

MINISTERIE VAN LANDBOUW

Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ

Oostende.

Direkteur : P. HOVART

**VERGELIJKEND ONDERZOEK VAN TWEE METODEN
VOOR DE BEPALING VAN DE TOTALE VLUCHTIGE
BASISCHE STIKSTOF (TVB) IN VIS**

door

W. VYNCKE

1426/2

MINISTERIE VAN LANDBOUW

Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek
Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ

Oostende.

Direkteur : P. HOVART

**VERGELIJKEND ONDERZOEK VAN TWEE METODEN
VOOR DE BEPALING VAN DE TOTALE VLUCHTIGE
BASISCHE STIKSTOF (TVB) IN VIS**

door

W. VYNCKE

1. Inleiding.

De bepaling van de TVB is één van de meest gebruikte objektieve kwaliteitsbepalingsmethoden. De TVB bestaat bij zeevissen hoofdzakelijk uit ammoniak en trimethylamine (TMA) en in mindere mate uit methylamine, dimethylamine en hogere aminen (tyramine, histamine, cadaverine, putresceïne, enz.).

Ammoniak kan tijdens het bederf van vis door verschillende reakties worden gevormd. Het ontstaat door hydrolyse van ureum met bacterieel urease als biokatalysator, door desaminering van de aminozuren en verwante verbindingen (bv. creatine), door oxydatie van aminen en door afbraak van nucleïnebasen. Tenslotte dient opgemerkt te worden, dat vrije ammoniak ook in levende vis voorkomt ten gevolge van de normale desamineringen van het celmetabolisme, zoals bv. de overgang adeninehypoxanthine ; de concentratie aan vrije ammoniak varieert van 5 tot 20 mg N % (1).

TMA wordt hoofdzakelijk gevormd door reductie van het in vis aanwezige trimethylamineoxyde (TMAO) door toedoen van het enzym triamine-oxydase (2) (3). Kleine hoeveelheden TMA kunnen ook door bacteriële aktie uit choline worden gevormd (4) (5).

Methylamine en dimethylamine worden in diverse beenvissen in concentraties van enkele mg N % aangetroffen (1).

De hogere aminen ontstaan door decarboxylering van de aminozuren ; dit treedt echter in veel mindere mate en slechts in de latere stadia van het bederf op (6) (7).

Voor de bepaling van de TVB werden verschillende methoden voorgesteld. Deze methoden doen beroep hetzij op destillatie, hetzij op mikrodiffusie, waarbij de TVB door alkalisering wordt vrijgemaakt. De destillatie kan bij gewone atmosferische druk, onder vakuum en met stoom gebeuren. Daarenboven verkiezen sommige onderzoekers vooraf de eiwitten neer te slaan, daar anders een zekere hydrolyse van deze verbindingen kan optreden met nieuwvorming van TVB.

Voor de mikrodiffusie wordt meestal gebruik gemaakt van de methode van Conway met concentrische schalen (8). Deze laatste techniek is relatief eenvoudig en nauwkeurig, maar nogal tijdrovend, zodat zij voor routine-onderzoek minder geschikt is.

