

FISKERIDIREKTORATETS SKRIFTER

Serie Undersøkelser ved Statens Fiskeriforsøksstasjon
(Fortsettelse av Serie Teknologiske Undersøkelser)

Reports from the Norwegian Fisheries Research Laboratory
Vol. I, No. 6

Published by the Director of Fisheries

Undersøkelser over analysemetoder for
ammoniakk og metylaminer i fisk

Investigations on Analytical Methods for
Estimation of Ammonia and Methylamines in Fish

Av

Sverre Hjorth-Hansen og Kåre Bakken

Avdeling for Mikrobiologi

1 9 4 7

A.s John Griegs Boktrykkeri, Bergen

Innholdsfortegnelse.

	Side
<i>Innledning</i>	5
A. <i>Forskjellige utdrivingsmåter</i>	8
1. Destillasjon	8
Atmosfæretrykk	8
Anvendelse av forskjellige alkaliseringsmidler	12
Vakuum	14
2. Luftgjennomledning	17
Luftmengde og lufthastighet	18
Oppløsningens volum	19
Alkaliseringsmidler	19
3. Diffusjon i lukket system	21
B. <i>Anvendelse av vannekstrakter og sera</i>	25
1. Framstilling av vannekstrakter	25
2. Framstilling av sera	26
Framstilling av jernsera	27
Ekstraksjonstidens innflytelse på innhold av flyktig N i jernsera ..	28
Avspalting av flyktig N	29
Anvendelse av forskjellige alkaliseringsmidler	30
Holdbarheten av jernsera	31
Volumforholdene ved framstilling av sera	32
C. <i>Anvendelse av farseoppslemninger</i>	34
D. <i>Atskillelse av de flyktige N-baser</i>	36
1. Kolorimetriske bestemmelser	37
Trimetylamin	37
Dimetylamin	37
Ammoniakk	38
2. Flyktige N-basers reaksjon med salpetersyrling	39
3. Flyktige N-basers reaksjon med formaldehyd	41
Formoltitrering av ammoniakk	42
Formoltitrering av monometylamin	42
Formoltitrering av ammoniakk og monometylamin i blanding	43
Formoltitrering av dimetylamin	44
Destillasjon av et ammoniumsalt etter tilsetning av formaldehyd ..	46
E. <i>Om prøvetaing</i>	49
F. <i>Framgangsmåte ved bestemmelse av flyktig N i fisk</i>	51
1. Framstilling av jern- og syreserum	51
2. Destillasjon	51
3. Titrering	51
4. Utregning av resultater	52
G. <i>Lagringsforsøk</i>	53
H. <i>Sammendrag</i>	61
I. <i>Summary</i>	63
J. <i>Litteratur</i>	65

Innledning.

Ved kontrollen av lettbederverlige matvarer, som råfisk, er en objektiv metode til påvisning av varens friskhetstilstand nødvendig, ikke bare for å hindre at svakt bedervete matvarer når konsumenten, men også for å kunne forutsi hvor lenge fisken kan holde seg frisk under forskjellige betingelser, for eksempel ved forsendelse og oppbevaring på is, (BOURY og SCHWINTE 1935, BEATTY og GIBBONS 1936—1937, NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og KARLSEN 1942 og DYER og MOUNSEY 1945). Ved tilvirkningen av ethvert foredlet fiskeriprodukt er også en slik metode ønskelig, da kvaliteten selvsagt er avhengig av råstoffets friskhetstilstand. Uteksperimentering av en slik metode har bydd på visse problemer, som beror på vanskelighetene med å finne et kjemisk stoff i fiskemuskulaturen, et stoff hvis mengde til enhver tid står i en viss relasjon til fiskens friskhetstilstand og dertil ikke minst på vanskelighetene med å bestemme dette stoff analytisk på grunn av fiskekjøttets kompliserte sammensetning.

Da det er bakterier som ødelegger fiskekjøttet, skulle man vente at bestemmelse av antall bakterier i fiskekjøttet var den mest gunstige metode til fastleggelse av dets friskhet. Dyrkingen av bakterier tar dog alt for lang tid til at metoden kan anvendes i praksis, og det har også vist seg at bakterietelling i slike *halvflytende* medier som fisk ikke blir nøyaktige nok, (BEATTY og GIBBONS 1936—1937). I stedet for å bestemme bakterieantallet direkte blir man da henvist til å bestemme mengden av kjemiske stoffer som dannes av bakteriene. Bakteriernes nedbryting av fiskekjøttet kan man tenke seg foregå i 2 stadier:

Stadium 1. Spalting av melkesyre, kullhydrater og lavmolekylære organiske stoffer.

Stadium 2. Nedbryting av aminosyrer og protein.

Stadium 2 setter først inn ved en framskreden bederverelse, og de kjemiske stoffer som dannes ved bakterievirksomheten i stadium 2 kan derfor ikke tjene som indisium på friskheten. Den, i hvert fall tidligere mest anvendte metode til fastsettelse av fiskens friskhetstilstand, var bestemmelse av »flyktig N«, eller »ammoniakk« som det

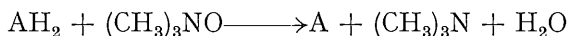
ofte feilaktig blir kalt. Som vist i tidligere arbeider (NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og KARLSEN 1942, NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og BAKKEN 1944) og påpekt senere i dette arbeid, vil mengden av ammoniakk i fisk lagret i is i den første del av lagringsperioden gå tilbake, og først nå opp i utgangsverdien etter at den er lagret over en uke i is. Den alt overveiende mengde ammoniakk må antas å dannes først i stadium 2 og således være uskikket som uttrykk for fiskens friskhetstilstand.

Det mest karakteristiske produkt som dannes som følge av bakterievirksomheten i stadium 1, og som gir oss et utmerket middel til å fastslå fiskens friskhetstilstand, er *trimetylamin*. Dette stoff dannes utelukkende som følge av bakterievirksomhet, idet BEATTY og GIBBONS (1936—1937) har vist at der ikke dannes trimetylamin som følge av autolyse eller kjemiske reaksjoner i fiskekjøtt. Kilden til dette trimetylamin er *trimetylaminoksyd* som forekommer i varierende mengder i de forskjellige fiskearter.

De viktigste av de bakterier som forekommer på fisk og ødelegger denne ved lavere temperatur er arter tilhørende slekten *Achromobacter*. Disse kan inndeles i 2 grupper: 1) fakultative anaerobere (reducerer trimetylaminoksyd) og 2) obligate aerobere (reducerer ikke trimetylaminoksyd), (WATSON 1939). De trimetylaminoksyd-reducerende bakterier inneholder et enzym som aktiverer oksydet slik at det blir redusert av cellenes dehydrogenase-systemer. TARR (1940) har vist at dette enzym er spesifikt for *trialkylaminer*, og gitt det navnet »triaminoksydase«. Andre forbindelser som inneholder trimetylamingruppen, som betain, cholin, acetylcholin, ergothionein samt stachydrin avspalter *ikke* trimetylamin under de samme betingelser. Trimetylamin i fiskekjøtt må altså antas, i et hvert fall for den alt overveiende dels vedkommende, å stamme fra trimetylaminoksyd.

Dannelsen av trimetylamin fra dets oksyd må tenkes å foregå etter skjemaet:

Triaminoksydase



hvor AH_2 — vannstoffdonatoren — kan være for eksempel melkesyre, glykose og liknende som da spaltes av bakteriene.

Da ikke alle bakterier som ødelegger fisken er trimetylaminoksydspaltere, kunne man gjøre den innvending at verdien av trimetylamin som mål for bedervelsen var begrenset, da den var avhengig av en mer eller mindre tilfeldighet i arten av bakterieinfeksjonen. TARR (1939) har således, ved å infisere steril fiskemuskel med ikke-trioks-spaltere, fått fisken bedervet uten at der samtidig ble dannet trimetylamin.

Men i alminnelighet må man gå ut fra, inntil det motsatte er blitt bevist, at bakteriefloraen på fisk som har gått gjennom de vanlige distribusjonskanaler fra den ble trukket opp av sjøen, er forholdsvis ensartet sammensatt, og at derfor trimetylamininnholdet står i en bestemt relasjon til fiskens friskhet.

Da således grunnlaget for trimetylamins anvendelighet som mål for fiskens friskhet skulle være vel teoretisk begrunnet, blir da oppgaven å finne fram til en analytisk metode som gir et korrekt uttrykk for den mengde trimetylamin som i analyseøyeblikket foreligger i fiskekjøttet i form av flyktig N.

De vidt forskjellige verdier for flyktig N og trimetylamin-N som finnes angitt i litteraturen for fisk av noenlunde samme beskaffenhet, skyldes forskjellig og oftest feilaktig analysemetodikk, og det er forbausende hvor lite arbeid det er nedlagt i utforskningen av selve analysemetodikken.

I nærværende arbeid vil bli behandlet de inngående undersøkelser vi har foretatt over de forskjellige metoder til bestemmelse av flyktig N, og der foreslås en metode som gir et analytisk riktig uttrykk for fiskekjøttets innhold av total flyktig N, ammoniakk-N og trimetylamin-N.

A. Forskjellige utdrivingsmåter.

De forskjellige metoder hertil som har vært foreslått og som vi har prøvet, er følgende:

Destillasjon ved vanlig lufttrykk.

Destillasjon i vakuum ved lav temperatur.

Utdriving av det flyktige N ved luftgjennomledning ved værelses-temperatur.

Diffusjon i flate, lukkede skåler.

Vi vil i det følgende behandle hver enkelt av de nevnte metoder i den utstrekning de av oss har vært gjenstand for nærmere undersøkelser.

1. DESTILLASJON.

Atmosfæretrykk.

Den enkleste og vel hyppigst anvendte metode til bestemmelse av flyktig N i fisk og fiskemel består i innveining av en bestemt mengde fiskefarse resp. fiskemel som oppslemmes i vann. Der destilleres over i et forlag med kjent mengde syre, etter at oppslemningen er gjort alkalisk med et mildt alkaliseringsmiddel. Som regel benyttes brent magnesia. Noen nærmere forskrifter angående destillasjonens varighet eller intensitet blir som regel ikke nærmere presisert eller bare høyst svevende. Således foreskrives for eks. i »Den departementale analysekomités« forslag nr. 2 til analyse av for- og gjødselstoffer, Kristiania (1924), ved bestemmelse av »lett avspaltbart kvelstoff« (for eks. i sildemel) en destillasjonstid som angis til »30 min. etter at *forlaget* er kommet i kok«, et tidspunkt som er vanskelig å kontrollere da man slett ikke behøver å koke så kraftig at *forlaget* overhodet begynner å koke.

At destillasjonstiden spiller en vesentlig rolle ved destillasjon av slike oppslemninger som inneholder eggehvitestoffer og andre N-holdige stoffer som lett spaltes selv av et så mildt alkaliseringsmiddel som MgO, skulle være innlysende og vil tydelig framgå av fig. 1. Fig. 1 gjengir destillasjonstidskurver for en oppslemning av 5 g fiskemel i 250 ml vann, resp. 20 g seiefarse i 230 ml vann og MgO som alkaliserings-

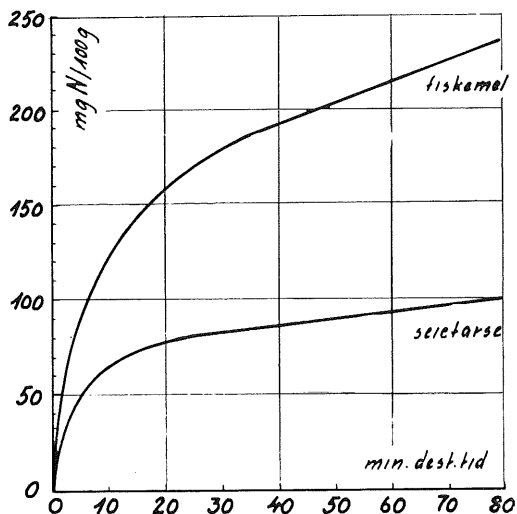


Fig. 1.

Destillasjonstidskurver for fiskefarse og fiskemel.

Distillation of Minced Fish Muscle and Fish Flour.

middel. Oppvarmingen ble regulert slik at innholdet i *destillasjonskolben* kom i kok etter 12—13 min. oppvarming. Destillasjonstiden er da tiden fra det tidspunkt da innholdet i *destillasjonskolben* begynner å koke.

Som det vil framgå av fig. 1 stiger kurvene for flyktig N under hele destillasjonen som tegn på at der avspaltes flyktig N etter hvert (fra eggehvitestoffer m.m.), og man kan av kurvene ikke slutte seg til et tidspunkt da man kan si at destillasjonen er ferdig.

For å få sammenliknbare resultater må man da enten avbryte destillasjonen etter en vilkårlig valgt destillasjonstid, eller man må finne den nødvendige destillasjonstid for de forskjellige flyktige N-baser fra vandige oppløsninger. Dessuten må man hindre at det under destillasjonen dannes flyktige baser fra eggehvitestoffer og andre kilder. Det flyktige N som går over ved destillasjonen vil da være det som opprinnelig forelå som sådant. Bare den siste metode kan gi riktige resultater.

Det første man da må ha klarlagt er hvor *lenge* eller hvor *intense* man må destillere for at det flyktige N som finnes i en vandig oppløsning skal være destillert over med en viss nøyaktighet under givne destillasjonsbetingelser.

EGNÉR og JOHANSSON (1938) behandler i et arbeid de teoretiske lover for destillasjon av ammoniakk fra vandige oppløsninger.

For nøyaktigheten av en slik destillasjon kan settes opp følgende uttrykk:

$$\log M/M_0 = F/k \cdot \log (1 \div v_1/v_0) = Q \cdot \log (1 \div v_1/v_0)$$

hvor:

M = ammoniakk i destillasjonskolben ved vilkårlig valgt tidspunkt.

