

УДК 543.544.5.068.7:543.51:547.231

ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-НИТРОЗАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ УЛЬТРАВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ– КВАДРУПОЛЬ-ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ПО ТОЧНЫМ МАССАМ ПРОТОНИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ

© 2019 г. В. Г. Амелин^{1, 2, *}, Д. С. Большаков¹

¹Федеральный центр охраны здоровья животных
600901 Россия, Владимир, мкрн. Юрьеvec

²Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых
600000 Россия, Владимир, ул. Горького, 87

*E-mail: amelinvg@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2018 г.

После доработки 18.01.2019 г.

Принята к публикации 18.01.2019 г.

Предложен способ экспресс-идентификации и определения семи N-нитрозаминов в пищевых продуктах методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения. Диапазоны определяемых содержаний N-нитрозаминов составили от 0.001–5 до 2–100 нг/мл для жидких (вода, пиво) и от 2–50 до 4–100 нг/г для твердых (мясо, рыба, мидии, солод, зерно, колбаса, сосиски, сардельки) продуктов. Пределы обнаружения составили 0.0005–2 нг/мл, 2–5 нг/г для жидких и твердых продуктов соответственно. Степень извлечения аналитов – от 62 до 105%. Оценен матричный эффект при определении N-нитрозаминов в объектах различной природы. Матричный эффект незначителен ($\leq 20\%$) при определении N-нитрозаминов в воде и значителен для пива, мясных продуктов, зерна, солода и рыбы ($> 20\%$). Предложена методика экспресс-идентификации и определения N-нитрозаминов методом стандартной добавки и с использованием матричной градуировки. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0.17. Продолжительность идентификации проб 40 мин, определение обнаруженных аналитов занимает 1–1.5 ч.

Ключевые слова: N-нитрозамины, пищевые продукты, ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, квадруполь-времяпролетная масс-спектрометрия высокого разрешения.

DOI: 10.1134/S0044450219070132

Большинство N-нитрозаминов (НА) обладает выраженными канцерогенными и мутагенными свойствами и включены в списки приоритетных загрязнителей объектов окружающей среды и пищевых продуктов во многих странах. В соответствии с Техническим регламентом Таможенного Союза “О безопасности пищевой продукции” (ТР ТС 021/2011) максимально допустимый уровень (МДУ) нитрозаминов во всех видах рыбной продукции и морских млекопитающих (в том числе сушеной продукции) составляет 0.003 мг/кг; в мясных консервах из мяса птицы с добавлением нитрита натрия, консервах из субпродуктов (в том числе паштетных) – 0.002 мг/кг; в пивоваренном солоде – 0.015 мг/кг; в жире-сырце, шпике сви-

ном и продуктах из них – 0.002 мг/кг; в пиве – 0.003 мг/кг [1].

В отличие от многих других токсикантов, остаточные количества которых могут присутствовать в пищевой продукции и оказывать значительный вред здоровью человека (микотоксины, пестициды, полициклические ароматические углеводороды), задача определения НА по своему нормативно-методическому обеспечению является недостаточно проработанной для повсеместного внедрения и использования в испытательных лабораториях, проводящих рутинные исследования на показатели безопасности пищевой продукции. Поэтому разработка новых более совершенных методик определения НА – весьма актуальная за-

дача аналитической химии продовольственного сырья и пищевых продуктов.

В настоящее время методики определения НА можно разделить на две группы: первая группа включает методики определения производных НА, как правило, методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии; вторая группа – методики определения немодифицированных НА методами газожидкостной хроматографии (ГЖХ) (реже ВЭЖХ).

Первая группа методов в силу увеличения числа стадий пробоподготовки и ужесточения требований к чистоте конечного экстракта является более трудоемкой. Утвержденные в Российской Федерации методические указания [2] основаны на выделении летучих НА путем перегонки с водяным паром или в вакууме, экстракции дихлорметаном НА из водного дистиллята, концентрировании экстракта, денитрозировании НА бромоводородом в уксусной кислоте, алкилировании аминов 8-метокси-5-хинолинсульфонилациридином, разделении и полуколичественном определении флуоресцирующих 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфонамидных производных в тонком слое силикагеля. Разработаны методики ВЭЖХ-определения НА в продовольственном сырье и пищевых продуктах с флуориметрическим [3–5] и УФ-детектированием [6]. Особенность методик [3–5] – высокая концентрационная чувствительность детектирования остаточных количеств НА, обусловленная природой флуориметрических методов анализа: пределы обнаружения достигают 0.075–0.08 нг/г [3] и 0.01–0.07 нг/г [5]. Для получения производных соответствующих аминов (продуктов денитроирования НА) используют, как правило, 5-(диметиламино)нафталин-1-сульфохлорид (дансилхлорид) [3, 4]. Следует отметить, что подобные работы описывают определение небольшого числа НА, несмотря на то, что в пищевых продуктах могут содержаться остаточные количества НА различной природы [7, 8].

