

MINISTERIE VAN LANDBOUW

Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE

(Directeur : P. HOVART)

# **Bepaling van de oxydatieve vetranzigheid in vis met de peroxyde- en de thiobarbituurzuurtest**

W. VYNCKE



---

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)  
Publikatie nr 30/1970



**MINISTERIE VAN LANDBOUW**

Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent

**RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE**

(Directeur : P. HOVART)

# **Bepaling van de oxydatieve vetranzigheid in vis met de peroxyde- en de thiobarbituurzuurtest**

W. VYNCKE



---

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)  
Publikatie nr 30/1970  
D/1970/0889/6



## Inleiding.

De lipiden zijn zoals de andere bestanddelen van vis en visserijprodukten, tijdens de opslag, onderhevig aan afbraakreacties, die de kwaliteit ongunstig beïnvloeden. Men gebruikt hierbij dikwijls de term ranzigheid, die een verzamelnaam is voor alle verschijnselen die duiden op een verandering in samenstelling van de "verse vetten", nl. de vetten zoals zij in levende vis voorkomen.

De afbraak van de lipiden is zeer complex en omvat vele aspecten. Schematisch kan dit als volgt worden geschetst :

### Vetbederf



#### Biochemische processen

(door eigen enzymen of  
bacteriële enzymen)

(a) Hydrolytisch proces :  
geeft een stijging van de  
zuurtegraad

(b) Afbraakprocessen :  
- vorming van de methylketonen  
- oxydatieve veranderingen van  
de lipiden die leiden tot poly-  
merisatiereacties.

#### Zuiver chemische processen

(a) Hydrolytisch proces :  
geeft een stijging van de  
zuurtegraad

(b) Autoxydatieve processen :  
- afbraakprocessen  
- autoxydatieve polyme-  
risatie.

De oxydatieve vetranzigheid is veruit het belang-  
rijkste verschijnsel en wordt in deze publikatie behandeld. Om tot

een duidelijk beeld te komen, is het echter noodzakelijk een overzicht van de voornaamste vislipiden te geven. Samen met de bespreking van de autoxydatie maakt dit het voorwerp van hoofdstuk I uit. In hoofdstukken 2 en 3 worden respectievelijk de bepaling van de peroxyde-index en van het thiobarbituurzuurgetal als maatstaf voor de oxydatieve vetranzigheid besproken. Een bruikbare werkwijze werd voor beide methoden op punt gesteld (\*). Tijdens verdere proeven zal echter de waarde van deze methoden voor de objektieve kwaliteitsbepaling van vis dienen te worden onderzocht.

## HOOFDSTUK I. - De lipiden van vis en de oxydatieve ranzigheid.

### 1.1. De visvetten.

Men kan de vislipiden indelen in reserve-vetten en niet-reserve-vetten. Wanneer men in visweefsel meer dan 1 % lipiden aantreft, heeft men meestal met reserve-vet te maken, dat als energievoorraad dienst doet. In de overgrote meerderheid van de vissoorten bestaan deze vetten - zoals in de meeste vertebraten en hogere planten - uit triglyceriden. Typische voorbeelden van vissoorten waar de vetten hoofdzakelijk uit triglyceriden bestaan zijn haring (*Clupea harengus* L), makreel (*Scomber scomber*), sprot (*Clupea sprattus* L), zalm (*Salmo salar* L) en paling (*Anguilla anguilla* L).

In enkele vissoorten zijn de triglyceriden geheel of gedeeltelijk door andere lipiden vervangen. Dit is o.m. het geval bij de kraakbeenvissen (haaien, roggen), waar alkoxydiglyceriden voorkomen.

---

(\*) Wij bedanken Mej. G. CORNETTE en Mej. Y. ZONNEKEYN, stagiairs van het Hoger Technisch Instituut te Oostende voor de medewerking aan de proeven.

De niet-reserve-vetten bestaan vooral uit fosfolipiden en in mindere mate uit triglyceriden, sfyngolipiden, sterolen en wassen. Zij komen in veel kleinere concentraties dan de reservevetten voor en zijn typisch voor magere vissoorten.

Tabel 1 geeft een overzicht van de procentuele samenstelling van de vetten in twee magere (schelvis en kabeljauw) en één vette vissoort (tonijn).

Uit deze tabel volgt, dat de triglyceriden en de fosfolipiden de voornaamste visvetten vormen.

Tabel 1. - Samenstelling van de vetten bij magere en vette vissoorten (in %).

	Schelvis (Gadus aeglefinus L) (1)	Kabeljauw (Gadus morhua L) (2)	Tonijn (Germa alalunga) (3)
Totaal vetgehalte (in g/100 g visweefsel)	0,55	0,60	10,3
Triglyceriden	2,4	3	96,1
Lecithine (fosfatidylcholine)	42,8	35	2,4
Fosfatidylethanolamine	5,4	7	0,9
Fosfatidylinositol	4,4	2	0,1
Cholesterolesters	3,4	5	
Vrije vetzuren	6,1	6	
Vrije cholesterol	6,1	8	
Wassen en alcoholen	10,5	13	
Koolwaterstoffen	1,7	sporen	
Plasmologeën (a)	1,7		
Niet gefdentificeerde lipiden (b)	15,2	21	0,2

(a) Onstabiele, onvolledig gefdentificeerde scheikundige verbinding, waarin palmitine- en stearine-aldehyde voorkomen.

(b) Waarschijnlijk in hoofdzaak fosfolipiden en polyglycerolderivaten.

1.2. Samenstelling van de voornaamste visvetten.

De voornaamste bestanddelen van de lipiden zijn de vetzuren. Zij vormen ongeveer 90 % van de verzeepbare fraktie. Zoals bij de hogere dieren en planten bevatten zij hoofdzakelijk een rechte keten met een paar aantal al dan niet verzadigde koolstofatomen. Zij onderscheiden zich echter door (4) :

(a) Een grotere gamma van moleculaire gewichten : hun verzadigde vetzuren bevatten 8 à 24 C, met een sterk overwicht  $C_{16}$  (palmitinezuur) tegenover 14 à 22 C met een overwicht  $C_{18}$  (stearinezuur) bij de hogere dieren ; de onverzadigde zuren hebben 10 à 28 C t. o. v. 16 à 22 C bij de landdieren, met een meerderheid van  $C_{20}$  à  $C_{22}$  (arachidezuur) i. p. v.  $C_{18}$  (oliezuur).

(b) Een hoger gehalte aan verzadigde vetzuren, nl. 19 à 23 % t. o. v. 15 % en minder in andere oliën.

(c) Een hogere gemiddelde onverzadigheidsgraad : hun vetzuren hebben 1 à 7 dubbele bindingen, terwijl bij de hogere dieren zelden meer dan 1 of 2 analoge bindingen voorkomen. Hoe hoger het aantal C-atomen, des te sterker wordt de gemiddelde onverzadigheidsgraad.

De talrijke dubbele bindingen zijn noch gekonjugeerd noch verdeeld zoals bij de hogere dieren : i. p. v. de structuur  $= CH - CH_2 - CH =$  treft men meestal  $= CH - CH_2 - CH_2 - CH =$  aan, waar de dubbele bindingen meer onafhankelijk zijn om chemische reacties, o. m. oxydaties, aan te gaan. De meest voorkomende structuur is deze van de linoleenreeks.

De tabellen 2 en 3 geven de gemiddelde samenstellingen van respectievelijk de reserve- en niet-reserve-vetten van enkele voorname vissoorten weer (5).



Tabel 2. - Samenstelling van reserve-vetten van enkele vissoorten en invloed van biologische factoren (in % van totaal vetzuren-gehalte ; gemiddeld aantal dubbele bindingen tussen haakjes).

	Verzadigde vetzuren			Onverzadigde vetzuren				
	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
Haring (Clupea harengus L)	(a) 8,0	15,7	0,2	-	4,6 (1,3)	22,2 (1,4)	22,0 (1,9)	27,3 (2,1)
	(b) 8,3	12,1	0,3	0,5	6,4 (1,7)	21,0 (2,2)	28,3 (2,7)	23,1 (2,3)
Zalm (Salmo salar L)	(c) 2,7	17,7	3,3	3,1	21,7 (1,1)	30,0 (1,9)	12,9 (4,1)	9,9 (5,1)
	(d) 2,3	13,2	1,0	-	4,3 (1,0)	27,3 (1,3)	25,8 (2,6)	26,1 (3,9)
Sprot (Clupea sprattus L)	6	19	1	spoor	16	29 (1,4)	18 (2,8)	11 (3,5)

(a) Magere vis (8,2 % vet) april

(b) Vette vis (20,7 % vet) juli

(c) Jonge vis vóór paaitijd

(d) Jonge vis na paaitijd

Tabel 3. - Samenstelling van enkele niet-reserve-vetten van schelvis (Gadus aeglefinus L) (in % van totaal vetzurengehalte ; gemiddeld aantal dubbele bindingen tussen haakjes).

	Verzadigde vetzuren			Onverzadigde vetzuren				
	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>
Triglyceriden	spoor	14	7	-	14	26 (2,0)	26 (3,5)	13 (5,4)
Cholesterylesters	-	8	6	-	-	20 (1,7)	29 (3,0)	37 (3,9)
Fosfatidylesters	-	18	7	-	-	14 (2,1)	35 (3,6)	24 (5,4)

### 1.3. Variatie in de samenstelling van de lipiden.

De samenstelling van de reserve-vetten bij vissen is meer aan schommelingen onderhevig dan bij hogere dieren. Zij hangt vooral van de voeding en de geslachtscyclus (seizoen) af. Tabel 2 geeft hiervan een voorbeeld voor haring en zalm.

Vele vissen voeden zich rechtstreeks of onrechtstreeks met zoöplankton, waarin kleine crustacea met sterk onverzadigd vet overvloedig voorkomen. Andere voeden zich met fytoplankton of algen, waarin de lipiden tamelijk goed op deze van vissen gelijken, maar rijker aan  $C_{18}$ -zuren zijn.

De vissoorten die de lipiden ongeveer in ongewijzigde toestand opstapelen, hebben reserve-vetten, die de samenstelling van deze van het plankton dat op dit ogenblik van het jaar aanwezig was, vertonen. De paling is hiervan een voorbeeld. Bij andere meer geëvolueerde vissoorten bestaat een transformatiemogelijkheid, zodat de lipiden slechts gedeeltelijk dezelfde samenstelling als de voedingsvetten hebben.

Gedurende de geslachtsrijpheid worden de diverse konstituenten niet op dezelfde wijze verbruikt : de glyceriden ondergaan de sterkste daling ; de kortste zuren en misschien de meest onverzadigde onder de langere zuren verdwijnen het eerst, terwijl andere ( $C_{20}$  en  $C_{22}$ ) dikwijls toenemen of gehydrogeneerd worden.

Al deze factoren maken het lipidenpatroon van vissen uiterst complex en hebben hun weerslag op de oxydatiegevoeligheid die soms sterk kan schommelen.

### 1.4. De autoxydatie van de lipiden.

De autoxydatie van de vetten is een complex

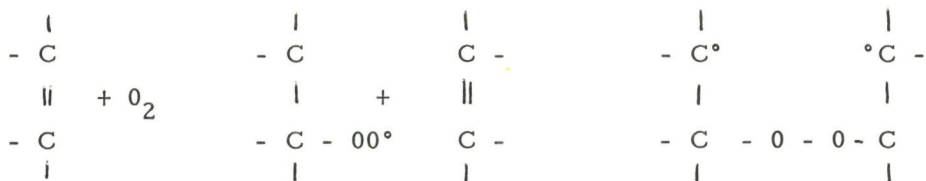
geheel van reacties die verschillen volgens de heersende omstandigheden, nl. temperatuur, vochtigheidsgraad, lichtsterkte, zuurtegraad enz. Deze reacties werden nog niet volledig opgehelderd. Men weet echter dat de oxydatie in twee fasen plaats grijpt, nl. (a) de vorming van peroxyden en (b) de verdere afbraak van de peroxyden.

1.4.1. Vorming van de peroxyden.

Volgens Rieche (6) komen vooral twee reaktieschema's voor.

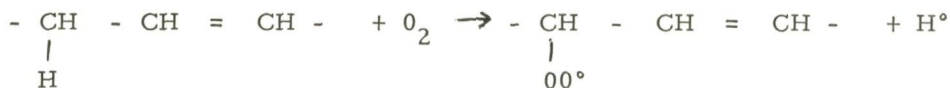
(a) Verbindingen met gekonjugeerde of geaktiveerde dubbele bindingen.

De zuurstof fixeert zich rechtstreeks op de dubbele binding en het gevormde peroxyderadikaal zet zich op zijn beurt op een geaktiveerde dubbele binding in de onmiddellijke nabijheid vast :



(b) Verbindingen met gefsoleerde dubbele bindingen.

Het merendeel van de visvetten is hieronder te rangschikken. Deze dubbele bindingen zijn naburig aan methyleengroepen en worden niet rechtstreeks door luchtzuurstof aangetast. Als tussenprodukt wordt een peroxyderadikaal aan de geaktiveerde methyleengroep naast de dubbele binding gevormd. Waar de methyleengroep de aktiveeringsenergie vandaan haalt is nog niet met zekerheid gekend, maar men neemt aan dat het licht hierin een grote rol speelt.



