

Ключевые слова:

АЛО, дистилляция, кислотный экстракт, рыбное сырье, показатель порчи

Keywords:

TVB-N, distillation, acid extract, fish products, spoilage index

Аналитический контроль содержания общего азота летучих оснований, как показателя качества рыбной продукции

DOI

Д-р техн. наук, профессор **Л.С. Абрамова** – заместитель руководителя департамента по вопросам качества пищевой рыбной продукции Департамента мониторинга среды обитания, водных биоресурсов и продуктов их переработки; Кандидат химических наук **А.В. Козин** – старший научный сотрудник отдела качества пищевой рыбной продукции; **Е.С. Гусева** – специалист отдела качества пищевой рыбной продукции; **И.В. Дерунец** – специалист отдела качества пищевой рыбной продукции – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» Кандидат технических наук, доцент **М.В. Кочнева** – заместитель директора Агроинженерного департамента – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

@ abramova@vniro.ru
kozin82a@gmail.com

ANALYTICAL CONTROL OF THE TOTAL VOLATILE BASES NITROGEN IN FISH PRODUCTS

Doctor of Technical Sciences, Professor **L.S. Abramova** – Deputy Head of the Department for the Quality of Fish Food Products of the Department for Monitoring the Habitat, Aquatic Bioresources and Products of their Processing; Candidate of Chemical Sciences **A.V. Kozin** – Senior Researcher of the Department of Quality of fish food products; **E.S. Guseva** – Specialist of the Department of Quality of fish food products ; **I.V. Derunets** – Specialist of the Department of Quality of fish Food products – Federal State Budgetary Scientific Institution " Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography Candidate of Technical Sciences, Associate Professor **M.V. Kochneva** – Deputy Director of the Agroengineering Department – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia"

Comparative studies of the nitrogen content of total volatile base nitrogen (TVB-N) in fish raw materials, as an objective indicator of quality, were carried out by the method of direct sample distillation and by the method of acid extract distillation. It was found that the method based on the direct distillation of the sample leads to obtaining 25-30% higher values compared to the method of distillation of the acid extract due to alkaline hydrolysis of the sample protein. Comparison of the reproducibility of the two methods using the Fisher statistical test showed the heterogeneity of the variances and the impossibility of attributing them to a single general population. The method of acid extract distillation is recommended for grading the quality of fish raw materials. The studies of objects of three different categories were carried out, grouped according to the proposed three grades of quality, which are characterized by the maximum permissible levels of nitrogen content of volatile bases. The reliability of the results was shown and a conclusion was made on the use of the (TVB-N) content as an indicator characterizing both the initial state of fish raw materials and the dynamics of the storage process and the establishment of the spoilage time. A procedure for measuring of the TVB-N has been developed and certified (certificate of certification No. 0168 / POCC RU.0001.310430 / 2020).

ВВЕДЕНИЕ

Для объективной характеристики рыбной продукции требуется разработка современных методов определения показателей качества, с точки зрения ее соответствия целям приобретения и заявленным потребительским свойствам. Органолептические методы обычно считаются наиболее подходящими для характеристики свежести или порчи рыбы, как показателя качества рыбы на рыбных аукционах, в местах выгрузки улова, для расчета сроков и условий хранения, в целях сортировки перед дальнейшей переработкой [1]. У целой или потрошеной рыбы оценивается внешний вид, запах, состояние слизи, глаз, жабр и брюшной полости. В зависимости от показателей рыбу относят к сорту Е (Extra) – высшая степень свежести, А, В или С (непригодна к употреблению). Однако органолептические показатели рыбной продукции базируются на описательной терминологии, что приводит к различным формулировкам и, как следствие, к разногласиям при определении качества рыбы. Кроме того, органолептические методы являются субъективными, так как результаты зависят от опыта эксперта и состояния его органов чувств.

В настоящее время рыбное сырье оценивают по показателю общего азота летучих оснований (АЛО), как суммарного содержания в мясе рыбы аммиака, диметиламина (ДМА), триметиламина (ТМА) и ряда других основных летучих азотистых соединений. В рыбной продукции, особенно в морской рыбе, летучие амины, такие как ТМА, образующийся за счет микробиальной порчи, аммиак, который накапливается в результате дезаминирования аминокислот и нуклеотидных катаболитов и ДМА, вырабатываемый автолитическими ферментами при хранении в мороженом виде, являются веществами, ответственными за рыбный запах, вкус и характеризуют степень изменения свежести продукции. При исследовании динамики накопления АЛО в мышечной ткани рыбы установлена хорошая корреляция между ухудшением органолептических свойств и накоплением летучих азотистых оснований [2-4].

Предприняты попытки определения нижнего предела содержания азотистых летучих оснований в сырье для использования в качестве маркера свежести рыбы. Как видно из данных таблицы 1, начальное значение и интенсивность накопления АЛО зависит от вида рыбы, среды обитания, а в пределах одного вида – от сезона добычи [5-19]. Установлено, что уровень АЛО в свежесловленной рыбе составляет в среднем от 5 до 20 мг/100 г мышечной ткани, при этом содержание 30-35 мг/100 г считается пределом хранения охлажденной продукции [20-23].