M_0 = opprinnelig mengde ammoniakk.

F = Henry's lovs konstant.

$k = \frac{\text{vol.vekt av mettet damp}}{\text{vol.vekt av vann}}$

$Q = F/k =$ konstant avhengig av forsøksbetingelsene (for eks. saltkonsentrasjonen, alkalioverskudd osv.).

$v_1 =$ volum vann som er destillert over.

$v_0 =$ opprinnelig volum vann.

Som man ser avhenger nøyaktigheten (M/M_0) av en destillasjon, av forholdet mellom mengde destillat (v_1) og opprinnelig væskevolum (v_0) samt av forsøksbetingelsene ellers (Q).

Ved destillasjon av en ren ammoniakk-oppløsning skulle Q teoretisk ha en verdi av 12,7. Men ved slike destillasjoner som omhandles i nærværende publikasjon, vil der alltid være en større eller mindre mengde nøytralsalt og overskudd av alkaliseringsmiddel tilstede, og Q vil alltid være større enn 12,7. Således finner EGNÉR og JOHANSSON ved destillasjon med MgO som alkaliseringsmiddel verdier for Q mellom 14,2—14,6. Ved en Kjeldahldestillasjon hvor mye nøytralsalt og overskudd av natronlut er tilstede, kan Q anta verdier som er dobbelt så høye, slik at man ved en MgO-destillasjon må destillere av dobbelt så meget som ved en Kjeldahldestillasjon.

Nå er det imidlertid vanlig at man ved destillasjon av flyktig N ikke bruker vannkjøling, men WAGNERS apparat uten kjøling. Det er da vanskelig å bestemme volumet av destillatet da der jo stadig damper bort vann fra forlagskolben. Det er da hensiktsmessig istedenfor en viss *destillat-mengde* å bestemme seg for en viss *destillasjonstid*, skjønt tiden i og for seg ikke er det avgjørende. Man må da innregulere oppvarmingskilden slik at det i løpet av en viss tid ved alle analyser går over tilnærmet samme mengde destillat, og at væskevolumet i destillasjonskolben er det samme.

Vi har funnet at et væskevolum av 250 ml i destillasjonskolben er mest hensiktsmessig, og oppvarmingen reguleres da slik at disse 250 ml kommer i kok i løpet av 12—13 minutter. *Destillasjonstiden* er da tiden fra væsken i *destillasjonskolben* begynner å koke til destillasjonens avbrytelse.

For å finne den nødvendige destillasjonstid for de flyktige N-baser det her er tale om, ble opptatt destillasjons-tidskurver for de forskjellige aminer. Som destillasjonskolbe benyttes en 750 ml Erlenmeyerkolbe og til forlaget en 300 ml Erlenmeyerkolbe. Ellers vil apparatoppstillingen framgå av fig. 2. Som alkaliseringsmiddel ble benyttet magnesiumoksyd

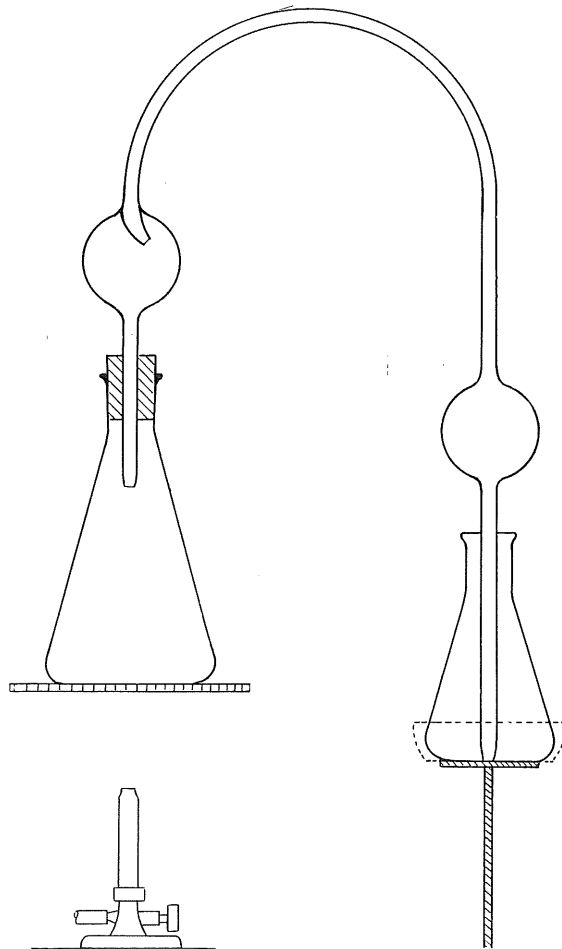


Fig. 2.

Apparatoppstilling for
destillasjon ved atmos-
færetrykk.

Arrangement of Distillation
Apparatus, Atmospheric
Pressure.

(1/2 g brent MgO er tilstrekkelig) og mengde av N-base til hvert forsøk var ca. 2,5 millimol. Resultatet framgår av fig. 3.

Som en ser av fig. 3 destillerer trimetylamin hurtigst over. Etter ca. 30 min. skulle dette amin være kvantitativt destillert over, ammoniakk krever ca. 40 min. mens di- og mono-metylamin destillerer svært langsomt over.

Men da mono- og di-metylamin bare finnes i forsvinnende små mengder i fisk i forhold til ammoniakk og trimetylamin, kan man se bort fra dem ved fastsettelsen av den nødvendige destillasjonstid.

En ser altså at en *destillasjonstid på 45 min.* er tilstrekkelig til en kvantitativ overdestillering av de flyktige N-baser fra et oppløsningsvolum av 250 ml under de før nevnte betingelser.

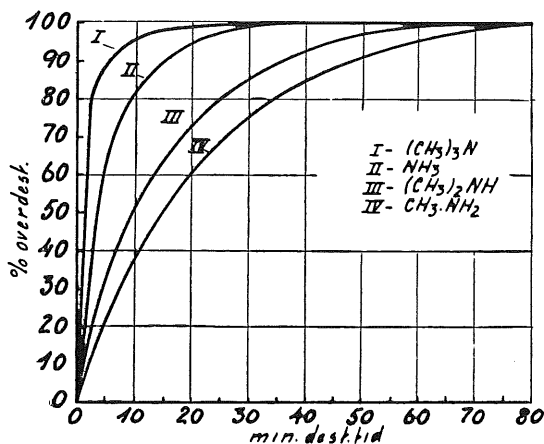


Fig. 3.

Destillasjonstidskurver for ammoniakk og metylaminer ved atmosfæretrykk.

Distillation of Ammonia and Methylamines, Atmospheric Pressure.

I fig. 4 er framstilt grafisk den mengde destillat man må destillere over fra et gitt oppløsningsvolum når man vil oppnå en viss nøyaktighet. Kurven gjelder destillasjoner av ammoniakkoppløsninger tilsatt overskudd av MgO, og er tegnet etter verdier beregnet av formelen

$$\log M/M_0 = Q \cdot \log (1 \div v_1/v_0)$$

med en verdi for $Q = 14,4$.

Som det vil framgå av fig. 4 må man for å oppnå en nøyaktighet på 99,9 %, destillere over ca. 38 % av oppløsningen.

Anvendelse av forskjellige alkaliseringsmidler.

Som det vil ha framgått av det foregående trenger ammoniakk i vandig oppløsning ca. 45 min. for kvantitativt å destillere over under gitte betingelser. Ser vi på kurvene i fig. 1 vil disse etter 45 min. stadig stige som tegn på at der dannes flyktig N under destillasjonen. Da en kan gå ut fra at spaltingen er foregått noenlunde jevnt under hele destillasjonsperioden, vil en altså etter 45 minutters destillasjon ha destillert over en god del mer flyktig N enn det en egentlig skal bestemme. (Som en skal komme tilbake til senere består dette avspaltete flyktige N både av ammoniakk og trimetylamin og mengden varierer noe for de forskjellige fiskeslag). MgO er på grunn av sin ringe oppløselighet i vann et mildt alkaliseringsmiddel. Mange har vært oppmerksom på at til tross for dette skjer der under bestemmelsen av flyktig N en spalting av eggehvitestoffene, og for å bøte på dette er det foreslått anvendt forskjellige andre alkaliseringsmidler enn MgO. Vi har prøvet en del forskjellige slike stoffer og vil nedenfor gjengi noen forsøk vi har gjort med destillasjoner av sildefarse med forskjellige alkaliserings-

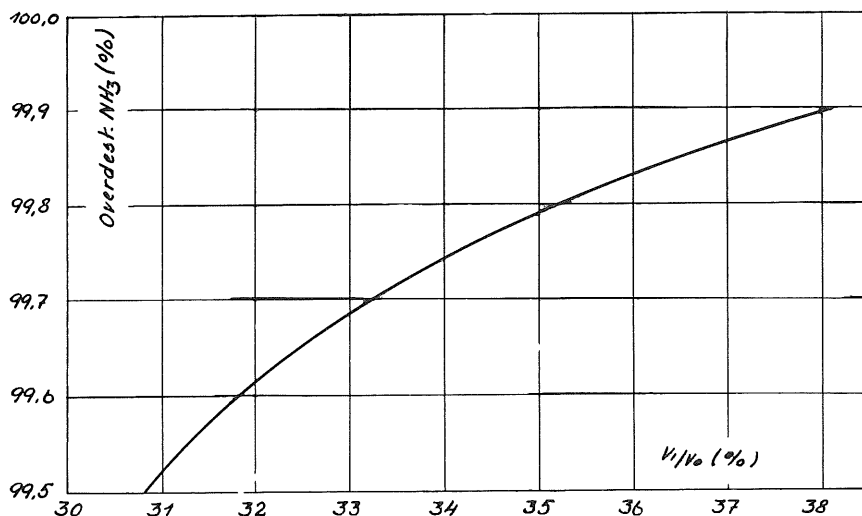


Fig. 4. Overdestillert mengde NH_3 i relasjon til V_1/V_0 .
Distilled Amount of NH_3 in Relation to V_1/V_0 .

midler. Atskillelse av de flyktige baser i destillatet er utført etter den senere beskrevne metode ved formoltitrering.

De forskjellige alkaliseringsmidler som er blitt prøvet, er følgende:

Base	Anvendt mengde
MgO	0,5 g
MgO . B ₂ O ₃ . 8aq	1,5 g
Ba (OH) ₂ . 8aq	1,0 g
Li ₂ CO ₃	0,5 g
CaO.....	0,5 g

20 g sildefarse oppslemmet i 230 ml vann tilsettes alkaliseringsmiddel. Destillasjonstid 45 min. Resultatet finnes i tabell 1.

Som det vil framgå av forsøket er MgO . B₂O₃ det mildeste av de alkaliseringsmidler som har vært prøvet. MgO gir resultater som ligger omtrent 5 mg tot.fl.N/100 g farse høyere. Da vi, som det vil bli vist senere, ved sammenlikning mellom destillasjoner av silde-farse og -serum er kommet til det resultat at MgO ved destillasjon av sildefarse gir resultater som ligger ca. 19 mg tot.fl.N/100 g farse for høyt ved en 45 min. destillasjon, vil altså også MgO.B₂O₃ gi altfor høye verdier ved destillasjon av sildefarse.

De andre alkaliseringsmidler som har vært prøvet er mer usikre i sine virkninger. Ba(OH)₂ gir resultater som snart ligger over, snart

Tabell 1. *Forskjellige alkaliseringsmidler ved destillasjon av farseoppslemninger.*

Distillation of Minced Muscle Suspensions with Different Alcalinizers.

	MgO	MgO . B ₂ O ₃	Ba(OH) ₂	Li ₂ CO ₃	CaO
Tot.fl.N (mgN/100g)					
Forsøk nr. 1	32	27	55	61	—
—>— 2	35	30	22	77	—
—>— 3	36	30	36	62	62
—>— 4	45	40	38	68	75
—>— 5	55	49	70	98	—
Trimetylamin (mgN/100 g)					
Forsøk nr. 1	8	6	20	23	—
—>— 2	10	8	5	33	—
—>— 3	10	8	11	24	24
—>— 4	17	14	14	28	33
—>— 5	19	15	26	40	—

under verdiene for MgO. Li₂CO₃ og CaO gir verdier som ligger langt over verdiene for MgO. Ved de tre siste alkaliseringsmidler var det også vanskelig å få parallellene til å stemme overens, slik at de må betraktes som utjenlige som alkaliseringsmidler ved destillasjon av sildefarse.

Da det altså viser seg umulig å bestemme flyktig N i fiskekjøtt ved vanlig destillasjon av farseoppslemninger, må man forsøke på annen måte å eliminere innflytelsen av eggehvitestoffene.

Vakuu.

Teorien for destillasjon i vakuum blir den samme som for destillasjon ved atmosfæretrykk. Men da destillasjonen foregår ved lavere temperatur, blir Q høyere, idet « k » forminskes hurtigere ved synkende temperatur enn « F ». EGNÉR og JOHANSSON finner for eksempel ved:

$$100^{\circ} \text{ C } \quad Q = F/k = 13$$

$$60^{\circ} \text{ C } \quad Q = F/k = 19$$

$$35^{\circ} \text{ C } \quad Q = F/k = 28$$

$$20^{\circ} \text{ C } \quad Q = F/k = 33$$

Også ved destillasjoner i vakuum er det lettere å kontrollere en viss destillasjonstid enn en viss destillatmengde, spesielt da en ved vakuumdestillasjoner ingen vanskeligheter har med å oppnå de samme destillasjonsbetingelser ved hver destillasjon idet den tilførte varmemengde er lettere å regulere og kontrollere.