Deze radicalen zijn echter zeer onbestendig en reageren onmiddellijk verder op een andere methyleenolefinegroep (-CH<sub>2</sub> - CH = CH -), waaraan zij een H-radikaal, afkomstig van de methyleengroep, onttrekken.



Dit nieuw gevormde radikaal gaat met O<sub>2</sub> opnieuw in een peroxyderadikaal over en reageert dan verder zoals hierboven ; hierdoor ontstaat een nieuwe kettingreactie.

In aanwezigheid van zuurstof gaat de autoxydatie ongestoord verder eenmaal dat de kettingreactie een aanvang heeft genomen. De stijging van de oxydatiegraad is exponentieel, zodat de ranzigheid maar na een bepaalde tijd merkbaar wordt.

De intensiteit van de oxydatie hangt van de natuur van de vetten af : zij treedt vlugger in wanneer deze sterk onverzadigd zijn of meer vrije vetzuren bevatten. Dat is bijvoorbeeld het geval met zomersharing die sterk onverzadigde vetten bevat.

Magere vissen worden pas in een veel later stadium geoxydeerd.

#### 1.4.2. Verdere afbraak van de peroxyden.

De primair gevormde peroxyden ondergaan verder diepgaande omvormingen. Door technische of katalytische ontbinding worden lagere carbonzuren (mono- en dicarbonzuren), alsook diverse carbonylverbindingen (aldehyden, ketonen, keto- en aldehydezuren) gevormd.

Deze sekundaire processen verlopen ten koste van de primair gevormde peroxyden, d.w.z. onder verbruik van actieve zuurstof. De vormingswijze van vele verbindingen is nog duister. In de jongste jaren werden evenwel een aantal carbonylverbindingen geïdentificeerd (tabel 4) (7).

Tabel 4. - Overzicht van de uit auto-geoxydeerde vetten geïsoleerde carbonylverbindingen.

<u>Verzadigde aldehyden</u>	<u>Onverzadigde aldehyden</u>	<u>Ketonen</u>
formaldehyde	2-butenal	aceton
acetaldehyde	2-pentenol	methylaethylketon
propionaldehyde	2-hexenol	di-n-propylketon
n-butyraldehyde	2-heptenal	
n-pentanol	2-octenal	
n-hexanol	2-undecenal	
n-undecanal	2,4-decadienal	
	2,6-decadienal	
	malonaldehyde	

Naast de verzadigde alifatische aldehyden treden aldus vooral  $\alpha$  - en  $\beta$  - onverzadigde verbindingen op. Een veel voorkomend aldehyde is het epihydrinaldehyde of het isomeer malonaldehyde.



Dit aldehyde werd het meest bestudeerd en als maatstaf voor het vetbederf voorgesteld (zie hoofdstuk 3).

### 1.5. Factoren die de oxydatieve ranzigheid in de hand werken.

De oxydatie wordt door bepaalde spiercomponenten geactiveerd, o.m. vrije aminozuren en heem-verbindingen (hemoglobine, hematine, myoglobine, enz.). Zo worden de pelagische vissen die veel heem-pigmenten bevatten, sneller dan de magere vissen geoxydeerd. Om dezelfde reden worden de rode spieren (M. laterales superficiales) vlugger ranzig. Tijdens de oxydatie die zij katalyseren, gaan de pigmenten in de geoxydeerde vorm over en veranderen van kleur : zo worden de rode hemoglobine en myoglobine respectievelijk in bruin methemoglobine en metmyoglobine omgezet.

Naast zuurstof en licht komen als uitwendige factoren vooral de zware metalen, het zoutgehalte, de hydratatiegraad en de temperatuur in aanmerking (4).

- Zware metalen : Co, Mg, Pb, Cu en Fe, afkomstig van het gebruikte materiaal of de waterleidingen kunnen zich in de buitenste laag van bijvoorbeeld visfilets fixeren en de oxydatie katalyseren.
- Zoutgehalte : NaCl bevordert de oxyderende aktie van de spiercomponenten, vooral hemoglobine. Door het verhogen van het vriespunt bevordert het zout daarenboven de chemische reacties in de vloeibare fase, o.m. de oxydaties. Tenslotte breekt een hoge concentratie NaCl de gel-eigenschappen van de eiwitten en maakt het weefsel meer toegankelijk voor luchtzuurstof.

- Hydratatiegraad : wanneer vis uitdroogt, vergroten de poriën van de huid en worden de spiervezels van de oppervlakte samgetrokken waardoor het indringen van luchtzuurstof wordt vergemakkelijkt. Dit verschijnsel doet zich vooral in diepvriesvis voor.
- Temperatuur : de vetoxydatie wordt, als chemische reactie, door het verhogen van de temperatuur versneld.

## HOOFDSTUK II. - Bepaling van de oxydatiegraad van vis met de peroxyde-test.

### 2.1. Methoden om peroxyden in vetten te bepalen.

Om de peroxyden te bepalen, kent men vooral de jodometrische en de kolorimetrische methoden.

#### 2.1.1. Jodometrische methoden.

Men steunt bij deze methoden op het feit dat de graad van autoxydatie van een vet kwantitatief kan worden bepaald door de actieve zuurstof te doseren. Hierbij gebruikt men kaliumjodide opgelost in een organisch oplosmiddel als reductor, en het vrijgestelde jodium wordt getitreerd met natriumthiosulfaat.

Men kent hierbij vooral twee methoden, namelijk de methode volgens Wheeler (8) en de methode volgens Lea (9) (10) (11). Beiden maken gebruik van een mengsel van organische oplosmiddelen bestaande uit ijsazijn en chloroform. De twee methoden zijn zeer analoog. Wheeler gebruikt een verhouding ijsazijn - chloroform van 3 : 2 vol., terwijl Lea de verhouding 2 : 1 vol. verkiest. Deze laatste verhouding zou volgens Heaton en Uri (12) beter zijn omdat :

- (a) de neiging voor verdere autoxydatie, gekatalyseerde oxydatie geïnduceerde oxydatie, kleiner is in het meer polaire mengsel ijsazijn - chloroform (2 : 1 vol.) en
- (b) er een grotere tolerantie voor kleine hoeveelheden water is vooraleer een scheiding van de lagen optreedt.

Het peroxydegetal is het aantal milliëkwivalenten oxydans per kilogram vetstof en het wordt berekend met de volgende formule :

$$P. G. = \frac{(a - p) \times N \times 1000}{w}$$

waarbij : a - p : aantal ml verbruikt natriumthiosulfaat (p ml verbruikt bij de blanco)

N : normaliteit van het natriumthiosulfaat

w : aantal gram vetstof.

## 2.1.2. Kolorimetrische methoden.

### 2.1.2.1. De Stamm-metode (13) (14).

Deze gevoelige kwantitatieve methode is op de kleurreactie tussen een vet en difenylcarbazine gebaseerd. Het difenylcarbazine wordt door de aanwezige peroxyden geoxydeerd en er ontstaat een rode kleur te wijten aan het gevormde difenylcarbazon.

Deze methode is zeer geschikt om de eerste stadia van de autoxydatie in vetten te bestuderen, daar zij gevoelig en nauwkeurig is zelfs bij zeer laag peroxydegehalte. Bij deze methode dient men de meting binnen de 30 minuten uit te voeren daar de kleur niet stabiel is.



2.1.2.2. De ijzer III thiocyanaatmetode (15) (16).

Deze methode is gesteund op de reactie tussen  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$  en de aanwezige peroxyden.

Er wordt hierbij  $\text{Fe}^{+++}$  gevormd dat kolorimetrisch onder de vorm van het  $\text{Fe} \left[ \text{Fe}(\text{SCN})_6 \right]$  -komplex wordt bepaald.

Het peroxydegehalte met deze methode in aanwezigheid van lucht bepaald, is ongeveer tweemaal sterker dan dit langs jodometrische weg gevonden. Tot nog toe kan hiervoor geen volledig bevredigende verklaring worden gegeven. Indien de proef in afwezigheid van lucht wordt uitgevoerd, wordt een deel van de peroxyden ontbonden zonder oxydatie van het  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$ , hetgeen te lage resultaten oplevert.

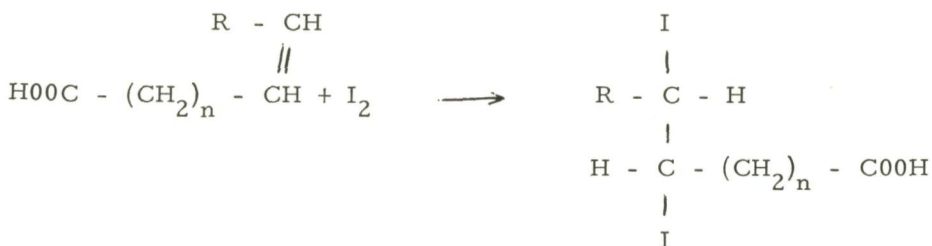
2.1.2.3. De dichloorfenol-indofenolmetode (17).

Deze methode is gesteund op de reactie tussen de dichloordihydroxydifenylamine en de in het vet aanwezige peroxyden ; de rode kleur die gevormd wordt is afkomstig van het dichloorfenol-indofenol. De methode is gevoelig en gemakkelijk uit te voeren, maar wordt ook sterk door luchtzuurstof beïnvloed. Zoals bij de ijzer III thiocyanaat-methode, worden in aanwezigheid van lucht twee- tot drie-maal hogere waarden gevonden in vergelijking met de jodometrische methode, doch bij de dichloorfenol-indofenolmetode kan dit verschil niet worden verklaard door de katalyserende werking van het  $\text{Fe}^{++}$ , daar in deze laatste methode geen metalen aanwezig zijn.

De reproduceerbaarheid van deze methode is kleiner dan deze van de Fe III thiocyanaat-methode vandaar dat zij minder wordt aangewend in vergelijkende proeven.

2. 1. 3. Besluit.

De verschillende kolorimetrise metoden, die werden voorgesteld om peroxyden in vetten te bepalen, hadden tot doel de jodometrische metoden te vervangen. De reden hiertoe is de mogelijke reabsorptie van het gevormde jodium door onverzadigde verbindingen, waardoor fouten kunnen optreden :



Alhoewel de kolorimetrise metoden gevoeliger zijn dan de jodometrische, leveren zij, zoals werd vermeld, geen volledig bevredigende resultaten op. De kolorimetrise metoden worden dan ook vooral bij routineonderzoek aangewend, waarbij slechts de relatieve resultaten van belang zijn. Dank zij hun grote gevoeligheid worden zij ook toegepast om de eerste tekenen van ranzigheid aan te tonen, als ook in deze gevallen waar de beschikbare hoeveelheid stof zeer klein is er dan ook op een mikrotechniek beroep moet worden gedaan.

Daar de titrimetrise metoden echter eenvoudiger zijn en sneller kunnen worden uitgevoerd, werd verkozen tijdens deze proeven de jodometrische bepaling uit te testen.

2. 2. Uittesten van de jodometrische peroxydenbepaling.

2. 2. 1. Extraktie van de lipiden en peroxyden.

Voor de peroxyde-test moeten de vetten vooreerst uit de vis worden geëxtraheerd. Hiervoor werden talrijke metoden

voorgesteld, waarvan een overzicht door Lovern (13) wordt gegeven.

Bij al deze methoden worden de lipiden door een solvent of een mengsel van solventen geëxtraheerd. De eiwit-gebonden lipiden worden dikwijls eerst door hydrolyse (bv. met HCl) vrijgesteld.

De twee hoofdvereisten die zich bij de vetextractie stellen, zijn het volledig in oplossing brengen van alle lipiden en het zo weinig mogelijk kontamineren van de solventen met niet-lipiden.

In 1959 stelden Bligh en Dyer (19) een handige methode voor die goed aan deze vereisten beantwoordt. De methode is een vereenvoudiging van de methode van Folch et al. (20), waarin het extraheermiddel een mengsel van chloroform, methanol en water is (het weefselwater inbegrepen). Nadien wordt voldoende water toegevoegd om het extract in twee fasen te doen scheiden. De lipiden zijn in de chloroformlaag aanwezig. De functie van het methanol is tweevoudig : enerzijds zorgt het dat de chloroform die het effectieve vetsolvent is, het monster kan bevochtigen en anderzijds breekt het de bindingen van de lipoproteïnen. Men verkrijgt twee fasen door achteraf een grotere hoeveelheid chloroform en water toe te voegen.

Om een goede scheiding van de twee fasen te verzekeren, een minimale kontaminatie van de lipiden met niet-lipiden en een minimaal verlies aan lipiden in de methanollaag te bekomen, dient men nauwkeurig de verhouding chloroform - methanol - water (2 : 2 : 1) in acht te nemen, vandaar dat het watergehalte van de vis vooraf op 1 % na moet worden bepaald.

Men maalt een hoeveelheid vis (zonder graten noch vel) in een vleesmolen. Hiervan brengt men een monster dat  $80 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$  water bevat in een mixer, voegt er 200 ml methanol en 100 ml chloroform aan toe. Dit mengsel wordt gedurende 2 minuten gehomo-

geniseerd. Vervolgens giet men er nog 100 ml chloroform bij en mixt gedurende 30 seconden. Tenslotte wordt 100 ml water toegevoegd en het geheel wordt opnieuw gedurende 30 seconden gehomogeniseerd. Men filtreert af en brengt het filtraat in een scheitrechter over.

