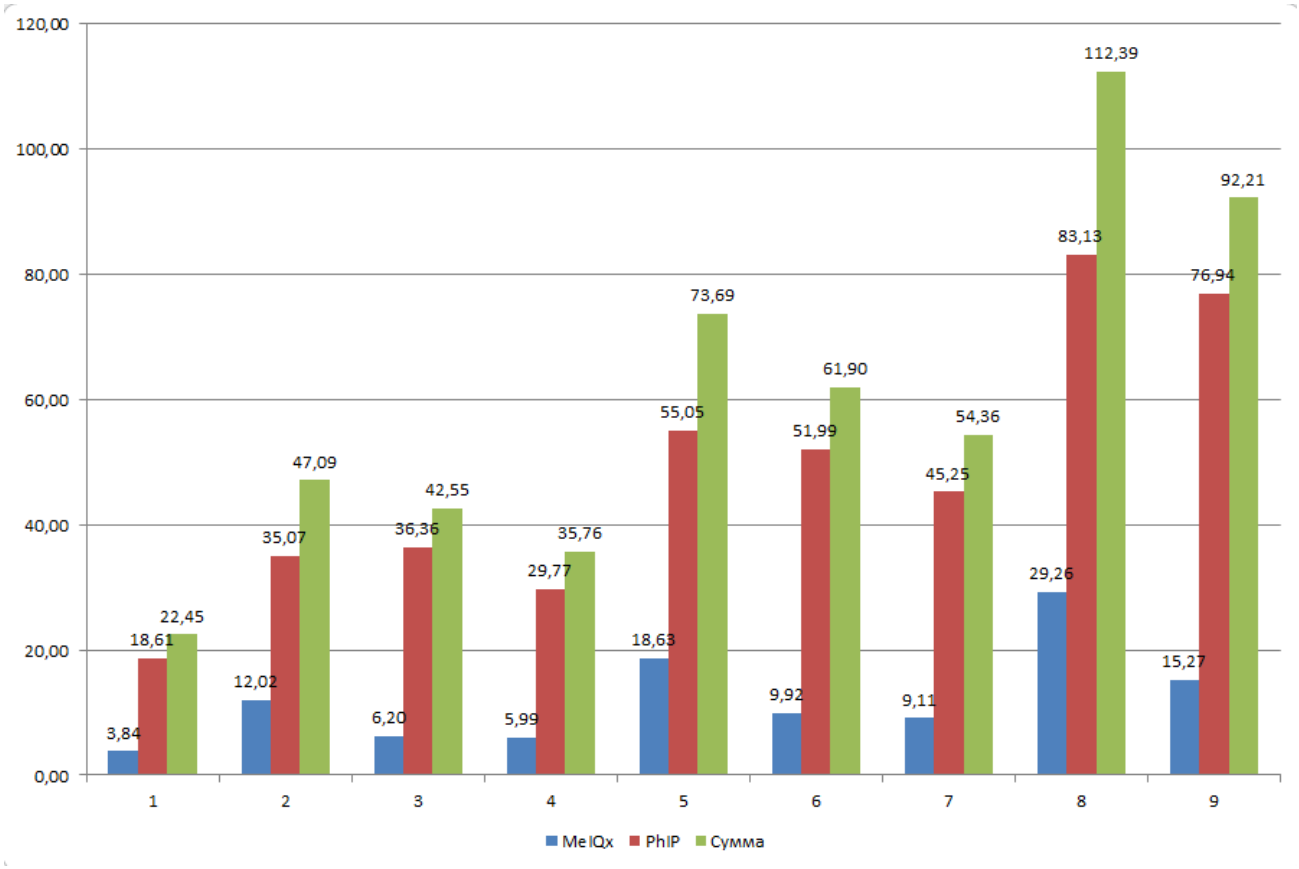


Рисунок 24 – Количество ГАА образующихся при жарке полуфабрикатов из различного вида сырья, нг/г, 1, 2, 3 – курица, свинина, говядина, соответственно, подвергшиеся тепловой обработке в течение 5 минут с каждой стороны, 4, 5, 6 – курица, свинина, говядина, соответственно, подвергшиеся тепловой обработке в течение 7,5 минут с каждой стороны, 7, 8, 9 – курица, свинина, говядина, соответственно, подвергшиеся тепловой обработке в течение 10 минут с каждой стороны, ось ординат – концентрация нг/г

Проведенные исследования не выявили большой разницы в суммарной концентрации ГАА образующихся при жарке свинины и говядины, однако показали, что при жарке курицы, сумма ГАА в 1,5-2 раза меньше, чем в свинине или говядине. Вероятно, это связано с меньшим содержанием жира в мясе птицы относительно других образцов. Одновременно увеличение продолжительности термообработки на 2,5 минуты с каждой стороны увеличивает количество ГАА образующихся в продукте практически в полтора раза. Кроме того, результаты

показали, что в свинине образуется наибольшее количество MeIQx и суммарно в свинине образуется наибольшее количество ГАА.

Также на концентрацию ГАА был исследован нагар образующийся при жарке мяса. Для этого на гриле последовательно жарили по 3 образца мяса каждого вида животных в течение 10 минут каждый при температуре 220ºС без чистки гриля между образцами. После жарки с нагревающей поверхности было собрано по ≈1,0 г нагара. Результаты проведенных исследований приведены в таблице 11.

Таблица 11 – результаты проведенных исследований о концентрации ГАА образующихся в гари

Образец	MeIQx, нг/г	PhIP, нг/г
Нагар, образующийся при жарке мяса птицы (курица)	436,63±152,82	3179,95±1112,98
Нагар, образующийся при жарке свинины	480,30±168,10	3402,55±1190,89
Нагар, образующийся при жарке говядины	414,80±145,18	3275,35±1146,37

Как видно из проведенных исследований, разница между образцами полученными при жарке различных видов мяса незначительна, но количества превышают значения полученные в мясе больше чем в 30 раз. Это говорит о том, что нагревающую поверхность необходимо чистить, а употребление в пищу нагара недопустимо.

Проведенные исследования показали, что вид сырья не оказывает существенного влияния на концентрации образуемых ГАА, в то время как продолжительность термической обработки оказывает сильное воздействие на них. Это позволит определить направление дальнейших работ по разработке управляющих мероприятий риска образования ГАА в мясной продукции.

3.4.2 Исследование мясной продукции промышленного производства

Для выявления критических технологий в мясной промышленности в соответствии с рисунком 14 были проанализированы основные виды: технология производства вареных колбас, варено-копченых, полукопченых, сырокопченых, консервы. Проведённый анализ показал, что при промышленном производстве отсутствуют критические технологии образования ГАА. Наиболее приближенная технология – производство консервов, которые решено было исследовать на наличие ГАА.

Для эксперимента были отобраны образцы мясных кусковых консервов из говядины, изготовленных по режимам в соответствии с технологической инструкцией, и образцы, изготовленные по режимам выше установленных технологической инструкцией. Результаты приведены в таблице 12

Таблица 12 – результаты исследований мясных кусковых консервов из говядины

образец	Количество обнаруженных ГАА, нг/г готового изделия	
	MelQx	PhIp
Консервы, произведенные по технологической инструкции (производитель 1)	Ниже предела качественного обнаружения	Ниже предела качественного обнаружения
Консервы, произведенные по технологической инструкции (производитель 2)	Ниже предела качественного обнаружения	Ниже предела качественного обнаружения
Консервы, произведенные с завышенными режимами стерилизации (производитель 3)	Ниже предела качественного обнаружения	Ниже предела качественного обнаружения
Консервы, произведенные с завышенными режимами стерилизации (производитель 4)	Ниже предела качественного обнаружения	Ниже предела качественного обнаружения

Проведенные исследования показали, что во всех образцах определяемые аналиты были в количествах ниже пределов качественного обнаружения.

Проведённый анализ технологий и аналитические исследования мясных кусковых консервов показывают, что мясная продукция промышленного производства, изготовленная по традиционным технологиям, не представляет опасности в отношении ГАА и ее исследование в рамках данной работы далее нецелесообразно.

3.4.3 Исследования кулинарных изделий.

На данном этапе работы были проведены исследования количественного содержания ГАА в кулинарных изделиях. Кулинарные изделия были выбраны в качестве объектов исследования ввиду того, что их производство происходит при более высоких температурах относительно производства мясной продукции промышленного изготовления. В качестве объектов исследований были выбраны:

- полуфабрикаты рубленые из говядины, приготовленные в ресторанах быстрого питания (три образца, отобранные в разных ресторанах).

- кулинарные изделия:

- блюдо второе обеденное с гарниром азу из говядины с рисом;
- блюдо второе обеденное с гарниром азу из говядины с пюре;
- блюдо второе обеденное с гарниром азу из говядины с макаронами.

Результаты мониторинговых исследований приведены в таблицах 13 и 14

Таблица 13 – результаты исследований мясной составляющей вторых обеденных блюд с гарниром

образец	Количество обнаруженных ГАА, нг/г мясной составляющей готового изделия		
	MelQx	PhIP	Сумма
азу из говядины с макаронами	11,50±4,02	Ниже предела количественного обнаружения	11,50±4,02
азу из говядины с пюре	3,17±1,11	Ниже предела количественного обнаружения	3,17±1,11
азу из говядины с рисом	2,43±0,85	Ниже предела количественного обнаружения	2,43±0,85

Проведенные исследования позволили установить наличие ГАА во вторых обеденных блюдах, употребление которых потенциально может оказывать негативное воздействие на здоровье человека, причем в первом образце концентрация ГАА в 3-5 раз выше относительно других образцов.

Другими мясными продуктами, подвергаемыми высокотемпературной термической обработке, являются бургеры – рубленые полуфабрикаты из мяса. Температура приготовления их варьируется в широких диапазонах, в некоторых ресторанах имеет место быть приготовление их на открытом огне. В связи с этим бургеры, приготовленные в ресторанах быстрого питания, так же были выбраны в качестве объектов исследования.