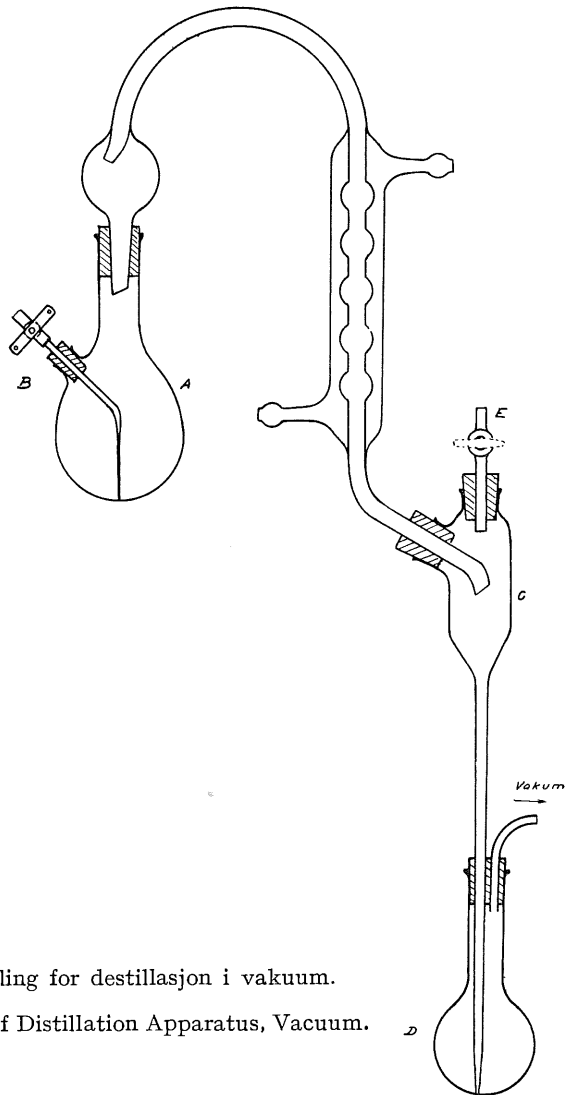


Fig. 5. Apparatoppstilling for destillasjon i vakuum.

Arrangement of Distillation Apparatus, Vacuum.

Fig. 5 viser den apparatoppstilling vi benytter ved vakuumdestillasjoner.

A. 300 ml destillasjonskolbe med tubus for innføring av kokekapillar (B).

C. Forstøt hvis spiss under destillasjonen befinner seg nede i forlagssyren.

D. Forlagskolbe, 100 ml.

E. Glasshane, som ved eventuell sjenerende skumdannelse i kokekolben åpnes forsiktig og hindrer at skum trenger opp i kjøleren og over i forlaget. Noen dråper octylalkohol vil for øvrig hindre skumdannelse. Når destillasjonen er ferdig, føres spissen av forstøtet opp

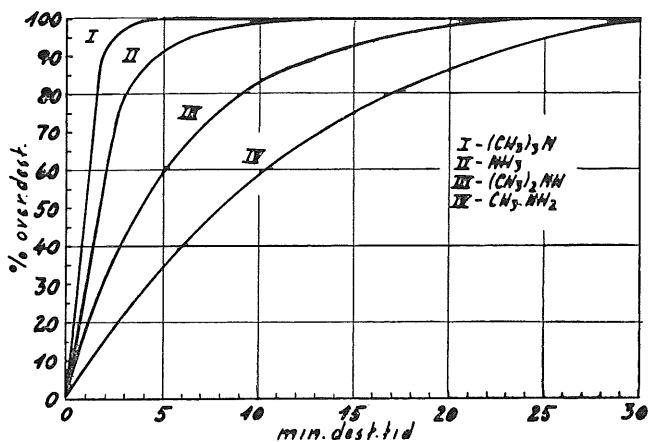


Fig. 6.
Destillasjonstidskurver for ammoniakk og metylaminer i vakuum.

Distillation of Ammonia and Methylamines, Vacuum.

av forlagssyren. Forstøtet blir lett gjennom gummipropen når man fukter med litt vann.

For å finne den nødvendige destillasjonstid ble utført destillasjonskurver for de forskjellige aminer. Mengde amin ved de forskjellige destillasjoner var ca. 1 millimol N og destillasjonsvolum 100 ml. Som alkaliseringsmiddel ble benyttet 0,5 g MgO. Destillasjonskolben sto under destillasjonen i et vannbad av 50° C, og trykket var 15 mm Hg.

Resultatet framgår av fig. 6.

En ser av kurvene i fig. 6 at trimetylamin destillerer hurtigst over. Etter 4—5 min. skulle dette være destillert over kvantitativt. Ammoniakk krever 13—14 min. mens di- og mono-metylamin bare destillerer langsomt over, hvilket også var tilfellet ved destillasjon ved atmosfæretrykk. Men da som tidligere nevnt de to siste aminer kvantitativt spiller liten rolle i fiskekjøtt, er vi blitt stående ved en destillasjonstid på 15 min. som tilstrekkelig til kvantitativt å destillere de flyktige baser i fiskekjøtt over ved de nevnte betingelser.

Vakuumdestillasjon er en hurtig og skånsom metode til å bestemme de flyktige baser i fiskekjøtt. Utførelsen krever en del øvelse og påpasselighet slik at det er vanskelig for én analytiker å ha en serie destillasjoner gående parallelt. Men til enkeltbestemmelser er den vel den hurtigste og eleganteste metode.

Slemmer man opp fiskefarse i vann — 20 g farse til 80 ml vann — og destillerer i vakuum som ovenfor beskrevet, finner en at der etter 15 minutters destillasjon ikke går over mer flyktig N. Eggehvitestoffene og andre stoffer vil altså ved destillasjon ved ca. 50° C ikke avspalte noe flyktig N, når MgO anvendes som alkaliseringsmiddel, og det N man bestemmer ved en 15 minutters destillasjon i vakuum er det som i analyseøyeblikket forelå i fiskekjøttet som flyktig N.

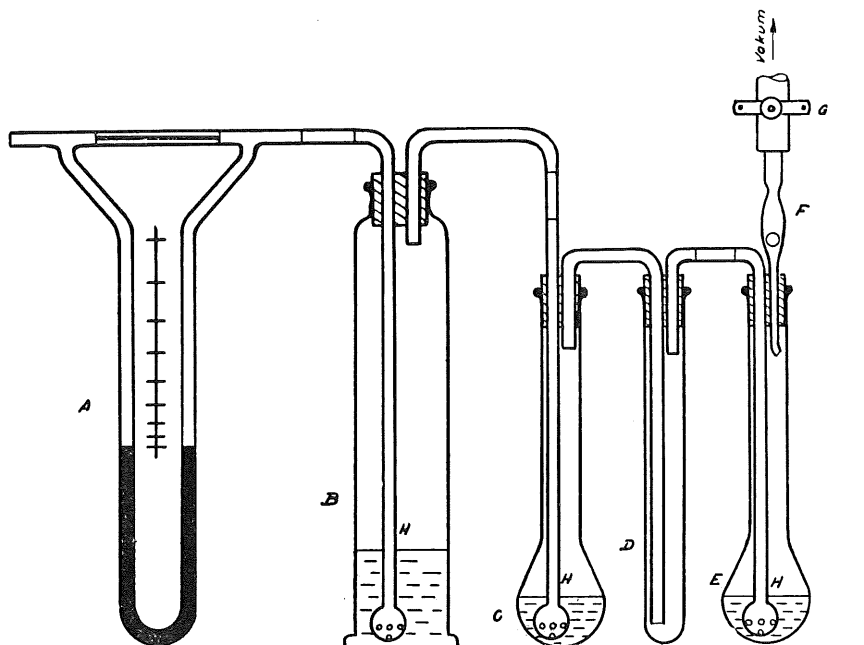


Fig. 7. Apparatoppstilling for gjennomlufting.
Arrangement of Apparatus, Aeration.

2. LUFTGJENNOMLEDNING.

Utdriving av flyktig N ved hjelp av luftgjennomledning har den fordel at «destillasjonen» kan foregå ved romtemperatur. Virkningen av alkaliseringsmidlet på eggehvitestoffer etc. blir da betydelig nedsatt, slik at man ikke risikerer å få avspaltet nevneverdige mengder flyktig N fra disse.

Metoden er opprinnelig foreslått for bestemmelse av ammoniakk i urin (FOLIN 1902). De fleste som har anvendt metoden synes imidlertid ikke å ha vært oppmerksom på at metodens nøyaktighet må baseres på måling av den luftmengde som ledes igjennom systemet. Foruten luftmengden spiller også luftens fuktighet inn, videre oppløsningens volum, alkaliseringsmiddel og saltkonsentrasjonen.

Innflytelse av de forskjellige faktorer skulle framgå av de forsøk vi har gjort med utlufting av ammoniakk under forskjellige betingelser, slik som beskrevet i det følgende:

Den apparatmessige oppstilling framgår av fig. 7. Her er:

A = kapillarmanometer til måling av luftmengden.

B = vaskeflaske med fortennet svovelsyre for å fjerne det flyktige N som den innsugete luft eventuelt måtte inneholde.

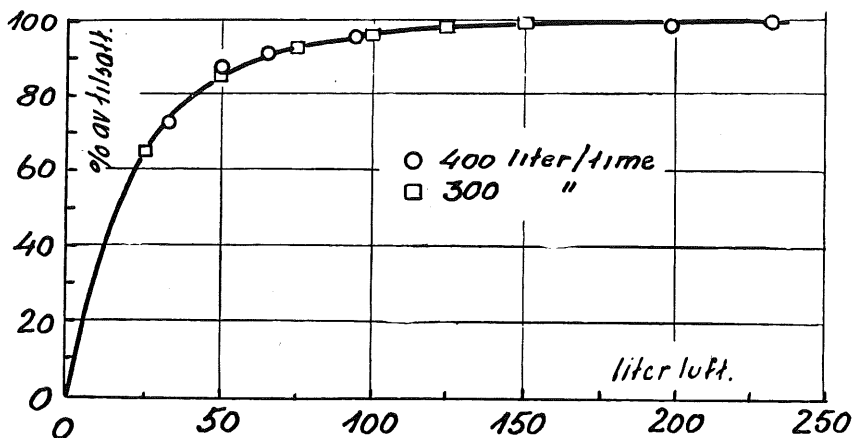


Fig. 8. Utlufting ved forskjellig lufthastighet.
Aeration at Different Air Velocities.

- C = oppløsningen, hvis innhold av flyktig N skal bestemmes.
 D = reagensglass med bomull for å hindre at dråpe-partikler fra den alkaliske oppløsning rives med over i forlaget.
 E = forlag.
 F = innsnevret glassrør med glassperle. Denne vil bevirke at eventuelt medrevne dråpepartikler fra forlaget slår seg ned på glassveggen, og kan spyles ned i forlaget.
 G = klemhane til regulering av luftstrømmen.
 H = glassrør hvis ene ende er utblåst til en kule med mange små hull. Luften vil strømme ut av hullene som små blærer, slik at utluftingen resp. absorpsjonen av ammoniakk i forlagssyren blir mer intens.

Luftmengde og lufthastighet.

At utluftingen avhenger av den *mengde* luft som ledes gjennom oppløsningen skulle være innlysende og ikke nødvendig å dokumentere.

Angående *lufthastigheten* så er den uten betydning så lenge *luftmengden* er konstant. Dette framgår tydelig av fig. 8.

Fig. 8 gjengir forsøk med utlufting av 10 ml ammoniumkloridopløsning tilsvarende 1 millimol N, med forskjellig lufthastigheter, 300 og 400 liter pr. time. Som alkaliseringsmiddel anvendes 5 ml mettet pottaskeopløsning slik at totalvolumet blir 15 ml. Som det vil framgå av fig. 8 spiller det ingen rolle om utluftingen skjer med en hastighet av 300 eller 400 liter pr. time, bare *luftmengden* er den samme hver gang.

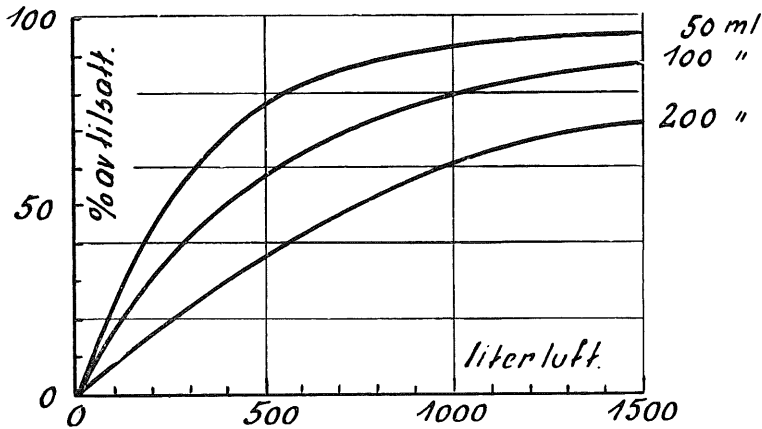


Fig. 9. Utlufting fra forskjellige volum.
Aeration from Different Volumes.

Oppløsningens volum.

Volumet av den oppløsning som skal utluftes er av avgjørende betydning. Jo større oppløsningsvolum, jo lenger tid tar utluftingen under ellers like betingelser. Dette framgår av fig. 9 som viser resultater av utlufting av 1 millimol ammoniakk-N fra forskjellige oppløsningsvolumer. Som alkaliseringsmiddel ble benyttet soda i en mengde av 5 g pr. 100 ml oppløsningsvolum.

Figuren viser at det gjelder å holde oppløsningens volum så lite som mulig.

Alkaliseringsmidler.