Вторая группа методов является приоритетной, поскольку требует меньших манипуляций с анализируемым образцом. Для идентификации и количественного определения НА все чаще применяют ГЖХ с термоэнергетическим, пламенно-ионизационным (ПИД) [9, 10] и масс-спектрометрическим (МС) детектированием [7, 11–13]. Невысокая стоимость ПИД делает подобные разработки более доступными для исследовательских лабораторий, однако методики недостаточно чувствительны к летучим НА с низкой молекулярной массой.

Ввиду сложного состава матрицы пищевых продуктов и низких концентраций в них НА необходимы процедуры концентрирования пробы и очистки полученного экстракта [7, 8]. Для извле-

чения НА из жидких проб (кровь, вода и т.д.) используют твердофазную (ТФЭ) или жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ), твердофазную микроэкстракцию [7, 13, 14]. N-нитрозамины извлекают из проб пищевых продуктов в основном перегонкой с водяным паром, затем используют ЖЖЭ слабо полярными органическими растворителями (обычно дихлорметаном) и ТФЭ [14]. Из пищевых продуктов НА также извлекают экстракцией с микроволновым нагревом в сочетании с дисперсионной жидкостно-жидкостной [11, 12] и твердофазной микроэкстракцией (используют углеродные молекулярные сита) [14]. Подобные методы позволяют существенно сократить продолжительность подготовки пробы, однако масса навески (обычно 1 г), подвергаемая микроволновому разложению, накладывает дополнительные требования к коэффициенту концентрирования пробы, который должен быть достаточным для детектирования аналитов на уровне МДУ.

Значительный интерес представляет определение немодифицированных НА с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с МС-детектированием (УВЭЖХ–МС) [15, 16]. В указанных работах представлены методики определения НА в питьевых и сточных водах с применением метода ТФЭ для концентрирования и очистки пробы. Перспективность развития таких методик обусловлена особенностями метода УВЭЖХ–МС, к которым можно отнести высокую концентрационную чувствительность, высокую селективность определения аналитов различных классов и низкий расход токсичных растворителей.

Анализ литературы показывает, что в настоящее время отсутствуют простые скрининговые методики, позволяющие быстро идентифицировать НА в пищевых продуктах. Кроме того, существующие методики определения НА весьма трудоемки, многостадийны и зачастую требуют перевода целевых компонентов в подходящую для чувствительного детектирования форму.

В данной работе предлагается простая методика экспресс-идентификации и определения N-нитрозаминов в пищевых продуктах методом УВЭЖХ с детектированием квадруполь-времяпролетной МС высокого разрешения по точным массам протонированных молекул.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Использовали ультравысокоэффективный жидкостный хроматограф UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США) в сочетании с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором maXis 4G и ионизацией электрораспылением в устройстве ionBooster (Bruker

Daltonics, Германия). Разделение проводили на колонках 30 × 2.1 мм, 50 × 2.1 мм, 100 × 2.1 мм ACQUITY UPLC® BEN C18, 50 × 2.1 мм ACQUITY UPLC® Shield RP18, 50 × 2.1 мм ACQUITY UPLC® Phenyl (1.7 мкм) (Waters, США), 50 × 2.1 мм Acclaim™ 120 C18 (2.2 и 3.0 мкм) (Thermo Scientific, США) в режиме градиентного элюирования.

Применяли весы аналитические Sartorius TE214S I специального класса точности (Sartorius, Германия), центрифугу MPW-260R (MPW Med. Instruments, Польша), ножевую мельницу Grindomix GM200 (Retch, Германия), роторный испаритель Buchi (Германия), мембранные фильтры Corning®, 0.20 мкм (Германия).

Реактивы. Использовали стандартный раствор (2 мг/мл) смеси нитрозаминов в дихлорметане EPA 521 Nitrosamine Mix (Supelco Analytical, США), состоящей из N-нитрозометилэтиламина (НМЭА), N-нитрозодибутиламина (НДБА), N-нитрозодипропиламина (НДПА), N-нитрозодиэтиламина (НДЭА), N-нитрозодиметиламина (НДМА), N-нитрозопиперидина (НПП) и N-нитрозопирролидина (НПР).