2.2.2. Uittesten van de jodometrische methode aan de hand van visuele titraties.

Alle proeven werden op diepgevroren haring (*Clupea harengus* L), met ca 10 % vet uitgevoerd ; deze haring was organoleptisch duidelijk ranzig.

De toegepaste methode is grotendeels gebaseerd op de methode van Lea (9). In de literatuur wordt geen eenvormige modus operandi aangetroffen. Zo verschilt de reageertijd van 0 tot 15 min., de hoeveelheid toegevoegde kaliumjodide (in één maal of voor en na de reageertijd), de sterkte van het natriumthiosulfaat (0,002 tot 0,1 N) enz.

De oriënterende proeven bleek volgende voorschrift echter bevredigende resultaten te geven.

- Reagentia :
1. ijsazijn p. a.
  2. verzadigde kaliumjodide-oplossing : 135 g KI p. a. oplossen in 100 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 %.
  3. 10 %-ige KI oplossing in 0,1 %-ige  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
  4. zetmeeloplossing : 2 g zetmeel per liter gedestilleerd water (+ 0,01 g  $\text{HgI}_2$  als bewaarmiddel).
  5. Natriumthiosulfaat 0,01 N.

Werkwijze :

Men gaat uit van 10 ml visextract (chloroformlaag) waar-

aan 20 ml ijsazijn en 3 druppels verzadigde kaliumjodide worden toegevoegd. Het mengsel wordt gedurende 1 minuut flink geschud en dan gedurende 10 minuten in het donker geplaatst. Alvorens te titreren worden nog 5 ml 10 %-ige KI, alsook 20 ml gedestilleerd water toegevoegd. Tenslotte wordt het reaktiemengsel met  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,01N getitreerd ; juist voor het eindpunt voegt men 1 ml zetmeeloplossing als indikator toe.

#### 2. 2. 2. 1. Invloed van het toevoegen van water.

Er werd ondervonden dat met het hier gebruikte chloroformextract het toevoegen van water noodzakelijk is om het omslagpunt van de titratie duidelijk te kunnen waarnemen. Deze hoeveelheid water mag - zoals in 2. 2. 3. 3. wordt besproken - niet willekeurig worden genomen.

Men werkt het best met een automatische buret van 20 ml.

#### 2. 2. 2. 2. Invloed van de reageertijd.

Na het toevoegen van kaliumjodide is een bepaalde reageertijd noodzakelijk : 10 min blijkt een geschikte tijdsduur te zijn. Wordt langer dan 10 min gewacht, dan worden de resultaten niet meer reproduceerbaar. Zo bedraagt de variatiecoëfficiënt bepaald op 20 proeven na 30 min 5 à 20 % t. o. v. 0,5 à 1 % na 10 min.

#### 2. 2. 2. 3. Invloed van de luchtzuurstof.

Tijdens de extractie, de filtratie en de titratie kunnen onder invloed van de luchtzuurstof peroxyden worden gevormd, die de resultaten ongunstig beïnvloeden. Ten einde deze fout te minimaliseren werd de invloed nagegaan van het gebruik van een antioxydans

(BHT - butylhydroxytolueen) en van het extraheren onder stikstofatmosfeer.

- (a) BHT als antioxydans : 0,1 % werd vóór de proef aan de chloroform toegevoegd. Tabel 5 geeft de gemiddelde resultaten van vijf proeven weer.

Tabel 5. - Invloed van BHT (0,1 %) in de chloroformlaag (in ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N) - (procentuele vermeerdering tussen haakjes)

	Zonder BHT	Met BHT
Onmiddellijk na extractie	4,18	4,18
2 u na extractie	4,35(+4,0 %)	4,18
1 d na extractie	4,56(+9,2 %)	4,19(+0,2 %)
2 d na extractie	4,81(+15,1 %)	4,21(+0,7 %)

Uit deze resultaten blijkt, dat BHT de verdere vorming van peroxyden praktisch volledig verhindert. Zelfs na twee dagen is de vermeerdering verwaarloosbaar. Zonder BHT stijgen de waarden echter relatief vlug en zij bereiken reeds 4 % na twee uur. Tenzij de titratie onmiddellijk wordt uitgevoerd, heeft men er aldus belang bij BHT aan de chloroform toe te voegen. Dit laat toe de extrakten zonder gevaar enige tijd vooraf te bereiden.

Op te merken valt tenslotte dat BHT op het homogeniseren zelf geen invloed blijkt te hebben.

- (b) Stikstofatmosfeer tijdens de extractie : om de extractie onder stikstofatmosfeer uit te voeren, werd aan het roestvrijstalen deksel van de beker van de mixer een buis in roestvrij staal gelast. Deze buis, die op een stikstoffles werd aangesloten, liep bijna tot op de bodem van de beker, zodat de stikstofstroom door het mengsel borrelde. Vóór het homogeniseren wer-

den de gemalen vis en de oplosmiddelen gedurende 10 min door middel van stikstofstroom ontlucht.

Het homogeniseren zelf werd ook onder stikstof doorgevoerd, doch tijdens de filtratie van het extract was er onvermijdelijk opnieuw contact met de lucht.

Tabel 6. - Invloed van een stikstofatmosfeer tijdens de extractie (in ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N).

Kontrole	$\text{N}_2$ -atmosfeer	% vermeerdering
4,18	5,02	20 %
5,54	6,32	14 %
4,80	6,07	26 %
3,10	3,78	22 %
3,84	4,53	18 %

De resultaten van 5 proeven die vermeld zijn in tabel 6 zijn volledig anders dan normaal zou kunnen worden verwacht : men bekomt een duidelijke stijging (gemiddeld 20 %) van het peroxydengehalte na doorborrelen van stikstof. De reden hiervoor werd niet verder onderzocht, doch is wellicht te wijten aan feit dat er door de turbulente stikstofstroom een beter contact tussen de in het begin nog aanwezige zuurstof en de onverzadigde verbindingen ontstaat.

In ieder geval lijkt het homogeniseren onder stikstof niet aan te raden te zijn.

### 2. 2. 3. Jodometrische methode met potentiometrische titratie uit- gevoerd.

Bepaalde vissoorten met donker vlees (bv. haring, koolvis, rode zeebaars) geven een geel-bruin extract, hetgeen het bepalen van het eindpunt van de titratie soms bemoeilijkt. Ook visserijproducten met rood gekleurd vlees (bv. zalm, garnalen) veroorzaken dikwijls moeilijkheden.

Om deze redenen werd nagegaan of de peroxydenbepaling niet beter potentiometrisch kan worden uitgevoerd. Daarboven geeft deze techniek een beter inzicht in het verloop van de oxydo-reduktie tijdens de titratie, hetgeen ook voor de visuele eindpuntbepaling van belang kan zijn.

Voor de potentiometrische titratie werd op een pH-meter Metrohm type E 350 B, een gekombineerde platina-kalomelelektrode aangesloten. Een elektrische buret, namelijk de Metrohm Multi-Dosimate E 415, werd gebruikt waarbij het toegevoegde volume onmiddellijk digitaal kan worden afgelezen. De Multi-Dosimate biedt ook nog het voordeel dat men het reagens automatisch in frakties van 0,1 ml kan toevoegen. De oplossing wordt gedurende de titratie voortdurend door middel van een magnetische roerder in beweging gehouden.

Het eindpunt van de titratie wordt bepaald door het toegevoegde volume  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N tegenover de afgelezen potentiaal grafisch uit te zetten. Deze potentiaal komt overeen met het verschil tussen de redoxpotentiaal van het stelsel en de potentiaal van de referentie-elektrode (kalomelelektrode). De potentiaal  $E_c$  van de verzadigde kalomelelektrode is gekend, namelijk 247,6 mV bij 20° C. Bij konventie echter wordt de redoxpotentiaal ten opzichte van de waterstofelektrode gemeten ; de potentiaal van



deze elektrode wordt aan nul gelijkgesteld.

De redoxpotential wordt dan ook als volgt bepaald :

$$E = E_c \pm E' \text{ (mV)}$$

waarbij :  $E_c$  : potentiaal van de kalomelelektrode

$E'$  : gemeten potentiaal

Het  $\pm$  teken slaat op de polariteit van de platina-elektrode ten opzichte van de kalomelelektrode.

Om redenen van praktische aard werd hier altijd met de gemeten potentiaal gewerkt. Wil men echter de redoxpotential kennen, dan volstaat het de potentiometrische waarden met 247,6 mV te verhogen.

2.2.3.1. Vergelijking van de resultaten van de visuele titratie met deze van de potentiometrische titratie.

(a) Proef met haringextrakt.

Figuur 1 geeft het verloop van de titratiecurve weer.

Voor het bepalen van het ekwivalentiepunt kan in principe gebruik gemaakt worden van het feit dat bij het buigpunt van de curve de eerste afgeleide maximaal en de tweede afgeleide nul is. In het geval van figuur 1 echter is de curve rond het eindpunt zeer steil zodat dit punt gemakkelijk grafisch kan worden bepaald. Het bedraagt 4,00 ml.

De visuele titratie (in driedubbel uitgevoerd) geeft 3,68 ml, zodat het verschil met de potentiometrische -0,32 ml bedraagt ; dit verschil zou erop wijzen dat bij de visuele titratie het eindpunt nog niet volledig bereikt is wanneer wordt afgelezen.

(b) Proef met een zuiver peroxyde.

Lauroylperoxyde (  $\left[ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO} \right]_2\text{O}_2$  ) werd gekozen daar het een peroxyde is dat in visvetten wordt aangetroffen en dat tevens oplosbaar is in chloroform.

Men lost 0,2250 g lauroylperoxyde op in 100 ml chloroform ; daarvan wordt 10 ml genomen en verder volgens de gewone werkwijze behandeld.

Figuur 2 geeft het verloop van de titratiecurve weer.

Het volume dat overeenstemt met het eindpunt is 4,18 ml. De visuele titratie geeft 3,84 ml, zodat het verschil -0,34 ml bedraagt.

Herhalingen van de proeven (a) en (b) gaven een gemiddeld verschil van 0,32 ml.

Uit deze proeven blijkt dan ook dat bij de jodometrische methode met een visuele titratie uitgevoerd een systematische fout van ongeveer 0,32 ml wordt gemaakt, hetgeen waarschijnlijk te wijten is aan de absorptie van kleine hoeveelheden jodium door het aanwezig zetmeel. Daar deze fout echter zeer konstant is, speelt zij voor vergelijkend onderzoek geen grote rol.

2. 2. 3. 2. Invloed van een stikstofstroom in het reaktievat ge-  
urende de potentiometrische titratie.

(a) Proef met haringextrakt.

Door de titreeroplossing in het titratievat wordt konstant een stikstofstroom geleid.

Figuur 3 toont het verloop van de twee titratiecurven. Het berekend eindpunt voor de titratie onder stikstof geeft 3,60 ml en dit voor de blanco 3,65. Beide ekwivalentiepunten verschillen dan ook zeer weinig, hetgeen eveneens klaar uit de figuur is af te leiden.

Opmerkenswaardig is echter het feit dat de begin- en eindpotentialen verschillend zijn bij een titratie onder stikstof. Zij liggen nl. respectievelijk 10 en 30 mV hoger zonder evenwel het ekwivalentiepunt te beïnvloeden.

(b) Proef met lauroylperoxyde.

Uit het verloop van de kurven in figuur 4 weergegeven, blijkt opnieuw dat de twee eindpunten van de titratie weinig verschillen. De berekende waarden geven respectievelijk 5,41 en 5,22 ml voor de titraties onder stikstof en in lucht.

De begin- en eindpotentialen verschillen daarentegen opnieuw gevoelig, nl. ca 20 mV.

Bij vergelijking van de kurven van het visextrakt en deze bekomen met een zuiver peroxyde merkt men echter op dat bij een zuiver peroxyde de curve van de titratie met stikstof onder deze zonder stikstof valt, terwijl bij een visextrakt de curve van de titratie met stikstof boven deze zonder stikstof komt te liggen. Dit

verschil is waarschijnlijk te verklaren door de aanwezigheid van andere redoxsystemen in het visextract die op verschillende wijze, door het al dan niet aanwezig zijn van zuurstof, worden beïnvloed.

Algemeen gezien echter kan men besluiten dat het titreren onder stikstof van geen praktisch nut is.

2.2.3.3. Invloed van de hoeveelheid gedestilleerd water voor het titreren toegevoegd.

Zoals vermeld in de voorgestelde werkwijze (zie 2.2.2.), wordt vóór het titreren een hoeveelheid gedestilleerd water toegevoegd om met zetmeel een beter omslagpunt te bekomen.

De invloed van deze watertoevoeging op de titratie werd onderzocht.

(a) Proef met haringextract.