En rekke forskjellige alkaliseringsmidler er blitt prøvet. Nedenfor er gjengitt resultater av en sammenlikning mellom virkningen av pottaske, soda og boraks som alkaliseringsmiddel. 10 ml av en ammoniumkloridoppløsning, tilsvarende 1 millimol N ble tilsatt 5 ml av en mettet oppløsning av de forskjellige alkaliseringsmidler, slik at totalvolumet ble 15 ml. Resultatet er gjengitt i tabell 2.

Som det vil framgå av tabell 2 er pottaske det beste alkaliseringsmiddel av de som er prøvet. Boraks synes ikke å gi tilfredsstillende resultater innen rimelig tid.

Da utluftingen foregår ved romtemperatur, vil alkaliseringsmidlenes — selv alkalikarbonatene — virkning på eggehvitestoffene ikke forårsake avspalting av flyktig N i nevneverdig grad, når utluftingen er tilendebrakt innen en rimelig tid.

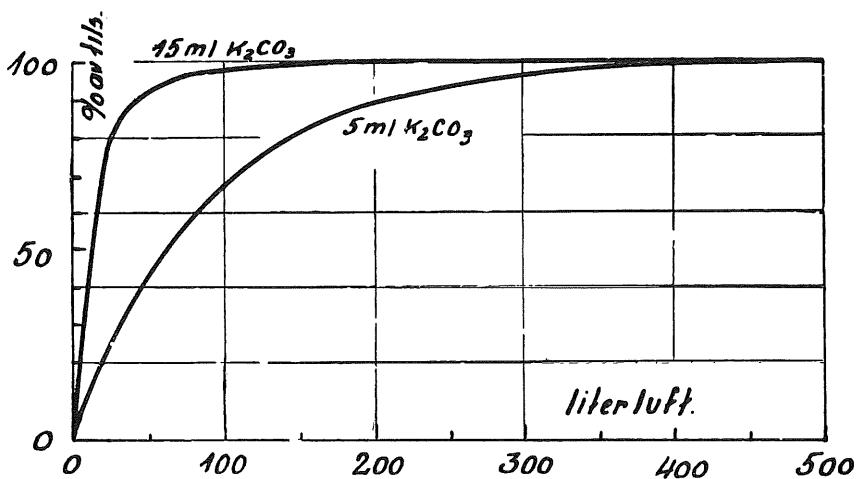


Fig. 10. Utluftning ved forskjellig konsentrasjon av kaliumkarbonat.
Aeration at Different Concentrations of Potassium Carbonate.

Tabell 2. *Forskjellige alkaliseringsmidler ved luftgjennomledning.*
Aeration with Different Alcalinizers.

Menge luft gjennomledet liter	% av tilsatt N		
	K_2CO_3	Na_2CO_3	$Na_2B_4O_7$
100	95	86	29
200	99	95	46
300	100	97	57
400	100	99	65
500	100	100	71

At utluftingen foregår så meget hurtigere med pottaske som alkaliseringsmiddel, enn med boraks, beror jo for en stor del på pottaskens langt større oppløselighet slik at saltkonsentrasjonen blir større.

Det gjelder altså, av hensyn til oppnåelse av en høy saltkonsentrasjon, å tilsette mest mulig alkaliseringsmiddel. Fig. 10 viser forholdet under utluftning av 1 millimol ammoniakk-N fra et totalvolum av 30 ml tilsatt forskjellige mengder pottaske som alkaliseringsmiddel. I det ene tilfelle er tilsatt 15 ml mettet pottaskeoppløsning slik at oppløsningen blir halvmettet m. h. p. alkaliseringsmiddel. I det andre tilfelle er tilsatt 5 ml mettet pottaskeoppløsning.

Lenger enn til halvmetting av oppløsningen med pottaske bør man på den annen side ikke gå, da oppløsningen i tilfelle blir for viskøs, slik at utluftingens effektivitet nedsettes av den grunn.

Man bør imidlertid ha klart for seg at oppløsningsvolumet har sin betydning, selv om man tilsetter pottaske til halvmetting. Dette skulle framgå av tabell 3 som viser forsøk med utlufting av 1 millimol ammoniakk-N fra forskjellig oppløsningsvolum, tilsatt pottaske inntil halvmetting. Resultatet gjelder den prosentiske mengde ammoniakk som er drevet over etter gjennomledning av 200 liter luft.

Tabell 3. *Veskevolumets innflytelse på utluftingen.*
The Aeration Volume.

Total volum	% av tilsatt NH ₃
30 ml	99,8
50 »	97,6
100 »	92,8
150 »	85,8
200 »	78,0

Som det vil framgå av tabell 3 vil resultatet av utluftingen bli dårligere jo større væskevolumet er, selv om oppløsningen halvmettes m. h. p. pottaske.

En kan trekke den konklusjon av forsøkene at de gunstigste betingelser ved bestemmelse av ammoniakk ved utlufting er:

Oppløsningens volum (etter tilsetning av alkaliseringsmiddel) — ikke over 30 ml.

Alkaliseringsmiddel — pottaske, i en mengde tilsvarende halvmetting av oppløsningen.

Luftmengde — 200 liter.

Apparatoppstilling — som vist i fig. 7.

Metoden egner seg utmerket til bestemmelse av flyktig N i *oppløsninger* som også inneholder forbindelser som avspalter flyktig N ved høyere temperaturer på grunn av virkningen av alkaliseringsmidlet, for eks. i urin. For bestemmelse av flyktig N direkte i fiskefarse egner metoden seg dog ikke. Skal nemlig utluftingen foregå under de gunstigste betingelser, lite volum og halvmetting med pottaske, vil oppslemningen bli altfor viskøs til at utluftingen kan bli effektiv.

3. DIFFUSJON I LUKKET SYSTEM.

Prinsippet ved denne metode er ganske enkelt en diffusjon av ammoniakk-gass fra et kammer hvor der hersker en viss tensjon av gassen, framkalt ved tilsetning av alkaliseringsmiddel, til et annet rom

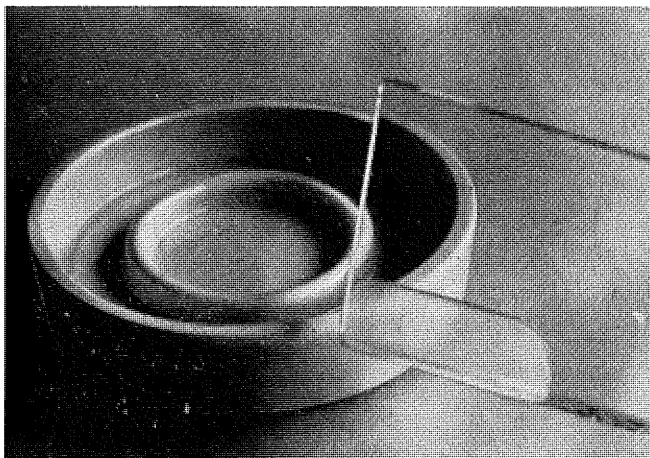


Fig. 11.
Mikrodiffusjons-
kammer av
porselen.
Microdiffusion
Unit, Porcelain.

hvor tensjonen er null i overflaten av den absorberende væske (forlagssyren).

Diffusjonen foregår i flate, lukkede skåler, slike som for eksempel er foreslått av CONWAY og BYRNE (1933).

Fig. 11 viser en skåltype framstilt for vårt bruk ved Porsgrunds Porsellænsfabrik av glassert porselen. Den har den fordel at indikatoromslaget blir meget lett å iaktta mot den hvite bunn.

CANZANELLI, GUILD og RAPPORT (1944) har latt skålene forarbeide av parafin (sm. p. 55—58° C) og beskriver en tilhørende støpeform av messing. En variasjon av den vanlige diffusjonsmetode er foreslått av PRATER, COWLES og STRAKA (1942). Istedenfor de vanlige Conway- og Byrneskåler benyttes petriskåler med en rund glassplate som lokk. Under lokket henger en rekke dråper mettet borsyre i glyserin og tjener som absorpsjonssyre. Som alkaliseringsmiddel anvendes en mettet oppløsning av natrium-metaborat og kaliumklorid og skålene får stå 3 timer ved 25° C. Derpå spyles glyserin-borsyredråpene ned i en kolbe eller et begerglass og ammoniakken titreres med n/100 syre.

Diffusjonen av ammoniakk fra ytre til indre rom i en Conway- og Byrneskål foregår etter relasjonen:

$$dx/dt = 2,30A_1(a-x)$$

hvor dx/dt er *hastigheten av forandringen av ammoniakkmengden i ytre rom*. Denne er altså proporsjonal med den mengde ammoniakk som til enhver tid befinner seg der, $(a-x)$. A_1 er en konstant som avhenger av de forhold diffusjonen foregår under, og kan altså tjene som et uttrykk for diffusjonens intensitet, eller absorpsjonshastigheten. Man kan tegne opp absorpsjons-tidskurven etter relasjonen:

$$\frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x} = A_1 \quad (\text{Conway og Byrne 1933}).$$

De faktorer som influerer på absorpsjonshastigheten er:

- Skålens dimensjoner.
- Volumet av væske i ytre rom.
- Temperaturen.
- pH i ytre rom.
- Saltkonsentrasjonen i ytre rom.

Forøkes skålens dimensjoner, vil det i alminnelighet bety en forminskelse i absorpsjonshastigheten. Generelt kan man si at absorpsjonshastigheten er proporsjonal med det geometriske middel av overflatene i indre og ytre rom, og omvendt proporsjonal med middelavstanden av molekylpassasjen.

Forøkelse av væskevolumet i ytre rom har til følge en nedsettelse av ammoniakk-gastensjonen, og dermed absorpsjonshastigheten. Den relative absorpsjonshastighet er omvendt proporsjonal med volumet. En forøket tilsetning av alkali, hvis man da ikke tilsetter dette i fast form, vil på den ene side virke ved salteffekt, på den annen side som en forøkelse av volumet. Der gis altså for volumet et optimum ved tilsetning av *mettet* alkali.

En temperaturforhøyelse vil bidra til forøkelse av absorpsjonshastigheten. Hvis for eksempel væsken i ytre rom er halvmettet med pottaske, vil en stigning av temperaturen på én grad bety en forøkelse av absorpsjonshastigheten på ca. 3 % (CONWAY og BYRNE, 1933).

En forhøyelse av pH vil bety en forøkelse av absorpsjonshastigheten, da denne er proporsjonal med dissosiasjonsgraden av ammoniumjonen som bestemt ved følgende ekvasjon:

$$\text{pH} = 9,44 + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

Tilsetning av salter til væsken i ytre rom vil bidra til forhøyelse av ammoniakk-tensjonen og dermed forøkelse av absorpsjonshastigheten. Således vil ammoniakk-tensjonen ved halvmetting av væsken med KBO_2 og K_2CO_3 forøkes med ca. 200 % og absorpsjonshastigheten tredobles, i forhold til vann.

Metoden egner seg bare for bestemmelse av flyktig N i *oppløsninger*. Vil man bestemme flyktig N i fiskekjøtt, må man enten lage serum eller pressaft. Da den relative absorpsjonshastighet er omvendt proporsjonal med volumet av væske i ytre rom, må dette holdes så lite som mulig, 2—2½ ml etter alkalitilsetning. Vil man da bestemme flyktig N i et serum framstilt av fiskekjøtt som inneholder for eksempel 1—2 mg

trimetylammin-N/100 g, er det innlysende at metoden må bli unøyaktig, da man får svært små mengder flyktig N å bestemme.

BEATTY og GIBBONS (1936) griper til den utvei å bestemme trimetylammin-N i *pressaft*. 1 ml pressaft tilsettes i den ytre ring av en Conway- og Byrneskål 1/2 ml formol (for å binde ammoniakk) samt 1 ml mettet pottaskeoppløsning. I den indre ring has overskudd av standardsyre (alm. n/70). Skålene stilles ved 36° C i 2 timer. Resultatet vil bli noe for høyt, da trimetylamminoksyd hydrolyseres en del under de givne betingelser. Om pressaftens innhold av trimetylammin vil gi et riktig uttrykk for fiskens kvalitet synes noe tvilsomt. Spesielt hvis fisken har vært lagret noen tid i frossen tilstand, vil den gi fra seg varierende mengder pressaft, og bestemmelse av flyktig N i pressaft vil i dette tilfelle neppe gi et riktig uttrykk for fiskekjøttets friskhet.

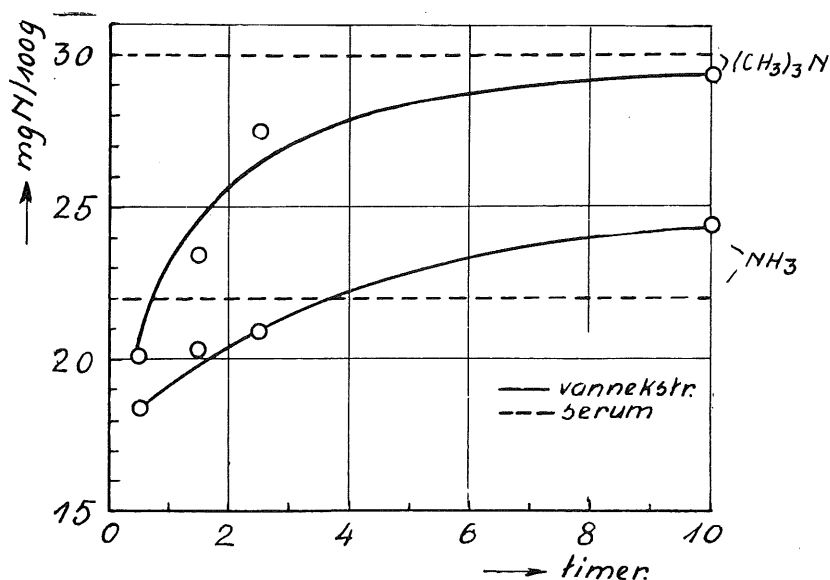


Fig. 12. Ekstraksjonstid ved vannekstrakter.
The Extraction Time, Waterextracts.