Использовали CCl₄, C₂H₂Cl₄, CHCl₃ (Sigma-Aldrich, США); CH₂Cl₂ (Scharlab S.L., Испания); CH₃OH (Fisher Chemical, Германия).

Идентификация и определение. Для идентификации нитрозаминов по полученным хроматограммам использовали программный продукт DataAnalysis-4.1, TargetAnalysis (Bruker Daltonics, Германия), для составления картины изотопного распределения аналитов – IsotopePattern (Bruker Daltonics, Германия). Неизвестную концентрацию аналита в пробе определяли по матричной градуировке каждого из исследуемых продуктов или рассчитывали методом стандартной добавки по формуле:

$$c_x = c_{\text{доб}} / [(S_{x+\text{доб}} / S_x) - 1],$$

где $c_{\text{доб}}$ – концентрация добавки в пробе, нг/мл (г); $S_x, S_{x+\text{доб}}$ – площади пиков m/z в исследуемом растворе и в растворе с добавкой аналита соответственно.

Оценка матричного эффекта. Для оценки матричного эффекта (МЭ) использовали площади хроматографических пиков аналитов с концентрацией 5 и 50 нг/г, полученные в условиях анализа экстракта из анализируемого продукта, не содержащего исследуемых соединений, и деионированной воды. Расчет МЭ проводили по формуле:

$$\text{МЭ}(\%) = (S/S_0 - 1) \times 100,$$

где S, S_0 – площади хроматографических пиков аналитов, полученные для экстрактов из анализируемого продукта и деионированной воды соответственно.

Степень извлечения устанавливали на уровне концентраций для воды 0.001 и 1 нг/мл, для пива 3 и 50 нг/мл, для мяса, рыбы, мидий, солода, зерна, колбасы, сосисок, сарделек 5 и 50 нг/г. Степени извлечения (R) рассчитывали по формуле:

$$R(\%) = (X/X_0 - 1) \times 100,$$

где X – найденное значение массовой концентрации аналита в образце, нг/г (мл); X_0 – истинное значение массовой концентрации аналита в образце, нг/г (мл).

Условия хроматографического разделения и дегидратирования. Подвижная фаза состояла из 0.1%-ной муравьиной кислоты в воде (А) и 0.1%-ной муравьиной кислоты в ацетонитриле (В). Осуществляли градиентное элюирование: 0 мин – 5% В, 0.5 мин – 5% В, 2 мин – 50% В, 5 мин – 100% В, 6 мин – 5% В, 8 мин – 5% В. Расход подвижной фазы 0.4 мл/мин. Оптимальная температура термостата хроматографической колонки 50°C, объем вводимой пробы 50 мкл. Температура термостата автоматического дозатора 10°C.

Использовали ионизацию электрораспылением в устройстве ionBooster (Bruker Daltonics, Германия). Установлены следующие оптимальные значения параметров: напряжение на щите капилляра 400 В, на капилляре 1000 В, давление газа-распылителя азота 4.76 атм, поток газа-осушителя азота 6 л/мин, температура газа-осушителя азота 200°C, газа-испарителя азота 250 л/ч, температура газа-испарителя азота 250°C.

Диапазон регистрируемых масс ионов 50–300 Да. Для калибровки использовали раствор формиата натрия 10 мМ в смеси вода–изопропанол (1 : 1) в интервале хроматографирования 7.5–8 мин.

Пробоподготовка. Пиво. В центрифужную пробирку емк. 15 мл отбирали 5 мл пива, добавляли 5 мл дихлорметана (ДХМ), встряхивали вручную в течение 5 мин, центрифугировали 5 мин при 2700 об./мин, экстракт переносили в колбу для упаривания. Данную операцию повторяли дважды. Объединенные экстракты упаривали на роторном испарителе при 10–15°C досуха. К остатку прибавляли 50 мкл ацетонитрила и 950 мкл воды и тщательно перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр в микрофлакон и хроматографировали.

Вода. В делительную воронку емк. 200 мл помещали 100 мл исследуемой воды, добавляли 10 мл ДХМ и экстрагировали в течение 5 мин, экстракт переносили в колбу для упаривания. Данную операцию повторяли дважды. Объединенные экстракты упаривали на роторном испарителе при 10–15°C досуха. К остатку прибавляли 50 мкл ацетонитрила и 950 мкл воды и тщательно перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр в микрофлакон и хроматографировали.