Таблица 14 – Результаты исследований рубленных полуфабрикатов, изготовленных в ресторанах быстрого питания

образец	Количество обнаруженных ГАА, нг/г готового изделия		
	MelQx	PhIP	Сумма
Изготовитель 1	0,94±0,33	Ниже предела количественного обнаружения	0,94±0,33
Изготовитель 2	1,75±0,61	Ниже предела количественного обнаружения	1,75±0,61
Изготовитель 3	7,57±2,65	2,72±0,95	10,29±3,60

Проведенные исследования показали, что во всех исследованных образцах обнаружены ГАА.

В первых двух образцах количества ГАА примерно равны. Первые два производителя используют полуфабрикаты, производимые промышленными предприятиями до полной кулинарной готовности, и разогреваемые предприятием общественного питания перед подачей. Тем самым снижается температурное и временное воздействие на продукт.

В третьем образце значительные количества ГАА относительно других образцов можно объяснить тем, что изделие изготавливается и подвергается жарке при температуре 250˚С в течение четырех минут с каждой стороны непосредственно на предприятии общественного питания.

Проведенные на данном этапе выполнения диссертационной работы исследования показали, что кулинарные изделия, приготовленные промышленно или же в ресторанах быстрого питания, являются источником риска ГАА.

Выявление основных источников риска ГАА приводит к необходимости изучения мероприятий по управлению риском образования ГАА в мясной продукции.

3.4.4 Исследования управляющих воздействий на риск образования ГАА.

На следующем этапе были определены и оценены технологические управляющие воздействия снижения образования ГАА в готовой продукции. На основании проведенного анализа литературных данных о влиянии растительных алкалоидов на количества образуемых ГАА, было оценено влияние внесения красного перца в рубленые мясные полуфабрикаты. Для этого были подготовлены котлеты из свинины, говядины и курицы массой 100±0,1г в которые было добавлено 0,5, 1,0, 1,5 г молотого красного перца, затем сформованные изделия жарили при температуре 180ºС в течение 10 минут – по 5 минут с каждой

стороны, переворачивая один раз. Результаты исследований приведены в таблице 15 и рисунках 25-27.

Таблица 15 – результаты проведенных исследований о влиянии добавления молотого красного перца на количества образуемых ГАА в рубленых мясных полуфабрикатах

Продукт	образец	MeIQx, нг/г	PhIP, нг/г	Сумма ГАА, нг/г	Снижение относительно контрольного образца, %
Рубленые изделия из свинины	Контроль	3,98±1,59	10,69±4,27	14,67±5,86	-
	0,5% перца	1,69±0,67	4,48±1,79	6,17±2,46	57,94
	1,0% перца	2,07±0,83	5,59±2,24	7,66±3,07	47,78
	1,5% перца	2,15±0,86	6,01±2,40	8,16±3,26	44,38
Рубленые изделия из говядины	Контроль	3,01±1,20	11,31±4,52	14,32±5,72	-
	0,5% перца	1,24±0,50	4,71±1,88	5,95±2,38	58,44
	1,0% перца	1,72±0,69	5,64±2,26	7,36±2,95	48,60
	1,5% перца	1,95±0,78	5,98±2,39	7,93±3,17	44,62
Рубленые изделия из курицы	Контроль	3,42±1,37	11,97±4,79	15,39±6,16	-
	0,5% перца	1,41±0,56	4,88±1,95	6,29±2,51	59,12
	1,0% перца	1,98±0,79	5,87±2,35	7,85±3,14	48,99
	1,5% перца	2,09±0,84	6,12±2,45	8,21±3,29	46,65

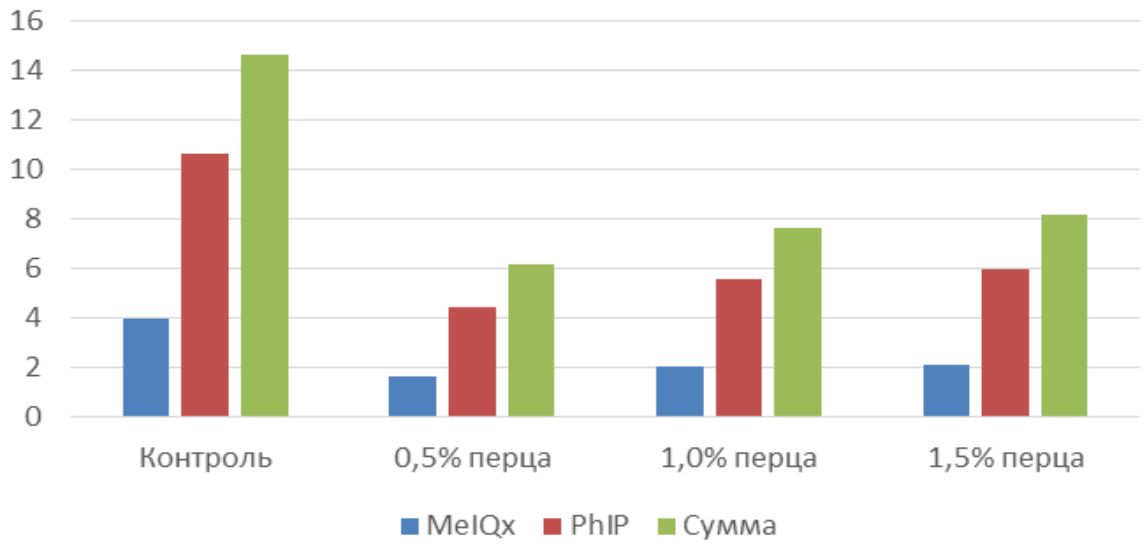


Рисунок 25 – Количество ГАА, нг/г, в рубленных полуфабрикатах из свинины с добавлением красного перца

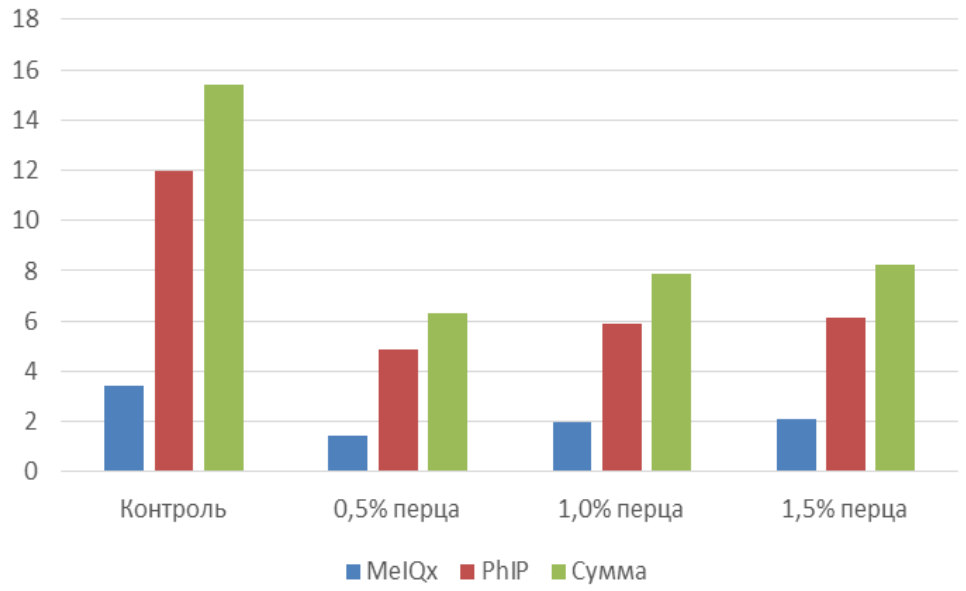


Рисунок 26 – Количество ГАА, нг/г, в рубленных полуфабрикатах из мяса птицы (курица) с добавлением красного перца

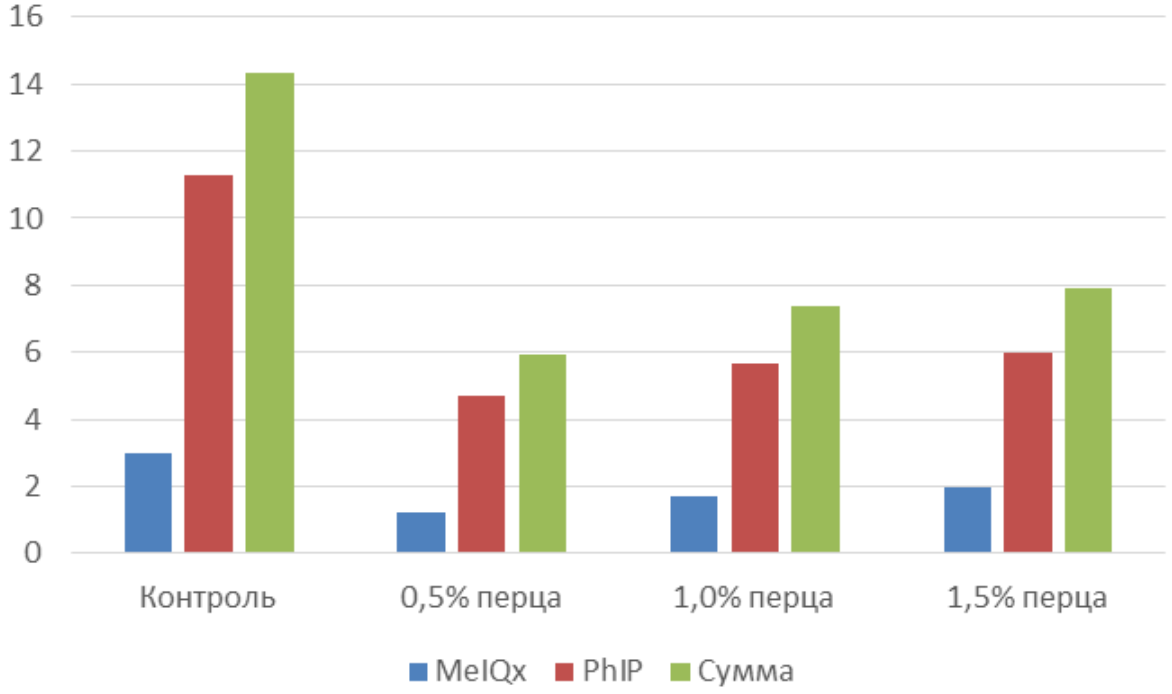


Рисунок 27 – Количество ГАА, нг/г, в рубленных полуфабрикатах из говядины с добавлением красного перца

Установлено, что добавление красного перца в мясной рубленый полуфабрикат перед жаркой снижает количество образуемых ГАА на 45-60%.