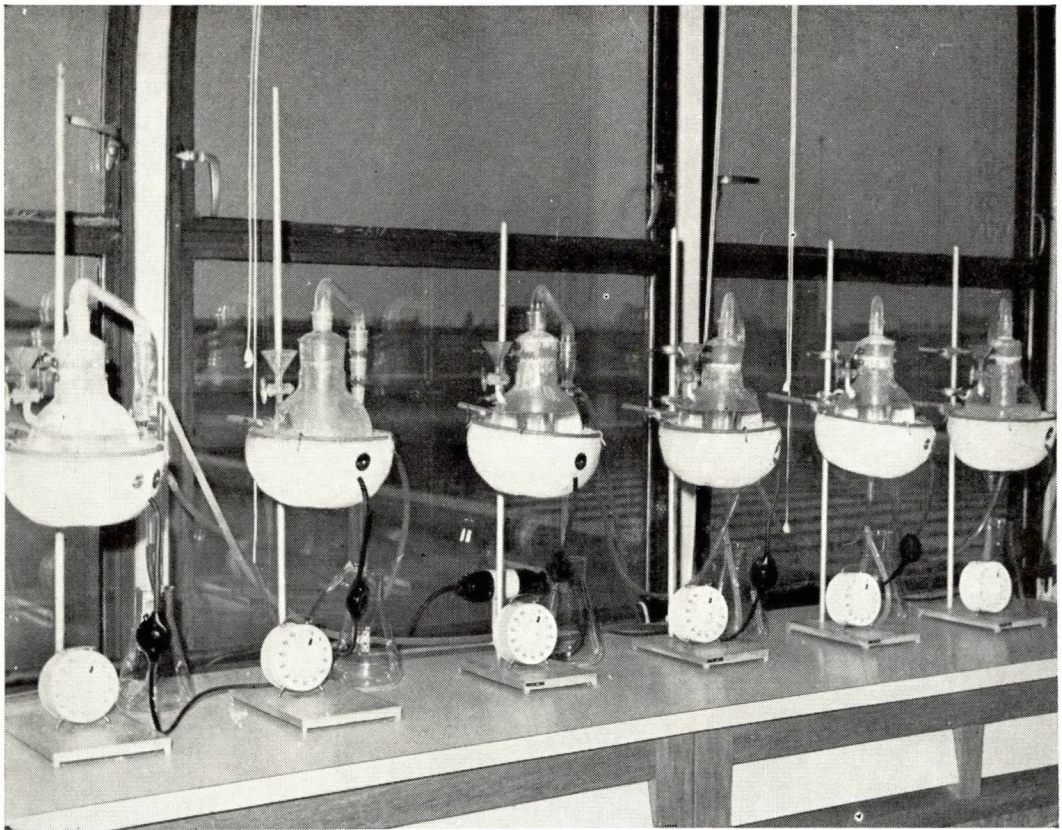
Onder de talrijke varianten van de destillatiemethode wordt de werkwijze van Lücke en Geidel (9) in verschillende landen, vooral in Europa, toegepast (*). Bij deze methode wordt een vismonster in gestandaardiseerde omstandigheden met magnesiumoxyde gedestilleerd. De TVB wordt dan door zuurbasetitratie bepaald.

Wanneer de stoomdestillatie-apparatuur, door Antonacopoulos ontworpen (10) (figuur 1) wordt gebruikt, kan de originele werkwijze gevoelig worden vereenvoudigd en de tijd nodig voor de analyse aanzienlijk worden ingekort (11).

Deze methode wordt sedert meer dan zeven jaar in het laboratorium van het Rijksstation voor Zeevisserij toegepast en geeft volledige voldoening; de werkwijze werd in een vroegere publikatie beschreven (**) (12).

(*) De originele werkwijze van deze methode is in bijlage 1 opgenomen.

(**) De volledige werkwijze is in bijlage 2 opgenomen.



Figuur 1 — STOOMDESTILLATIE-APPARATEN
VOLGENS ANTONACOPOULOS

Anderzijds heeft het Visserijkomité van de Codex Alimentarius (FAO/WHO) een standaardmethode voorgesteld, die door Canada werd uitgewerkt. Bij deze methode worden de vis-eiwitten eerst met trichloorazijnzuur neergeslagen. Het filtraat wordt dan in een mikro-Kjeldahl-apparaat met natriumhydroxyde alkalisch gemaakt en de vrijgekomen TVB overgedestilleerd (*). (13).

In het kader van de studies in verband met de Codex Alimentarius werd het nuttig geacht een vergelijkend onderzoek tussen beide methoden te maken. De reproduceerbaarheid, de mogelijke korrelatie en de meest belangrijke factoren, nl. invloed van de vissoort en van de destillatie-omstandigheden werden onderzocht.

2. Modus operandi.

2.1. Vissoorten : kabeljauw (*Gadus morhua* L), rode zeebaars (*Sebastes marinus* L) en haring (*Clupea harengus* L) van verschillende versheidsgraad werden gebruikt.

2.2. Destillatiemethoden : de werkwijzen door Antonacopoulos (11) en door het Codex-komité (13) voorgesteld werden nauwkeurig gevolgd. Voor de laatste methode werd als mikro-Kjeldahlapparaat een Markham-toestel gebruikt. (figuur 2).