Er werden twee oplossingen van hetzelfde vis-extract getest. Bij de ene oplossing werd 20 ml gedestilleerd water toegevoegd alvorens te titreren, bij de andere niet. Figuur 5 toont aan dat de twee titratiecurven een verschillend verloop kennen en dat, indien water wordt toegevoegd, het eindpunt vroeger wordt bereikt. De ekwivalentiepunten bedragen respectievelijk 5,10 en 5,94 ml voor titraties met en zonder watertoevoeging.

De beginpotentialiaal van de oplossing met water ligt ongeveer 90 mV hoger dan dit zonder water ; de eindpotentialen vertonen echter een geringer verschil (ca 20 mV).

(b) Proef met lauroylperoxyde.

Een analoog beeld wordt met een zuiver peroxyde bekomen (figuur 6). De ekwivalentiepunten bedragen respektievelijk 3,73 en 5,20 ml voor titraties met en zonder water.

De beginpotentialen verschillen hier ook ongeveer met 90 mV, doch de eindpotentialen zijn praktisch gelijk.

De blankoproeven laten deze verschijnselen nog beter tot uiting komen. Figuur 7 geeft het verloop van de potentiaal weer wanneer i. p. v. 10 ml extract 10 ml chloroform met of zonder watertoevoeging met  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N wordt getitreerd.

Zonder water wordt een duidelijke titratiecurve bekomen met ekwivalentiepunt 1,00 ml. Met water stelt men dit verschijnsel niet vast. Beide titraties verschillen aldus met 1,00 ml, hetgeen de resultaten van de titraties met visextract en lauroylperoxyde bevestigt die van dezelfde grootte-orde zijn (respektievelijk 0,84 en 1,47 mV).

De invloed van de watertoevoeging komt eveneens naar voren wanneer men een haringextract met water i. p. v.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  "titreert" (figuur 8). Bij toevoeging van water stijgt de potentiaal en bereikt met 20 ml een meerwaarde van 97 mV, hetgeen goed overeenkomt met de vroegere titraties, nl. ca 90 mV (figuren 5 en 6).

Uit deze proeven blijkt, dat voor de visuele titratie de hoeveelheid toegevoegde water vrij nauwkeurig moet worden gemeten. Bij een potentiometrische titratie is het toevoegen van water niet noodzakelijk, maar dan moet men rekening houden met een blanco-waarde van ca 1 ml.

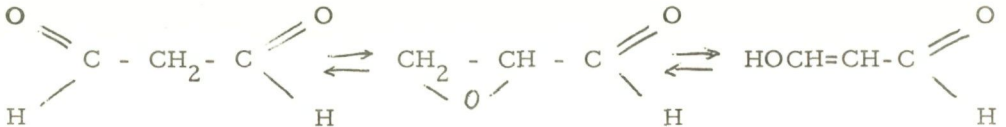
HOOFDSTUK III - Bepaling van de oxydatiegraad van vis met de thiobarbituurzuur-test (TBZ- test).

---

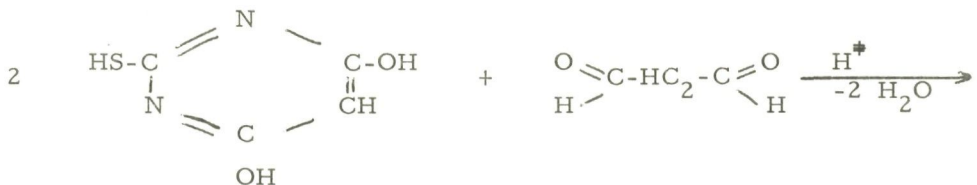
3.1. Reactie van het TBZ met het door vetoxydatie ontstane malonaldehyde.

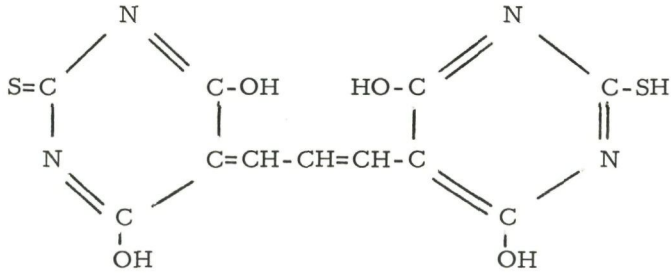
De TBZ-test bestaat in de vorming van een roodkleurige verbinding door reactie van een waterige of zure TBZ-oplossing met malonaldehyde. Malonaldehyde is de voornaamste component die met TBZ reageert om het rode pigment te vormen. Deze oplossing vertoont een maximale extinktie bij 532 nm.

In waterige oplossing komt het malonaldehyde hoofdzakelijk voor onder de vorm van het enoltautomeer en beneden pH 4,5 treft men het meer en meer aan onder de vorm van het cyclisch chelaat (21).

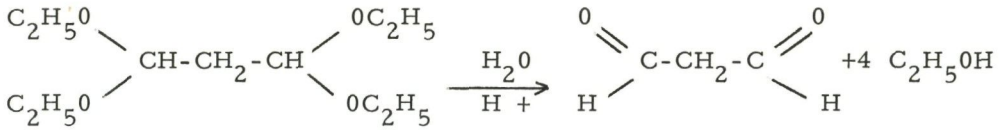


Er wordt meestal aangenomen, dat de vorming van de rode TBZ-kleurstof gebeurt door condensatie van 2 mol TBZ met 1 mol malonaldehyde met afsplitsing van 2 mol H<sub>2</sub>O en met vorming van een gekonjugeerd systeem (22) (23) :





Door Schmidt (24) en Sinnhuber (25) kon worden aangetoond, dat zowel geoxydeerde vetten als malonaldehyde met TBZ een kleurstof geven van dezelfde scheikundige samenstelling. Er ontstaat verder een kleurstof met hetzelfde extinktiemaximum en met dezelfde extinktiecurve onder dezelfde omstandigheden met het 1,1,3,3, tetraethoxypropan (TEP). Het TEP splitst immers door zure hydrolyse kwantitatief in malonaldehyde en ethanol :



TEP kan dan ook als standaardstof i. p. v. malonaldehyde worden gebruikt.

### 3.2. Storende verbindingen.

De aanwezigheid van bepaalde stoffen, zoals suikers en carbonylverbindingen andere dan malonaldehyde, kunnen geel gekleurde interfererende verbindingen geven met extinktiemaxima in het gebied van 450 tot 490 nm. De aanwezigheid van zuurstof onder de vorm van peroxyden, malonaldehyde-derivaten en koolhydraten kunnen een storende invloed hebben (26) (27).

Tenslotte dient er nog op gewezen te worden, dat bepaalde kationen (bv  $\text{Cu}^{++}$  en  $\text{Fe}^{+++}$  (28) (29), alsook sommige eiwitten (bv. myosine) (30) eveneens storend kunnen inwerken.

### 3.3. Uitvoering.

Voor visserijprodukten werden vooral twee methoden voorgesteld, nl. de methode van Yu en Sinnhuber (26) en de methoden van Tarladgis et al. (31).

Bij de methode van Yu en Sinnhuber grijpt de reactie van TBZ met malonaldehyde rechtstreeks plaats onder reflux, terwijl bij de methode van Tarladgis et al. eerst een destillatie wordt toegepast. In een latere publikatie stelden Tarladgis et al. (32) echter voor op bepaalde voedingswaren eveneens de bepaling rechtstreeks, maar zonder verwarming toe te passen.

Daar uit latere onderzoeken (zie 3.2.) is gebleken dat talrijke stoffen kunnen storen en daar bovendien de rechtstreekse methode van Yu en Sinnhuber minder handiger voorkwam, werd verkozen vooreerst de distillatiemethode van Tarladgis et al. aan en onderzoek te onderwerpen. De studie van de rechtstreekse extraktiemethoden zal het voorwerp van een volgende publikatie uitmaken.

#### 3.3.1. Reagentia.

- TEP-standaard of stockoplossing :  $10^{-3}$  M tetraethoxypropan in gedistilleerd water of 0,2204 g TEP per liter. Deze oplossing wordt vóór gebruik verdund. Zij kan gedurende 1 week in een koelkast worden bewaard (31).



- TBZ-reagens : 0,02 M in H<sub>2</sub>O of 2,883 g/ l H<sub>2</sub>O. Het TBZ wordt door verwarmen in een warm waterbad in oplossing gebracht. Het reagens wordt elke dag vers bereid.
- Trichloorazijnzuuroplossing (TCA) : 7,5 % in water.
- Antischuimmiddel : UCB 1801.

### 3.3.2. Werkwijze.

Vijf ml malonaldehyde-oplossing worden met 5 ml TBZ-reagens in proefbuizen van 15 x 1,6 cm met schroefdop behandeld. De kleurintensiteit wordt bij 520nm gemeten. Voor deze proeven werd een Coleman Junior-spektrofotometer met ronde kuvetten van 19 mm diameter gebruikt.

### 3.3.3. Temperatuur en duur van de kleurontwikkeling.

Tarladgis et al. (32) bestudeerden diverse temperaturen en ontwikkelingstijden en stelden volgende overeenkomst tussen beide factoren bij de maximale extinktie vast :

± 20°C (kamertemperatuur)	: 900 min
37°C	: 480 min
50°C	: 360 min
70°C	: 125 min
100°C	: 40 min

De auteurs geven dan ook op dat de bepaling het gemakkelijkst bij kamertemperatuur wordt uitgevoerd, maar onderlijnen dat bij elke temperatuur de ijkcurve dezelfde is. Tijdens de hier beschreven proeven werd dit echter niet vastgesteld. Bij 20°C werden lagere waarden bekomen (figuur 9) en was de reproduceerbaar-

heid lager.

Daarenboven bleek de kleurintensiteit ook na 15 uur nog geleidelijk te verhogen : na vier bijkomende uren bedroeg de stijging 10 à 15 %.

Bij 100°C (kokend waterbad) werden gunstiger resultaten genoteerd en werd vastgesteld dat de maximale extinktie na 40 min wordt verkregen (tabel 7), hetgeen de proeven van Tarladgis et al. (32) bevestigt.

Tabel 7. - Invloed van de reaktieduur op de kleurontwikkeling (extinktie) bij 100° C.

Koncentratie malonaldehyde ( $\mu\text{g}/5 \text{ ml}$ )	20 min	40 min	60 min	80 min
2,16	0,313	0,330	0,329	0,331
1,44	0,218	0,232	0,232	0,233
0,72	0,114	0,121	0,123	0,120

Men bemerkt dat na 40 min de tijd niet nauwkeurig in acht dient te worden genomen. De kleur na afkoelen is daarenboven stabiel en dient niet onmiddellijk te worden gemeten.

### 3.4. Destillatie van malonaldehyde.

#### 3.4.1. Apparatuur.

Voor de destillatie gebruiken Tarladgis et al. (31) een gewoon Kjeldahl-stoomdestillatie-apparaat ; 50 ml destilleren hierbij over in 10 min met een rendement van 66 à 70 % (gemiddeld 68 %). malonaldehyde.

Dezelfde auteurs toonden aan dat de destillatie zo snel mogelijk dient te gebeuren, m. a. w. dat het aanwezige malonaldehyde zo vlug mogelijk moet overkomen, daar een zekere vetoxydatie bij langere verwarmingsperioden bij lage pH optreedt.

Tijdens deze proeven werd verkozen de stoomdestillatieapparatuur van Antonacopoulos te gebruiken (33) (figuur 10). De voordelen van dit apparaat t. o. v. de meeste bekende toestellen zijn :

- Het destilleervat is rechtstreeks in de stoomgenerator geplaatst. Hierdoor wordt de te onderzoeken vis vooraf door de watermantel (stoomgenerator) verwarmd en is niet aan koude lucht blootgesteld. Op deze wijze wordt het monster niet door condenswater verdund, hetgeen de destillatie aanzienlijk versnelt en meer reproduceerbaar maakt.
- De destillatie begint aanstonds na het sluiten van de kraan van de stoomgenerator en houdt onmiddellijk op bij het terug openen. Daarbij wordt het aanzuigen van het monster in de stoomgenerator vermeden.
- De destillatie is zeer reproduceerbaar : zo komen 100 ml over in in gemiddeld 9 min 53 sec met een variatiecoëfficiënt van 1,5 % (bepaald op 20 proeven).
- Het apparaat is zeer handig en door middel van slijpstukken gemakkelijk uit elkaar te nemen en te reinigen.

#### 3. 4. 2. Werkwijze.

Men pipeteert 10 ml malonaldehyde- (of TEP-) oplossing in het destilleervat. Men brengt de pH op 1,5 (zie 3. 4. 4. 3.),

met HCl 1 N en voegt enkele druppels antischuimmiddel toe. Men destilleert 100 ml over en voert de TBZ-test op 5 ml uit.

### 3. 4. 3. Rendement.

De hoeveelheid overgedestilleerd malonaldehyde werd vijfmaal op vijf oplossingen met stijgende concentraties bepaald (tabel 8).

Tabel 8. - Hoeveelheid malonaldehyde in 100 ml destillaat.

<u>Teoretische hoeveelheid</u> ( $\mu$ g/ 5 ml)	<u>% teruggevonden</u>	<u>Variatiekoefficiënt</u> (%)
0,72	95,1	2,1
1,44	93,4	1,8
2,16	91,0	2,2
2,88	94,3	2,0
3,60	91,5	2,6

Het gemiddeld rendement bedraagt aldus 93,0 % met een variatiekoefficiënt van 2,1 %.