B. Anvendelse av vannekstrakter og sera.

1. FRAMSTILLING AV VANNEKSTRAKTER.

Framstilling av vannekstrakt av farsen uten pH-korrigering og oppvarming benyttes av flere som metode til isolering av det flyktige N i fiskekjøtt. Dette vil ialminnelighet ikke gi riktige resultater. Ekstraktene inneholder større eller mindre mengder eggehvite-stoffer, avhengig av farsens pH, og under destillasjon med MgO vil der avspaltes flyktig N. Den nødvendige ekstraksjonstid er vanskelig å bestemme, da der, især ved litt dårligere råstoff, skjer en stadig dannelse av flyktig N på grunn av bakterievirksomhet, slik at ekstraktens innhold av flyktig N stadig vil stige. Fig. 12 gjengir et forsøk med framstilling av vannekstrakt av sildefarse. 100 g finmalt farse veies inn i en rekke kolber og slemmes opp med 400 ml vann. Oppslemningen får stå ved romtemperatur under delvis rysting. Så filtreres gjennom et grovt filter, og i filtratene bestemmes flyktig N ved destillasjon med MgO. Til sammenlikning lages *serum* av farsen uten forutgående ekstraksjon.

Da en etter det som er sagt senere, har grunn til å anta at serumet gir korrekte verdier, ser en av kurven at selv etter 10 timers ekstraksjon er ikke all trimetylamin trukket ut av farsen. Vannekstraktets innhold av ammoniakk ligger etter 10 timers ekstraksjon en del over serumets. Dette skyldes både bakterievirksomhet og avspalting fra eggehvite-stoffer under destillasjonen, uten at man har noen garanti for at all

Tabell 4. *Ekstraksjonstiden ved vannekstrakter.*

The Extraction Time, Waterextracts.

Ekstraksjonstid i timer	Ammoniakk mg N/100 g	Trimetylamin mg N/100 g
1	33,0	33,2
2	33,3	34,6
3	35,7	35,3
5	37,4	36,3
21	56,3	56,7
serum	35,4	34,6

den ammoniakkmengden som opprinnelig forelå i farsen er trukket ut i ekstraktet.

En noe hurtigere ekstraksjon får man når man uavbrutt ryster oppslemningen i maskin. Dette framgår av tabell 4 som viser ekstraksjon av sildefarse i rystemaskin. For å hindre bakterievirksomhet ble forsøkt tilsatt toluol.

Toluol greier altså ikke å hindre bakterievirksomheten slik som synes å være den alminnelige oppfatning. Etter 2—3 timers ekstraksjon i rystemaskin vil vannekstraktet i foreliggende tilfelle gi omtrent samme verdier for flyktig N som et serum. Men man kan aldri stole på resultatet, så framstilling av vannekstrakter for å isolere flyktig N fra fiskekjøtt må frarådes.

2. FRAMSTILLING AV SERA.

For å kunne bestemme flyktig N i fiskekjøtt må man altså ved destillasjoner ved atmosfæretrykk, søke å bli kvitt eggehviten. Man må med andre ord tilstrebe å overføre det flyktige N i en oppløsning, mest mulig befridd for slike stoffer som under destillasjon i alkalisk miljø avspalter flyktig N.

Dette oppnår man ved framstilling av et *serum*, som er en oppløsning som inneholder alle fiskemuskulaturens vannoppløselige stoffer, som regel i lavere konsentrasjon enn i muskulaturen selv. Sera kan framstilles fysikalsk ved hjelp av dialyse eller ultrafiltrasjon, eller kjemisk ved tilsetning av stoffer som forbinder seg med eggehvitestoffene og med dem danner tungtoppløselige produkter. Ved ultrafiltrater kan man oppnå ufortynnete sera. I alle andre tilfelle foreligger serumstoffene i mer fortynnet tilstand enn før. Nå er både dialyse og ultrafiltrasjon prosesser som krever sin tid, og er av den grunn lite egnet ved mer rutinemessige bestemmelser av flyktig N. En må derfor velge en kjemisk metode som iallfall hurtig fører til målet. Ved rutinemessige analyser må man stille følgende krav til et serum:

Framstillingsmetoden må ikke by på komplisert arbeide. Det anvendte stoff må ikke i vesentlig grad øke utgiftene ved analysen.

Hvis syre anvendes, må denne etter framstillingen av serumet ikke foreligge i så stort overskudd at den sjenerer den påfølgende alkalisering.

Framstillingsmetoden må muliggjøre at alt flyktig N fra fiskemuskelen ekstraheres over i serumet.

Det ferdige serum må være mest mulig fritt for eggehvite- og andre stoffer som under destillasjonen i nærvær av alkalier avspalter flyktig N.

Dessverre vil man ikke kunne finne noe kjemisk stoff som feller eggehvitestoffene helt kvantitativt. Men man må stille det krav at destillasjonstidskurven for et serum med MgO som alkaliseringsmiddel etter 45 minutter bare stiger ubetydelig.

Blant de mange kjemiske stoffer av dette slag er det i grunnen bare 5 som i tidens løp er blitt anvendt ved framstilling av sera for flyktig N-bestemmelse. Disse er:

1. Trikloredikesyre.
2. Saltsyre.
3. Natrium-wolframmat.
4. Alkohol.
5. Kolloid jernhydroksyd.

Mens *trikloredikesyre* må tilsettes i ganske stor mengde (i felningsvolumet bør den utgjøre ca. 5—10g/100 ml, hvorved pH kommer under 1), trengs det ganske lite *saltsyre*, da den kun skal tilsettes i en mengde stor nok til å gi felningsvolumet et syretrinn $\text{pH} = 5,2$. Herved felles størsteparten av fiskeeggehviten ved dens isoelektriske punkt. Triklorediksyren er dessuten ganske kostbar, men synes p. t. å være den som mest brukes i de forskjellige land (Canada, Skottland, Frankrike).

Alkohol er intet fullstendig eggehvitefellende middel, derfor er den i sin tid blitt supplert, først med saltsyre og siden dessuten med natriumsulfat (Vorr, 1929).

Natrium-wolframmat og den store mengde svovelsyre som blir brukt sammen med wolframmatet, blir integrerende del av serumet, og gjør det derved mindre anvendelig, om man, ved siden av flyktig N, også vil bestemme andre stoffer i det.

Kolloid jernhydroksyd er i høyt dialysert tilstand meget aktivt ved felling av eggehvite i en oppløsning som er brakt til isoelektrisk reaksjon ved hjelp av syre. Stoffet feller da, anvendt i økende konsentrasjon, stadig mer av den eggehvite som forblir i serumet selv ved den nevnte pH. Ved oppvarming til 70°C i kort tid er virkningen av kolloidet enda bedre, og en oppnår et serum med en ubetydelig eggehvitekonsentrasjon.

Framstilling av jernsera.

Av den finmalte, godt homogeniserte farse innveies 100 g som slennes opp med 400 ml vann og tilsettes syre til $\text{pH} = 5,2$, det vil si isoelektrikum for de fleste fiskesorters eggehvite.

Oppslemningen oppvarmes i et vannbad til 60°C og tilsettes 15 ml kolloid jernhydroksyd (10 %-ig, dialysert praktisk talt saltsyrefritt). Så oppvarmes videre til 70°C , og etter ca. 5 min. avkjøles og filtreres.

Hvis serumet er framstilt ved den riktige pH, vil det nå framkomme som en vannklar — ved sildeseraer svak gulfarget — oppløsning som lett renner gjennom filteret.

Framstilling av serum etter ovenfor beskrevne metode tilfredsstillende alle de krav man kan stille til en effektiv og rask isolering av flyktig N i fiskekjøtt.

Serumet lar seg framstille lett og hurtig. Det eneste punkt som synes å kunne innebære noen vanskelighet er innstillingen av den riktige pH. Her yter imidlertid »Lyphan« papir en utmerket tjeneste. Man får snart erfaring for hvor meget syre man omtrentlig må tilsette, og en liten avvikelse fra $\text{pH} = 5,2$ synes ikke å volde noen ulemper (for eksempel $\pm 0,2$ pH enheter). Vi pleier erfaringsmessig å tilsette ca. 1 ml HCl (1 : 1) pr. 100 g farse ved innstilling av $\text{pH} = 5,2$ ved alminnelig frisk rå torsk og sild. Tilsettingen varierer en del for de forskjellige andre fiskesorter.

Hva forbruk av kjemikalier angår er metoden meget rimelig. Den lille mengde syre som skal til kan man se bort fra og kolloid jernhydroksyd er et meget billig reagens.

Skal man bare bestemme flyktig N i serumet, og ikke samtidig andre stoffer, kan man, om man vil, sløyfe tilsetting og felling med kolloid jernhydroksyd. Det viser seg nemlig at de stoffer som avspalter flyktig N under destillasjonen, fjernes ved syretilsetting og oppvarming til 70°C . *Serumet kan da ganske enkelt framstilles ved å innstille pH på 5,2 og oppvarme til 70°C .*

Serumet inneholder ikke noe overskudd av syre som må nøytraliseres før destillasjonen. Litt magnesiumoksyd vil raskt gjøre serumet alkalisk.

Forsøk som vil bli beskrevet i det følgende vil vise at all flyktig N som fiskekjøttet inneholdt finnes igjen i serumet, og at der ved en 45 minutters destillasjon med magnesiumoksyd som alkaliseringsmiddel ikke dannes nevneverdige mengder flyktig N.

Ekstraksjonstidens inflytelse på innhold av flyktig N i jernsera.

Selve framgangsmåten ved framstilling av serum etter ovenfor beskrevne metode, ved tilsetting av syre og oppvarming til 70°C , medfører at alt flyktig N ekstraheres over i serumet under framstillingen, slik at en forutgående ekstraksjon ikke er nødvendig. Dette vil framgå av følgende forsøk:

Av en finmalt og godt homogenisert sildefarse innveies 100 g i forskjellige kolber og slemmes opp med 400 ml vann. Etter forskjellige ekstraksjonstider lages serum av oppslemningene etter ovenfor beskrevne

metode. Oppslemningene får stå ved romtemperatur under delvis rysting. I seraene bestemmes så total flyktig N og trimetylamin-N ved destillasjon med MgO og formoltitrering. Resultatet framgår av tabell 5.

Tabell 5. *Ekstraksjonstiden ved sera.*
The Extraction Time, Sera.

Ekstraksjonstid i timer	Tot. fl. N. mg N/100 g	Trimetylamin mg N/100 g	Ammoniakk mg N/100 g
0	19	3	16
1	19	3	16
4	19	3	16
10	19	3	16
28	20	3	17
96	28	4	24

Som en ser vil resultatet bli det samme om man framstiller serumet med én gang uten forutgående ekstraksjon, eller om man først ekstraherer i for eksempel 28 timer.

At flyktig N i foreliggende tilfelle begynner å stige etter 28 timers ekstraksjon skyldes bakterievirksomhet. Ved et dårligere råstoff ville virkningen begynne å gjøre seg gjeldende på et enda tidligere tidspunkt.

Avspalting av flyktig N.

Som nevnt må man stille det krav til et serum at det under destillasjon med magnesiumoksyd ikke avspalter flyktig N fra eggehvite- og andre stoffer, med andre ord at destillasjons-tidskurven for et serum etter 45 minutters destillasjon med magnesiumoksyd som alkaliseringsmiddel i høyden viser en ubetydelig stigning.

Dette vil være tilfelle med et jernserum hvilket framgår av nedennevnte forsøk: Seraene blir framstilt etter tidligere beskrevne framgangsmåte. 100 ml serum fortynnes med 150 ml vann og destilleres i 45 min. med magnesiumoksyd som alkaliseringsmiddel. Etter endt destillasjon påfylles vann i destillasjonskolben til volumet atter er 250 ml og der destilleres ytterligere i 45 min. Det samme gjentas enda en gang, idet man skifter inn nytt forlag for hver destillasjon.

Resultatet framgår av tabell 6.

Som det vil framgå av tabell 6 skjer det under destillasjonen av et jernserum bare en ubetydelig avspaltning av flyktig N, ca. 1 mg N/100 g farse. Det avspaltete N består av ammoniakk. *Trimetylamin vil ikke avspaltes under destillasjonen*, så den trimetylaminmengde man

Tabell 6. *Avspaltning av flyktig N fra sera under destillasjon.*
The Splitting-off of Volatile N from Sera during Distillation.

	mg N/100 g farse		
	Tot. fl. N.	Trimetylamin	Ammoniakk
<i>Serum av lange.</i>			
1. gangs destillasjon	17,8	6,1	11,7
2. —»—	1,0	0,0	1,0
3. —»—	0,9	0,0	0,9
<i>Serum av sild</i>			
1. gangs destillasjon	24,4	3,9	20,5
2. —»—	1,2	0,0	1,2
3. —»—	1,1	0,0	1,1
<i>Serum av sild (bedervet)</i>			
1. gangs destillasjon	69,6	35,1	34,5
2. —»—	1,8	0,0	1,8
3. —»—	1,2	0,0	1,2

bestemmer ved en 45 minutters destillasjon av et jernserum med MgO som alkaliseringsmiddel, kan betraktes som det korrekte uttrykk for fiskekjøttets innhold av trimetylamin.

Anvendelse av forskjellige alkaliseringsmidler.

Som nevnt tidligere s. 13 ble MgO . B₂O₃ funnet å være et noe mildere alkaliseringsmiddel enn MgO ved destillasjon av farseopp-slemninger.

Ved destillasjon av jernserum spiller dog dette ingen rolle, hvilket framgår av tabell 7 som viser destillasjon av et sildeserum med forskjellige alkaliseringsmidler. 100 ml serum ble fortynnet med 150 ml vann og destillert 45 min. etter tilsetning av alkaliseringsmiddel.