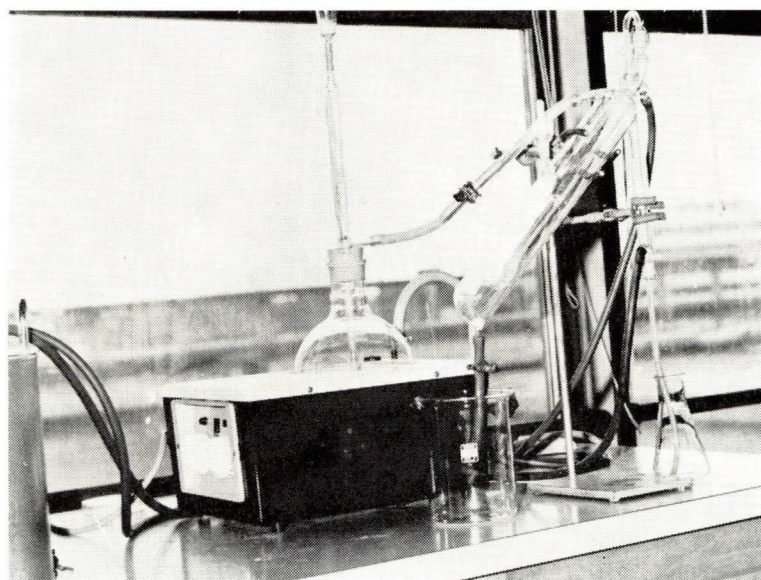
Gemakshalve wordt de eerste methode verder "MgO-methode" genoemd.

3. Resultaten en diskussie.

3.1. Reproduceerbaarheid.

De standaardafwijking werd uit de resultaten van de dubbelproeven berekend volgens :

(*) De volledige werkwijze is in bijlage 3 opgenomen.



Figuur 2 — MIKRO-KJELDAHL-APPARAAT
VOLGENS MARKHAM

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

waarbij d = verschil tussen dubbelproeven en
n = aantal paren.

De variatiekoëfficiënt werd eveneens bepaald. Zes TVB-koncentratie-intervallen werden gekozen, gaande van 10 tot 69 mg N % en 200 vissen werden in iedere groep geanalyseerd.

Tabel 1 geeft de resultaten voor kabeljauw.

Tabel 1 - Standaardafwijkingen (in mg N %) en variatiekoëfficiënten (tussen haakjes) van de MgO - en Codex-metoden voor TVB-bepaling.

TVB-interval (mg N %)	MgO-metode	Codex-metode
10-19	0,24 (1,6%)	0,33 (2,2%)
20-29	0,54 (2,2%)	0,39 (1,6%)
30-39	0,88 (2,5%)	0,35 (1,0%)
40-49	0,87 (1,9%)	0,44 (1,0%)
50-59	1,17 (2,1%)	0,59 (1,1%)
60-69	1,39 (2,1%)	0,74 (1,1%)

Uit deze resultaten blijkt, dat de standaardafwijking niet gelijk is voor de zes groepen en dit met beide methoden. Toepassing van de Hartley-toets (14) geeft trouwens een significant verschil. De variatiekoëfficiënten daarentegen zijn vrij gelijk, hetgeen erop wijst dat beide methoden eenzelfde relatieve reproduceerbaarheid over een groot concentratie-interval behouden.

De codex-metode blijkt meer reproduceerbaar te zijn, maar ook de MgO-metode heeft een zeer bevredigende nauwkeurigheid. Met 95 % waarschijnlijkheid zijn de middelbare fouten respektievelijk ca 2 en 3,5 % voor de Codex- en de MgO-metoden wanneer de bepalingen in het dubbel worden uitgevoerd.

Dezelfde reproduceerbaarheid werd met rode zeebaars en haring bekomen, hetgeen erop wijst dat de vissoort en het vetgehalte geen invloed op de TVB-bepalingen hebben.