Het rendement voor zuiver malonaldehyde is aldus veel hoger dan door Tarladgis et al. (31) opgegeven, nl. gemiddeld 68 % in 10 min destillatie.

Op te merken valt hierbij dat er in de eerste 50 ml gemiddeld 80 % overkomt.

### 3. 4. 4. Destillatie-metoden.

Voor de destillatie kan men in principe gebruik maken van een waterig filtraat, een eiwitvrij filtraat (TCA-extrakt),

gemalen vis en visbrij (met water gehomogeniseerde vis). Deze verschillende vormen werden uitgetest. Er valt hierbij te noteren, dat Tarladgis et al. (32) voor vlees de laatste methode hebben voorgesteld.

#### 3.4.4.1. Waterig filtraat.

40 g vis worden met 200 ml water gehomogeniseerd en gefiltreerd ; 20 ml filtraat worden dan met HCl 1 N op pH 1,5 gebracht en aan de stoomdestillatie onderworpen. De TBZ- test wordt dan op 5 ml destillaat uitgevoerd.

Alhoewel het rendement bevredigend was bij toevoegen van TEP (90 à 103 % met een gemiddelde van 98 % werd teruggevonden), bleek deze methode niet geschikt voor de praktijk. Inderdaad, het filtreren duurt meestal lang, vooral bij vette en halfvette vissoorten, en het risico van verdere oxydatie onder invloed van de luchtzuurstof is dan ook groot.

#### 3.4.4.2. TCA-filtraat.

Dezelfde werkwijze als voor het waterig filtraat wordt gevolgd, maar i.p.v. water wordt TCA 7,5 % gebruikt.

Om na te gaan of malonaldehydekwantitatief werd overgedestilleerd, werd een reeks proeven met diverse vissoorten uitgevoerd waarbij telkens 10 ml TEP  $2 \cdot 10^{-5}$  M bij 20 ml filtraat werden gevoegd.

Het rendement was onregelmatig en varieerde tussen 70 en 85 %, zodat deze werkwijze niet geschikt bleek te zijn.

### 3. 4. 4. 3. Gemalen vis.

Volgens de te verwachten oxydatiegraad wordt 5 à 20 g in de vleesmolen gemalen vis gebruikt ; in de meeste gevallen is 10 g een geschikte hoeveelheid. De pH wordt op 1,5 gesteld door additie van HCl 1 N ; tevens worden enkele druppels antischuimmiddel toegevoegd. Men destilleert 100 ml over en voert de TBZ-test op 5 ml uit.

- Invloed van de pH in het destilleervat en van de destilleertijd.

Het aanzuren van het vismonster is noodzakelijk voor de malonaldehyde-vrijstelling. Tarladgis et al. (31) toonden aan, dat de pH een rol speelt en voor vlees best bij pH 1,5 wordt gewerkt. Zij vonden ook dat de destillatie zo vlug mogelijk en bij maximale hitte dient te gebeuren, daar bij langere destillatieperioden het monster wordt geoxydeerd en bijkomstig malonaldehyde vrijkomt, hetgeen de resultaten vervalst.

Beide factoren werden op haring, rode zeebaars, kabeljauw, hondstong en doornhaai van uiteenlopende oxydatiegraad onderzocht. Daar oriënterende proeven met pH's van 0,5 tot 2 hadden aangetoond dat de proeven best in het pH-gebied 1 - 1,5 worden uitgevoerd, werd besloten de invloed van deze twee pH's meer in detail te bestuderen. Drie destillatiefrakties van telkens 100 ml, overeenkomend met 3 x 10 min werden daarbij getest. De proeven werden telkens tienmaal herhaald. De gemiddelde resultaten zijn in tabel 9 vermeld. De extinktiewaarden voor de eerste fraktie van 100 ml bij pH 1 werden op 100 % gesteld.

Uit deze resultaten blijkt, dat in de eerste fraktie van 100 ml de grootste hoeveelheid malonaldehyde overkomt (60 à 75 %). Om bovenvermelde redenen zal in de 2e en 3e fraktie waarschijnlijk nieuwvorming van malonaldehyde plaatsgrijpen. Om deze reden is het voor de praktijk geraadzaam zich aan de eerste fraktie van 100 ml te houden.

Tabel 9. - Invloed van de pH en de destilleertijd op de TBZ-bepaling.

Vissoort	Destillatie- frakties van 100 ml	pH 1		pH 1,5	
		Gemiddelde E	E in %(*)	Gemiddelde E	E in %(*)
Haring (Clupea harengus L)	1e	0,340	100	0,409	120,3(110,4-132,5)
	2e	0,085	25,0(18,2-33,5)	0,084	24,7(20,2-29,3)
	3e	0,031	9,7(6,6-12,2)	0,028	8,2(7,0-10,1)
Rode zeebaars (Sebastes marinus L)	1e	0,144	100	0,200	138,7(126,0-150,5)
	2e	0,034	23,6(16,9-27,4)	0,040	27,7(24,7-29,3)
	3e	0,016	11,1(8,9-15,3)	0,016	11,1(8,5-15,2)
Kabeljauw (Gadus morhua L)	1e	0,060	100	0,064	106,7(103,4-111,5)
	2e	0,016	26,7(20,1-34,7)	0,012	20,0(15,3-26,1)
	3e	0,008	13,3(9,9-16,5)	0,004	6,9(5,0-9,2)
Hondstong (Pleuronectes cynoglossus L)	1e	0,088	100	0,104	118,2(110,2-128,4)
	2e	0,026	29,5(21,0-36,6)	0,027	30,7(25,3-35,6)
	3e	0,013	14,7(10,1-19,0)	0,013	14,7(9,8-18,8)
Doornhaai (Squalus acanthias L)	1e	0,120	100	0,152	126,7(113,4-140,1)
	2e	0,020	16,7(8,4-24,0)	0,026	21,7(16,9-25,8)
	3e	0,010	8,3(5,0-12,5)	0,010	8,3(6,9-10,7)

(\*) Eerste fraktie van 100 ml bij pH 1 = 100 % ; laagste en hoogste waarden tussen haakjes.

Bij pH 1,5 worden duidelijk hogere waarden bekomen (gemiddeld 22 %). Op te merken valt hierbij dat deze vermeerdering praktisch uitsluitend op de eerste fractie slaat. Uit deze proeven kan besloten worden dat 100 ml destillaat (10 min destillatie) en een pH van 1,5 de beste resultaten geven.

#### 3.4.4.4. Visbrij.

Volgens de te verwachten oxydatiegraad worden 5 à 10 g visvlees gedurende 2 min met 25 ml water in een mixer gehomogeniseerd. De brij wordt met 25 ml water kwantitatief in de destillatiekolf gebracht en op pH 1,5 gesteld. De rest van de proef verloopt zoals bij gemalen vis.

Teneinde een beter inzicht in de waarde van beide methoden te bekomen, werden op vijf vissoorten (kabeljauw, rode zeebaars, haring, hondstong en doornhaai) zes vergelijkende proeven tussen de TBZ-bepalingen op gemalen vis en op visbrij uitgevoerd. De resultaten, die in figuur 11 grafisch zijn weergegeven, duiden op een goede korrelatie, en dit voor alle vissoorten. De korrelatiecoëfficiënt bedroeg 0,978 en was zeer significant.

De waarden van visbrij blijken ongeveer 1,65 maal hoger te liggen dan voor gemalen vis. Om reden van de zeer goede korrelatie is echter deze laatste methode, die eenvoudiger is uit te voeren, te verkiezen.

#### 3.4.4.5. Besluit.

De destillatiemethode die vermeld is in 3.4.4.3. (10 g vis, pH 1,5, 100 ml destillaat) blijkt voor de praktijk het meest geschikt te zijn.



### Samenvatting.

Na een bespreking van de voornaamste vislipiden en van de autoxydatie wordt vooreerst de peroxyde-index behandeld. De jodometrische methode, toegepast op een chloroformextract, werd uitgetest en op punt gesteld. Hierbij werden de invloed van het toevoegen van water tijdens de titratie, van de reageertijd en van de luchtzuurstof onderzocht. De hoeveelheid water dient nauwkeurig gemeten te worden, de optimale reageertijd bedraagt 10 min en de nadelige invloed van de luchtzuurstof kan worden vermeden door een antioxydans (BHT) aan de chloroform toe te voegen. Het doorborrelen van stikstof tijdens de extractie van de vetten is hierbij van geen nut.

De peroxyde-index kan ook potentiometrisch worden bepaald. Hierbij is het niet nodig water voor de titratie toe te voegen of te werken in een stikstofatmosfeer.

Vervolgens werd de bepaling van de oxydatiegraad van vis met de thiobarbituurzuur-test (TBZ-test) met behulp van een destillatietechniek bestudeerd. De kleurontwikkeling blijkt het best bij 100° C door te gaan (40 min). Bij het gebruik van het destillatie-apparaat van Antonacopoulos wordt in 100 ml destillaat (10 min) gemiddeld 93 % malonaldehyde gedoseerd. Als monster kan gemalen vis of visbrij (in de mixer met water gemalen vis) worden gebruikt. Bij het gebruik van visbrij worden waarden bekomen die ca 1,65 maal hoger liggen dan bij gemalen vis. Daar de korrelatie echter zeer goed is (korrelatiecoëfficiënt 0,978), is deze laatste methode te verkiezen : zij is immers eenvoudiger uit te voeren.

De pH in het destilleervat tenslotte wordt het best op 1,5 gesteld en een hoeveelheid destillaat van 100 ml is aan te raden.

Literatuur.

1. Olley, J. en Lovern, J. (1954) : Biochem. J. 57, 610.
2. Garcia, D., Lovern, J. en Olley, J. (1956) : Biochem. J. 62, 99.
3. Olcott, H. : geciteerd door Soudan (4) p. 33.
4. Soudan, F. (1965) : La Conservation par le Froid des Poissons, Crustacés et Mollusques, J.B. Ballière & Fils, Paris.
5. Lovern, J. (1962) : in : Fish in Nutrition, Uitg. E. Heen en R. Kreuzer (FAO), Fishing News (Books) Ltd, London, p. 86.
6. Rieche, A. (1962) : Fette, Seifen, Anstrichmittel 64, 198.
7. Taufel, K. en Zimmermann, R. (1959) : Ernährungsforschung 4, 326.
8. Wheeler, D. (1932) : Oil and Soap 9, 89.
9. Lea, C. (1931) : Proc. Roy. Soc. 108, 175.
10. Lea, C. (1946) : J. Soc. Chem. Ind. 65, 286.
11. Lea, C. (1952) : J. Sci. Food Agric. 3, 586.
12. Heaton, W. en Uri, N. (1958) : J. Sci. Food Agric. 9, 781.
13. Stamm, J. (1926) : Analyst 51, 416.
14. Hamm, D., Hammond, E., Parvanah, V. en Snyder, H. (1965) : J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 920.
15. Loftus Hills, G. en Thiel, C. (1946) : J. Dairy Res. 14, 340.
16. Smith, G. (1952) : J. Sci. Food Agric. 3, 26.
17. Hartmann, L. en White, M. (1952) : J. Sci. Food Agric. 3, 112.
18. Lovern, J. (1965) : J. of the AOAC 48, 60.
19. Bligh, E. en Dyer, W. (1959) : Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911.
20. Folch, J., Lees, M. en Stanley, G. (1957) : J. Biol. Chem. 226, 497.
21. Cranford, D., Yu, T. en Sinnhuber, R. (1967) : J. Food Sci. 32, 332.
22. Purr, A. (1964) : Deutsche Lebensmittel-Rundschau 9, 269.
23. Tarladgis, B., Pearson, A. en Dugan, L. (1962) : J. Amer. Oil Chem. Soc. 39, 34.

24. Schmidt, H. (1959) : Fette, Seifen, Anstrichmittel 61, 883.
25. Sinnhuber, O. en Yu, T. (1958) : Food Technol. 12, 9.
26. Yu, T. en Sinnhuber, O. (1957) : Food Technol. 11, 104.
27. Yu, T. en Sinnhuber, O. (1964) : J. Amer. Oil Chem. Soc. 41, 540.
28. Castell, C., Moore, B. en Neal, W. (1966) : J. Fish. Res. Bd. Canada 23, 737.
29. Castell, C. en Boyce, G. (1966) : J. Fish. Res. Bd. Canada 23, 1587.
30. Buttkus, H. (1967) : J. Food Sci. 32, 432.
31. Tarladgis, B., Watts, B. en Younathan, M. (1960) : J. Amer. Oil Chem. Soc. 37, 44.
32. Tarladgis, B., Pearson, A. en Dugan, L. (1964) : J. Sci. Food Agric. 15, 602.
33. Antonacopoulos, N. (1960) : Z. Lebensmittel-Untersuch. 113, 113.