Таблица 1. Основные характеристики N-нитрозаминов, определяемых методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии—квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения (колонка ACQUITY UPLC® BEN C18, 2.1 × 30 мм, 1.7 мкм)

Аналит	Брутто-формула	Ион	t_R , мин	Моноизотопная масса, m/z	Δ , млн ⁻¹ ($n = 3$, $P = 0.95$)	Инструментальная чувствительность, нг/мл
НДМА	C ₂ H ₆ N ₂ O	[M + H] ⁺	1.41	75.0560	6 ± 5	5
НМЭА	C ₃ H ₈ ON	[M + H] ⁺	0.81	89.0709	0.0 ± 0.1	1
НПР	C ₄ H ₈ ON ₂	[M + H] ⁺	0.80	101.0709	0.9 ± 0.1	0.1
НДЭА	C ₄ H ₁₀ ON ₂	[M + H] ⁺	1.52	103.0866	0.4 ± 0.5	0.5
НПП	C ₅ H ₁₀ ON ₂	[M + H] ⁺	1.75	115.0866	0.0 ± 0.1	0.05
НДПА	C ₆ H ₁₄ ON ₂	[M + H] ⁺	3.95	131.1174	0.6 ± 0.8	0.1
НДБА	C ₈ H ₁₈ ON ₂	[M + H] ⁺	4.72	159.1492	0.9 ± 0.6	0.05

Колбаса, сосиски, сардельки, мидии, мясо, рыба, зерно, солод. Навеску измельченного исследуемого образца массой 2.0 г помещали в центрифужную пробирку емк. 50 мл, добавляли 10 мл ДХМ и выдерживали на ультразвуковой ванне 15 мин, затем центрифугировали 5 мин при 2700 об./мин. Данную операцию повторяли дважды, объединяя экстракты в колбу для упаривания. Экстракт упаривали на роторном испарителе при 10–15°C до суха. К остатку прибавляли 50 мкл ацетонитрила и 950 мкл воды и тщательно перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр в микрофлаконе и хроматографировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий анализа. Выбор колонки. Оценивали свойства следующих колонок: 30 × 2.1 мм, 50 × 2.1 мм, 100 × 2.1 мм ACQUITY UPLC® BEN C18, 50 × 2.1 мм ACQUITY UPLC® Shield RP18, 50 × 2.1 мм ACQUITY UPLC® Phenyl (все с диаметром зерна 1.7 мкм), 50 × 2.1 мм Acclaim™ 120 C18, диаметр зерна 2.2 мкм и 3.0 мкм (Thermo Scientific, США). Установлено, что использование любых из перечисленных колонок не приводит к существенному изменению разрешения и эффективности разделения нитрозаминов. Продолжительность анализа (разделение + кондиционирование) на колонках длиной 5 см составила 10 мин, на колонке 3 см — 8 мин. Колонка 30 × 2.1 мм, ACQUITY UPLC® BEN C18 выбрана для дальнейших исследований.

Выбор подвижной фазы. Использовали воду, ацетонитрил и метанол без добавок и с добавками муравьиной кислоты и формиата аммония. В качестве оптимального выбрали следующий вариант: А — 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты, В — 0.1%-ный ацетонитрильный рас-

твор муравьиной кислоты. Добавки формиата аммония и использование метанола в качестве подвижной фазы не приводит к существенному увеличению хроматографических пиков аналитов.

Расход подвижной фазы и градиент подбирали таким образом, чтобы исследуемые аналиты распределялись по времени удерживания от 0.5 до 6 мин. Лучшие результаты получили при расходе подвижной фазы 0.4 мл/мин и градиенте: 0 мин — 5% В, 0.5 мин — 5% В, 2 мин — 50% В, 5 мин — 100% В, 6 мин — 5% В, 8 мин — 5% В. В результате продолжительность разделения составила 6 мин, и после кондиционирования колонки в течение 2 мин переходили к следующему анализу. Общая продолжительность хроматографирования одной пробы составила 8 мин.