3.2. Korrelatie.

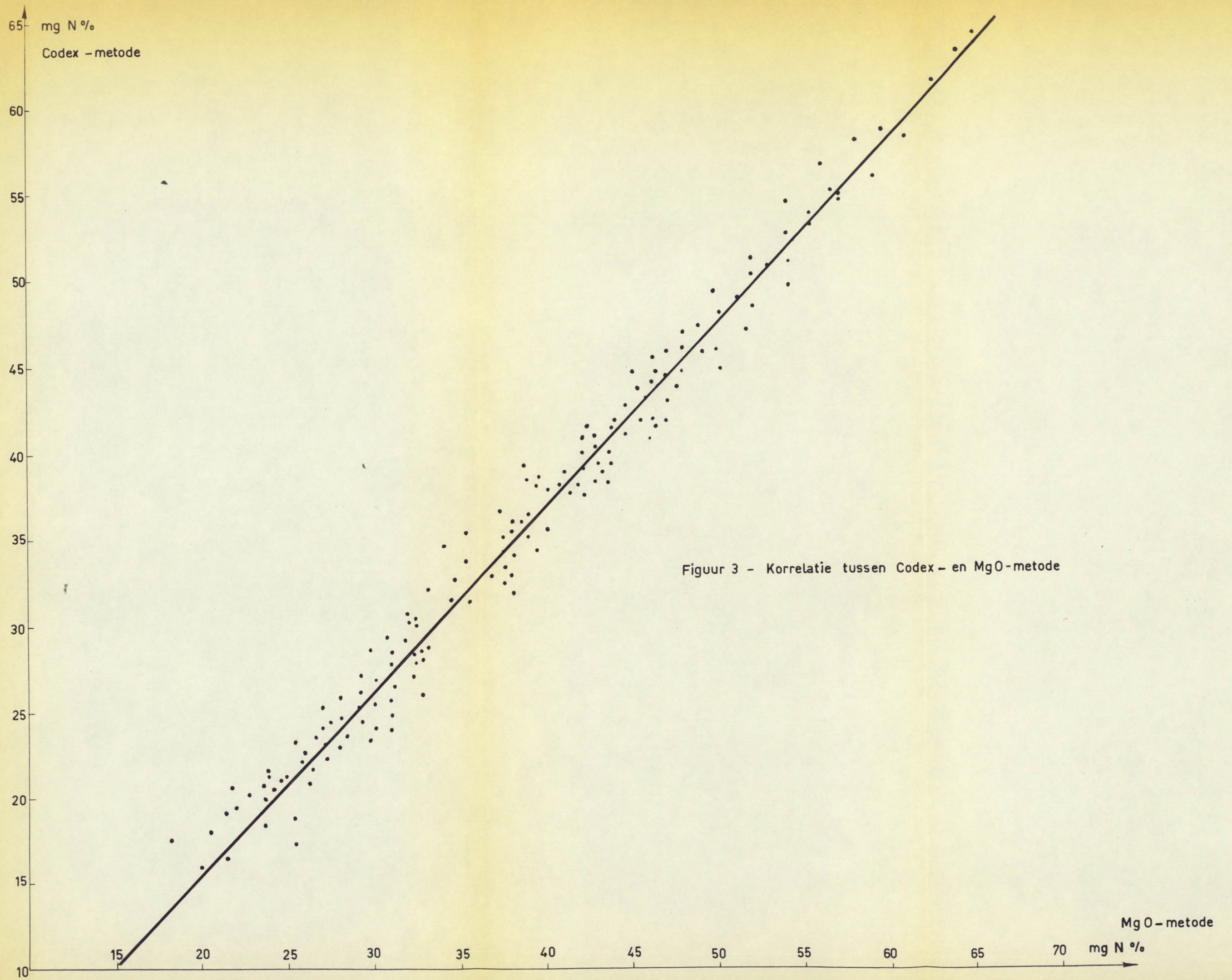
Beide methoden hebben een hoge korrelatiegraad (figuur 3). De korrelatiecoëfficiënt, op 200 paarsgewijze uitgevoerde analyses bepaald, bedraagt 0,99 en is zeer significant. De resultaten van de MgO-metode beantwoorden aan deze van de Codex-metode door volgende vergelijking :

$$y = 5,30 + 0,93 x$$

waarbij voor y en x de TVB-waarden respektievelijk van de Codex- en van de MgO-metode gelden.

3.3. Destillatietijd.

In de Codex-metode worden ongeveer 40 ml in 7 minuten overgedestilleerd. Deze duur bleek bevredigend te zijn, daar alle TVB in ongeveer 5 minuten overgedestilleerd is. De hoeveelheden destillaat (40 ml) en boorzuur (10 ml) dienen echter niet nauwkeurig afgemeten te worden en het gebruik van een maatkolf van 50 ml is overbodig. Een erlenmeyer van 250 ml kan rechtstreeks worden gebruikt.



In de MgO-metode worden ongeveer 120 ml in 12 minuten overgedestilleerd. Praktisch alle TVB komt in 5 minuten over. Controleproeven toonden trouwens aan dat zuivere ammoniak, TMA, methylamine en dimethylamine in minder dan 5 minuten volledig overkomen.