Fig.1: POTENTIOMETRISCHE TITRATIE VAN  
EEN HARINGEXTRAKT

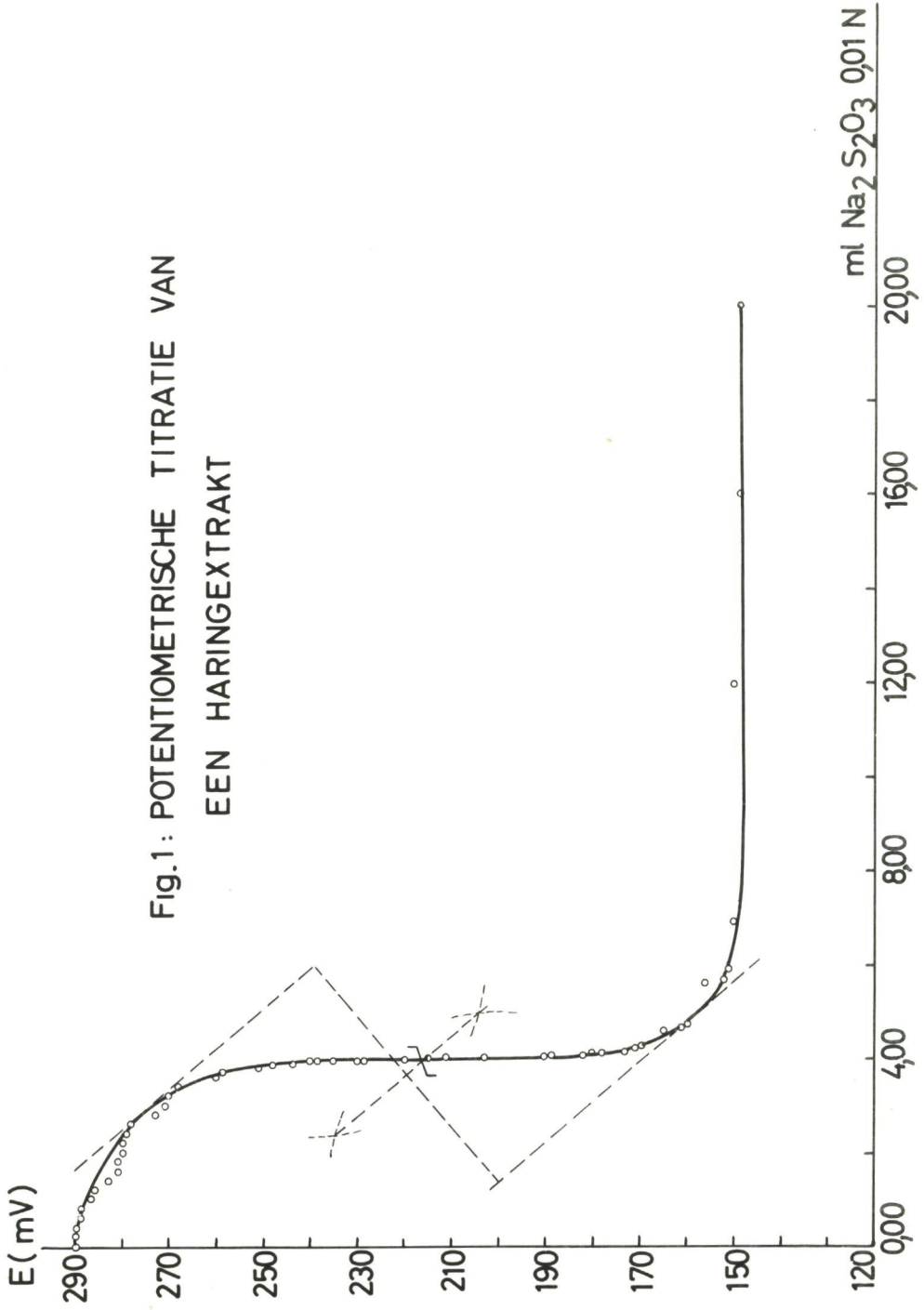


Fig.2: POTENTIOMETRISCHE TITRATIE VAN  
LAUROYLPEROXYDE

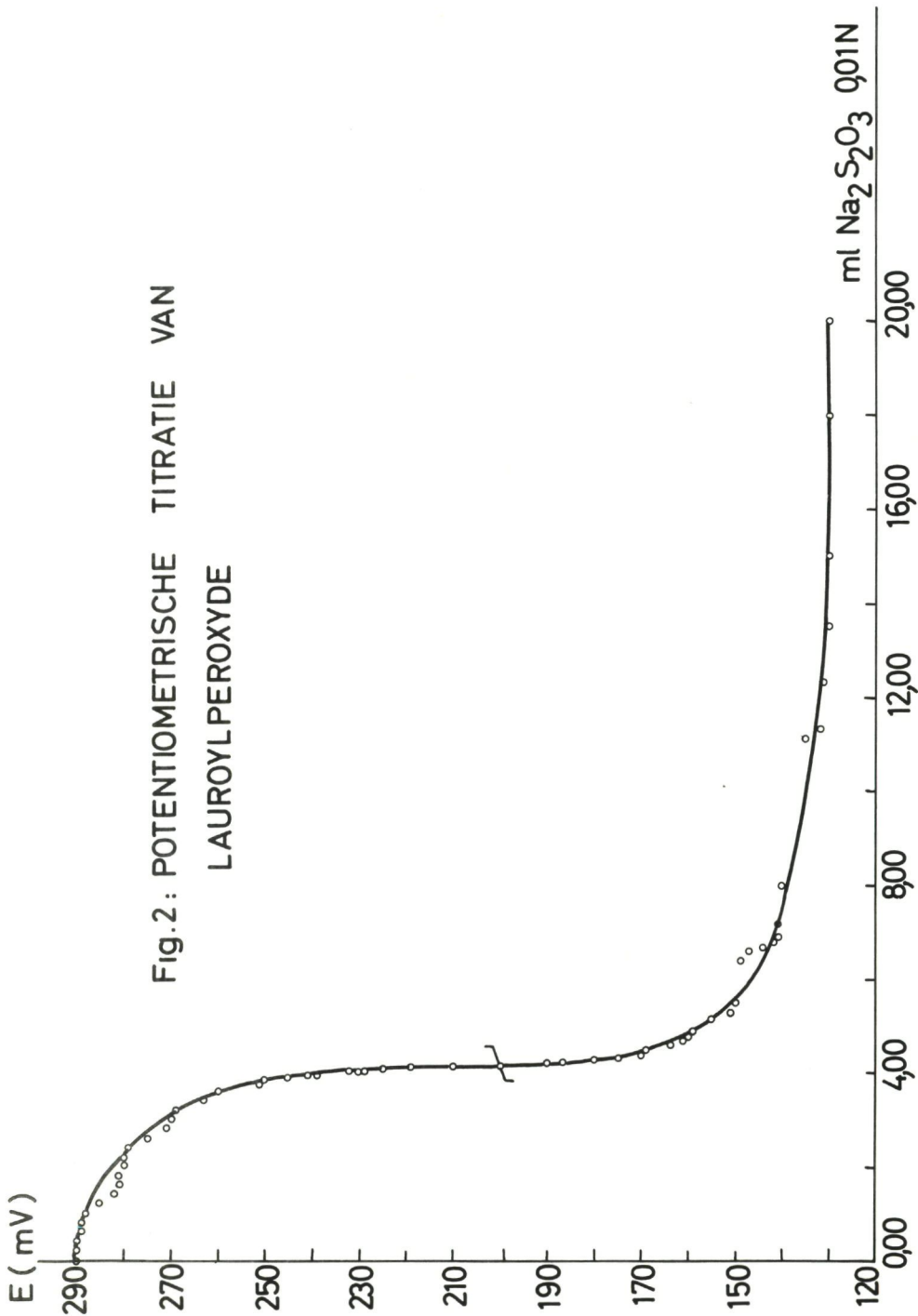


Fig. 3: POTENTIOMETRICHE TITRATIE VAN  
EEN HARINGEXTRAKT