Выбор температуры, объема пробы. Варьировали температуру термостата хроматографической колонки (30, 40, 50 и 60°C) и объем вводимой пробы (5, 10, 20, 50, 60 и 100 мкл). Установлено, что для достижения высокой чувствительности определения следует использовать температуру хроматографической колонки 50°C (при этом давление подвижной фазы на хроматографической колонке составило 120–130 бар) и объем вводимой в дозатор пробы 50 мкл (ввод более 50 мкл приводит к нарушению симметричности хроматографического пика).

Все исследуемые НА в условиях ионизации электрораспылением образуют протонированные молекулы [M + H]⁺ (табл. 1). В значительной степени стабильность образования протонированных форм обусловлена строением НА, а именно наличием атомов азота с неподеленными парами электронов, главным образом в составе аминного фрагмента.

Погрешность определения масс ионов не превышала ±1 млн⁻¹ (для НДМА ± 6 млн⁻¹) ($n = 3$).

Таблица 2. Метрологические характеристики определения N-нитрозаминов в пиве ($n = 3$, $P = 0.95$)

Аналит	R , %	МЭ, %	c_{\min} , нг/мл	$c_{\text{н}}$, нг/мл	Диапазон линейности, нг/мл (коэффициент корреляции, r)
НДМА	100 ± 2	+0.2	1	2	2–100 (0.9959)
НМЭА	87 ± 5	–45	0.5	1	1–40 (0.9899)
НДЭА	76 ± 8	–24	0.02	0.1	0.1–40 (0.9904)
НДПА	93 ± 5	–38	0.05	0.1	0.1–100 (0.9949)
НПП	86 ± 6	–16	0.02	0.1	0.1–100 (0.9986)
НДБА	93 ± 5	–42	0.01	0.02	0.02–20 (0.9886)
НПР	99 ± 7	–48	0.02	0.1	0.1–100 (0.9956)

Таблица 3. Метрологические характеристики определения N-нитрозаминов в воде ($n = 3$, $P = 0.95$)

Аналит	R , %	МЭ, %	c_{\min} , нг/мл	$c_{\text{н}}$, нг/мл	Диапазон линейности, нг/мл (коэффициент корреляции, r)
НДМА	78 ± 6	–20	0.1	0.5	0.5–5 (0.9921)
НМЭА	89 ± 5	–20	0.05	0.1	0.1–5 (0.9946)
НДЭА	83 ± 8	–17	0.001	0.005	0.005–5 (0.9971)
НДПА	99 ± 4	–1.0	0.001	0.005	0.005–5 (0.9871)
НПП	83 ± 9	–17	0.0005	0.001	0.001–5 (0.9926)
НДБА	105 ± 2	+19	0.0005	0.001	0.001–5 (0.9980)
НПР	89 ± 5	–12	0.0005	0.001	0.001–5 (0.9900)

Таблица 4. Метрологические характеристики определения N-нитрозаминов в мясе, колбасе, сосисках, сардельках, мидиях, зерне, солоде ($n = 3$, $P = 0.95$)

Аналит	R , %	МЭ, %	c_{\min} , нг/мл	$c_{\text{н}}$, нг/мл	Диапазон линейности, нг/г (коэффициент корреляции, r)
НДМА	98 ± 10	+1.0	1	2	2–50 (0.9901)
НМЭА	97 ± 15	–4.0	1	2	2–25 (0.9943)
НДЭА	85 ± 9	–28	1	2	2–50 (0.9904)
НДПА	86 ± 11	–41	1	2	2–50 (0.9949)
НПП	76 ± 7	–3.0	2	4	4–100 (0.9986)
НДБА	91 ± 12	–32	1	2	2–50 (0.9886)
НПР	89 ± 13	–35	2	5	5–100 (0.9956)

Таблица 5. Метрологические характеристики определения N-нитрозаминов в рыбе ($n = 3$, $P = 0.95$)

Аналит	R , %	МЭ, %	c_{\min} , нг/мл	c_H , нг/мл	Диапазон линейности, нг/г (коэффициент корреляции, r)
НДМА	93 ± 8	-27	2	3	3–50 (0.9801)
НМЭА	77 ± 20	-48	2	3	3–50 (0.9900)
НДЭА	76 ± 8	-46	2	3	3–50 (0.9854)
НДПА	66 ± 20	-48	3	3	3–50 (0.9849)
НПП	62 ± 9	-57	2	3	3–100 (0.9980)
НДБА	65 ± 22	-55	3	4	4–50 (0.9886)
НПР	49 ± 14	-42	2	4	4–100 (0.9900)

В табл. 2–5 указаны пределы обнаружения (c_{\min}) и пределы определения (c_H) для матриц различной природы, установленные по соотношениям сигнал/шум, равным 3 и 10 соответственно. Пределы обнаружения составили от 0.0005 до 2 нг/мл для жидких (вода, пиво) и от 2 до 5 нг/г – для твердых (мясо, рыба, мидии, солод, зерно, колбаса, сосиски, сардельки) продуктов, что позволило определять НА на уровне МДУ [1].