Содержание АЛО, согласно международной практике официального контроля – подтверждения соответствия критериям качества, регламентируется требованиями Имплементационного регламента Комиссии ЕС № 2019/627 от 15 марта 2019 г. (далее регламент Комиссии ЕС) [24] в качестве арбитражного показателя при разногласиях в органолептической оценке рыбного сырья.

Проведены сравнительные исследования содержания общего азота летучих оснований (АЛО) в рыбном сырье, как объективного показателя качества, методом прямой дистилляции образца и методом дистилляции кислотного экстракта. Установлено, что метод, основанный на прямой дистилляции образца, приводит к получению на 25-30% более высоких значений, по сравнению с методом дистилляции кислотного экстракта, вследствие щелочного гидролиза белка образца. Сравнение воспроизводимости двух методов с использованием статистического критерия Фишера показало разнородность дисперсий и невозможность их отнесения к единой генеральной совокупности. Для градации качества рыбного сырья рекомендован метод дистилляции кислотного экстракта. Исследованы объекты трех различных категорий, сгруппированных по предложенным трем степеням качества, исходя из предельно допустимых уровней содержания азота летучих оснований. Показана достоверность результатов и сделано заключение об использовании содержания АЛО в качестве показателя, характеризующего как начальное состояние рыбного сырья, так и динамику процесса хранения и установления момента порчи. Разработана и аттестована методика измерений массовой доли общего азота летучих оснований (свидетельство об аттестации № 0168/РОСС RU.0001.310430/2020).

Согласно указанному регламенту, при сомнении в свежести продукции при органолептических исследованиях могут быть отобраны образцы, которые подвергаются лабораторным исследованиям для определения уровня общего азота летучих оснований.

Данный международный подход к оценке качества рыбного сырья используется в техническом регламенте Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции» (ТР ЕАЭС 040/2016) [25], в котором пищевая рыбная продукция считается непригодной для промышленной переработки и потребления в пищу при превышении следующих предельных норм АЛО:

- 25 мг азота на 100 г мяса для видов семейства *Scorpaenidae* (скорпеновые);
- 30 мг азота на 100 г мяса для видов семейства *Pleuronectidae* (камбаловые), за исключением вида *Hippoglossus* spp. (палтус);
- 35 мг азота на 100 г мяса для других видов рыб.

В КНР к регламентированию содержания АЛО в рыбе и беспозвоночных подходит более дифференцированно. Согласно регламенту КНР GB 2733-2015 [26], содержание АЛО (мг/100 г) составляет: для морской рыбы и креветок – 30, морских крабов – 25, пресноводной рыбы и пресноводных креветок – 20, мороженных моллюсков – 10.

Для обеспечения выполнения требований указанных регламентов по содержанию АЛО в них определены основные методы измерения общего азота летучих оснований, которые различаются как по способу подготовки проб, так и по аппаратурному оформлению.

Таблица 1. Содержание общего азота летучих оснований в различных видах рыбного сырья и методы определения / **Table 1.** TVB-N contents in different types of fish and determination methods