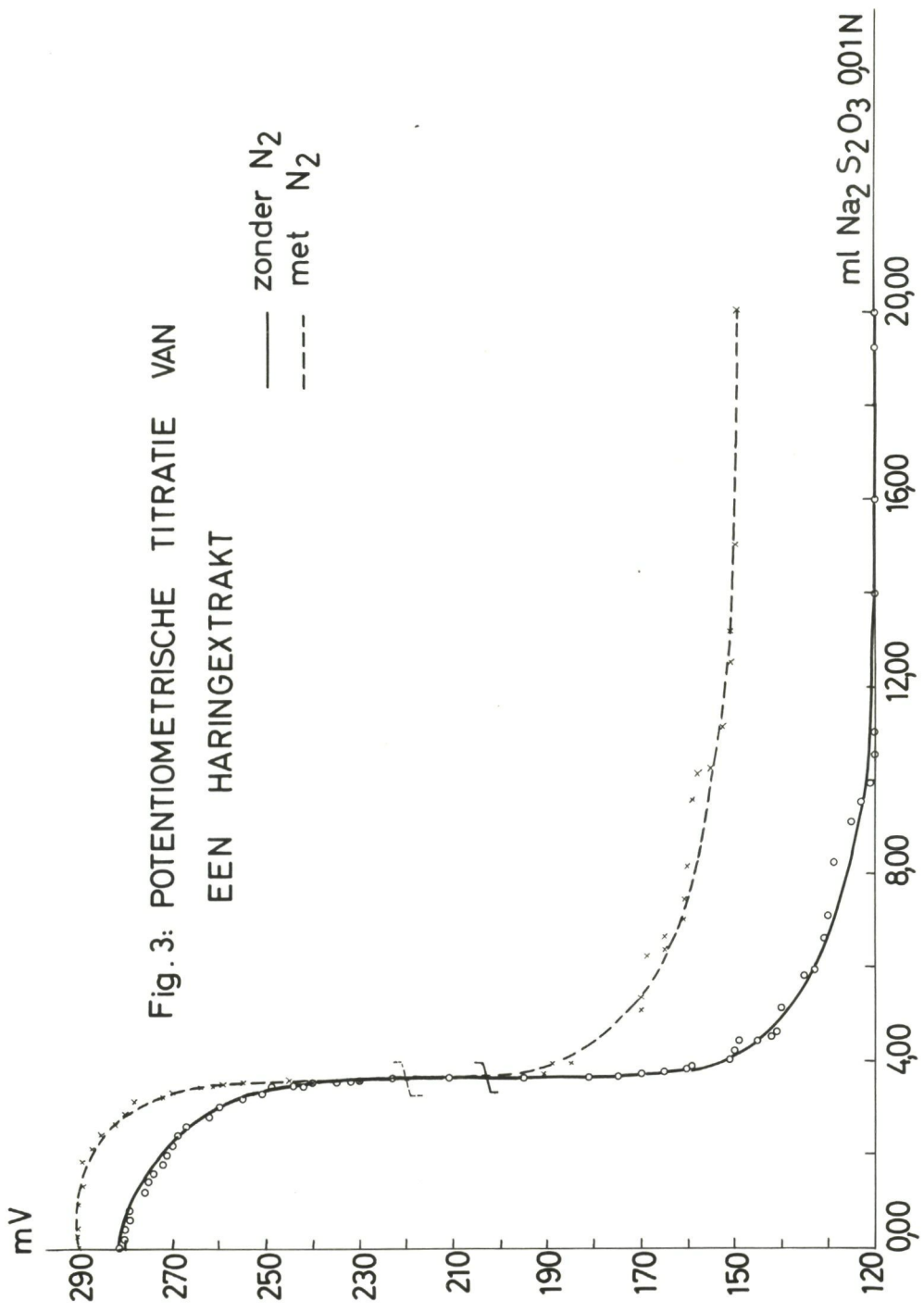


Fig. 4 : POTENTIOMETRISCHE TITRATIE  
VAN LAUROYLPEROXDE

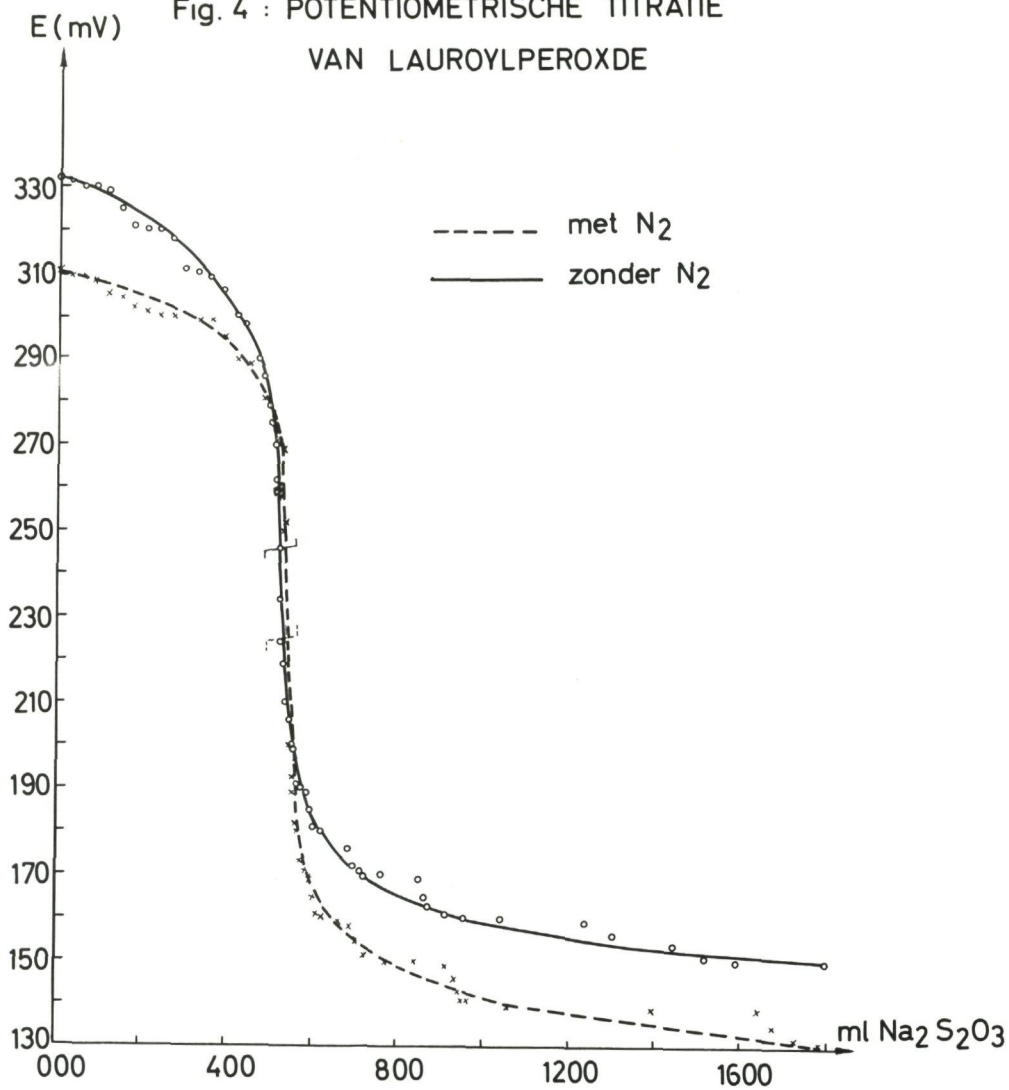


Fig 5 : POTENTIOMETRISCHE TITRATIE VAN  
EEN HARINGEXTRAKT

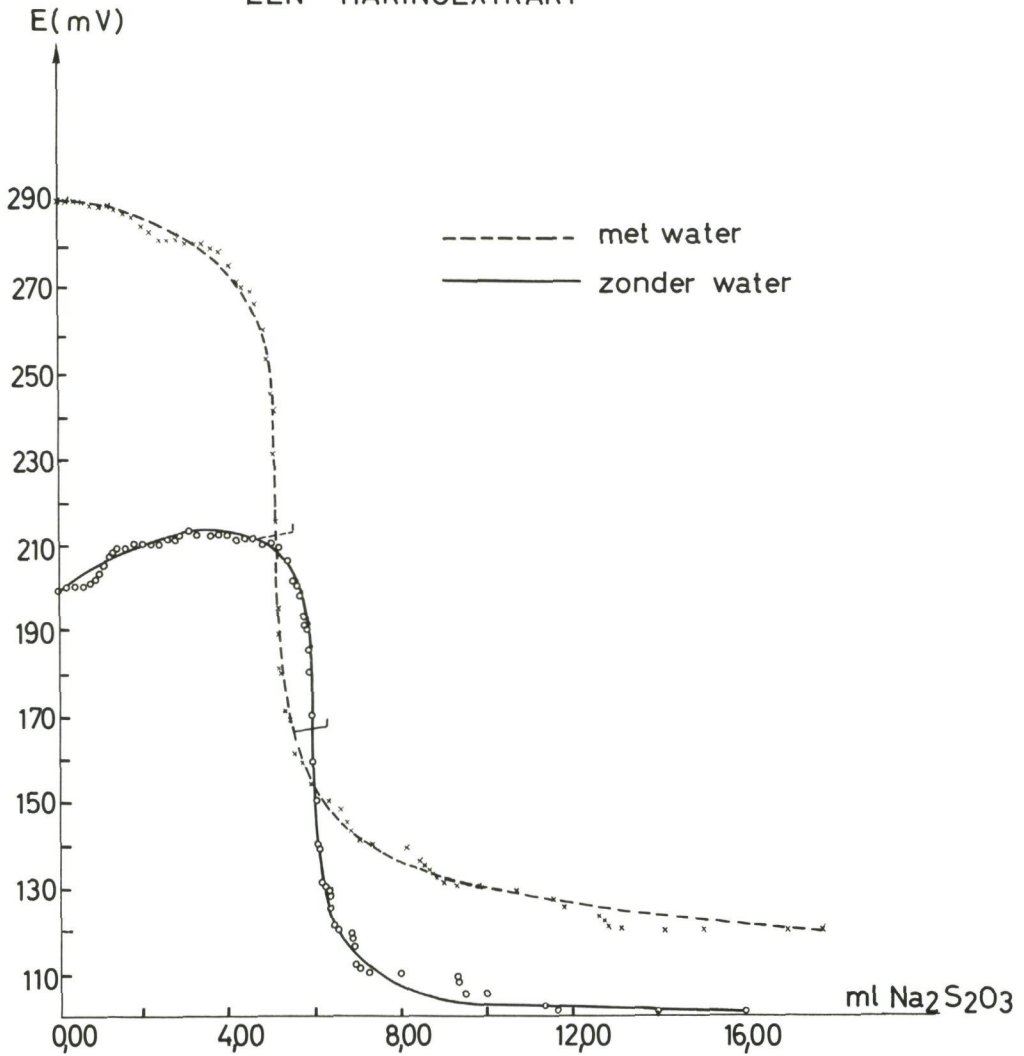
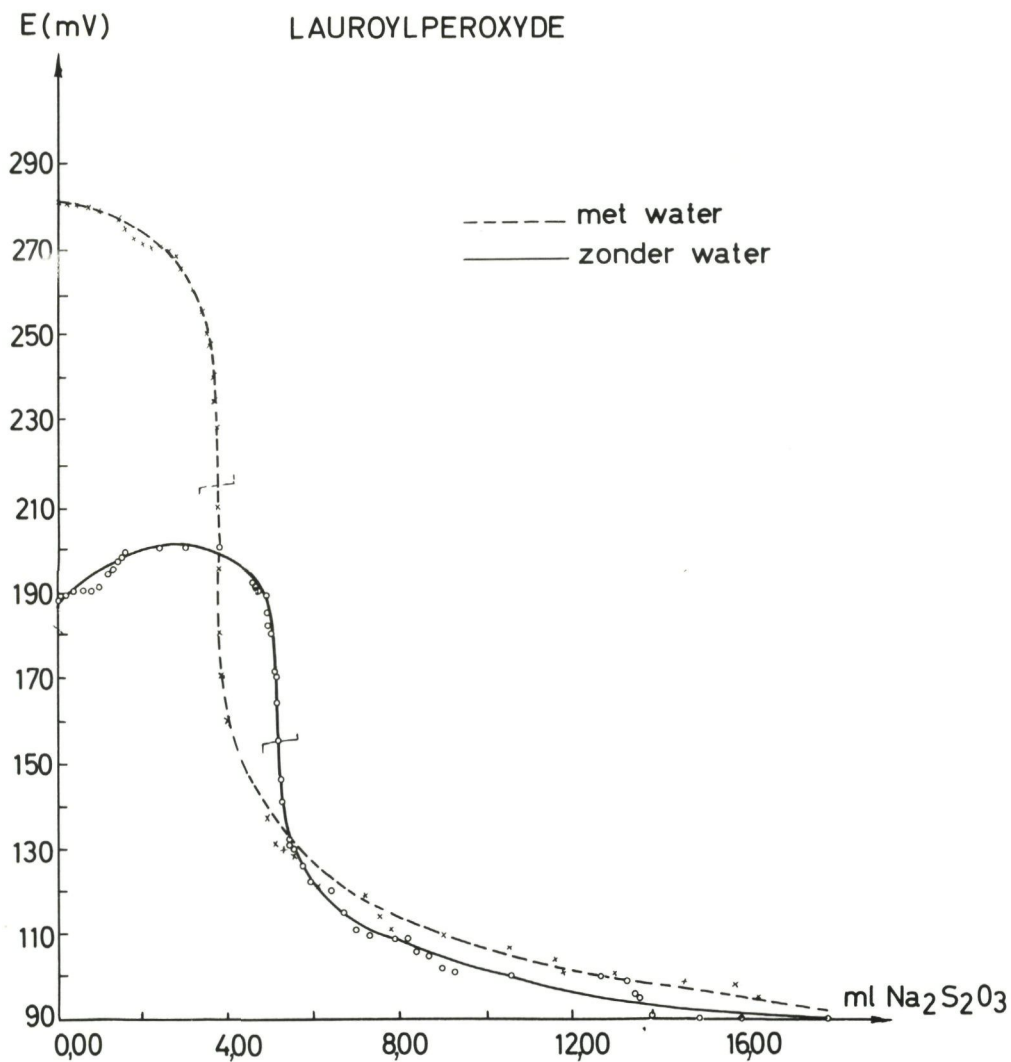