Наибольшего снижения получилось добиться при добавлении 0,5 г перца на 100 г изделия.

Оценка данного управляющего воздействия показывает снижение количества ГАА, но не влияет на вероятность его образования и не позволяет оценить влияние на тяжесть последствия, поскольку отсутствуют TD_{50} и LD_{50}. Таким образом, на настоящий момент, единственным видом управляющего воздействия для рассматриваемого вещества является вид «Исследование риска».

Полученные результаты показывают необходимость проведения дальнейших работ по определению TD_{50} и LD_{50} для человека и дальнейшему их нормированию в пищевой продукции, поскольку в условиях существующей неопределенности риск ГАА для здоровья человека остается высоким.

Оценив воздействие красного перца на концентрации образующихся ГАА следующим этапом экспериментальных исследований настоящей диссертационной работы по аналогии с [83] было решено исследовать воздействие дотермической обработки мяса маринадами. Однако, маринование проводилось маринадами, произведенными промышленно, поставляемые в точки общественного питания. Было использовано два подобных маринада – маринад 1 в составе которого были следующие возможные ингибиторы и катализаторы в реакции образования ГАА: смесь растительных масел, паприка, чеснок, лук, черный перец и маринад 2 в составе которого были следующие возможные ингибиторы и катализаторы в реакции образования ГАА: паприка, черный перец, красный перец, чеснок, кориандр и горчица.

Кроме промышленно изготовленных маринадов были подготовлены еще два маринада: один включал в свой состав перец чили (далее маринад 3), другой подготовлен на основе паприки (далее маринад 4). Для эксперимента использовалось мясо свинины (m. l. dorsi), которое было порезано на стейки толщиной 15±1 мм, масса кусков варьировалась от 110 до 120 г. Маринование маринадами 1 и 2 производилось в соответствии со спецификацией и инструкцией, предоставленными производителем, маринование маринадами 3 и 4

выполнялось в соответствии с общепринятыми рекомендациями (таблица 16). Маринование продолжалось в течение 24 часов.

Таблица 16 – Параметры маринования образцов

№ п/п	образец	Масса мяса до маринования, г	Масса внесенных добавок, г
1	Контрольный	117,05	-
2	Маринад 1	117,15	Маринад – 5,60
			Соль – 0,56
3	Маринад 2	112,01	Маринад – 2,34
			Соль – 1,20
			Вода – 9,37
4	Маринад 3	112,20	Перец чили 1,22
			Соль – 0,61
5	Маринад 4	121,73	Паприка – 1,12 Соль – 1,12

После маринования стейки были подвергнуты тепловой обработке на гриле при температуре 230ºС в течение 10 минут, в процессе термообработки изделия переворачивались 1 раз.

Результаты исследований влияния дотермической обработки мяса маринованием приведены в таблице 17.

Таблица 17 – результаты исследований влияния маринования мяса

№ 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	Маринад 1	3,31±1,16	Ум.* 3,2	3,88±1,36	Ум. 4,82
3	Маринад 2	40,39±14,14	Ув.** 3,81	10,68±3,74	Ум. 1,75
4	Маринад 3	37,11±9,49	Ув. 3,50	45,70±15,99	Ув. 2,44
5	Маринад 4	86,94±30,43	Ув. 8,21	68,27±23,90	Ув. 3,65
* уменьшает в…; ** увеличивает в…					

Проведенные исследования показали, что в отличие от [83] предварительная обработка маринованием не всегда снижает количество образующихся при термической обработке ГАА. В образцах с использованием маринадов, изготовленных на масляной основе, снижение образования количества MeIQx и PhIP в 3,2 и 4,82 раз соответственно, применение маринада на сухой основе так же уменьшило количество образующихся PhIP, но уже в 1,75 раза, в то время как количество MeIQx увеличило в 3,81 раза.

Самым сильным катализирующим воздействием на процесс образования ГАА имел маринад с паприкой: количество MeIQx увеличилось в 8,21 раза, а количество PhIP в 3,65 раз.

Маринование красным перцем показало совсем иные результаты, нежели использование красного перца непосредственного перед термической обработкой, что описано в главе 3.4.4 настоящей диссертационной работы. Применение красного перца для маринования показало увеличение количество MeIQx и PhIP в 3,50 и 2,44 раза соответственно. Вероятнее всего это связано с тем, что при мариновании была добавлена соль, кроме того сам состав использованной «мельницы» 50/50 красный перец/морская соль. Вероятнее всего, соль «вытягивала» воду к поверхности стейка, из-за чего больше воды участвовало в реакции образования ГАА (влияние воды на количество ГАА описано в обзоре литературы настоящей диссертационной работы).

Проведенные исследования показали, что управление риском ГАА возможно путем дотермической обработки мяса острым красным перцем или же маринование маринадами на основе растительных масел, где удалось достичь снижения количества MeIQx в 2,4 раза и количества PhIP более чем в 9 раз. Но в то же время дотермическая обработка мяса может оказать обработанное – катализирующее воздействие в реакции образования ГАА, как, например, маринование паприкой привело к увеличению количества MeIQx в 8,22 раза, а количество PhIP почти в 4 раза. Данный факт говорит о необходимости проведения более детальных исследований в области определения ингибиторов и катализаторов в реакции образования ГАА в мясной продукции.

Результаты, полученные в ходе выполнения настоящей работы показывают, что промышленная продукция, произведенная по традиционным технологиям, не является источником риска ГАА. Одновременно, 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 ингредиентов - катализаторов процесса образования ГАА. Разработанный, в рамках работы метод, 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.

3.5 Экономическая эффективность

Оценка экономической эффективности использования методики измерений «Определение гетероциклических ароматических аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» проводился путем расчета стоимости используемых реактивов, аренды используемого оборудования и лабораторной посуды. Подробная методические подходы и результаты расчета приведены в приложении 2.

Результаты расчёта 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 методики с использованием подготовки проб жидкостной экстракцией для арбитражного определения ГАА в готовой мясной продукции.

ВЫВОДЫ

1. Проведена идентификация 30 ГАА, составлен профиль риска ГАА, оценена: тяжесть последствия, равная 4, вероятность возникновения, равная 10, возможность выявления - 10 баллов. Приоритетное число риска составило 400 ед, показывающее 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 позволят определять ГАА в концентрациях от 1нг/г.

4. Подобраны 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 маринования паприкой и маринадами на сухой 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.

7. Подготовлен проект методики определения ГАА в мясной продукции МИ-01-2020 Определение гетероциклических ароматических аминов методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sugimura T. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish / Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. // Cancer Sci – 2004 – № 4. – P. 290-299.

2. Gibis M. Occurrence of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in fried patties of different animal species / Gibis, M. // Proceedings of the 53th International Congress of Meat Science and Technology – 2007. – P.13.

3. Jagerstad M. Formation of heterocyclic amines using model systems/ Jagerstad M, Skog K, Grivas S, Olsson K. // Mutat Res. – 1991 – № 4. – P. 219-233.

4. Соляков, А.А. Влияние тепловой кулинарной обработки и способов подготовки полуфабрикатов на содержание гетероциклических ароматических аминов в жареных мясных кулинарных изделиях: дисс. … канд. техн. наук: 05.18.16 / Соляков Алексей Алексанрович. – Москва, 1998. – 145 с.

5. Maite Sanz Alaejos. Factors that affectr the content of heterocyclic aromatic amines in foods / Maite Sanz Alaejos // Comprehensive reviews in food science and food safety – 2011. – V. 10. – P. 52-108.

6. Nagao M. A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens—heterocyclic amines-based on molecular information / Nagao M. // Mutat Res – 1999 – № 1. – P. 3– 12.

7. Creatine and Mailard reaction products as precursors on mutagenic compounds: effect of various amino acids / Jagerstad M. et al. // Food Chemistry. – 1983. – V. 12 – № 2. – P. 255 – 264.

8. Дмитриев М.А. Исследование органических ксенобиотиков и способ снижения их содержания в мясных продуктах: дисс. … канд. техн. наук: 03.00.16 / Дмитриев Михаил Александрович. – Москва, 2007. – 143 с.

9. Josh K. Heterocyclic aromatic amines / K.John, S.Beedanagari // Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) – 2014 – P. 855-863.

10. Structure and chemical synthesis of MeIQ, a potent mutagen isolated from broiled fish / Kasai H. et al. // Chem Lett – 1980 – P. 1391–1394.

11. Structure of a potent mutagen isolated from fried beef / Kasai H. et al. // Chem Lett – 1981 – P. 485–488.

12. The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) / Felton J.S. et al. // Carcinogenesis – 1986 – № 7 – P. 1081–1086.

13. Механизм образования гетероциклических ароматических аминов в пищевой промышленности / Д. А. Утьянов и др. // Птица и птицепродукты. – 2019. – №4. – С. 26-29.

14. Vitaglione P. Use of antioxidants to minimize health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food / Vitaglione, P., Fogliano, V. // J. Chromatogr. – 2004 – V. 802 – № 1. – P. 189–199.