№ п/п	Наименование объекта, место происхождения	Характеристика объекта	Значение* АЛО, мг/100 г	Метод извлечения и определения	Ссылка
1	Форель (<i>O. mykiss</i>), объект аквакультуры, река Вайдоматис Греция	Филе, хранение на льду 0-18 суток	14-20	Дистилляция кислотного экстракта	5
		Рыба неразделанная, хранение на льду 0-18 дней	18-26		
2	Радужная форель (<i>O. mykiss</i>), объект аквакультуры, ферма около города Муннар на юге Индии	Рыба неразделанная, хранение на льду при 0-+2°C, 0-15 дней	15-31	Микродифузионный метод Конвея	6
3	Форель (<i>O. mykiss</i>), объект аквакультуры, город-порт Ноушехр, Иран	Рыба неразделанная, хранение на льду при +3°C, 0-20 дней	22-30	Дистилляция с паром с MgO, титрование HCl	7
4	Форель (<i>O. mykiss</i>) объект аквакультуры	Рыба неразделанная, хранение на льду при 4-6°C, упакована в пленку или фольгу	11-140	Микродифузионный Конвея, дистилляция с паром, проточно-инжекционный	8
5	Форель аквакультурная (<i>O. mykiss</i>), объект аквакультуры, река Турец, Словакия	Рыба неразделанная и филе, хранение на льду при 0-2°C 1-7 дней	13-14	Микродифузионный Конвея	9
		Хранение при -18°C, 0-7 месяцев	17-19		
6	Хек (<i>Merluccius merluccius</i> L.), Испания	Хранение при -5°C 0-150 дней	20-55	Дистилляция с паром с MgO, титрование HCl	10
7	Средиземноморский хек, (<i>Merlucciusmerluccius</i>)	Рыба потрошена, хранение при 0°C, 0-8 дней	14-17	Проточно-инжекционный	11
8	Хек (<i>Merlucciusmerluccius</i>) Тирренское море, Чивитавеккья, район Лацио, Италия	Рыба зимнего периода лова, хранение при 0-1 °C, 0-13 дней	11-18	Дистилляция кислотного экстракта (HClO ₄).	12
		Рыба летнего периода лова, хранение при 0-1 °C, 0-13 дней	10-44		
9	Треска (<i>Gadus morrhua</i>)	Хранение при 0 °C на льду или в холодильнике при 7 °C ± 1 °C.	15-45	Дистилляция кислотного экстракта (CCl ₃ COOH)	4
10	Филе трески (<i>Gadus morrhua</i>), объект аквакультуры Филе трески (<i>Gadus morrhua</i>), коммерческая	Хранение на льду, 0-21 день	21-75	Дистилляция с паром	13
		Хранение на льду, 0-21 день	29-77		
11	Треска (<i>Gadus morrhua</i>), прибрежный лов, деревня Квал, Норвегия	Хранение на льду при 2-4 °C, 0-16 дней	11-35	Дистилляция с паром по методу Кьельдаля	14
12	Треска (<i>Gadus morrhua</i>), прибрежный лов, Северное море, Бридлингтон	Хранение в холодильнике при 4 °C, 0-16 дней	35-65	Проточно-инжекционный Дистилляция кислотного экстракта (CCl ₃ COOH)	15
			35-52		
13	Камбала (<i>Paralichthys dentatus</i>), рыбоперерабатывающее предприятие из Род-Айленда	Хранение при 21-22 °C, 0-48 часов	16-27	Дистилляция кислотного экстракта (CCl ₃ COOH), титрование H ₂ SO ₄	16
		Хранение при 4-5 °C, 0-19 дней	17-24		
14	Окунь (<i>Dicentrarchus labrax</i>), Тоскана, северная Италия	Хранение при 0,5 °C, 0-14 дней	13-35	Дистилляция кислотного экстракта (CCl ₃ COOH)	17
		Хранение при +4,8 °C, 0-7 дней	13-34		
15	Морской окунь (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.), Алжир	Хранение при +16 °C, 0-2 дня	15-35	Дистилляция кислотного экстракта (CCl ₃ COOH), титрование H ₂ SO ₄	18
		Хранение в холодильнике при 0-+3 °C, 0-15 дней	15-39		
16	Макрель (<i>Scomberjaponicas</i>), Ионическое море, Греция	Целая рыба, хранение на льду при +2 °C, 0-30 дней	11-58	Дистилляция с паром с MgO, титрование HCl	19

Примечание: * первое значение - начало хранения, второе - окончание хранения

В регламенте Комиссии ЕС приведен метод, который должен использоваться в качестве арбитражного для определения предельного значения АЛО, предусматривающий дистилляцию экстракта, депротенизированного хлорной кислотой (далее метод дистилляции экстракта). Кроме того, согласно регламенту Комиссии ЕС, могут использоваться и другие стандартные методы анализа АЛО:

- метод микродиффузии, описанный Конвеем и Бирном [27];
- метод прямой дистилляции, описанный Анто-накопулосом [28];
- дистилляция экстракта, депротенизированного трихлоруксусной кислотой [29].

Для выполнения требований ТР ЕАЭС 040/2016 рекомендуется ГОСТ 7636-85 [30], по которому азот летучих оснований определяют двумя методами:

- титриметрическим – к образцу продукта добавляют окись магния, дистиллированную воду и отгоняют свободные и связанные летучие основания при нагревании с паром. Образовавшийся аммиак взаимодействует с серной кислотой, находящейся в приемной колбе, затем избыток кислоты титруют щелочью (далее – метод прямой дистилляции);
- колориметрическим – свободные и связанные летучие основания отгоняют с паром, а количество образовавшегося аммиака определяют после обработки дистиллята реактивом Несслера (раствор йода в йодистом калии) по оптической плотности растворов, при длине волны 400 нм на фотоэлектроколориметре, с предварительным построением градуировочного графика.

В регламенте КНР GB 2733–2015 для определения содержания АЛО, согласно стандарту GB 5009.228 [31], предусмотрены три метода: полумикрометод Кьельдаля, автоматический метод Кьельдаля, микродиффузионный метод.

Согласно анализу литературных данных, приведенному в таблице 1, наиболее применимы на практике два метода: метод прямой дистилляции и метод дистилляции экстракта, которые, по мнению ряда исследователей, дают сравнимые результаты [32; 33] в то время как другими показаны различия в показателях на 25-30% [34; 35]. В связи с этим, целью работы было обоснование метода аналитического контроля содержания АЛО, характеризующего как начальное состояние, так и динамику процесса хранения рыбного сырья и установления момента его порчи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение содержания АЛО проводили по методам, изложенным в ГОСТ 7636-85 (разд. 3, п. 3.2, п.п. 3.2.1) (метод прямой дистилляции) и регламенте Комиссии ЕС (приложение VI, гл. II, разд. С) арбитражный метод (метод дистилляции экстракта).