Пробоподготовка. В табл. 1 представлена инструментальная чувствительность определения НА предлагаемым методом (анализ стандартных растворов НА). Видно, что с учетом МДУ для различных матриц требуется концентрирование проб путем выбора объема и массы навески, степени концентрирования. В связи с этим для пива (табл. 2) выбран объем анализируемой пробы 5 мл и двукратная экстракция по 5 мл ДХМ, для воды – объем пробы 100 мл и двукратная экстракция по 10 мл ДХМ (табл. 3). В этих случаях достигаются максимальные значения степени извлечения аналитов (62–105%), указанные в табл. 2, 3. Для твердых продуктов потребовалась двукратная интенсификация экстракции путем обработки ультразвуком в течение 15 мин (табл. 4, 5).

Оценка матричного эффекта. Матричный эффект обусловлен влиянием присутствующих в экстракте соэкстрагируемых компонентов на ионизацию целевых аналитов. В условиях ионизации электрораспылением они могут как усиливать (+), так и понижать (–) интенсивность сигнала аналита. В табл. 2–5 представлены значения МЭ для различных проб. Согласно данным [17] МЭ можно пренебречь, когда его значения находятся в диапазоне $\pm 20\%$. В связи с этим МЭ можно пренебречь для воды (табл. 3). Однако для других исследуемых продуктов МЭ значителен (табл. 4, 5). Существует несколько способов ни-

велирования МЭ при анализе объектов биологического происхождения: уменьшение объема вводимой пробы, разбавление конечного экстракта водой, использование дейтерированного внутреннего стандарта, использование метода стандартной добавки, использование матричной градуировки.

Нами выбраны два последних способа как наиболее простые и доступные. Для матричной градуировки использовали следующие концентрации аналитов: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 и 5.0 нг/мл для воды; 2.0, 3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 80.0 и 100.0 нг/г для мясных и рыбных продуктов, зерна и солода; 0.02, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 и 100.0 нг/г для пива. Коэффициенты корреляции линейности градуировочных графиков (r) составили не менее 0.99 (табл. 2–5).

Более простым и эффективным вариантом нивелирования МЭ оказался метод стандартной добавки. В данном случае влияние компонентов матрицы на аналит и введенную добавку одинаков, что позволяет предотвратить погрешность оценки содержания определяемого соединения в анализируемом экстракте.

Анализ реальных объектов. Образцы для исследования были приобретены в местных супермаркетах. Воду для анализа отбирали в водоемах Владимирской области, или из центрального водоснабжения г. Владимира. В качестве примера на рис. 1 показаны масс-хроматограммы НА, полученные при определении их в образце пива, не содержащего определяемых соединений с добавкой 20 нг/мл каждого компонента. В табл. 6 представлены результаты определения НА в объектах различного происхождения с использованием метода стандартной добавки. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0.17. На рис. 2 представлены масс-хромато-