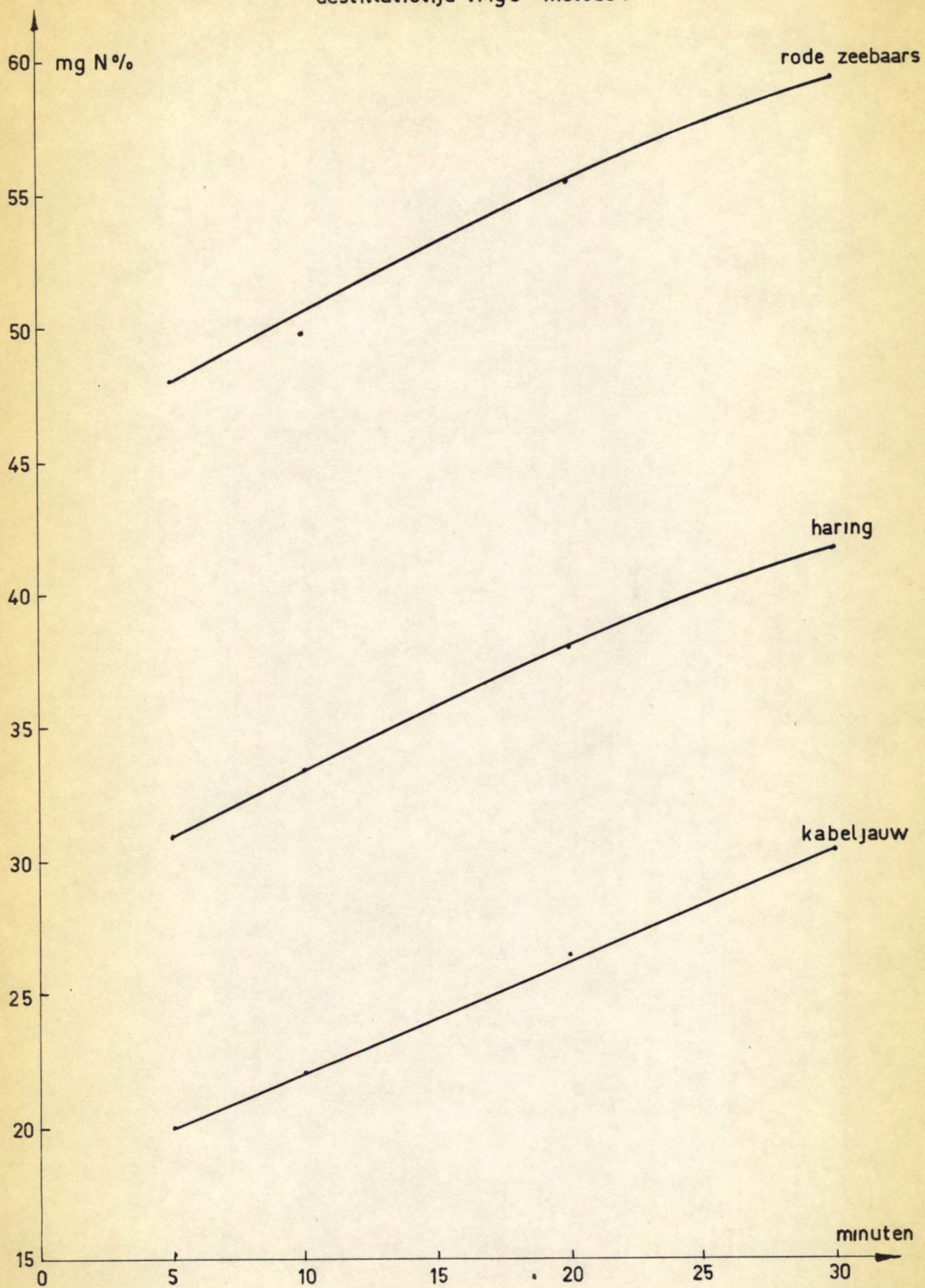
Magnesiumoxyde, dat een zwakke base is, heeft slechts een beperkte invloed op de eiwitafbraak : tussen 5 en 20 minuten wordt 0,5 mg N % ($\pm 0,1$ mg) per minuut overgedestilleerd ; tussen 20 en 30 minuten wordt dit ca 0,4 mg N % per minuut. Deze hoeveelheden blijken onafhankelijk van de vissoort en van de beginkoncentratie aan TVB te zijn ; zij zijn daarenboven zeer reproduceerbaar (figuur 4). Het is echter noodzakelijk een bepaalde destillatietijd ± 1 minuut in acht te nemen. In principe kan gelijk welke duur boven de 5 minuten worden genomen, maar de 12 minuten die door Antonacopoulos (11) werden voorgesteld en ook in ons laboratorium van het Rijksstation voor Zeevisserij worden in acht genomen, blijken praktisch te zijn.

3.4. Centrifugeren en filtreren.

In de voorgestelde Codex-metode wordt de vis met 7,5 % trichloorazijnzuuroplossing in een mixer gehomogeniseerd, gefiltreerd en gecentrifugeerd. Er werd onderzocht of filtreren alleen niet voldoende zou zijn.

Toepassing van de statistische methode van de gepaarde vergelijkingen (15) toonde aan, dat centrifugeren gemiddeld gezien een hoger resultaat geeft, nl. 0,24 mg N % ; dit verschil blijkt echter niet significant te zijn. Dezelfde standaardafwijkingen worden bekomen, hetgeen erop wijst dat de reproduceerbaarheid door centrifugeren niet verhoogt.