В качестве объектов исследований использовали кету (*Oncorhynchus keta*) обезглавленную потрошеную из двух районов промысла (залив Ольги Приморского края и Северо-Курильск), камбалу неразделанную (*Paralichthys dentatus*), филе форели (*O. mykiss*), филе хека (*Merluccius merluccius*), филе трески (*Gadus morrhua*) и окуна обезглавленного потрошеного (*Dicentrarchus labrax*), приобретенные в торговой сети в мороженом виде.

Подготовку проб проводили в соответствии с вышеприведенными методами:

- по методу прямой дистилляции, рыбу разделяли на филе, измельчали, фарш тщательно перемешивали; навеску исследуемого продукта массой от 9 до 10 г, взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,01 г, количественно переносили в колбу с 250 см³ дистиллированной воды для отгонки с паром;

Таблица 2. Сравнение методических подходов к определению АЛО по методу прямой дистилляции и методу дистилляции экстракта / **Table 2.** Comparison of methodological approaches to the TVB-N determination by the direct distillation and the extract distillation methods

Характеристика условий	Метод прямой дистилляции (ГОСТ 7636-85)	Метод дистилляции экстракта (Регламент Комиссии ЕС)
Пробоподготовка	пробу измельчают при помощи мясорубки или гомогенизатора	пробу измельчают на мясорубке, затем гомогенизируют 2 мин с раствором хлорной кислоты и фильтруют
Масса навески пробы	9–10 г	10 ± 0,1 г
Условия хранения подготовленной пробы, фильтрата	не предусмотрено	не менее 7 дней при температуре от 2 до 6 °С
Паровая дистилляция	проба, дистиллированная вода, окись магния, парафин	экстракт, фенолфталеин, гидроксид натрия, силиконовый антивспениватель
Приемная колба	серная кислота	борная кислота, индикатор Таширо
Время паровой дистилляции	30 мин	10 мин
Объем дистиллята	–	100 мл
Конечная точка титрования	переход окраски от розовой до слабо-желтой	pH 5,0 ± 0,1
Титрование	гидроксид натрия	соляная кислота
Холостая проба	дистиллированная вода, окись магния, парафин	50,0 мл раствора хлорной кислоты

Таблица 3. Результаты определения содержания азота в хлористом аммонии по методу прямой дистилляции и методу дистилляции экстракта ($n=3$, $P=0,95$, $t_{\text{табл}}=4,30$) / **Table 3.** Results of nitrogen content determination in ammonium chloride by direct distillation and extract distillation methods ($n=3$, $P=0,95$, $t_{\text{table}}=4,30$)

Наименование	Содержание азота, %	s_r , %	Степень извлечения, %
Метод прямой дистилляции	26,18±0,62	0,95	101,06
Метод дистилляции экстракта	25,64±0,14	0,22	98,95

Таблица 4. Результаты определения содержания АЛО в образцах кеты по методу прямой дистилляции и методу дистилляции экстракта ($n=8$, $P=0,95$, $t_{\text{табл}}=2,36$) / **Table 4.** Results of TVB-N determination in chum salmon samples by direct distillation and extract distillation methods ($n=8$, $P=0,95$, $t_{\text{table}}=2,36$)

Наименование образца	Метод прямой дистилляции		Метод дистилляции экстракта		Критерий Фишера	
	Среднеарифметическое значение АЛО, мг/100г	S_r	Среднеарифметическое значение АЛО, мг/100г	S_r	$F_{\text{экс}}$	$F_{\text{табл}}$
Кета (<i>Oncorhynchus keta</i>), Залив Ольги Приморского края	27,66±1,05	1,26	17,67±0,36	0,43	8,72	3,79
Кета (<i>Oncorhynchus keta</i>), Северо-Курильск	29,23±1,60	1,92	21,95±0,49	0,59	10,71	3,79

– по методу дистилляции экстракта, рыбу, разделанную на филе, измельчали, взвешивали $10 \pm 0,1$ г пробы фарша, смешивали с $90 \text{ см}^3 0,6 \text{ М}$ раствора хлорной кислоты, гомогенизировали в течение 2 мин, затем фильтровали и фильтрат использовали для отгонки с паром.

Исследование образцов по методу прямой дистилляции проводили на аппарате, состоящем из отгонной колбы, каплеуловителя, парообразователя, холодильника, нагревательного элемента, приемника, согласно ГОСТ 7636-85 (п.п. 3.2.1.3).

Определение АЛО по методу дистилляции экстракта осуществляли с применением полуавтоматического дистиллятора Büchi K-355 (BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland). В отгонную колбу помещали 50 см^3 экстракта с добавлением 3-5 капель фенолфталеина для последующей проверки подщелачивания экстракта и $6,5 \text{ см}^3$ раствора гидроксида натрия (непосредственно перед началом паровой дистилляции). В приемную коническую колбу вместимостью 500 см^3 наливали 100 см^3 раствора борной кислоты и 3-5 капель индикатора Таширо. Содержимое приемной колбы ти-

тровали раствором соляной кислоты молярной концентрации $0,05 \text{ моль/дм}^3$. Уровень рН конечной точки титрования составлял $5,0 \pm 0,1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведены сравнительные исследования метода прямой дистилляции и метода дистилляции экстракта, при определении показателей АЛО в рыбном сырье, для выявления преимуществ и недостатков каждого метода.