15. Dashwood R.H. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an ‘A–Z’ guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models / R. H. Dashwood // Rev. Mutat. Res. – 2002 – V. 511 – № 2. – P. 89–112

16. Turesky R.J. Heterocyclic aromatic amines / Turesky, R.J. // In: Stadler, R.H., Lineback, D.R. (Eds.), Process-Induced Food Toxicants-Occurrence, Formation, Mitigation and Health Risks. John Wiley and Sons Inc. – 2009 – P. 75–116.

17. Turesky R.J. Heterocyclic aromatic amines: potential human carcinogens / Turesky R.J. // In: Trevor, T.M. (Ed.), Chemical Carcinogenesis. Humana Press, New York, NY – 2011 – P. 95–112.

18. Wei Zheng M.D. Well-done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk / Wei Zheng M.D., Sang-Ah Lee // Nutr. Cancer. – 2009 – V. 61 – №4. – P. 437-446.

19. Rohrmann S. Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines / Rohrmann S., Becker N. // Public Health Nutr – 2002 – № 5. – P. 699–705.

20. Analysis of total meat intake and exposure to individual heterocyclic amines in a case-control study of colorectal cancer: contribution of metabolic variation to risk / Nowell S. et al. // Mutat Res – 2002 – V. 506-507. – P. 175–185.

21. Estimation of dietary HCA intakes in a large-scale population-based prospective study in Japan / Kobayashi M. Mutat Res – 2002 – V. 506-507. – P. 233–241.

22. 3Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole initiates two-stage carcinogenesis in mouse skin but is not a complete carcinogen / Takahashi M. et al. // Jpn J Cancer Res – 1986 – V. 77. – P. 509–513.

23. Synergistic enhancement of small and large intestinal carcinogenesis by combined treatment of rats with five heterocyclic amines in a medium-term multi-organ bioassay / Hasegawa R. et al. // Carcinogenesis – 1994 – V. 15 – № 11. – P. 2567–2573.

24. Genetic changes induced by heterocyclic amines / Nagao M. et al. // Mutat Res – 1997 – V. 376. – P. 161–167.

25. Schut H.A.J. / DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis / Schut H.A.J., Snyderwine E.G.// Carcinogenesis – 1999 – V. 20 – № 3. – P. 353–368.

26. Formation of mutagens in cooked foods. III. Isolation of potent mutagens from beef / Spingarn N.E. et al. // Cancer Lett – 1980 – № 9. – P. 177–183.

27. Turesky R.J. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines // Turesky R.J., Le Marchand L. – Chem. Res. Toxicol – 2011 – V. 24 – № 8. – P. 1169–1214.

28. Factors affecting human heterocyclic amine intake and the metabolism of PhIP / Knize M.G. et al. // Mutat Res – 2002 – V. 506-507 – P. 153 – 162

29. Reaction of N-hydroxylamine and N-acetoxy derivatives of 2-amino-3-methylimidazo[4,5f]quinoline with DNA. Synthesis and identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)IQ / Snyderwine E.G. et al. // Carcinogenesis – 1988 – V. 9 – # 6. – P. 1061–1065.

30. Adduct formation at C-8 of guanine on in vitro reaction of the ultimate form of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine with 2′-deoxyguanosine and its phosphate esters / Nagaoka H. et al. // Jpn J Cancer Res – 1992 – V. 83 – # 10. – P. 1025 – 1029.

31. Characterization of DNA adducts formed in vitro by reaction of N-hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5f]quinoline and N-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline at C8 and N2 atoms of guanine / Turesky R.J. et al. // Chem Res Toxicol – 1992 – V. 5 – # 4. – P. 479–490.

32. Effect of diet on serum albumin and hemoglobin adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in humans. / Magagnotti C. et al. // Int J Cancer – 2000 – V. 88 – # 1.– P. 1–6.

33. Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolysate / Matsukura N.et al. // Science – 1981 – V. 213 – # 4505. – P. 346–347.

34. Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from glutamic acid and soybean globulin pyrolysates / Ohgaki H. et al. // Carcinogenesis – 1984 – V. 5 – # 6. – P. 815–819.

35. Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, from broiled sardine, cooked beef and beef extract / Ohgaki H. et al. // Carcinogenesis – 1984 – V. 5 – # 6. – P. 921–924.

36. Induction of hepatocellular carcinoma and highly metastatic squamous cell carcinomas in the forestomach of mice by feeding 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline / Ohgaki H. et al. // Carcinogenesis – 1986 – V. 7 – # 11. – P.1889–1893.

37. Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) from cooked foods / Ohgaki H. et al. // Carcinogenesis – 1987 – V. 8 – # 5. – P. 665 – 668.

38. Difference in target organs in carcinogenesis with a heterocyclic amine, 2-amino3,4-dimethylimido[4,5-f]quinoline, in different strains of mice / Fujita H. et al. // Jpn J Cancer Res – 1999 – 90 – P. 1203–1206.

39. Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine / Esumi H. et al. // Jpn J Cancer Res – 1989 – V. 80 – P. 1176–1178.

40. Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole from tryptophan pyrolsate / Takayama S. et al. // Jpn J Cancer Res – 1985 – V. 76 – № 9. – P. 815–817.

41. The rat urinary bladder as a new target of heterocyclic amine carcinogenicity: tumor induction by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate / Takahashi M. // Jpn J cancer Res – 1993 – V. 84 – № 8. – P. 852–858.

42. Induction of cancers in the intestine, liver and various other organs of rats by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate / Takayama S. et al. // Gann – 1984 – V. 26 – № 3. – P. 207–213.

43. Carcinogenicity of a mutagenic compound from food, 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeAαC), in male F344 rats / Tamano S. et al. // Carcinogenesis – 1994 – V. 15. – P. 2009–2015.

44. Demonstration of carcinogenicity in F344 rats of 2-amino-3-methylimidazo[4,5f]quinoline from broiled sardine, fried beef and beef extract / Takayama S. // Gann – 1984 – V. 75 – № 6. – P. 467–470.

45. Induction of tumors in the Zymbal gland, oral cavity, colon, skin and mammary gland of F344 rats by a mutagenic compound, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinolone / Kato T. et al. // Carcinogenesis – 1989 – V. 10 – № 3. – P. 601–603.

46. Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline / Kato T. et al. // Carcinogenesis – 1988 – V. 9 – № 1. – P. 71–73.

47. New colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) / Ito N. et al. // Carcinogenesis – 1991 – V. 12 – № 8. – P. 1503–1506.

48. The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods / Shirai T. et al. // Cancer Res – 1997 – V. 57 – № 2. – P. 195–198.

49. Induction of intestinal tumors and lymphomas in C57BL/6N mice by a food-borne carcinogen, 2-amino-1methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine / Ochiai M. et al. // Jpn J Cancer Res – 2002 – V. 93 – № 5. – P. 478–483.

50. Atrophy of salivary glands and pancreas of rats fed on diet with amino-methyl-α-carboline / Takayama S. et al. // Proc Jpn Acad – 1985 – V. 61 – № 6. – P. 277–280.

51. Tanaka T. Multipotential carcinogenicity of the fried food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats / Tanaka T., Barnes W.S., Williams G.M., Weisburger J.H. // Gann – 1985 – V. 76 – № 9. – P. 570–576.

52. Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three macaques / Adamson R.H. et al. // Jpn J Cancer Res – 1990 – V. 81 – № 1. – P. 10–14.

53. Efficient induction of rat large intestinal tumors with a new spectrum of mutations by intermittent administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in combination with a high fat diet / Ubagai T. et al. // Carcinogenesis – 2002 – V. 23 – № 1. – P. 197–200.

54. Induction of mammary tumors in female Sprague-Dawley rats by the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and effect of dietary fat / Ghoshal A. et al. // Carcinogenesis – 1994 – V. 15 – № 11. – P. 2429–2433.

55. Heterocyclic amine mixture carcinogenesis and its enhancement by caffeine in F344 rats / Tsuda H. et al. // Cancer Lett – 1999 – V. 143 – № 2. – P. 229–234.

56. Turesky R.J. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine–DNA adducts in vitro and in vivo / Robert J. Turesky, Paul Vouros // Journal of Chromatography B – 2004 – V. 802 – № 1. – P. 155-166

57. The urinary metabolite profile of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine is predictive of colon DNA adducts after a low-dose exposure in humans / Malfatti M.A. et al. // Cancer Res – 2006 – V. 66 – № 21. – P. 10541–10547

58. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study / Augustsson K. et al. // The Lancet – 1999 – V. 353 – № 9154. – P. 703-707

59. Lack of association between the polyadenylation polymorphism in the NAT1 (acetyltransferase 1) gene and colorectal adenomas / Probst-Hensch N.M. et al. // Carcinogenesis – 1996 – V. 17 – № 10. – P. 2125–2129.

60. Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study / Butler L.M.// Am J Epidemiol – 2003 – V. 157 – № 5. – P. 434– 445.

61. Acetylation polymorphism and prevalence of colorectal adenomas / Probst-Hensch N.M. et al. // Cancer Res – 1997 – V. 55 – № 10. – P. 2017–2020.

62. Genetic polymorphisms in heterocyclic amine metabolism and risk of colorectal adenomas / Ishibe N. et al. // Pharmacogenetics – 2002 – V. 12 – № 2. – P. 145–150.

63. Modification by N-acetyltransferase 1 genotype on the association between dietary heterocyclic amines and colon cancer in a multiethnic study / Butler L.M. et al. // Mutat Res – 2008 – V. 638 – № 1-2. – P.162–174

64. Meat intake, heterocyclic amines and risk of colorectal cancer: a case-control study in Uruguay / De Stefani E. // Int J Oncol – 1997 – V. 10 – № 3. – P. 573–580.