Som en ser vil alle alkaliseringsmidler gi samme verdi for trimetylamin, mens Ba(OH)₂ vil forårsake en avspaltning av ammoniakk.

Tabell 7. *Destillasjon av sera med forskjellige alkaliseringsmidler.*
Distillation of Sera with Different Alcalinizers.

Alkaliserings- middel	Tot. fl. N. mg N/100g farse	Trimetylamin mg N/100 g farse	Ammoniakk mg N/100g farse
MgO	18,3	4,3	14,0
MgO.B ₂ O ₃	18,3	4,3	14,0
MgO.3B ₂ O ₃	18,3	4,3	14,0
Ba (OH) ₂	28,5	4,3	24,2

Tabell 8. *Destillasjon av sera med natriumhydroksyd.*
Distillation of Sera with Sodium Hydroxide.

prøve nr.	Alkaliserings- middel	Tot. fl. N. mg N/100g farse	Trimetylamin mg N/100g farse	Ammoniakk mg N/100g farse
1	MgO	18,2	4,5	13,7
	NaOH	53,7	4,9	48,8
2	MgO	18,3	4,3	14,0
	NaOH	54,3	4,5	49,8
3	MgO	15,7	2,8	12,9
	NaOH	48,6	3,2	45,4

Selv NaOH som alkaliseringsmiddel i nødvendig overskudd vil ikke forårsake noen nevneverdig avspalting av trimetylamin fra jernsera av sild hvilket framgår av tabell 8.

Holdbarheten av jernsera.

En annen, meget vesentlig fordel ved serumet er dets holdbarhet. Har man mange prøver på en gang til bestemmelse av flyktig N, gjelder det om så hurtig som mulig å få »fiksert« denne verdi, da fiskekjøttet, især hvis det ikke er helt fersk ikke skal ligge lenge før bakterievirk-somheten begynner å gjøre seg gjeldende. Har man først fått laget serum av prøven, kan destillasjonen skje etter hvert da serumet holder seg uforandret i lang tid. Under framstilling av serum, ved at dette opphetes til 70° C, skjer nemlig en delvis sterilisering av dette, samtidig som pH senkes og den vesentlige mengde eggehvite samt bakterier fjernes.

I tabell 9 er gjengitt et lagringsforsøk med serum, framstilt av sei. Tallene for trimetylamin viser at fisken har vært temmelig dårlig. Til sammenlikning ble framstilt vannekstrakt av den samme farsen, og lagret under de samme betingelser, ved ca. + 2° C.

Tabell 9. *Holdbarhet av sera og vannekstrakter.*
The Keeping Properties of Sera and Water Extracts.

Lagringstid i døgn		Tot. fl. N. mg N/100g farse	Trimetylamin mg N/100g farse	Ammoniakk mg N/100g farse
0	Serum	45	28	17
	Vannekstrakt	42	27	15
3	Serum	45	28	17
	Vannekstrakt	55	33	22
6	Serum	45	28	17
	Vannekstrakt	96	57	39

Som en ser holder serumet seg uforandret under hele lagringsperioden, mens flyktig N i vannekstrakt stadig stiger.

Volumforholdene ved framstilling av sera.

Når man framstiller serum av fiskefarse ved tilsetning av vann (iberegnet syre og kolloid jernhydroksyd), må en anta at de vannoppløselige stoffene i farsens væskefase fordeles i det nye volum av væske som oppstår når vannet tilsettes. Dette må da også være tilfelle for det flyktige N's vedkommende. Men spørsmålet er hvor stort dette volum blir når man går ut fra en vilkårlig valgt farse og vannmengde.

Fiskekjøttets vanninnhold er avhengig av fettinnholdet. For magre fiskeslag kan man således regne med et vanninnhold på ca. 80 g/100 g, for sild (vintersild) ca. 70 g/100 g. Et jernserums tørrstoffinnhold er så lavt (i alminnelighet under 1 g/100 ml) at man kan se bort fra volumforandring på grunn av oppløste stoffer. Lager man derfor serum av 100 g farse og 400 ml væske (vann + saltsyre + koll. $\text{Fe}(\text{OH})_3$) vil man ikke få 500 ml serum, men noe mindre. Dette kan best illustreres ved følgende forsøk:

Av seiefarse ble framstilt serum med og uten tilsetning av kjent mengde NH_4Cl . Seraene framstilles av 100 g farse og 400 ml væske (vann + saltsyre + koll. $\text{Fe}(\text{OH})_3$ og i det ene tilfelle kjent mengde NH_4Cl). 100 ml serum fortynnes med 150 ml vann og destilleres 45 min. etter tilsetning av MgO . Hvis 100 g farse og 400 ml væske ga 500 ml serum, skulle differensen mellom N-innholdet i 100 ml av de to seraer tilsvare femteparten av den tilsatte mengde ammoniumklorid, eller i foreliggende tilfelle 10,67 mg N. Som det vil framgå av resultatet, tabell 10, vil verdiene ligge ca. 4% for høyt, hvilket skulle tyde på at

Tabell 10. *Volumforholdene ved framstilling av sera.*

The Production of Sera and the Volume Conditions.

Prøve nr.	Serum av	mg N/100 ml	% av tilsatt
1.	Farse + NH_4Cl	14,18	104,4
	Farse.....	3,05	
	Diff.	11,13	
2.	Farse + NH_4Cl	14,93	104,0
	Farse	3,83	
	Diff.	11,10	
3.	Farse + NH_4Cl	14,03	104,0
	Farse.....	2,93	
	Diff.	11,10	

man av 100 g seiefarse + 400 ml væske ikke fikk 500 ml serum, men bare ca. 480 ml.

Det samme vil gjenspeile seg om man framstiller seraer ved forskjellig forhold mellom farse/vann, som gjengitt i nedenfor beskrevne forsøk. Av en sildefarse ble framstilt serum, i det ene tilfelle av 100 g farse og 400 ml væske, i det andre tilfelle av 50 g farse og 450 ml væske. Regner man ut resultatet under den forutsetning at man har et totalt væskevolum av 500 ml i begge tilfelle, får man følgende resultat:

	Tot. fl. N. mg N/100g farse	Trimetylaminn mg N/100g farse
Serum av 100 g farse + 400 ml væske	33,5	13,9
Serum av 50 g farse + 450 ml væske	32,4	13,6

Man får altså tilsynelatende lavere verdier for flyktig N jo mindre forholdet farse/vann er. Men tar man i betraktning at sildefarse bare inneholder ca. 70 g/100 g vann, må man regne med at man i foreliggende tilfelle ikke har et væskevolum på 500 ml, men bare henholdsvis 470 og 485 ml. Regner man ut resultatet på grunnlag av de korrigerede væskevolum, får man i de to tilfelle følgende resultater:

	Tot. fl. N. mg N/100g farse	Trimetylaminn mg N/100g farse
Serum av 100 g farse + 400 ml væske	31,8	13,1
Serum av 50 g farse + 450 ml væske	31,4	13,2

Resultatet blir altså det samme uansett hvilket forhold mellom farse og væske man velger.

For å kunne angi de korrekte verdier for flyktig N som mg N/100 g farse, måtte man altså for hver enkelt fiskesort kjenne det væskevolum som oppsto når man framstilte serum med et visst forhold farse/væske. Dette ville komplisere metoden, og er ikke nødvendig. Tallene for flyktig N må jo vurderes i forhold til den øvre grense man setter for fisk som enda kan tillates omsatt som fersk råfisk. Da denne grense sannsynligvis er spesifikk for de forskjellige fiskeslag og må bli fastsatt på basis av den samme metode, spiller det ingen rolle om de angitte verdier ligger noen prosent over de virkelige.

Vår metode er basert på framstilling av serum under innveing av 100 g farse som slemmes opp med 400 ml væske (vann, saltsyre og koll. jernhydroksyd) og vi angir resultatet i mg flyktig N/100 g farse under forutsetning av et totalt væskevolum på 500 ml.

C. Anvendelse av farseoppslemninger.

Som nevnt tidligere vil der ved destillasjon av farseoppslemninger med MgO skje en avspalting av flyktig N fra eggehvitestoffer og muligens fra andre N-forbindelser. Det avspaltete N vil ved destillasjon av farse fra en mager fisk ha en annen sammensetting enn når man destillerer farse av vintersild. Forskjellen er meget karakteristisk. Mens det avspaltete N fra en mager fisk nesten utelukkende består av formoltrerbart N, vil man ved destillasjon av farse av vintersild få avspaltet en vesentlig mengde trimetylamin.

Tabell 11 og 12 gjengir resultatet av destillasjoner av farse av henholdsvis torsk og vintersild. 20 g farse ble slemmet opp med 230 ml vann, tilsatt MgO og destillert i 45 min. Basene i forlaget ble atskilt ved formoltrering. Det formoltrerbare er i tabellen kalt ammoniakk, det ikke-formoltrerbare, trimetylamin. Samtidig ble for hvert forsøk framstilt jernserum av farsen og destillert etter tidligere beskrevet metode.

Som det framgår av tabell 11 og 12 vil der under en 45 minutters destillasjon av en oppslemning av torskefarse med MgO som alkaliseringmiddel avspaltes ca. 14 mg flyktig N pr. 100 g farse. Det avspaltete N var formoltrerbart og må antas for en vesentlig del å bestå av ammoniakk. Trimetylamin (ikke formoltrerbart N) kunne bare påvises i små mengder som spaltingsprodukt.

Sildefarse derimot vil ved en 45 minutters destillasjon med MgO foruten ammoniakk også avspalte ca. 7—8 mg trimetylamin-N pr. 100 g farse. Sildefarse må altså inneholde stoffer som med MgO avspalter trimetylamin. Dette — eventuelt disse — stoffer fjernes under framstilling av jernserum, enten ved at de felles ut, eller filtreres fra.

Det skulle være nærliggende å anta at kilden til denne spalting var å søke i sildefettet. Dette inneholder jo umettete fettsyrer, som under destillasjonen kunne tenkes å redusere trimetylaminoksydet til trimetylamin.

Vi har gjort en del forsøk med destillasjon av sildefarse, samt sildefett tilsatt trimetylaminoksyd og MgO som alkaliseringmiddel, men har ikke kunnet påvise noen spalting av oksydet. Heller ikke betain ble spaltet under de nevnte destillasjonsbetingelser.

Tabell 11. *Avspalting av flyktig N fra farse av torsk.*
The Splitting-off of Volatile N from Minced Muscle of Cod.

Prøve nr.		Tot.fl.N. mg N/100 g	Diff. mg N/100 g	Ammoniakk mg N/100 g	Diff. mg N/100 g	Trimetylamin mg N/100 g	Diff. mg N/100 g
1	Farse	60		33		27	
	Serum	46	14	19	14	27	0
2	Farse	57		32		25	
	Serum	43	14	19	13	24	1
3	Farse	73		35		38	
	Serum	58	15	21	14	37	1
4	Farse	60		33		27	
	Serum	47	13	20	13	27	0

Tabell 12. *Avspalting av flyktig N fra farse av vintersild.*
The Splitting-off of Volatile N from Minced Muscle of Winterherring.

Prøve nr.		Tot.fl.N. mg N/100 g	Diff. mg N/100 g	Ammoniakk mg N/100 g	Diff. mg N/100 g	Trimetylamin mg N/100 g	Diff. mg N/100 g
1	Farse	53		31		22	
	Serum	34	19	20	11	14	8
2	Farse	46		28		18	
	Serum	27	19	16	12	11	7
3	Farse	45		29		16	
	Serum	23	22	15	14	8	8
4	Farse	38		26		12	
	Serum	19	19	15	11	4	8
5	Farse	34		25		9	
	Serum	14	20	12	13	2	7
6	Farse	33		24		9	
	Serum	15	18	14	10	1	8
7	Farse	31		23		8	
	Serum	15	16	14	9	1	7

D. Atskillelse av de flyktige N-baser.

De flyktige N-baser i fiskekjøtt som går over ved en alkalisk destillasjon, består av:

Ammoniakk
Mono-metylamin
Di-metylamin og
Tri-metylamin.

Den alt overveiende mengde i nydrecht fisk utgjøres av ammoniakk. Etter hvert stiger innholdet av trimetylamin, mens di- og især mono-metylamin aldri forekommer i nevneverdige mengder sammenliknet med ammoniakk og trimetylamin. Summen av de flyktige N-baser, eller »total flyktig N« er lite tjenlig som indisium på fiskens friskhetstilstand. Ammoniakkinnholdet, og dermed innholdet av total flyktig N, vil nemlig i begynnelsen av lagringsperioden gå tilbake, og først nå opp i utgangsverdien etter flere døgn's lagring (for storsild etter ca. 12, resp. 9 døgn i is) (NOTEVÅRP, HJORTH-HANSEN og BAKKEN 1944). Innholdet av trimetylamin vil derimot stige hele tiden, og bestemmelse av dette vil kunne gi opplysning om fiskens friskhetstilstand til enhver tid av lagringsperioden.

Også di-metylamin har vært foreslått som indisium på fiskens friskhetstilstand, da mengden av dette skal stå i en viss relasjon til bakterieinnholdet (SHEWAN 1938 og 1939).

Det gjelder altså å få atskilt de flyktige N-baser som går over ved destillasjonen.

Flere metoder har vært foreslått hertil, og vi vil i det følgende behandle en del metoder som har vært meget anvendt for dette formål. Det gjelder:

Kolorimetrisk bestemmelse av trimetylamin, di-metylamin og ammoniakk.

Bortskaffelse av ammoniakk, mono- og di-metylamin med salpetersyring.

Tilsetning av formol, som reagerer med ammoniakk, mono- og di-metylamin.

1. KOLORIMETRISKE BESTEMMELSER.

Trimetylamín.