Анализ стадий выполнения измерений АЛО методом прямой дистилляции и методом дистилляции экстракта приведен в таблице 2. Из представленных данных видно, что методики имеют различный подход к процессу пробоподготовки и дистилляции.

Перед проведением анализов образцов на количественное содержание АЛО проводили проверку работы установок паровой дистилляции для двух методов с использованием хлористого аммония в количестве $0,05 \text{ г}$ (чистота 99,0%, содержание азота 25,91%) для двух методов. Результаты определения содержания азота в хлористом

Таблица 5. Оценка правильности определения АЛО по методу дистилляции экстракта ($n=3$, $P=0,95$, $t_{\text{табл}}=4,30$) / **Table 5.** Evaluation of the accuracy of TVB-N determination by extract distillation method ($n=3$, $P=0,95$, $t_{\text{table}}=4,30$)

Наименование образца	Значение АЛО, мг/100 г			s_r , %
	исходный образец	введено	найдено	
Треска (<i>Gadus morrhua</i>)	18,04	52,00	71,28	1,28
	18,04	75,00	91,53	1,21
	18,04	100,50	118,96	0,69
	18,09	27,00	46,16	1,82
Кета (<i>Oncorhynchus keta</i>)	18,09	56,00	75,00	1,33
	18,09	76,50	94,37	1,18
	18,09	101,00	119,16	0,89
	18,09	152,50	173,46	0,54
	18,09	152,50	173,46	0,54

аммонии, приведенные в таблице 3, показали, что для каждой установки достигается извлечение близкое к 100%. Это позволило сделать заключение о правильности их работы и целесообразности дальнейшего использования для измерения содержания АЛО в образцах.

Результаты определения содержания АЛО в образцах кеты по методу прямой дистилляции и методу дистилляции экстракта представлены в таблице 4.

Средние значения содержания АЛО в двух образцах кеты, полученные по методу прямой дистилляции, близки. Однако необходимо отметить, что наблюдалось расхождение между результатами параллельных определений, что обусловило более высокие значения стандартного квадратич-

ного отклонения (S_p) сходимости по методу прямой дистилляции, по сравнению с данными метода дистилляции экстракта.

Для сравнения воспроизводимости двух методов использовали статистический критерий Фишера (F) [36]. Как следует из данных табл. 4, значение критерия Фишера, рассчитанное по экспериментальным данным, оказался значительно выше табличного ($F_{\text{табл}} < F_{\text{эксп}}$). Это подчеркивает разнородность дисперсий и невозможность их отнесения к единой генеральной совокупности, то есть несопоставимости результатов АЛО по методу прямой дистилляции и по методу дистилляции экстракта.

Это объясняется недостатками метода прямой дистилляции и, в первую очередь, несовершен-

Таблица 6. Градация объектов исследований по содержанию АЛО для трех степеней качества / **Table 6.** Classification into three levels of quality according to TVB-N value of research objects

Наименование группы	Норма АЛО, мг азота/100 г мышечной ткани (ТР ЕАЭС 040/2016)	Наименование объекта исследований	Содержание АЛО в объекте исследований, мг/100 г, для степени качества		
			1	2	3
1	25	Окунь (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	10-15	16-25	>25
2	30	Камбала (<i>Paralichthys dentatus</i>)	10-20	21-30	>30
3	35	Форель (<i>O. mykiss</i>), хек (<i>Merluccius merluccius</i>), треска (<i>Gadus morrhua</i>)	10-20	21-35	>35

Таблица 7. Результаты определения содержания АЛО в объектах исследований методом дистилляции экстракта / **Table 7.** Results of TVB-N value determination of research objects by extract distillation method

Объект исследований	n	Степень свежести	Минимальное значение АЛО, мг/100 г	Максимальное значение АЛО, мг/100 г	Размах	Медиана	Среднее значение АЛО, мг/100 г	s, %
Камбала (<i>Paralichthys dentatus</i>)	10	1	17,60	18,38	0,78	17,80	17,92	1,47
	10	1	17,59	18,32	0,73	17,85	17,86	1,29
	10	3	100,54	104,80	4,26	103,09	102,78	1,58
	10	3	100,09	105,08	4,99	102,92	102,78	1,69
Форель (<i>O. mykiss</i>)	10	1	19,87	21,63	1,76	20,67	20,74	2,83
	10	1	19,62	21,28	1,66	20,88	20,78	2,42
	10	3	66,02	67,83	1,81	67,25	67,13	0,78
	10	3	79,71	82,57	2,86	81,92	81,56	1,14
Хек (<i>Merluccius merluccius</i>)	10	2	23,79	24,51	0,72	24,10	24,10	0,89
	10	2	23,42	24,59	1,17	24,12	24,10	1,50
	10	3	40,10	40,97	0,87	40,80	40,68	0,78
	10	3	40,35	44,80	4,45	44,47	43,77	3,80
Треска (<i>Gadus morrhua</i>)	10	1	17,90	18,92	1,02	18,27	18,36	1,94
	10	1	17,92	18,99	1,07	18,32	18,40	2,05
	5	3	53,06	54,03	0,97	53,43	53,56	0,76
	5	3	53,42	53,97	0,55	53,79	53,76	0,39
Окунь (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	10	1	13,65	14,25	0,60	13,98	13,96	1,46
	10	1	13,79	14,09	0,30	13,96	13,94	0,87
	10	3	40,55	41,56	1,01	40,78	40,96	1,04
	10	3	40,39	41,61	1,22	40,61	40,81	1,12