65. Le Marchand L. Red meat intake, CYP2E1 genetic polymorphisms, and colorectal cancer risk / Le Marchand L., Donlon T., Seifried A., Wilkens L.R. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev – 2002. – P. 1019–1024.

66. Meat consumption, cigarette smoking, and genetic susceptibility in the etiology of colorectal cancer: results from a Dutch prospective study / Tiemersma E.W. et al. // Cancer Causes Control – 2002 – V. 13 – № 4. – P. 383–393

67. Risk of colorectal adenomas in relation to meat consumption, meat preparation, and genetic susceptibility in a Dutch population / Tiemersma E.W. et al. // Cancer Causes Control – 2004 – V. 15 – № 3. – P. 225–236.

68. Food and risk of bladder cancer: a case-control study in Uruguay / Balbi JC, Larrinaga M.T. et al. // Eur J Cancer Prev – 2001 – V. 10 – № 5. – P. 453–458.

69. Meat intake, heterocyclic amines and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay / De Stefani E. et al. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev – 1997 – V. 6 – № 8. – P.573–81.

70. Well-done meat intake and the risk of breast cancer / Zheng W. et al. // J Nat Cancer Inst – 1998 – V. 90 – № 22. – P.1724–1729.

71. DeBruin L.S. Detection of PhIP (2-amino-1-methyl-6phenylimidazo[4,5-b]pyridine) in the milk of healthy women / DeBruin L.S., Martos P.A., Josephy P.D. // Chem Res Toxicol – 2001 – V. 14 – № 11. – P. 1523–1528.

72. Carcinogen-DNA adducts in human breast epithelial cells / Gorlewska-Roberts K. et al. // Environ Mol Mutagen – 2002 – V. 39 – № 2-3. – P. 184–192.

73. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 / Wooster R. et al. / Nature – 1995 – V. 378 – № 6559. – P. 789–792.

74. Heterocyclic amine content of cooked meat and risk of prostate cancer / Norrish A.E. et al. // J Natl Cancer Inst – 1999 – V. 91 – № 23. – P. 2038–2044.

75. Comparison of heterocyclic amine levels in home-cooked meats with exposure indicators (United States) / Keating G.A. et al. // Cancer Causes & Control – 2000 – V. 11 – № 8. – P.731–739.

76. Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma / Sinha R. et al. // Cancer Res – 2005 – V. 65 – № 17. – P. 8034–8041.

77. Dietary nitrosamines, heterocyclic amines and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay / De Stefani E. et al. // Nutr Cancer – 1998 – V. 30 – № 2. – P. 158–162.

78. De Stefani E. Meat consumption and risk of stomach cancer in Uruguay: a case-control study / De Stefani E., Ronco A., Brennan P., Boffetta P. // Nutr Cancer – 2001 – V. 40 – № 2. P. 103–107.

79. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: associations with pancreatic cancer / Anderson K.E. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev – 2005 – V. 14 – № 9. – P. 2261–2265.

80. Weisburger J.H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health / Weisburger J.H. // Mutat. Res. – 2002. – P. 9–20

81. Факторы, влияющие на образование канцерогенов при высокотемпературной термической обработке мясной продукции / Утьянов и др. // Все о мясе – 2020 – № 1. – С. 42-47

82. Salmon. Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken / Salmon, Knize, M. G., & Felton, J. S. // Food and Chemical Toxicology – 1997 – V. 35 – № 5. – P. 433-441.

83. S. JinaP. Effect of organic acid ingredients in marinades containing different types of sugar on the formation of heterocyclic amines in grilled chicken / S. Jinap, N.D.S. Hasnol, M. Sanny, M.H.A. Jahurul // Food Control – 2018 – V. 84. – P. 478-484

84. UPLC-MS/MS and multivariate analysis of inhibition of heterocyclic amine profiles by black pepper and piperine in roast beef patties / Maomao Zeng et al. // Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems – 2017 – V. 168. – P. 96-106

85. K. Srinivasan. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects / K. Srinivasan // Crit. Rev. Food Sci. – 2007 – V. 47 – № 8. – P. 735-748.

86. F. Oz The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball / F. Oz, M. Kaya // Food Control – 2011 – V. 22 – № 3-4. – P. 596-600.

87. Quantitative analysis of all types of β-carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection / H. Tsuchiya et al. // Phytochem. Anal. – 1999 – V. 10 – № 5. – P. 247-253.

88. E. Sunila Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine / E. Sunila, G. Kuttan // J. Ethnopharmacol. – 2004 – V. 90 – № 2-3. – P. 339-346.

89. P. Chonpathompikunlert. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer’s disease / P. Chonpathompikunlert, J.

Wattanathorn, S. Muchimapura // Food Chem. Toxicol. – 2010 – V. 48 – № 3. – P. 798-802.

90. Piperine reverses high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice / S. Choi et al. // Food Chem. – 2013 – V. 141 – № 4. – P. 3627-3635.

91. F. Oz, The effects of direct addition of low and medium molecular weight chitosan on the formation of heterocyclic amines in beef chop / F. Oz, M. Kizil, A. Zaman, S. Turhan // LWT-Food Sci. Technol. – 2016 – V. 65. – P. 861-867

92. Effect of six Chinese spices on heterocyclic amine profiles in roast beef patties by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and principal component analysis / M. M. Zeng et al. // J. Agric. Food Chem. – 2014 – V. 62 – № 40. – P. 9908-9915.

93. Effect of phenolic compounds from spices consumed in China on heterocyclic amine profiles in roast beef patties by UPLC-MS/MS and multivariate analysis / M. M. Zeng et al. // Meat Sci. – 2016 – V. 116. – P. 50-57.

94. Minimization of heterocyclic amines and thermal inactivation of Escherichia coli in fried ground beef / Salmon C.P. et al. // J Natl Cancer Inst – 2000 – V. 92 – № 21. – P. 1773–1778.

95. Wakabayashi K. Food-derived mutagens and carcinogens / Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H., Sugimura T. // Cancer Res – 1992 – V. 52. – P. 2092–2098.

96. Reduction in formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced aberrant crypt foci in the rat colon by docosahexaenoic acid (DHA) / Takahashi M. et al. // Carcinogenesis – 1997 – V. 10. – P. 1937–41.

97. Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rats / Guo D. et al. // Carcinogenesis – 1995 – V. 16 – № 12. – P. 2931–2937.

98. Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat / Xu M. et al. // Carcinogenesis – 1996 – V. 17 – № 7. – P. 1429–1434.

99. Reddy B.S. Inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5f]quinoline, a food mutagen / Reddy B.S., Rivenson A // Cancer Res – 1993 – V. 53 – № 17. – P. 3914–3918.

100. Guo D. Inhibition by chlorophyllin of 2amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced tumorigenesis in the male F344 rat / Guo D., Horio D.T., Grove J.S., Dashwood R.H. // Cancer Lett – 1995 – V. 95 – № 1-2. – P. 161–165.

101. Inhibitory effect of chlorophyllin on PhIP-induced mammary carcinogenesis in female F344 rats / Hasegawa R. et al. // Carcinogenesis – 1995 – V. 16 – № 9. – P. 2243–2246.

102. Кузнецова О.А. Теоретические и практические аспекты анализа ипрогнозирования рисков в технологии мяса и мясной продукции: дисс. … доктор техн. наук: 05.18.04, 05.02.23 / Кузнецова Оксана Александровна. – Москва, 2017. – 279 с.

103. Quantitative analysis of fourteen heterocyclic aromatic amines in bakery products by a modified QuEChERS method coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) / Yuluan W. et al. // Food Chemistry – 2019 – V. 298. – P. 125-148.

104. Xueling Dong. Seasonal variations of atmospheric heterocyclic aromatic amines in Beijing, China / Xueling Dong, Dameng Liu, Shaopeng Gao // Atmospheric Research – 2013 – V. 120-121. – P. 287–297

Приложение 1

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Директор

_____ О.А. Кузнецова

«28» февраля 2020 г.

МИ-01-2020

Определение гетероциклических ароматических аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Москва 2020

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

РАЗРАБОТЧИК	ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
ЗАКАЗЧИК	
ИСПОЛНИТЕЛИ	КУЛИКОВСКИЙ А.В., к.т.н. УТЬЯНОВ Д.А.
АТТЕСТОВАНА	
УТВЕРЖДЕНА	Директор ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Область применения

Настоящая методика распространяется на продукты убоя и мясную продукцию, а также на мясо птицы, субпродукты и продукты его переработки, и устанавливает метод определения содержания гетероциклических ароматических аминов (2-амино-3,8-диметилимидазо[4,5-f]хиноксалина (MeIQx) и 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридина (PhIP)) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС).

Диапазон измерений гетероциклических ароматических аминов от 1,0 до 1000,0 нг/г.

2 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009–83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ OIML R 76-1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042−83, ИСО 4788−80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ Р 52501–2005 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ 4025–95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ Р ИСО 5725-2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 58144–2018 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7269–2015 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

ГОСТ 9792–73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 20469–95 Электромясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26272–98 Часы электронно-механические кварцевые наручные и карманные. Общие технические условия

ГОСТ 26678–85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 27460-87 Трубки, капилляры и палочки из боросиликатного стекла 3,3. Общие технические условия

ГОСТ 28165−89 Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1−81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31467–2012 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям

3 Термины и определения

В настоящей методике применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **ГАА:** Гетероциклические ароматические амины – циклические углеводороды в которых один или более атомов углерода заменены другими гетероатомами.

3.2 **супернатант:** Жидкость, располагающаяся над твердым слоем (осадком, седиментом) после центрифугирования пробы.

3.3 **элюент:** Подвижная фаза (растворитель или смесь растворителей).

3.4 **аналит:** Вещество, определяемое в пробе объекта аналитического контроля.