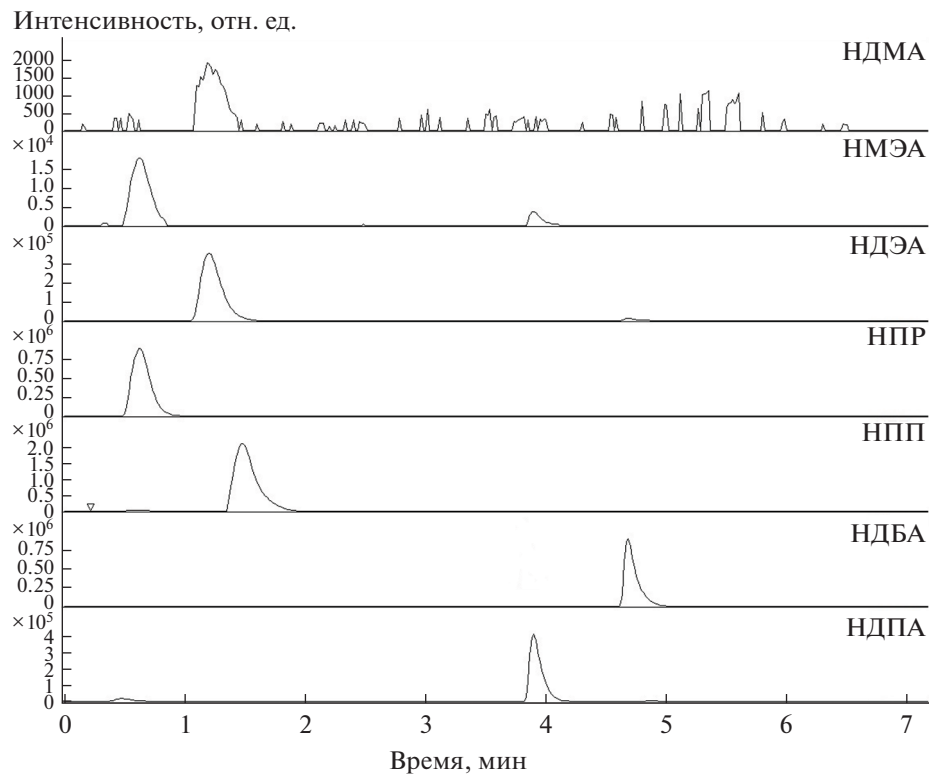


Рис. 1. Масс-хроматограммы N-нитрозаминов (добавка 20 нг/мл) для экстракта пива, не содержащего N-нитрозаминов.

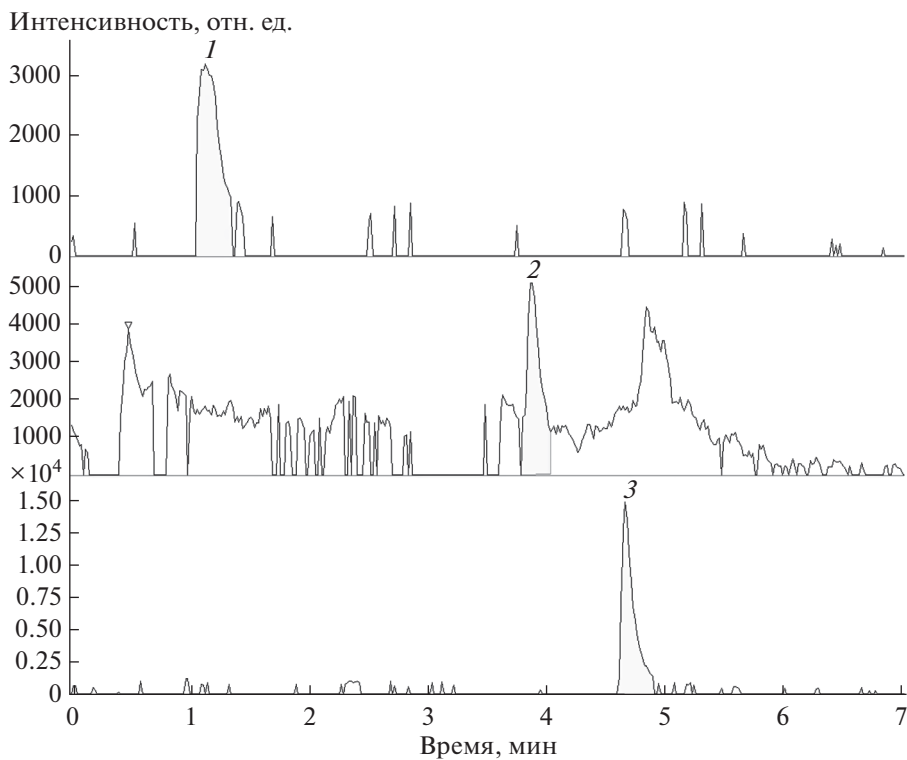


Рис. 2. Масс-хроматограммы экстракта пива. Обнаруженные N-нитрозамины: 1 – N-нитрозодиэтиламин, 2 – N-нитрозодипропиламин, 3 – N-нитрозодибутиламин.