Trimetylamín kan bestemmes kolorimetrisk som pikrat med RICHTERS aminreagens, (RICHTER (1938) og RICHTER, LEE og HILL (1941).) Prinsippet beror på at mens pikrinsyre bare gir liten farge, er aminpikrater sterkt farget i 50 %-ig kloroform-toluol-, eller i kloroform-petroleter-oppløsninger. Reagenset er altså ikke spesifikt for trimetylamín. Tvertimot gir mange andre aminer sterkere farge enn trimetylamín, for eksempel β -fenyletylamín, dietylamín, trietylamín med flere. Men av de normalt forekommende aminer i fisk vil trimetylamín spille den dominerende rolle. DYER (1943 og 1945) har tillempet metoden for kolorimetrisk bestemmelse av trimetylamín i fiskekjøtt. En aliquot del av et serum, som inneholder 0,002—0,2 mg trimetylamín-N tilsettes formalin for å binde ammoniakk, og trimetylamín ekstraheres med toluol, etter at serumet er gjort alkalisk med pottaske. En aliquot del av toluolskiktet tørres med Na_2SO_4 , tilsettes en 0,02 %-ig oppløsning av pikrinsyre i toluol og fargen avleses i et fotoelektrisk kolorimeter.

Foruten trimetylamín gir også di- og mono-metylamín gulfargete pikrater. Di-metylamín vil gi et pikrat hvis fargeintensitet er ca. 20 % av den tilsvarende mengde trimetylamín.

Da dimetylamín relativt spiller en kvantitativt mindre rolle, vil det ikke influere synderlig på resultatet. Metoden gir for høye resultater for fet fisk. Dette skyldes sannsynligvis lecithin, som danner en gulfarget forbindelse med pikrinsyre. Virkingen av lecithin kan riktig nok elimineres ved at dette ekstraheres på forhånd i sur oppløsning, under hvilke betingelser trimetylamín ikke ekstraheres. Men dette vil både komplisere og gjøre metoden unøyaktig. Dessuten er jo for eksempel sildesera i seg selv gulfargete, og dette vil sikkert også influere på metoden slik at den må betraktes som mindre anvendelig til bestemmelse av trimetylamín i fet fisk.

Dimetylamín.

Dimetylamín kan bestemmes kolorimetrisk som kobbersalt av dimetyl-dithiocarbaminsyre. DOWDEN's metode for bestemmelse av små mengder dimetylamín i urin (1938), kan med visse tillempninger benyttes til bestemmelse av dimetylamín i fiskekjøtt, (REAY (1938), SHEWAN (1938, 1939), BEATTY og COLLINS (1940), DYER og MOUNSEY (1945).) Prinsippet beror på at kobbersaltet av dimetyldithiocarbaminsyre er uoppløselig i vann, men lett oppløselig i organiske oppløsningsmidler, som for eksempel bensol. Hvis en 5 %-ig oppløsning av svovelkullstoff i bensol rystes med en vandig alkalisk oppløsning som inneholder dime-

tylamin og et kobbersalt, vil det øvre skikt hurtig anta en gul farge. Metylamin gir en liknende farge, men kobbersaltet av metyl-dithiocarbaminsyre kan fjernes fullstendig hvis man ryster ut med natronlut. Trimetylamin danner en addisjonsforbindelse med svovelkullstoff, men den fargeløse forbindelse reagerer ikke med kobbersalt.

Til bestemmelsen kreves følgende reagenser:

Oppløsning (A): 5 %-ig oppløsning av CS_2 i bensol.

— (B): En oppløsning av 20 g $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ og 0,2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{aq}$ i 30 ml vann blandes kaldt med 10 g NaOH i 25 ml vann. Hertil føyes 20 ml ammoniakk (kons.) og volumet fylles opp til 100 ml.

— (C): En 30 %-ig oppløsning av iseddik.

Framgangsmåten ved bestemmelsen er da følgende:

Av farsen lages der serum som destilleres på vanlig måte. Forlaget fortyndes med vann til 250 ml og herav uttas 10 ml som i et stort reagensglass tilsettes 1 ml av oppløsning (B) og 10 ml av oppløsning (A). Blanningen oppvarmes 1 min. ved 40°C , rystes kraftig i 30 sek., tilsettes 1 ml av oppløsning (C), og blanningen rystes igjen i 30 sek. Derpå avkjøles og centrifugeres. Det øvre skikt dekanteres fra, og fargen sammenliknes i et kolorimeter med fargen framstilt på samme måte fra en kjent mengde dimetylamin. Fargedybden følger BEER's lov opptil et innhold av $50\ \mu\text{g}$ dimetylamin-N. Dimetylamin-innholdet i friskt fiskekjøtt dreier seg om bare noen μg N/100 g. Først i bedervet fisk kan innholdet av dimetylamin-N komme opp i 2,8—4 mg N/100 g (SHEWAN 1938, DYER og MOUNSEY 1945).

SHEWAN (1938) finner at kurven for dannelsen av dimetylamin i hyse lagret i is følger bakteriekurven bedre enn tilfellet er med ammoniakk og trimetylamin, og mener at dimetylamin vil være et verdifullt uttrykk for fiskekjøttets friskhet. DYER og MOUNSEY (1945), finner dog at dimetylamininnholdet varierer for meget til at det kan anbefales å nytte dette som uttrykk for fiskekjøttets friskhetstilstand.

Ammoniakk.

Som kjent kan ammoniakk bestemmes kolorimetrisk med Nessler's reagens. Reaksjonen er meget skarp og ammoniakk kan påvises ned til en konsentrasjon av $3\ \mu\text{g}$ ammoniakk-N/liter, avhengig av hvilket reagens som nyttes samt av de tilstedeværende ioner, for eksempel Cl' , (WIRTH og ROBINSON 1933). Til bestemmelse av ammoniakk i fisk kan dog metoden ikke brukes direkte, da de tilstedeværende aminer også gir fargereaksjon med Nessler's reagens. Man må altså først atskille

ammoniakk og aminene, hvilket er en komplisert affære. GLASSMANN og ROCHWARGER (1929) benytter seg av permutitt til adsorbsjon av ammoniakk, og bestemmer etter eluering av permutitten ammoniakk kolorimetrisk med Nessler's reagens. Men da også en del trimetylamin vil adsorberes til permutitt, virker ikke metoden helt tilforlætelig.

Av andre kolorimetriske metoder som har vært foreslått til påvisning av ammoniakk, kan nevnes ZENGHELIS' reagens med sølvnitratformaldehyd eller sølvnitrat-tannin (ZENGHELIS 1921, MAKKRIS 1930) samt reaksjonen med tymol-hypobromit (Hansen 1930, LAPIN og HEIN 1934). Den siste metode er i et hvert fall ikke spesifikk for ammoniakk, da både mono-, di- og tri-metylamin gir liknende reaksjon.

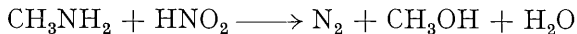
2. FLYKTIGE N-BASERS REAKSJON MED SALPETERSYRLING.

Som kjent forholder de primære, sekundære og tertiære aminer samt ammoniakk seg forskjellig overfor salpetersyrling. Dette har vært benyttet som grunnlag for en metode til atskillelse av de flyktige N-baser i fiskekjøtt, (BOURY og SCHWINTE 1935, BEATTY 1938). Behandles en blanning av de forskjellige aminer med salpetersyrling, vil følgende reaksjoner forløpe:

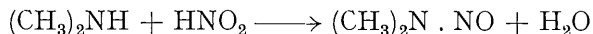
Ammoniakk vil spaltes til kvelstoff og vann:



Metylamin vil spaltes til kvelstoff, metylalkohol og vann:



Dimetylamin vil overføres til et nitrosamin:



Dette nitrosamin er flyktig og fjernes derfor under kokingen med salpetersyrling.

Det hevdes i litteraturen at alifatiske aminer ikke reagerer med salpetersyrling. Som det vil bli vist i det følgende, holder dog dette ikke stikk for trimetylamin. Også trimetylamin vil delvis spaltes av salpetersyrling. Der dannes sannsynligvis di- og mono-metylamin, som videre reagerer med salpetersyrling etter ovenfor anførte likninger.

Metoden skulle altså gå ut på å fjerne ammoniakk, mono- og dimetylamin slik at bare trimetylamin ble tilbake. Dette kunne så bestemmes ved en fornyet destillasjon.

Vi har funnet at følgende framgangsmåte er vel egnet til kvantitativ destruering av ammoniakk, mono- og dimetylamin i de mengder det ved de foreliggende undersøkelser kan bli tale om:

Destillatet som inneholder de flyktige N-baser (ca. 125 ml) tilsettes i en Erlenmeyerkolbe på 300 ml 2 g NaNO_2 og 3 ml iseddik. Der påsettes luftkjøler, opphetes forsiktig på trådnett, og oppløsningen holdes svakt i kok i 30 min. Så fjernes luftkjøleren, det tilsettes 5 ml H_2SO_4 (1 : 1), og oppløsningen kokes forsiktig i ytterligere 15 min. under delvis omrysting.

Deretter destilleres på vanlig måte etter at oppløsningen er gjort alkalisk med et lite overskudd av natronlut, hvorved bestemmes den eventuelt gjenværende mengde flyktig N.

Ved denne framgangsmåte ble det flyktige N fjernet kvantitativt i trimetylaminfrie oppløsninger som inneholdt ca.:

30 mg ammoniakk-N
5 mg mono-metylamin-N
7 mg di-metylamin-N

Forutsetningen for metodens brukbarhet til kvantitativ analyse var at trimetylamin ikke angripes under nitreringen. Og i følge vanlig oppfatning angripes ikke tertiære aminer av salpetersyrling.

For å få klarlagt trimetylaminets forhold under nitreringen ble en mengde trimetylamin, tilsvarende 9,13 mg N behandlet med salpetersyrling etter den nettopp beskrevne metode. Etter endt nitrering ble destillert, og den gjenværende mengde trimetylamin bestemt. Det titrerte destillat ble så atter behandlet med salpetersyrling på samme måte som tidligere.

Resultatet er gjengitt i tabell 13.

Tabell 13. *Spalting av trimetylamin ved nitrering.*
Decomposition of Trimethylamine with the Nitrosation Method.

	Trimetylamin mg N	% spaltet av oppr. mengde
Opprinnelig mengde	9,13	
Etter 1. gangs nitrering	7,60	16,7
Etter 2. gangs nitrering	5,90	35,2

Som det vil framgå av tabell 13 angripes også trimetylamin ved behandlingen med salpetersyrling. Ved den nevnte framgangsmåte, som medfører kvantitativ destruksjon av de andre aminer og ammoniakk, ble 16—18 % av trimetylaminmengden spaltet. Der skjer en oksydativ spaltning hvorved dannes blant annet dimetylnitrosamin. Dette forflyktiges under nitreringen. Vi samlet det opp, spaltet det ved koking

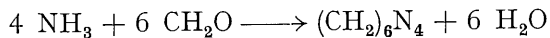
med kons. HCl, hvorved dimetylamin regenereres og kunne lett påvise det som kobber-dimetyl-dithiocarbamat.

Som det vil framgå av det ovenstående vil bestemmelsen av trimetylamin ved destruksjon av ammoniakk og de øvrige aminer med salpetersyring, gi for lave resultater, da også dette amin delvis spaltes under nitreringen. Metoden kan altså ikke nyttes til kvantitativ bestemmelse av trimetylamin.

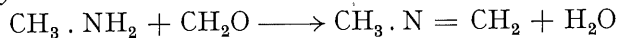
3. FLYKTIGE N-BASERS REAKSJON MED FORMALDEHYD.

Som kjent reagerer formalin med ammoniakk, mono- og di-metylamin, men ikke med trimetylamin. Reaksjonene foregår etter totallikningene:

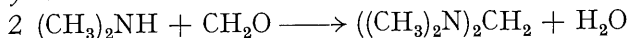
Ammoniakk



Monometylamin

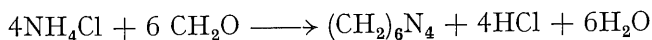


Dimetylamin



Ammoniakk reagerer altså med formalin under dannelse av $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ — *hexametylentetramin*, monometylamin danner $\text{CH}_3 \cdot \text{N} = \text{CH}_2$ — *metylenmetylamin*, og dimetylamin danner $((\text{CH}_3)_2\text{N})_2\text{CH}_2$ — *tetrametylmetylendiamin*, mens trimetylamin ikke reagerer med formalin. Reaksjonen mellom ammoniakk og formalin ble opprinnelig foreslått benyttet til bestemmelse av formalin i oppløsninger (LEGLER 1883). Der tilsettes i kjent mengde et overskudd av ammoniakk, som vil reagere med det tilstedeværende formalin til hexametylentetramin, og den uforbrukte mengde ammoniakk titreres tilbake med syre. Da hexametylentetramin selv er en base, må man velge en indikator som slår om ved en pH, hvor innflytelsen av hexametylentetramin ikke gjør seg gjeldende.

Tilsetter man en oppløsning av ammonium-klorid et overskudd av formalin, får en dannet hexametylentetramin, mens samtidig en med ammoniakkmengden ekvivalent mengde syre frigjøres:



Den frigjorte syre kan titreres, og metoden således benyttes til kvantitativ bestemmelse av ammoniakk i oppløsninger.

Teoretisk skulle en viss mengde ammoniakk bare kreve ca. den tredobbelte mengde formalin for dannelse av hexametylentetramin. Det

viser seg dog at skal reaksjonen forløpe kvantitativt og øyeblikkelig, må formalin være tilstede i rikelig overskudd.

Ved et titrervolum av ca. 100 ml må man tilsette 15 ml 30 %-ig formalin.