4 Сущность метода

Метод основан на щелочном гидролизе пробы с **последующем извлечением,** очисткой и концентрированием гетероциклических ароматических аминов с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ) и количественном определении методом ВЭЖХ-МС/МС.

5 Требования безопасности

5.1 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

5.2 Помещение, в котором проводят измерения, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

5.3 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостной высокоэффективный Agilent 1200, укомплектованный:

- трехквадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6410B с источником ионизации распылением в электрическом поле (*ESI*) с диапазоном измерений массы от 2 до 2000 а. е. м.;

- градиентным насосом;

- хроматографической колонкой для ВЭЖХ Agilent XDB-C18 длиной 50 мм и диаметром 4,6 мм с обращенной фазой С18, размером частиц 1,8 мкм;

- блоком термостатирования колонок с поддержанием температуры 40 ºС с точностью ± 0,1 ºС;

- записывающим устройством с компьютерным управлением и автоматической программой обработки хроматографических данных в соответствии с комплектацией хроматографа.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального или высокого класса точности, с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 1,0 мг.

Испаритель роторный по ГОСТ 28165.

Центрифуга лабораторная, с центробежным ускорением 4000 g.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

Часы электронно-механические по ГОСТ 26272.

Банки стеклянные вместимостью 250–500 $см^3$ с крышкой.

Пипетки градуированные 1–2–1–0,5, 1–2–1–1, 1–2–1–2, 1–2–1–5, 1–2–1–10 по ГОСТ 29227 с относительной погрешностью дозирования не более ± 5 % или дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования и относительной погрешностью дозирования не более ± 1 %.

Колба мерная 2–100–2, 2–500–2 по ГОСТ 1770.

Колба круглодонная К-1–50–29/32 ТХС по ГОСТ 25336.

Палочки из боросиликатного стекла по ГОСТ 27460.

Холодильник стеклянный ХСВО 10 ХС по ГОСТ 25336.,

Воронки делительные ВД-1-250(500) ХС по ГОСТ 25336.

Пробирки центрифужные из полипропилена вместимостью 50 $см^3$.

Флаконы – виалы хроматографические из темного стекла вместимостью 2,0 $см^3$.

Фильтр мембранный из политетрафторэтилена с диаметром пор 0,45 мкм.

Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144 или вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52501 первой степени очистки.

Кислота муравьиная, ос. ч.

Метанол, ос. ч.

Ацетонитрил, ос. ч.

Натрия гидроксид, х.ч.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.

Этилацетат, х.ч.

Аммиак водный, х.ч.

Диатомит

Картриджи ТФЭ на основе обращенно-фазного сорбента С18 с размером диаметра частиц не более 60 мкм.

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

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 7269, ГОСТ 31467, ГОСТ 9792.

7.2 Пробу измельчают, дважды пропуская через мясорубку с диаметром отверстий решетки 2– 4 мм, и тщательно перемешивают.

7.3 Подготовленную пробу помещают в стеклянную банку вместимостью 250–500 $см^3$, закрывают крышкой и хранят при температуре (4 ± 2) ºС не более 2 сут.

Допускается хранить подготовленную пробу в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 ºС не более 30 сут.

8 Подготовка к измерению

8.1 Приготовление растворов

8.1.1 Приготовление подвижной фазы хроматографической системы

Для проведения хроматографических измерений используют двухкомпонентную подвижную фазу:

- элюент А: 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде.

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ приливают 450 $см^3$ деионизованной воды, добавляют 0,5 $см^3$ муравьиной кислоты, доводят объем до метки деионизованной водой и перемешивают.

- элюент В: 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле.

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ приливают 450 $см^3$ ацетонитрила, а затем добавляют 0,5 $см^3$ муравьиной кислоты доводят объем до метки ацетонитрилом и перемешивают.

Перед проведением измерений элюенты дегазируют на ультразвуковой бане.

Растворы хранят в колбах с притертыми пробками в холодильнике при температуре (4 ± 2) ºС не более 1 мес.

8.1.2 Приготовление градуировочных растворов

Для определения **гетероциклических ароматических аминов** готовят градуировочные растворы MeIQx и PhIP следующих массовых концентраций: 1000,0 нг/$см^3$ (раствор 1), 500,0 нг/$см^3$ (раствор 2), 100,0 нг/$см^3$ (раствор 3), 10,0 нг/$см^3$ (раствор 4), 1,0 нг/$см^3$ (раствор 5).

Для приготовления градуировочных растворов сначала готовят основной раствор. Для этого взвешивают индивидуальный стандартный образец массой,

эквивалентной 10,0 мг определяемого компонента (MeIQx и PhIP), переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки метанолом.

Для приготовления раствора 1 в мерную колбу вместимостью 100 см^3 переносят 1,0 см^3 основного раствора и доводят объем до метки метанолом.

Примечание – При расчете концентрации градуировочных растворов учитывают содержание основного вещества в реактиве.

Для приготовления раствора 2 в хроматографическую виалу переносят 0,5 см^3 раствора 1 и 0,5 см^3 метанола.

Для приготовления раствора 3 в хроматографическую виалу переносят 0,1 см^3 раствора 1 и 0,9 см^3 метанола.

Для приготовления раствора 4 в хроматографическую виалу переносят 0,1 см^3 раствора 3 и 0,9 см^3 метанола.

Для приготовления раствора 5 в хроматографическую виалу переносят 0,1 см^3 раствора 4 и 0,9 см^3 метанола.

Для приготовления раствора 6 в хроматографическую виалу переносят 0,2 см^3 раствора 5 и 0,8 см^3 метанола.

Срок хранения растворов при температуре минус 20 ºС − не более 9 мес.

Примечание – При расчете концентрации градуировочных растворов учитывают содержание основного вещества в реактиве.

Допускается приготовление градуировочных растворов иных концентраций в заданном диапазоне измерений метода.

8.2 Приготовление рабочих растворов

8.2.1 Приготовление 1 М гидроксида натрия в этаноле

Взвешивают 4,0 г гидроокиси натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 по ГОСТ 1770, растворяют в этиловом спирте по ГОСТ 6709 и доводят объем до метки.

Раствор помещают в стеклянную колбу с притертой пробкой и хранят при комнатной температуре в темном месте не более одного месяца.

8.2.2 Приготовление раствора кислоты соляной молярной концентрации *c*(HCl) = 0,1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1 дм^3 добавляют 700-800 см^3 дистиллированной воды, с помощью механического дозатора приливают 8,5 см^3 концентрированной кислоты соляной (ρ=1.188 г/см^3) и доводят объем до метки дистиллированной водой.

8.2.3 Приготовление смеси метанол-аммиак в соотношении 19:1

В 4 объема метанола по каплям приливают один объем аммиака водного. Приготовление раствора проводят под вытяжной вентиляцией (в вытяжном шкафу). Раствор готовят в небольших количествах перед анализом.

8.3 Приготовление пробы

8.3.1 Экстракция гетероциклических ароматических аминов

Пробу анализируемого продукта массой (3,00±0,01) г, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 25336. Добавляют 50 см3 раствора 1 М гидроксида натрия в этаноле (8.2.1). Колбу соединяют с обратным холодильником, помешают в водяную баню и нагревают при температуре (80±2) °С в течение 30 мин или до полного растворения образца, периодически перемешивая палочкой из боросиликатного стекла по ГОСТ 27460 содержимое колбы. После этого содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры. Гидролизат смешивают с 6 г диатомита и переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3 по ГОСТ 25336. Добавляют 10 см^3 этилацетата, тщательно перемешивают и дают отстояться. После расслаивания верхний этилацетатный слой переносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3. Экстракцию повторяют 10 см^3 этилацетата, объединяя этилцетатный слой. После этого пробу центрифугируют 10 мин с центробежным ускорением 5000 g. Отбирают 10 см^3 полученного супернатанта и используют для ТФЭ.

8.3.2 Очистка пробы методом ТФЭ

Картриджи ТФЭ предварительно активируют, пропуская 6 см^3 метанола, затем 6 см^3 0,1М соляной кислоты (8.2.2) в деионизованной воде. Анализируемый раствор наносят на картридж со скоростью 1 см^3/мин, собирая этилацетатный экстракт. Картридж промывают, пропуская 6 см^3 0,1М соляной кислоты в деионизованной воде и 6 см^3 метанола, отбрасывая смывы. Аналиты элюируют 6

см^3 смеси метанол-аммиак в соотношении 19:1 (8.2.3) со скоростью 1 см^3/мин и переносят в круглодонную колбу объединяя с этилацетатным экстрактом. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. К сухому остатку приливают 1 см^3 метанола. Ставят на 5 мин на ультразвуковую баню до полного растворения остатка. Раствор пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в хроматографическую виалу вместимостью 2 см^3 для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

9 Проведение измерений

9.1 Условия хроматографических измерений

Условия проведения измерений методом ВЭЖХ-МС/МС подбирают в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа, масс-спектрометрического детектора и хроматографической колонки.

В качестве примера могут быть приведены следующие условия определения ГАА, выполненные на системе ВЭЖХ Agilent 1200 с МС/МС детектором Agilent 6410B с хроматографической колонкой Agilent XDB-C18 (4,6 х 50 мм, 1,8 мкм).

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (двухкомпонентная подвижная фаза):

объем вводимой пробы – 0,02 см^3;

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

температура термостата колонки − 40 ºС.

Параметры и условия ВЭЖХ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры и условия ВЭЖХ

Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы	
	А, %	В, %
0	90	10
3	60	40
4	40	60
6	10	90

8	10	90
8,1	90	10
12	90	10

9.2 Настройка масс-спектрометрического детектора

Для анализа подобраны следующие параметры масс-спектрометрического детектирования: температура источника – 100 ºС; температура газа десольвации – 320 ºС; скорость потока газа десольвации – 8 дм^3/мин; давление иглы распылителя – 30 *psi* (206,85 кПа).