Figuur 4 - Vermeerdering van de TVB in functie van de
destillatietijd (MgO -metode)



4. Besluiten.

Alhoewel de reproduceerbaarheid iets lager is, biedt de MgO-metode meer voordelen dan de Codex-metode. Zij wordt slechts in vier fazen uitgevoerd : afwegen van het vismonster en overbrengen in de destillatiekolf, toevoegen van MgO (niet nauwkeurig), destilleren en titreren.

De Codex-metode echter vereist negen fazen : afwegen van het vismonster, toevoegen van juist 200 ml trichloorazijnzuuroplossing, homogeniseren, filtreren, centrifugeren, pipeteren van een hoeveelheid filtraat in de destillatiekolf, toevoegen van een gemeten hoeveelheid NaOH-oplossing, destilleren en titreren.

De Codex-metode kan evenwel worden vereenvoudigd, door rechtstreeks een erlenmeyer te gebruiken als titreervat en het centrifugeren weg te laten.

Literatuur.

- (1) Soudan, F. (1965) : La Conservation par le Froid des Poissons, Crustacés et Mollusques, J.B. Baillière et Fils, Paris.
- (2) Watson, D. (1939) : J. Fish. Res. Bd. Can. 4, 252 en 267
- (3) Tarr, H. (1940) : J. Fish. Res. Bd. Can. 5, 187.
- (4) Dyer, F. en Wood, A. (1947) : J. Fish. Res. Bd. Can. 7, 17.
- (5) Takada, K. en Nishimoto, J. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 24, 636.
- (6) Dyer, W. en Mounsey, Y. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can. 6, 359
- (7) Hughes, R. (1958) : Nature 181, 1281.
- (8) Conway, E. (1962) : Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 5de Uitg., Crosby Lockwood & Son, London.
- (9) Lücke, F. en Geidel, W. (1935) : Zeitschr. f. Lebensm. - Unters. 70, 441.

- (10) Antonacopoulos, N. (1960) : Z. Lebensmitt.-Untersuch. 113, 113.
- (11) Antonacopoulos, N. (1968) : in : Handbuch der Lebensmittel-
chemie, Vol. III/2. Springer Verlag, Berlin.
- (12) Vyncke, W. (1964) : De objektieve kwaliteitsbepaling van vis,
Ministerie van Landbouw, Proefstation voor Zeevisserij,
Oostende, publikatie 5.
- (13) Codex Committee on Fish and Fishery Products, Codex Fish
1/7.
- (14) Hartley, H. (1950) : Biometrika 37, 308.
- (15) Bauer, E. (1960) : A Statistical Manual for Chemists,
Academic Press, New York.

Samenvatting.

De methode van Lücke en Geidel (9) waarbij de TVB door toevoeging van magnesiumoxyde wordt vrijgesteld en in een door Antonacopoulos voorgesteld apparaat wordt overgedestilleerd (10), werd vergeleken met de methode door het Visserijkomité van de Codex Alimentarius (FAO/WHO) voorgesteld en waarin de eiwitten eerst worden neergeslagen.

De reproduceerbaarheid van beide methoden was zeer bevredigend, nl. 2 % voor de Codex-methode en 3,5 % voor de MgO-methode. De korrelatiekoefficiënt bedroeg 0,99 hetgeen op een hoge graad van overeenkomst wijst.

Noch de vissoort (kabeljauw, rode zeebaars en haring) noch het vetgehalte hadden een invloed op de TVB-bepaling.

In het algemeen biedt de MgO-methode in de uitvoering van Antonacopoulos (11) meer voordelen dan de Codex-werkwijze en kan voor de objektieve kwaliteitsbepaling van vis zeer aanbevolen worden.

Bijlage 1 - MgO-metode volgens Antonacopoulos.

- Reagentia :

- Magnesiumoxyde, zuiver
- Zwavelzuur 0,1 N
- Boorzuur 3 %
- Gemengde indikator voor stikstoftitraties (Merck)
- Silikoon-antischuimmiddel (UCB)

- Werkwijze :

De vis wordt door een vleesmolen gedraaid en zorgvuldig dooreengemengd. Een homogeen monster van 10,0 g wordt in de reaktiekolf gebracht ; ca 2 g MgO en een weinig antischuimmiddel worden toegevoegd en de koeler, waarvan het uiteinde dompelt in 20 ml 3 % boorzuur, wordt onmiddellijk aangesloten. Van zodra het water in de stoomgenerator begint te koken, wordt de kraan gesloten en de destillatie 12 minuten doorgevoerd. Na afspoelen van de koelerbuis worden een achttal druppels indikator toegevoegd en de TVB met 0,1 N zwavelzuur getitreerd, met behulp van een semi-mikroburet (10 ml onderverdeeld in 0,05 ml).