Fig. 6 : POTENTIOMETRISCHE TITRATIE VAN  
LAUROYLPEROXYDE



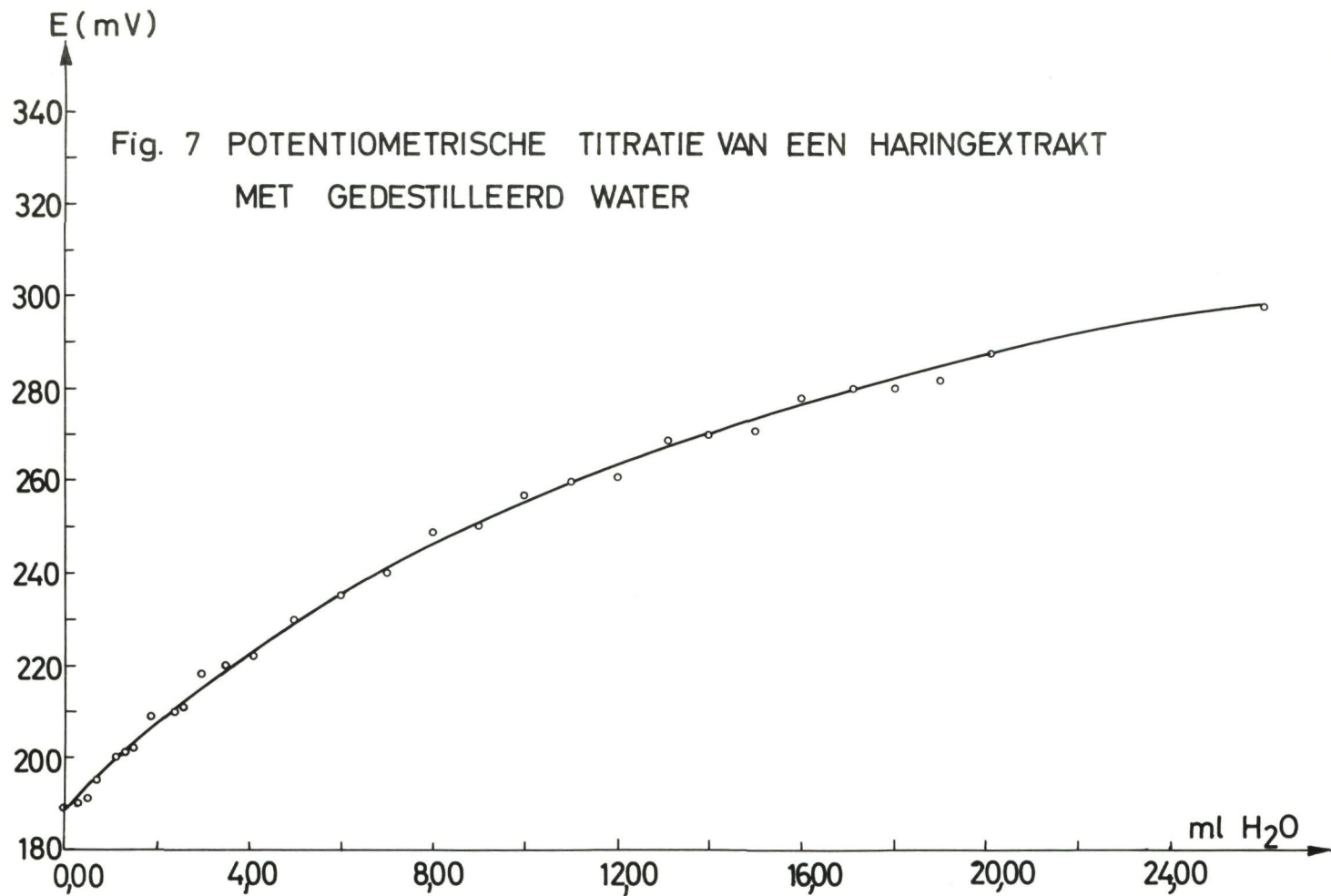


Fig. 8 BLANKPROEVEN

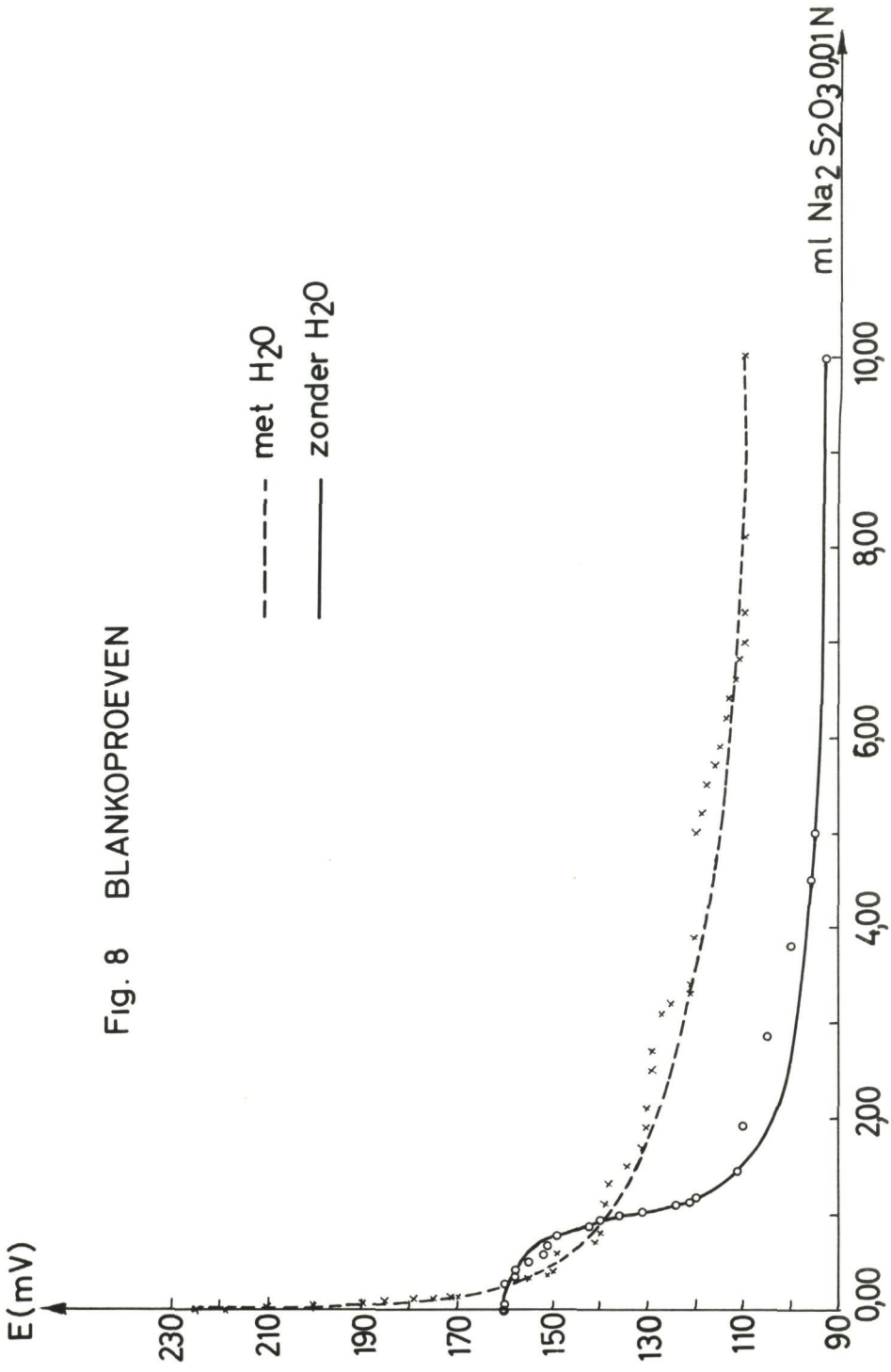


Fig. 9 INVLOED VAN DE TEMPERATUUR OP IJKKURVE VAN TBZ - METODE

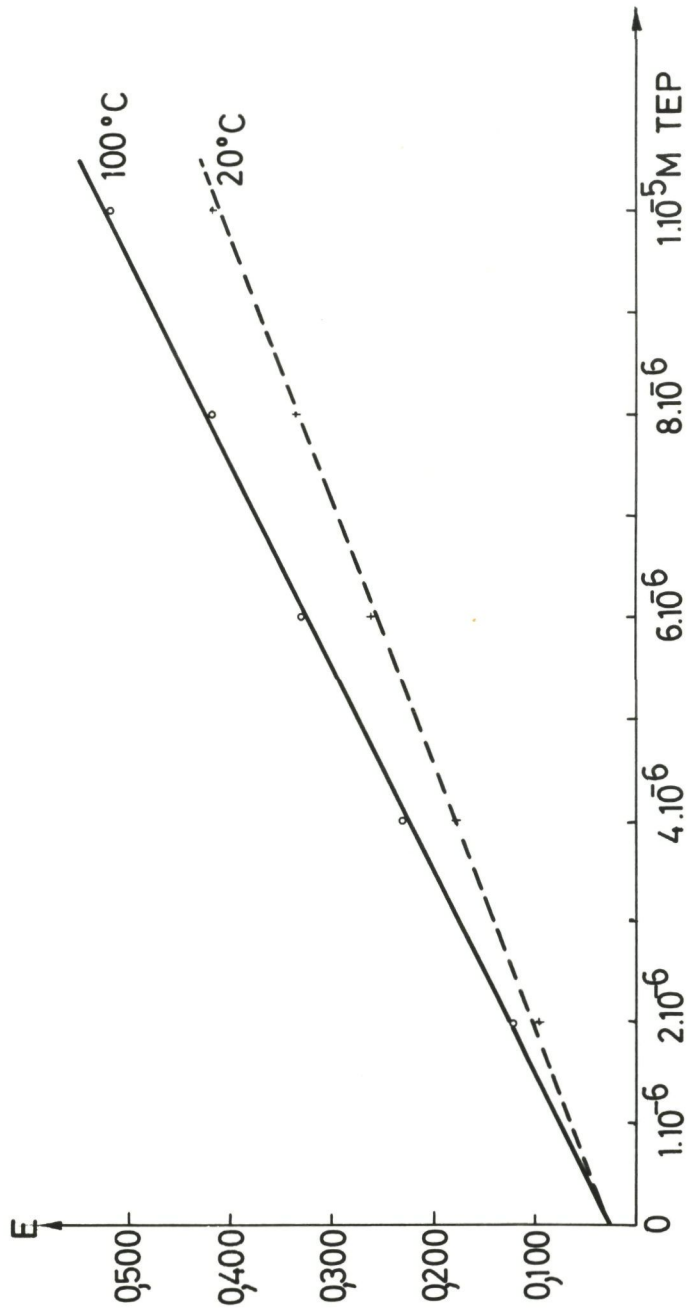


Fig. 10 STOOMDESTILLATIE - APPARAAT VOLGENS ANTONACOPOULOS

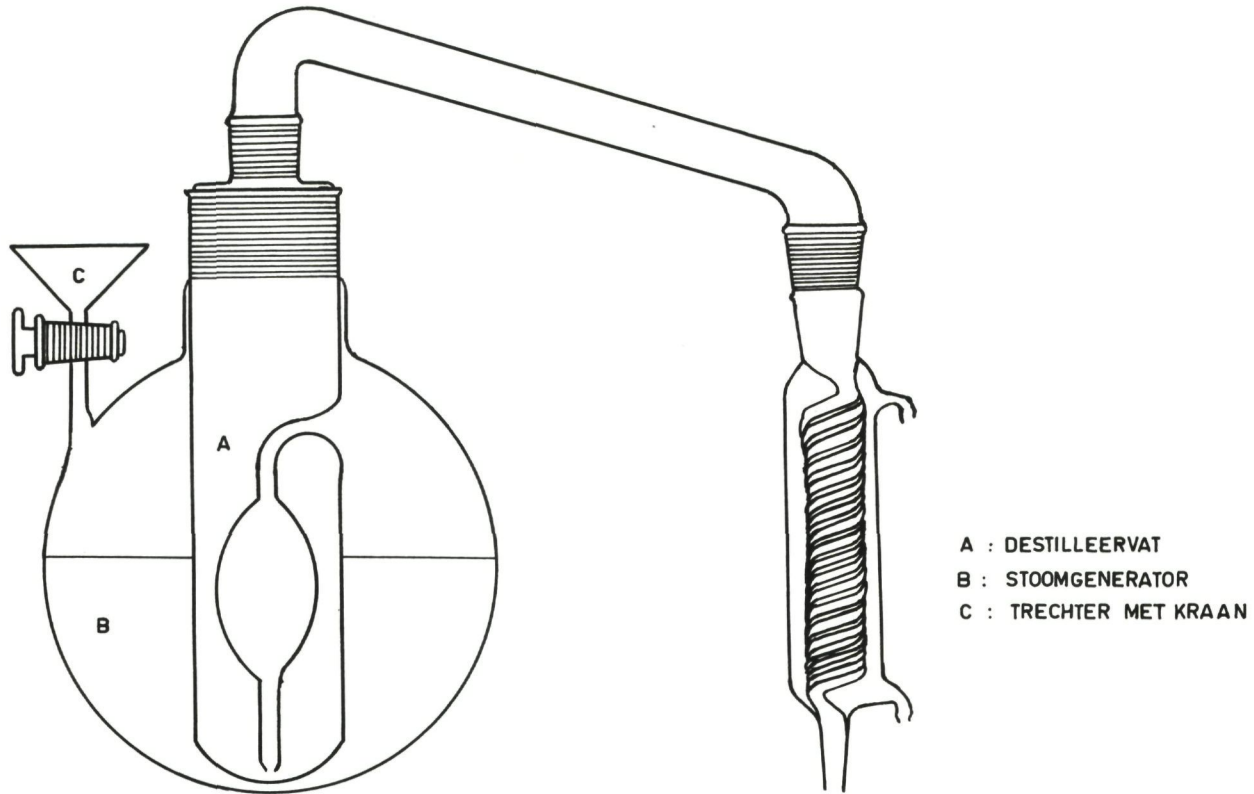
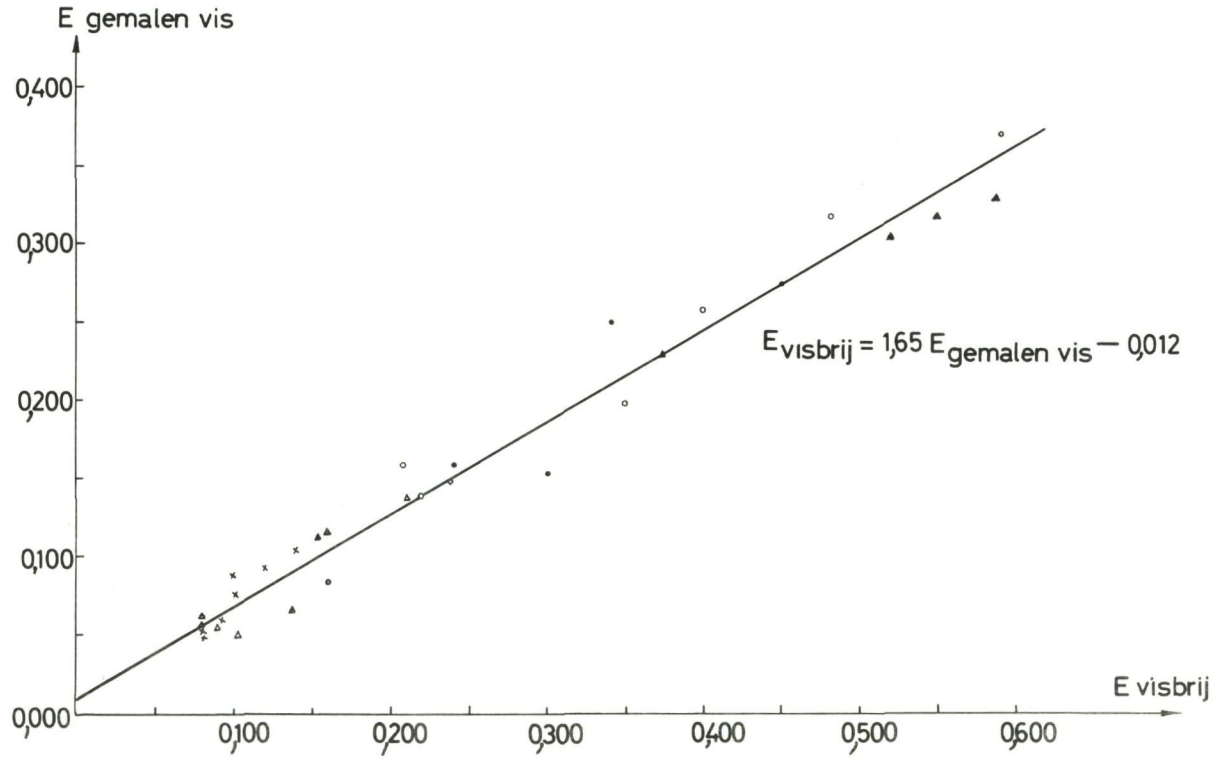


Fig.11 KORRELATIE TUSSEN TBZ - BEPALINGEN  
VAN GEMALEN VIS EN VISBRIJ

- rode zeebaars
- x kabeljauw
- △ hondstong
- haring
- ▲ doornhaai





C.L.O. Offset - Repro - Fotografie