Таблица 6. Результаты определения N-нитрозаминов в продуктах питания ($n = 3$, $P = 0.95$)

Объект анализа		Обнаруженный аналит	Найдено, нг/г(мл) (s_f)
Пиво	1	НДБА	1.7 ± 0.3 (0.14)
		НДЭА	1.0 ± 0.1 (0.15)
	НДПА	0.8 ± 0.2 (0.17)	
	2	НПП	3.0 ± 0.4 (0.12)
3		НДБА	<0.02
Рыбные продукты	4	н/о	—
		НДМА	<3
	Мидии копченые	НДМА	11 ± 2 (0.10)
	Рыба копченая (мойва)	НМЭА	<3
	Шпроты	НПР	<4
Мясные продукты	Колбаса	н/о*	—
	Сосиски	То же	—
Вода	Вода питьевая	—/—	—
	Вода из пруда	—/—	—
		НДБА	<0.001

* н/о — не обнаружено.

граммы НДБА, НДЭА и НДПА, которые обнаружены при анализе образца пива на уровне 1.7, 1.0 и 0.8 нг/мл соответственно. Продолжительность идентификации проб составила 40 мин, определения обнаруженных аналитов — 1–1.5 ч.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции: утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 г. № 880. 242 с.
2. МУК 4.4.1.011-93. Методические указания по методам контроля "Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах". М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1993. 16 с.
3. Cardenes L., Ayala J.H., Gonzalez V., Afonso A.M. Fast microwave-assisted dansylation of N-nitrosamines analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. A. 2002. V. 946. P. 133.
4. Комарова Н.В., Великанов А.А. Определение летучих N-нитрозаминов в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. № 4. С. 407. (Komarova N.V., Velikanov A.A. Determination of volatile N-nitrosamines in food by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Analyt. Chem. 2001. V. 56. № 4. P. 359.)
5. Lu S., Wu D., Li G., Lv Z., Gong P., Xia L., Sun Z., Chen G., Chen X., You J., Wu Y. Facile and sensitive determination of N-nitrosamines in food samples by high-performance liquid chromatography via combining fluorescent labeling with dispersive liquid-liquid microextraction // Food Chem. 2017. V. 234. P. 408.
6. Li W., Chen N., Zhao Y., Guo W., Muhammad N., Zhu Y., Huang Z. Online coupling of tandem liquid-phase extraction with HPLC-UV for the determination of trace N-nitrosamines in food products // Anal. Methods. 2018. V. 10. № 15. P. 1733.
7. Crews C. The determination of N-nitrosamines in food // Qual. Assur. Saf. Crop. 2010. V. 2. № 1. P. 2.
8. Herrmann S.S., Duedahl-Olesen L., Granby K. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionization // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1330. P. 20.
9. Drabik-Markiewicz G., Dejaegher B., De Mey E., Kowalska T., Paelinck H., Vander Heyden Y. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat // Food Chem. 2011. V. 126. P. 1539.
10. Al-Kaseem M., Al-Assaf Z., Karabeet F. Determination of seven volatile N-nitrosamines in fast food // Pharmacol. Pharm. 2014. V. 5. P. 195.
11. Амелин В.Г., Лаврухин Д.К. Сочетание экстракции с микроволновым нагревом и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции при определении нитрозаминов в пищевых продуктах методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 4. С. 377. (Amelin V.G., Lavrukhin D.K. Combination of microwave heating extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nitrosoamines in foods using gas-liquid chromatography with a mass-spectrometric detector // J. Analyt. Chem. 2016. V. 71. № 4. P. 359.)

12. *Kamankesh M., Ghasemzadeh-Mohammadi V. Mohammadi A.* Rapid determination of nitrosamines in sausage and salami using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry // *Eur. Food. Res. Technol.* 2015. V. 240. P. 441.
13. *Yuan Y., Meng W., Yutian M., Fang C., Xiaosong H.* Determination of eight volatile nitrosamines in meat products by ultrasonic solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry method // *Int. J. Food Prop.* 2014. doi 10.1080/10942912.2014.898652
14. *Huang M.-C., Chen H.-C., Fu S.-C., Ding W.-H.* Determination of volatile N-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography – chemical ionisation mass spectrometry // *Food Chem.* 2013. V. 138. P. 227.
15. *Qian Y., Wu M., Wang W., Chen B., Zheng H., Krasner S.W., Hrudey S.E., Li X.-F.* Determination of 14 nitrosamines at nanogram per liter levels in drinking water // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 1330.
16. *Ngongang A.D., Duy S.V., Sauve S.* // Analysis of nine N-nitrosamines using liquid chromatography-accurate mass high resolution-mass spectrometry on a Q-Exactive instrument // *Anal. Methods.* 2015. V. 7. P. 5748.
17. *Ferrer C., Lozano A., Aguera A., Giron A.J., Fernandez A.R.* Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 7634.