Bijlage 2 - TVB-Metode van Lücke en Geidel (9).

- Prinzip :

Das basische Destillat aus einer mit Wasser und MgO versetzten Untersuchungsprobe wird in überschüssig vorgelegter Säure bekannten Gehaltes aufgefangen. Durch Rücktitration des Säureüberschusses wird der basische Stickstoff bestimmt und ausgedrückt als mg basische Stickstoff in 1 kg der Probe.

- Reagentien :

- MgO,
- Antischaummittel (Oktylalkohol, Silicon oder Paraffinöl),
- 0,1 n Schwefelsäure,
- 0,1 n Natronlauge,
- Phenolphthalein als Indikator.

- Ausführung :

5 bis 10 g der zerkleinerten Untersuchungsprobe werden (auf Zentigramme genau !) abgewogen, mit 300 ml Wasser und 1 bis 2 g geglühtem MgO versetzt und destilliert. Zur Vermeidung des Schäumens werden einige Tropfen Oktylalkohol, Silicon oder einige ml Paraffinöl oder ein Stückchen geraspелtes Paraffin zugegeben. Die Dauer der Destillation beträgt 35 min, davon 10 min zum Anheizen und 25 min zur Destillation. Die übergehenden flüchtigen basischen Verbindungen werden in überschüssiger 0,1 n Schwefelsäure aufgefangen und nach Rücktitration des H_2SO_4 -Überschusses auf Stickstoff umgerechnet : 1 ml 0,1 n Schwefelsäure = 1,4 mg Stickstoff. Das Resultat wird in mg/kg basischer flüchtiger Stickstoff ausgedrückt. Die Arbeitsvorschrift ist genau einzuhalten !.

PRINCIPE DE LA METHODE :

- Extraction :

On utilise une solution à 7,5 % d'acide trichloracétique (T.C.A.) pour obtenir un extrait de poisson libre de protéines.

- Récupération de l'azote basique :

Après centrifugation et filtrage, on rend l'extrait alcalin et on récupère l'azote volatil basique par distillation à la vapeur.

- Titrage :

On titre 40 ml de distillat, rassemblés dans un récipient contenant 10 ml d'acide borique, avec l'acide sulfurique à 0,01 N en utilisant un indicateur mixte vert de brome crésol - rouge de méthyle.

REACTIFS :

(1) Solution d'acide trichloracétique à 7,5 % - 75 grammes d'acide trichloracétique dissous, volume porté à 1000 ml par addition d'eau distillée.

(2) Acide sulfurique - 0,01 N.

(3) Acide borique - 20 grammes d'acide borique dissous dans 500 ml d'eau chaude. Après refroidissement, ajouter 2 ml de rouge de méthyle - vert de brome crésol (1 partie de rouge de méthyle alcoolique à 0,2 % avec 5 parties de vert de brome crésol alcoolique à 0,2 %).

(4) Hydrate de sodium à 10 % - Dissoudre 100 grammes d'hydrate de sodium, qualité réactif, dans 1000 ml d'eau distillée.

APPAREILS :

- (1) Balance analytique avec précision de 1/10 gramme.
- (2) Appareil mélangeur - Capacité 500 ml.
- (3) Moteur du mélangeur.
- (4) Centrifugeuse atteignant 2-3000 t.p.m.
- (5) Entonnoir de Buchner et flacons d'aspirateurs.
- (6) Appareil à vide. Ejecteur d'air applicable à robinet d'eau.
- (7) Appareil à micro-distillation de Kjeldahl p. ex. Scientific Glass Co. No. Cat. J.M. 4250
- (8) Transformateur variable - 110 volts.
- (9) Micro burette - 10 ml graduée jusqu'à 0,01 ml avec réservoir.
- (10) Flacons volumétriques - 50 ml.
- (11) Flacons d'Erlenmayer - 300 ml.
- (12) Pipettes - 5 ml, 10 ml, et 25 ml, volumétriques.
- (13) Béchers - 200 ml.
- (14) Bouteille à lavage - Eau distillée.
- (15) Agitateur magnétique - aimants.