Условия регистрации аналитических сигналов в режиме *MRM* приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры воздействия на ионы в режиме *MRM* и условия ионизации распылением в электрическом поле (*ESI*) с регистрацией положительных (+) 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

Условия детектирования оптимизируют в ручном режиме. Для этого используют градуировочный раствор индивидуальных веществ концентрации 100,0 нг/см^3, приготовленного по 8.1.2. При этом, соотношение сигнал/шум (*S*/*N*) для дочерних ионов должно быть не менее 1:10 для раствора индивидуальных веществ концентрации 1,0 нг/см^3. Напряжение на фрагменторе оптимизируют с шагом 10 В по максимальному отклику протонированного молекулярного иона.

Энергию диссоциации (*CE*) оптимизируют с шагом 5 В по максимальному отклику характерного дочернего иона.

9.3 Градуировка ВЭЖХ-МС/МС системы

9.3.1 Градуировку ВЭЖХ-МС/МС системы проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

9.3.2 Градуировочную характеристику строят при помощи матричной градуировки. Для этого проводят приготовление экстракта пробы по 8.3, не содержащей ГАА. На стадии перерастворения сухого остатка (см. 8.3.2) после твердофазной экстракции в анализируемую пробу добавляют 1 $см^3$ смеси градуировочных растворов анализируемых соединений, приготовленных по 8.1.2. Для построения градуировочной зависимости используют растворы следующих массовых концентраций: 1000,0 $нг/см^3$, 100,0 $нг/см^3$, 10,0 $нг/см^3$, 1,0 $нг/см^3$.

При построении градуировочной характеристики для количественного определения остаточного количества содержания ГАА в инжектор хроматографа вводят по 0,02 $см^3$ и не менее двух раз градуировочные растворы различных уровней массовых концентраций.

Фактические массовые концентрации рассчитывают с учетом чистоты стандарта и молекулярного веса соединения в диссоциированном состоянии. Полученные хроматограммы обрабатывают с использованием компьютерной системы обработки данных хроматографа. Определяют абсолютное время удерживания ГАА. С использованием средств программного обеспечения строят градуировочную зависимость для наиболее интенсивного дочернего иона. Коэффициент линейной корреляции полученной градуировочной зависимости должен быть не менее 0,98. При невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Проведение градуировки обязательно при замене хроматографической колонки, а также при систематическом получении неудовлетворительных результатов контроля, выполняемого в соответствии с разделом 12.

9.4 Контроль аналитической системы

Контроль выполняют с использованием приготовленного по 8.1.2. градуировочного раствора с концентрацией аналитов 100 нг/см^3. За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений. Полученный результат измерений не должен отличаться от действительного значения концентрации определяемых веществ в градуировочном растворе более чем на 5 %, относительное стандартное отклонение времени удерживания аналитов – не более чем на 10 %. В случае невыполнения указанного критерия стабильности градуировочной характеристики проводят новую градуировку.

Контроль аналитической системы осуществляют при условиях, указанных в 9.1 и 9.2, перед началом проведения измерений, а также при смене хроматографической колонки, чистке блоков аналитического прибора и т. д.

9.5 Выполнение измерений

Для контроля фона прибора перед началом серии измерений в хроматограф вводят 20 мм^3 (мкл) ацетонитрила.

В виалы вместимостью 2 см^3 вносят приготовленный экстракт пробы и проводят измерения на системе ВЭЖХ-МС/МС при условиях, указанных в 9.1, 9.2.

По площадям хроматографических пиков наиболее интенсивного дочернего иона с использованием установленной градуировочной характеристики и программы обработки данных находят массовую концентрацию ГАА в анализируемой пробе.

Проводят два параллельных измерения анализируемой пробы и после каждого измерения вычисляют содержание ГАА.

Массовая концентрация ГАА в исследуемом растворе не должна превышать предельных значений градуировочных растворов. В случае превышения

исследуемый раствор, содержащий ГАА, с помощью механического дозатора разбавляют в рассчитанное количество раз раствором матричной калибровки, не содержащим анализируемые соединения, или раствором чистых образцов, содержащих близкое количество внутреннего стандарта, и проводят анализ разбавленных растворов.

10 Обработка результатов

10.1 В соответствии с данными, полученными при измерении градуировочных растворов, создают таблицу пиков с использованием программного обеспечения хроматографа. Расчеты содержания ГАА, а также площади пиков выполняют с помощью системы обработки данных в автоматическом режиме. Вычисление содержания ГАА проводят по наиболее интенсивному дочернему иону, для каждого соединения (см. таблицу 2).

10.2 Содержание ГАА X, нг/г, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \cdot V}{m}, \quad (1)$$

где C – массовая концентрация аналита в анализируемой пробе, найденная по градуировочному графику, нг/см^3;

V – объем растворителя после ТФЭ (см. 8.3.2), см^3;

m – масса анализируемой пробы, г.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если удовлетворяются условия повторяемости (сходимости).

11 Метрологические характеристики

11.1 Метрологические характеристики метода при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ приведены в таблице 3.

Таблица 3

Наименование	Диапазон	Показатели точности

определяемого аналита	измерений, нг/г	Границы относительной погрешности, ±δ, %	Предел повторяемости (сходимости), *r*, %	Предел воспроизводимости *R*, %
MeIQx	От 1,0 до 1000 включ.	35	$0{,}30x_{ср}$	$0{,}40X_{ср}$
PhIP		35	$0{,}30x_{ср}$	$0{,}40X_{ср}$
$x_{ср}$ – среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, нг/г; $X_{ср}$ – среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в разных лабораториях, нг/г.				

11.2 Расхождение между результатами двух параллельных измерений, выполненных одним оператором при измерении одной и той же пробы с использованием одних и тех же средств измерений и реактивов, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) *r*, значения которого приведены в таблице 3.

$$|x_1 - x_2| \le r, \quad (3)$$

где x_1 и x_2 – результаты двух параллельных измерений, нг/г;

r – предел повторяемости, нг/г.

11.3 Расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости *R*, значения которого приведены в таблице 3.

$$|X_1 - X_2| \le R, \quad (4)$$

где X_1 и X_2 – результаты двух измерений, выполненных в разных лабораториях, нг/г;

R – предел воспроизводимости, нг/г.

11.4 Границы относительной погрешности результатов измерений δ, находящиеся с доверительной вероятностью P = 0,95, при соблюдении условий настоящей методики, не должны превышать значений, приведенных в таблице 3.

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Контроль стабильности результатов измерений (повторяемости, промежуточной прецизионности и погрешности) проводят в соответствии с порядком, установленным в лаборатории, по ГОСТ Р ИСО 5725-6 (подраздел 6.2).

12.2 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости), осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений не должно превышать предела повторяемости r. Значения r приведены в таблице 3.

12.3 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений, полученными двумя лабораториями, не должно превышать предела воспроизводимости R. Значения R приведены в таблице 3.

Приложение 1 (справочное)

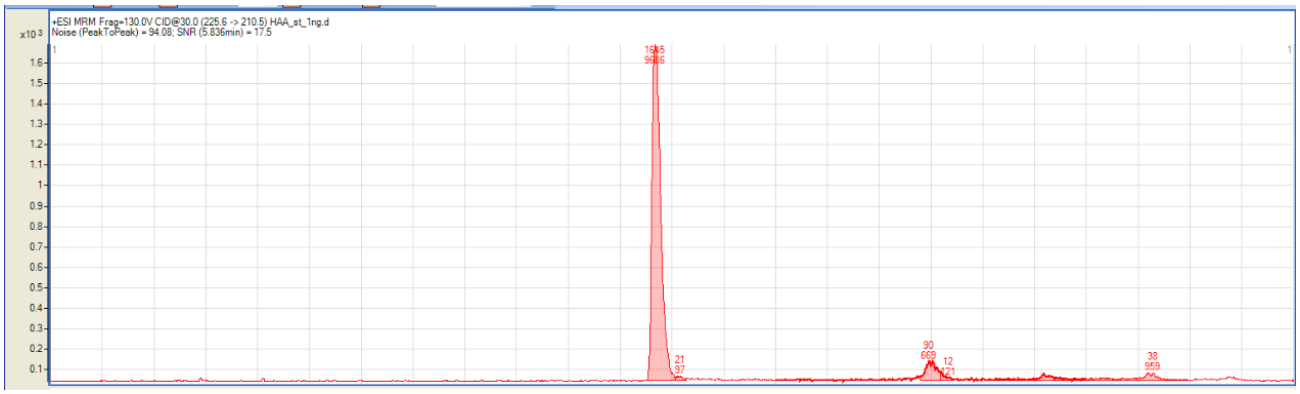


Рисунок 1. MRM-хроматограмма дочернего иона PhIP.

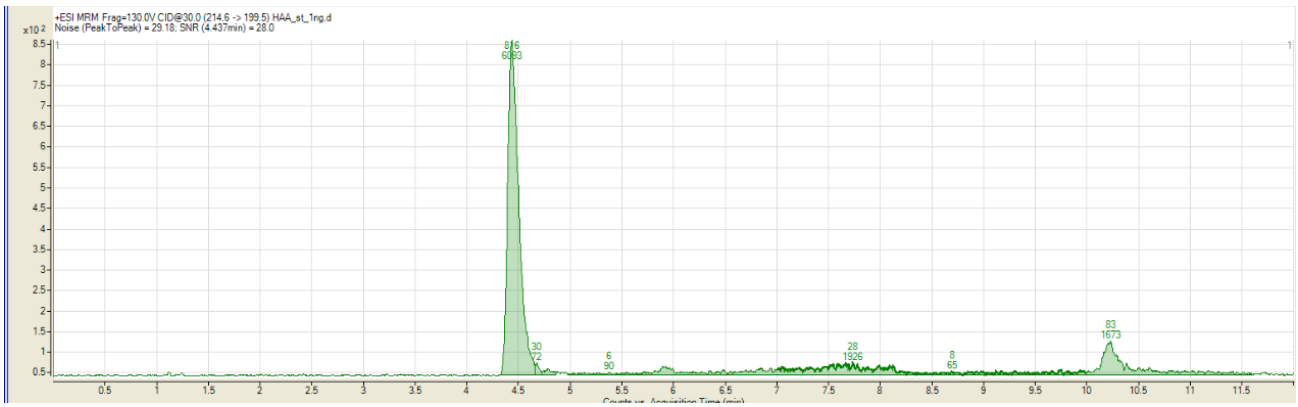


Рисунок 2. MRM-хроматограмма дочернего иона MeIQx.