Таблица 8. Метрологические показатели методики измерений АЛО методом дистилляции экстракта для объектов исследований / **Table 8.** Metrological indicators for TVB-N measurement methodology by extract distillation method

Объект исследования	Диапазон определяемых концентраций, мг/100 г	Показатель точности (границы относительной погрешности, $P = 0,95$), $\pm \sigma$, %	Показатель повторяемости (средне-квадратичное отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (средне-квадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R , % ($P = 0,95$)
Виды семейства <i>Scorpaenidae</i> (скорпеновые)	10-40	5	1,1	1,6	3	4
Виды семейства <i>Pleuronectidae</i> (камбаловые), за исключением вида <i>Hippoglossus spp.</i> (палтус)	15-40	7	1,5	2,1	4	6
Другие виды (<i>Salmo salar</i> , семейства <i>Merlucciidae</i> , <i>Gadidae</i>)	10-50	10	3,1	4,3	9	12

ной пробоподготовкой, так как в процессе отгонки возможен щелочной гидролиз белка образца, что приводит к дополнительному выделению АЛО, а также отсутствием субъективности окончания времени отгонки. Завышенные результаты, при определении АЛО методом прямой дистилляции (без предварительного осаждения белка), были получены на различных объектах, при проведении испытаний исследовательскими группами [32-33].

Предварительная экстракция летучих азотистых соединений из образца раствором 0,6 М хлорной кислоты, предусмотренная методом дистилляции экстракта, позволяет более равномерно провести процесс дистилляции и сорбции летучих компонентов кислотой, а также устранить возможность увеличения значений АЛО, из-за протекания гидролиза белка в образце, в процессе отгонки пробы из водно-щелочной суспензии.

Кроме того, метод дистилляции экстракта имеет преимущества, связанные с возможностью хранения экстракта и меньшим временем проведения паровой дистилляции.

Учитывая преимущества и недостатки каждой методики измерений массовой доли общего азота летучих оснований, за основу был взят метод дистилляции экстракта, который установлен в регламенте Комиссии ЕС в качестве арбитражного при оценке пищевой продукции.

С целью проверки точности выполнения метода дистилляции экстракта, проводили определение содержания АЛО в экстрактах образцов рыбы, содержащих различное количество введенного хлористого аммония, и оценивали степень извлечения. Результаты этих измерений, приведенные в таблице 5, характеризуют правильность и достаточно высокую воспроизводимость. Об этом свидетельствуют рассчитанные показатели относительного стандартного отклонения (s_r), которые не превышали 1,82%,

при заданном табличным значением ($t_{\text{табл}}$) равным 4,30 для данных условий ($n=3$, $P=0,95$).

Хорошо известно, что величины показателей АЛО специфичны для каждого вида рыбы и в определенной степени могут варьироваться внутри вида. Для определения диапазонов степени качества рыбного сырья взяли за основу подход изложенный в статье [23], в которой используется градация качества сырья по содержанию АЛО. Выбранные объекты исследований: окунь, камбала, форель, хек и треска были разделены на три условные группы по степени качества, характеристика которых приведена в таблице 6. В образцах рыбного сырья в процессе хранения определяли содержание АЛО и классифицировали по степени качества.

Согласно данным таблицы 7, можно сделать заключение, что в каждой группе рыбного сырья наблюдаются приемлемые показатели АЛО, характеризующиеся низкими значениями относительного СКО. Это дает основание для заключения о достоверности данных и возможности градации сырья по предложенным трем степеням качества внутри каждого вида. Предложенный подход аналитического контроля содержания АЛО позволяет оценить состояние сырья и дать рекомендации о целесообразности дальнейшего его использования.

На основании полученных данных (табл. 7), с применением расчетно-экспериментального метода обоснованы метрологические показатели методики измерений массовой доли общего азота летучих оснований, проведен выбор показателей точности измерений и установлены их значения (табл. 8)

Получено свидетельство об аттестации методики (метода) измерений МИ 003-2020 «Методика измерений массовой доли общего азота летучих оснований» № 0168/РОСС RU.0001.310430/2020.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для объективной характеристики рыбной продукции проведен анализ методических подходов к определению общего азота летучих оснований, как объективного показателя качества. Сравнительные исследования метода прямой дистилляции определения АЛО, согласно ГОСТ 7636-85 и метода дистилляции экстракта, изложенному в Имплементационном регламенте Комиссии ЕС № 2019/627 от 15.03.2019 г., который рекомендуется в качестве арбитражного, показали, что методики имеют различный подход к процессу пробоподготовки и дистилляции. Предварительная экстракция летучих азотистых соединений из образца раствором хлорной кислоты, предусмотренная методом дистилляции экстракта, позволяет более равномерно провести последующую паровую дистилляцию и сорбцию летучих компонентов кислотой, а также устранить возможность увеличения значений АЛО из-за протекания гидролиза белка в образце в процессе отгонки пробы из водно-щелочной суспензии. Результаты измерений содержания АЛО в исследуемых объектах, полученные по методу дистилляции экстракта показали достаточно высокую воспроизводимость и правильность методики.