PREPARATION DES ECHANTILLONS :

Avec une balance analytique peser 100 grammes de muscle de poisson. Introduire l'échantillon dans un pot de mélangeur et ajouter 200 ml de solution de T.C.A. à 7,5 %. Mélanger pendant 3 minutes. Verser le mélange dans des tubes de centrifugeuse et centrifuger pendant 5 minutes à 2000 t.p.m. Ecrémer les matières ressemblant à du lait caillé et filtrer,

au papier filtre Whatman no. 3, à travers un entonnoir Buchner, les produits qui surnagent. Transférer le filtrat dans un flacon Erlenmayer de 300 ml avec bouchon conique standard.

DISTILLATION DE L'AZOTE BASIQUE VOLATIL :

Transporter avec une pipette 10 ml d'une solution d'acide borique dans un flacon volumétrique de 50 ml et placer le flacon sous l'extrémité du condenseur. Transférer à l'aide d'une pipette 25 ml de l'extrait T.C.A. de poisson dans la chambre intérieure de l'appareil de distillation Micro-Kjeldahl. Evacuer l'extrait T.C.A. de poisson avec 2-3 ml d'eau distillée. Avec une pipette graduée de 10 ml, ajouter exactement 6 ml d'une solution de NaOH à 10 %. Evacuer la NaOH avec 2-3 ml d'eau distillée. Mettre en marche les réchauffeurs actionnant le générateur de vapeur et fermer immédiatement les deux robinets d'arrêt du dispositif de distillation. Régler le flacon volumétrique de 50 ml contenant la solution d'acide borique de manière que l'extrémité du condenseur soit en dessous de la surface du liquide dans le flacon. Continuer la distillation jusqu'à ce que le niveau du liquide dans le flacon récepteur approche la marque de 50 ml. Abaisser alors le flacon de manière que l'extrémité du condenseur soit au-dessus du niveau du distillat, et distiller jusqu'à la marque. Enlever le flacon et couper le courant des réchauffeurs.

TITRAGE :

Transférer le distillat dans un flacon Erlenmayer de 250 ml ; rincer à l'eau distillée le flacon volumétrique en ajoutant l'eau de lavage au distillat. Placer l'aimant dans l'Erlenmayer de 250 ml ; en utilisant un agitateur magnétique, titrer le distillat avec H_2SO_4 à 0,01 N jusqu'à décoloration finale. Utiliser une micro-burette de 10 ml graduée à 0,01 ml.

ELEMENT VIERGE :

Placer 25 ml d'une solution à 7,5 % de T.C.A. dans la chambre intérieure de l'appareil à distillation. Ajouter 6 ml de NaOH à 10 %, en lavant avec environ 4 ml d'eau distillée, et distiller dans une solution de 10 ml d'acide borique ; recueillir 40 ml de distillat, Titrer avec H_2SO_4 à 0,01N comme lors du titrage de l'échantillon.

EXPRESSION DES RESULTATS :- Calculs :

Soit A = nombre de ml de H_2SO_4 à 0,01 N utilisés pour titrage de l'échantillon de distillat.

Soit B = le nombre de ml de H_2SO_4 à 0,01 N utilisés pour titrage du distillat vierge.

Dans ces conditions, $A - B = C$ = nombre de ml de H_2SO_4 à 0,01 N utilisés pour la neutralisation de l'azote basique dans le distillat.

Nombre de mg N/100 grammes poisson = $C \times 0,14 \times \frac{300}{25}$

NOTES SUR LA METHODE SUIVIE :- Appareil de lavage :

En utilisant le vide induit à l'intérieur de l'appareil de distillation par le refroidissement, on peut effectuer le lavage immédiatement en une courte période de temps.

Aussitôt la distillation d'un échantillon terminée, on coupe le réchauffeur. Les deux robinets d'arrêt étant

fermés, tout liquide pouvant se trouver dans la chambre intérieure va siphonner dans la chambre extérieure d'où il peut être extrait au moyen du robinet d'arrêt de drainage. Les deux robinets d'arrêt étant ouverts, on peut ajouter de l'eau de rinçage à la chambre intérieure. Lorsqu'on ferme les deux robinets d'arrêt, le liquide se trouvant dans la chambre intérieure siphonne dans la chambre extérieure. Trois rinçages peuvent être effectués en très peu de temps. On ajoute alors de l'eau distillée à la chambre intérieure, les réchauffeurs étant en marche et les deux robinets d'arrêt fermés, et on distille environ 50 ml de distillat. Il est ainsi certain que toutes les substances volatiles provenant des siphons supérieurs et du condenseur ont été évacuées. La durée du lavage complet est d'environ 12 minutes ; on peut, pendant ce temps, effectuer les titrages.

Taux de distillation - 40 ml de distillat en 7 minutes.