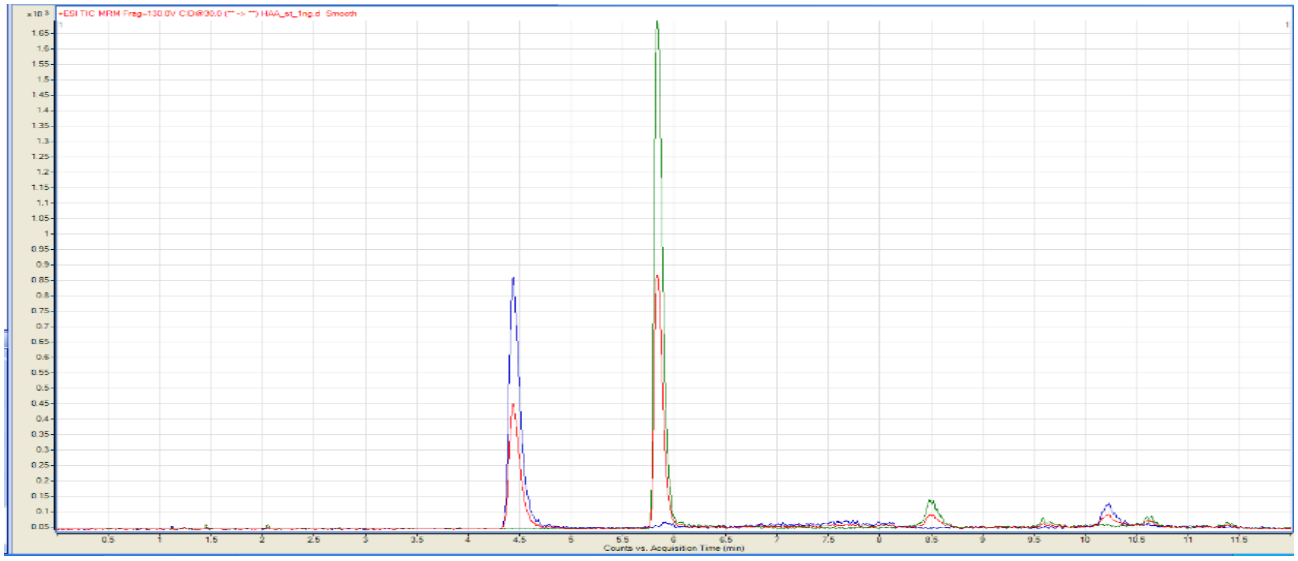


Рисунок 3. Хроматограмма наложения общего ионного тока на дочерние ионы PhIP и MeIQx.

Приложение 2

Расчет экономической эффективности использования методики измерений «Определение гетероциклических ароматических аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»

Данная статья содержит в себе затраты на приобретение, изготовление либо аренду инструментов, аппаратов, контрольно-измерительных приборов и прочих специальных устройств, необходимых для проведения исследований.

В данном случае химическая посуда и оборудование для исследований не приобретались специально, а были арендованы на время работы.

Таблица 1 – расчет стоимости химической посуды для проведения анализа определения ГАА с подготовкой проб методом с ТФЭ.

Посуда	Кол-во, шт.	Цена за единицу, руб.	Стоимость, руб.
Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 по ГОСТ 1770	4	165,0	660,0
Колбы круглодонные по К-1-100(250)-24/29 по ГОСТ 25336	4	95,0	380,0
Флаконы-виалы для жидких проб вместимостью 2 $см^3$	2	70,0	140,0
Воронка делительная грушевидная 250 $см^3$	2	900,0	1800,0
Центрифужная пробирка Eppendorf	2	60,0	120,0
		Итого:	3100,0

Арендная плата за пользование химической посудой рассчитывалась, исходя из стоимости посуды, 15% амортизации и срока аренды – 1 месяц. Арендная плата = $[(2840{,}0 \cdot 0{,}15)/12+140{,}0] \cdot 1 = 295{,}50$ руб.

Таблица 2 – расчет стоимости химической посуды для проведения анализа определения ГАА с подготовкой проб методом с жидкостной экстракцией.

Посуда	Кол-во, шт.	Цена за единицу, руб.	Стоимость, руб.
Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 по ГОСТ 1770	4	165,0	660,0
Колбы круглодонные по К-1-100(250)-24/29	4	95,0	380,0

по ГОСТ 25336			
Флаконы-виалы для жидких проб вместимостью 2 $см^3$	2	70,0	140,0
Воронка делительная грушевидная 250 $см^3$	2	900,0	1800,0
		Итого:	2980,0

Арендная плата за пользование химической посудой рассчитывалась, исходя из стоимости посуды, 15% амортизации и срока аренды – 1 месяц. Арендная плата = [(2840,0·0,15)/12+140,0]·1 = 175,50 руб.

Таблица 3 – Расчет стоимости химических реактивов при анализе ГАА с подготовкой проб методом с ТФЭ.

Материалы (реактивы)	Объем	Стоимость, руб.	Количество реактива, на 1 анализ	Сумма, руб.
Гидроксид натрия	1 кг	150,0	4 г	0,6
Этанол	1 л	70,0	100 мл	7
Диатомовая земля	1 кг	30 385,0	12 г	364,62
Этилацетат	1 л	227,0	40 мл	9,10
Метанол	2,5 л	7820,0	36 мл	112,70
Соляная кислота	1 л	108,0	0,44	0,05
Аммиак	1 л	82,0	0,6	0,05
Ацетонитрил для ВЭЖХ	2,5 л	15420,0	2	13,35
Картридж для ТФЭ	30 штук	19 033,0	2	1270,0
			Итого:	1777,47

Таблица 4 – Расчет стоимости химических реактивов при анализе ГАА с подготовкой проб методом с жидкостной экстракцией.

Материалы (реактивы)	Объем	Стоимость, руб.	Количество реактива, на 1 анализ	Сумма, руб.
Гидроксид натрия	1 кг	150,0	4 г	0,6
Этанол	1 л	70,0	100 мл	7
Эфир	1 л	448,0	100 мл	44,8

диэтиловый				
Натрий сернокислый б/в	1 кг	224,0	50 г	11,2
Ацетонитрил для ВЭЖХ	2,5 л	15420,0	2	13,35
			Итого:	76,95

Таблица 5 – Расчет стоимости оборудования при анализе ГАА с подготовкой проб методом с ТФЭ.

Наименование оборудования и приборов	Количество единиц	Стоимость, руб.
Система ВЭЖХ-МС/МС Agilent 6410B	1	10 000 000,0
Испаритель ротационный Heidolph	1	115 000,0
Система вакуумной фильтрации для ТФЭ	1	49 220,0
Весы аналитические (ц.д.0,0001г)	1	44 000,0
Персональный компьютер	1	35 000,0
Шкаф вытяжной химический	1	55 300,0
Баня водяная лабораторная	1	45 212,0
Холодильник бытовой электрический	1	14 000,0
Дозаторы пипеточные	2	12 300,0
Электромясорубка	1	3 500,0
	Итого	10 373 532,0

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из стоимости оборудования, 15% амортизации и срока аренды – 1 месяц.

Арендная плата = (10 373 532·0,15)/12 = 129 669,15 р.

<u>На один анализ:</u>

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из количества дней в месяце (30) и количества анализов в день(10) и проведение анализа в двух параллелях.

Арендная плата = [(129 669,15/30]/10*2 = 864,50 р.

Таблица 6 – Расчет стоимости оборудования при анализе ГАА с подготовкой проб методом с ТФЭ.

Наименование оборудования и приборов	Количество единиц	Стоимость, руб.
Система ВЭЖХ-МС/МС Agilent 6410B	1	10 000 000,0
Испаритель ротационный Heidolph	1	115 000,0
Весы аналитические (ц.д.0,0001г)	1	44 000,0
Персональный компьютер	1	35 000,0
Шкаф вытяжной химический	1	55 300,0
Баня водяная лабораторная	1	45 212,0
Холодильник бытовой электрический	1	14 000,0
Дозаторы пипеточные	2	12 300,0
Электромясорубка	1	3 500,0
	Итого	10 324 312,0

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из стоимости оборудования, 15% амортизации и срока аренды – 1 месяц.

Арендная плата = (10 324 312·0,15)/12 = 129 053,90 р.

<u>На один анализ:</u>

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из количества дней в месяце (30) и количества анализов в день(10) и проведение анализа в двух параллелях.

Арендная плата = [(129 053,90/30]/10*2 = 860,40 р.

Таблица 7 – Суммарные затраты на проведение аналитических исследований «Определение гетероциклических ароматических аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» с разными способами подготовки проб.

№ п/п	Статьи затрат	Сумма с методом с ТФЭ, руб.	Сумма с методом с жидкостной экстракцией, руб.
1	Арендная плата за пользование химической посудой	295,50	175,50
2	Стоимость химических реактивов	1777,47	76,95

	на 1 анализ		
3	Арендная плата за использование специального оборудования на 1 анализ	864,50	860,40
	Итого:	2937,47	1112,85

Предложенные подходы к масс-спектрометрической идентификации ГАА в мясной продукции позволят значительно повысить уровень контроля и как следствие безопасность мясной продукции.