Методом дистилляции экстракта определено содержание АЛО в окуне, камбале, форели, хеке и треске, результаты которых позволили сделать заключение о достоверности данных и возможности градиции сырья по предложенным трем степеням качества внутри каждого вида. Предложенный подход аналитического контроля содержания АЛО позволяет оценить состояние сырья и дать рекомендации о целесообразности дальнейшего его использования.

Авторы выражают благодарность руководителю Органа по аттестации методик, главному метрологу А.А. Гарбузовой, инженеру С.А. Мокренской и инженеру М.М. Дудареву – ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора – за помощь в проведении работ по установлению метрологических параметров и аттестации методики измерений массовой доли общего азота летучих оснований.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Абрамова Л.С. Методы оценки качества пищевой рыбной продукции / Л.С. Абрамова, А.В. Козин, А.Л. Погребиская // Контроль качества продукции – 2018. – № 6. – С. 25-31.
1. Abramova L.S. Methods of quality assessment of fish production // L.S. Abramova, A.V. Kozin, A.L. Pogrebinska // Quality Control of products – 2018. – No. 6. – P. 25-31.
2. Howgate P. A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance // Electron. J. Environ., Agric. Food Chem. – 2010. – V.9. – Pp. 58-88.
3. Jinadasa B.K.K.K. Determination of quality of marine fishes based on total volatile base nitrogen test (TVB-N) // Nat. Sci. – 2014. – V.12(5). – Pp.106-111.
4. Malle P., Poumeyrol M. A new chemical criterion for the quality control of fish; Trimethyl amine/Total volatile basic Nitrogen (%) // J. Food Protect. – 1989. – V. 52. – № 6. – P. 419-42.
5. Chytiri S., Chouliara I., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. // Food Microbiol. – 2004. – V.21. – Pp. 157-165.
6. Ninan G., Zynudheen A.A, Josep J. Effect of Chilling on Microbiological, Biochemical and Sensory Attributes of Whole Aquacultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) // J. Aquacult. Res. Dev. 2011.S5.
7. Rezaei M., Hosseini S.F. Quality Assessment of Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Chilled Storage // J. Food Sci. – 2008. – Vol. 73. – №. 6. – Pp.93-96.
8. Özogul F., Özogul Y. Comparison of methods used for determination of total volatile basic nitrogen (TVB-N) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Turk. J. Zool. – 2000. – V.24. – Pp.113-120.
9. Popelka P., Jevinova P., Marcincak S. Microbiological and chemical quality of fresh and frozen whole trout and trout filets // Potravinarstvo Slovak J. Food Sci. – 2016. – V10 – №1. – Pp. 431-436.
10. Sotelo C. G., Gallardo J. M., Pineiro C. Perez-Martin R. Trimethylamine oxide and derived compounds' changes during frozen storage of hake (*Merluccius merluccius*) // Food Chem. – 1995. – V.53. – №.1. – Pp.61-65.
11. Baixas-Nogueras S., Bover-Cid S., Veciana-Nogués M.T., Carmen Vidal-Carou M. Effects of previous frozen storage on chemical, microbiological and sensory changes during chilled storage of Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) after thawing // Eur. Food Res. Technol. – 2007. – V.226. – Pp.287-293.
12. Orban E., Navigato T., Di Lena G., Masci M., Casini I., Caproni R., Rampacci M., Carmen Vidal-Carou M. Total volatile basic nitrogen and trimethylamine nitrogen levels during ice storage of European hake (*Merluccius merluccius*): A seasonal and size differentiation. // Food Chem. – 2011. – V.128. – №3. – Pp. 679-682.
13. Burns B.G., Ke P.J., Irvine B.B. Objective Procedure for Fish Freshness Evaluation Based on Nucleotide Changes Using a HPLC System. // Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. – 1985. – №. 1373. – Pp.1-39.
14. Esaiassen M., Nilsen H., Joensen S., Skjerdal T., Carlehog M., Eilertsen G., Gundersen B., Evlevoll E. Effects of catching methods on quality changes during storage of cod (*Gadus morhua*) // LWT- Food Sci. Technol. – 2004. – V.37. – №5. – Pp. 643-648.
15. Ruiz-Capillas C., Gillyon C.M., Horner W.F.A. Determination of different volatile base components as quality control indices in fish by official methods and flow injection analysis // J. Food Biochem. – 2001. – V 25 – №6. – Pp. 541-553.
16. Pivarnik L., Ellis P., Wang X., Reilly T. Standardization of the ammonia electrode method for evaluating seafood quality by correlation to sensory analysis // J. Food Sci. – 2001. – V 66. – №7. – Pp. 945-952.
17. Limbo S., Sinelli N., Torri L., Riva M. Freshness decay and shelf life predictive modelling of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) applying chemical methods and electronic nose // LWT - Food Sci. Technol. 2009. – V.42. – №5. – Pp. 977-984.
18. Mokrani D., Oumouna M., Cuesta A. Fish farming conditions affect to European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) quality and shelf life during storage in ice. // Aquaculture. – 2018. – V.490. – Pp. 120-124.
19. Goulas A.E., Kontominas M.G. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes // Food Chem. – 2005. – V.93. – Pp.511-520.
20. Azam K., Ali M.Y, Asaduzzaman M., Basher M.Z., Hossain M.M. Biochemical assessment of selected fresh fish. // J. Biol. Sci. 2004. – V.4. – №1. – Pp. 9-10.
21. Calanche J, Pedrós S, Roncalés P, Beltrán JA. Design of Predictive Tools to Estimate Freshness Index in Farmed Sea Bream (*Sparus aurata*) Stored in Ice. // Foods. – 2020. – V.9(1). – P.69.
22. Shi L., Yin T., Wang L., Xiong G., Gao R., Ding A., Li X., Wu W., Qiao Y. U., Liao L. I., Jiao C. Effect of pre-chilling time on the physicochemical properties of channel catfish during frozen storage // Int. J. Refrig. – 2020. – V.115. – Pp.56-62.
23. Gormley T. R. Survey on fish freshness at retail level. // University College Dublin. School of Agriculture and Food Science. 2016. [Электронный ресурс]: <https://researchrepository.ucd.ie/handle/10197/9509> (дата обращения 10.03.2021).
23. Gormley T. R. Survey on fish freshness at retail level. // University College Dublin. School of Agriculture and Food Science.



2016. [Electronic resource]: <https://researchrepository.ucd.ie/handle/10197/9509> (accessed 10.03.2021).

24. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) № 2074/2005 as regards official controls // EUR-Lex. Access to European Union law [Электронный ресурс]: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02019R0627-20190517&qid=1607501919274&from=EN> (дата обращения: 14.03.2021).

24. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) № 2074/2005 as regards official controls // EUR-Lex. Access to European Union law [Electronic resource]: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02019R0627-20190517&qid=1607501919274&from=EN> (date of occurrence: 14.03.2021).

25. ТР ЕАЭС 040/2016. Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции». – М., 2016. – 126 с.

25. TR of the EAEU 040/2016. Technical Regulations of the Eurasian Economic Union "On the safety of fish and fish products". - M., 2016. - 126 p.

26. GB 2733-2015 China National Standards. National food safety standard — Fresh and frozen marine products of animal origin. The Standardization Administration of the People's Republic of China. 2016. Beijing. China.

27. Conway E.J., Byrne A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia // Biochem J. – 1933. – V.27(2). – P. 419-29.

28. Antonacopoulos N In: Acker I (Ed) Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd III/2. Berlin: Springer Verlag. 1968. S. 1482.

29. FAO/WHO Method for the determination of total volatile basic nitrogen (TVB) in fish muscle. Presented to the Codex Committee on Fish and Fishery Products. 3rd session, Bergen (Norway) as Codex Fish 1/7. 1968.

30. ГОСТ 7636-85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – М., 1985. – 180 с.

30. GOST 7636-85. Fish, marine mammals, marine invertebrates and products of their processing. Methods of analysis - M., 1985. - 180 p.

31. GB 5009.228.China National Standards. National Food Safety Standard - Determination of Volatile Basic Nitrogen in Food. 2017. Beijing. China.

32. Vyncke W. Comparison of the official EC method for determination of total volatile bases in fish with routine methods. // Archiv für Lebensmittelhygiene. – 1996. – V.47. – Pp. 110-112.

33. Maghraby O., Hassouba, M., El-Mossalami E. Effect of Methodology on the Determination of Total Volatile Basic Nitrogen as an Index of Quality of Meat and Fish. // Egypt.J.FoodSafety. – 2013. – V 1. – Pp. 23-34.

34. Пиль Л.И. Определение азотистых летучих оснований в рыбных продуктах. / Л.И. Пиль, Л.И. Ольховская, О.П. Миронова // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 1998. – № 5-6 (246-247). – С. 85-87.

34. Pil L.I. Determination of nitrogenous volatile bases in fish products. / L.I. Pil, L.I. Olkhovskaya, O.P. Mironova // News of higher educational institutions. Food technology. – 1998. – № 5-6 (246-247). – Pp. 85-87.

35. Clancy G.S., Beames R.M., Higgs D.A., Dosanjh B. Effect of Methodology on the Determination of Total Volatile Nitrogen and Trimethylamine Levels in Previously Frozen Pacific Herring, Clupea harengus pallasi, Stored at 2-5°C for Up to 15 Days // Can. Tech. Rep. Ser. Aquat. Sci. Rep. – 1995. – 2047. – P. 15.

36. Лесс В.Р. Практическое руководство для лаборатории. Специальные методы. СПб.: ЦОП «Профессия», 2014. – 472 с.

36. Less V.R. Practical guide for the laboratory. Special methods. St. Petersburg: PSC "Profession", 2014. - 472 p.