Da som nevnt trimetylamin ikke reagerer med formalin, kan man atskille ammoniakk og trimetylamin, slik de foreligger som hydroklorider eller sulfater i forlaget etter destillasjon av et serum, på følgende måte:

Formoltitrering av ammoniakk.

Oppløsningen (ca. 100 ml) tilsettes 5 dråper metylrødt (0,02%-ig) og titreres med $n/10$ natronlut til gul farge. Derved bestemmes summen av de flyktige baser. Så tilsettes 10 dråper fenolftalein (2 %-ig) samt 15 ml formalin (30—40 %-ig). Formalinoppløsningen er på forhånd nøytralisert til svak rødfarge på fenolftalein. Er det meget ammoniakk tilstede, vil oppløsningen etter formalintilsetningen anta rød farge, da den av ammoniumkloridet frigjorte syre vil gjøre oppløsningen sur overfor metylrødt. Man tilsetter så $n/10$ natronlut, hvorved oppløsningen igjen antar en gul farge, og fortsetter titreringen inntil svak rosa farge på fenolftalein. Derved bestemmer man innholdet av ammoniakk.

Innholdet av ammoniakk og trimetylamin i forlaget etter destillasjonen blir altså bestemt ved to titreringer. Ved den første titrering (omslag på metylrødt) bestemmes summen av de flyktige baser, eller »total flyktig N« (blindprøve ÷ den ved titreringen forbrukte mengde natronlut). Ved den andre titrering (tilsetning av formol og titrering inntil svak rosa farge på fenolftalein) bestemmes ammoniakkmengden. Trimetylamin blir da differensen mellom total flyktig N og ammoniakk.

Reaksjonen mellom ammoniumsaltet og formalin når denne er tilstede i tilstrekkelig overskudd, forløper øyeblikkelig og kvantitativt, og indikatorenes omslag er meget tydelige. Metoden er således meget sikker i sin utførelse og har sogar vært foreslått som innstillingsmetode for $n/10$ natronlut, idet man anvender ammoniumklorid som innstillingssubstans og formoltitrerer, (KATTWINKEL 1922). Dette gjelder rene oppløsninger av ammoniumsalter eller i blanding med trimetylamin-salter, som ikke influerer på formoltitreringen. Noe annerledes stiller saken seg hvis mono- og di-metylamin er til stede i *nevneverdige mengder*.

Formoltitrering av monometylamin.

En vandig oppløsning av metylamin-hydroklorid vil ved tilsetning av formalin, på samme måte som ammoniumklorid, frigjøre en med

aminen ekvivalent mengde syre, som kan titreres med natronlut og fenolftalein som indikator.

I tabell 14 vises et par eksempler på formoltitrering av rene oppløsninger av ammoniumklorid, og -sulfat samt mono-metylaminhydroklorid. Saltene oppløses i 100 ml utkokt, destillert vann. Der tilsettes 5 dråper metylrødt (0,02 % -ig) og n/10 natronlut til gult omslag. Så tilsettes 15 ml nøytralisert formol (30-40 % -ig) samt 10 dråper fenolftalein (2 %-ig) og der titreres med n/10 natronlut til svak rosa farge.

Tabell 14. *Formoltitrering av ammonium- og monometylaminsalter.*
Formoltritation of Ammonium- and Monomethylamine Salts.

Salt	Tilsatt mengde	Funnet ved titreringen	I % av tilsatt
	<i>mg N</i>		
NH ₄ Cl	28,20	28,22	100,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	28,15	28,07	99,7
CH ₃ NH ₂ · HCl	3,86	3,81	98,7
—»—	8,62	8,51	98,7

Som en ser vil ammoniumsalter kunne titreres 100 % ved tilsetting av formalin, og metylamin 98—99%, når man titrerer til svakt rosa omslag på fenolftalein.

Formoltitrering av ammoniakk og monometylamin i blanding.

Har man ammoniakk og metylamin i blanding, vil resultatet bli et annet. Dette framgår av følgende forsøk:

25 ml av oppløsninger av henholdsvis ammoniumklorid og metylaminhydroklorid tilsettes formol og krever ved titreringen en med N-basene ekvivalent mengde natronlut. Blander man derimot 25 ml av hver av de to oppløsninger og formoltitrerer, vil den forbrukte mengde natronlut ikke utgjøre summen av de to enkelttitreringer, men mindre. Eksempel:

Tabell 15. *Formoltitrering av ammoniakk og metylamin i blanding.*
Formoltritation of a Mixture of Ammonium- and Monomethylamine Salts.

	Forbrukt ved formoltitreringen:
25 ml NH ₄ Cl-oppl.	9,61 ml n/10 NaOH
25 ml CH ₃ NH ₂ · HCl-oppl.	6,13 —»—
Tilsammen	15,74 ml n/10 NaOH
25 ml NH ₄ Cl + 25 ml CH ₃ NH ₂ · HCl	14,50 —»—

Blandingen av ammoniumklorid og metylamin-hydroklorid lar seg altså bare formoltrere i en mengde av ca. 92 %. Lar man den ferdigtitrerte oppløsning stå, vil den anta en sterkere og sterkere *rødfarge* som tegn på at der frigjøres *base*, eller at reaksjonen går tilbake. Det er det samme fenomen som gjør seg gjeldende ved formoltrering av aminosyrer etter SØRENSENS metode, når der er ammoniumsalter til stede, (JÆGER 1909, HENRIQUES og SØRENSEN 1910). Ved blandinger av ammoniakk og aminosyrer vil resultatet ved formoltreringen bli 6—8 % lavere enn beregnet, og den ferdigtitrerte oppløsning blir ved henstand mer og mer alkalisk i motsetning til rene aminosyreoppløsninger som kan ettertitreres med syre. Metylamin gir ikke denne feil ved blanding med aminosyrer. Anomalien ved blandinger av ammoniakk og metylamin må altså skyldes ammoniakk. HENRIQUES og SØRENSEN prøver å forklare anomalien kjemisk, idet de tenker seg reaksjonen mellom ammoniakk og formol forløpe i to trinn:



De tenker seg altså at der som mellomprodukt dannes metylenimin. Da dette ved siden av N inneholder et reagerbart H, kan det tenkes at iminet foruten å reagere med formol til hexametylentetramin også reagerer med aminosyren, enten med amino- eller karboksyl-gruppen. I begge tilfelle vil bireaksjonen gi seg til kjenne ved et lavere lutforbruk ved formoltreringen.

At reaksjonen mellom formaldehyd og ammoniakk er en tidsreaksjon, som forløper i flere trinn er meget sannsynlig, og skulle ytterligere bli bekreftet av iakttagelser vi har gjort og som vil bli beskrevet i det følgende.

Formoltrering av dimetylammin.

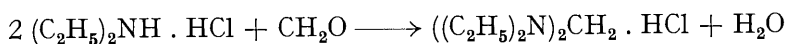
Mens hydrokloridene av ammoniakk og metylamin lar seg formoltrere kvantitativt med fenolftalein som indikator, er dette ikke tilfelle med *dimetylammin*. Forsøker man å formoltrere en oppløsning av dimetylammin-hydroklorid mot fenolftalein, vil man ved svakt rosa omslag bare ha forbrukt en mengde lut, tilsvarende ca. 30 % av den tilsatte mengde dimetylammin. Omslaget på indikatoren er meget svakt og utydelig. Tilsetning av noen dråper lut i overskudd vil bare forsterke rosafargen ubetydelig, som om oppløsningen skulle pufre ved fenolftaleinets omslagspunkt.

At dimetylammin i motsetning til ammoniakk og metylamin ikke lar kvantitativt formoltrere, må bero på en av to muligheter:

a) Ved reaksjonen mellom dimetylamin-hydroklorid og formalin vil der ikke »frigjøres« en ekvivalent mengde syre.

b) Den eventuelle »frigjorte« syre lar seg ikke titrere med fenolftalein som indikator, grunnet tilstedeværelse av pufrende forbindelser.

BOURY og SCHWINTE (1935) formoltitrerer *dietyl*-aminhydroklorid med kresol-rødt som indikator og kommer til det resultat at i motsetning til ammoniakk og metylamin, vil *dietyl*-amin-hydroklorid ved tilsetning av formol hverken frigjøre »syre eller base«. Samme resultat var tidligere OKOLOFF (1932) kommet til, idet rososyre ble anvendt som indikator. Han trekker den konklusjon at dietylamin-hydroklorid ikke reagerer med formol etter type av ammoniakk, men av anilinklorid, og setter opp følgende likning for reaksjonen mellom dietylamin-hydroklorid og formol (en reaksjonslikning som også BOURY og SCHWINTE anfører i sitt arbeid):



Bortsett fra en mystisk forsvinnen av et mol HCl, kan likningen i og for seg være riktig ved en bestemt pH. Men konklusjonen, at HCl skulle være bundet til komplekset, og ikke være titrerbar, er gal.

Vi har ikke hatt anledning til å undersøke forholdet ved *dietyl*-amin, men kan ikke tenke oss at reaksjonen skulle forløpe vesensforskjellig fra *dimetyl*-amins reaksjon med formol. Det av *dietyl*-amin dannete reaksjonsprodukt, *tetraetyl*-metylen-diamin er muligens en noe sterkere base enn *tetra-metyl-metylendiamin*, men prinsipielt skulle de to reaksjoner forløpe likt. Allerede til svakt rosa omslag på fenolftalein lot, som nevnt ca. 30 % av den tilstedeværende mengde dimetylamin-hydroklorid seg formoltitrere. Anvendes tymolftalein som indikator, lar over 90 % av aminet seg formoltitrere.

En har etter dette grunn til å anta at reaksjonen mellom dimetylamin og formol, i motsetning til hva blir hevdet av OKOLOFF, samt BOURY og SCHWINTE, ikke forløper prinsipielt forskjellig fra reaksjonen mellom ammoniakk og formol. Men det dannete reaksjonsprodukt, tetrametyl-metylen-diamin må være en relativt sterk base, som binder syre ved fenolftaleins omslagspunkt. pK_s for denne base ligger sannsynligvis på rundt 8, å dømme etter titreringsforløpet, mens hexametylentetramin har en pK_s på ca. 5, og således ikke influerer på titreringen med fenolftalein som indikator. Heller ikke metyl-metylen-amin, reaksjonsproduktet mellom metylamin og formol, synes å influere på titreringen mot fenolftalein i nevneverdig grad.

I alminnelig frisk råfisk forekommer metylamin og dimetylamin i så ubetydelige mengder, at en kan se bort fra deres virkninger ved formoltitreringen. Ved bedrevet fisk vil man kunne merke at omslaget

til rosa ved formoltitreringen ofte er vanskelig å observere helt nøyaktig. Etter det som er hevdet ovenfor, må dette tilskrives tilstedeværelse av dimetylamen.

Destillasjon av et ammoniumsalt etter tilsetning av formaldehyd.

Hvis hexametylentetramin var bestandig under en alkalisk destillasjon, kunne man bestemme trimetylamen i blanding med ammoniakk ved ganske enkelt å tilsette formol i destillasjonskolben som ville binde den ammoniakk som var til stede, og deretter kunne trimetylamen destilleres over etter at oppløsningen var gjort alkalisk med for eks. magnesiumoksyd. Forutsetningen var da både at hexametylentetramin ikke ble spaltet under destillasjonen, og at det virkelig av ammoniakk og formalin ble dannet kvantitative mengder hexametylentetramin. BUDAI (1913), finner at hexametylentetramin ikke spaltes under destillasjon fra en 4 %-ig NaOH-oppløsning. Den lille mengde syrekonsumerende base som destillerer over blir tilskrevet forurensninger i preparatet eller forsøksfeil.

Ved våre undersøkelser finner vi at hexametylentetramin undergår en svak spaltning, selv under destillasjon med magnesiumoksyd som alkaliseringsmiddel, som følgende forsøk viser:

En mengde hexametylentetramin, tilsvarende 10,6 mg N destillertes fra et volum av 250 ml, etter tilsetning av 0,5 g MgO. Som forlag ble benyttet kjent mengde fortynt svovelsyre. Etter 45 minutters destillasjon ble skiftet forlag, fylt på vann i destillasjonskolben til volumet atter var 250 ml, og destillert ytterligere i 45 minutter. Det samme ble gjentatt enda en gang.

Resultatet framgår av tabell 16.

Tabell 16. *Avspalting av flyktig N fra hexametylentetramin.*
The Splitting-off of Volatile N from Hexamethylene Tetramine.

	Avspaltet N i mg	Avspaltet N i %
Destillasjon 1	0,50	4,72
— 2	0,47	4,65
— 3	0,47	4,88

Hexametylentetramin vil altså spaltes i en mengde av 4,7 % under en 45 minutters destillasjon med MgO som alkaliseringsmiddel.

Tilsettes derimot formalin under destillasjonen, vil ikke påvisbare mengder flyktig N destillere over. Det tilsatte formalin vil altså binde det avspaltete N, eventuelt motvirke spaltingen av hexametylentetramin.

Hvis derfor et *ammoniumsalt* tilsettes overskudd av formalin, og der blir dannet kvantitative mengder hexametylentetramin, skulle denne oppløsning ved destillasjon med MgO forholde seg som en oppløsning av hexametylentetramin tilsatt formalin. Der skulle altså ikke destillere over noe flyktig N.

Følgende forsøk skulle imidlertid vise at dette ikke er tilfelle:

En oppløsning av kjent mengde ammoniumsulfat ble nøytralisert mot metylrødt, og formoltitrert som tidligere beskrevet. Den forbrukte mengde n/10 natronlut viste at ammoniumsaltet var kvantitativt omsatt med formalin. Den formoltrerte oppløsning ble fortynnet med vann til 250 ml, tilsatt magnesiumoksyd, og destillert i 45 minutter over i et forlag med kjent mengde fortynnet svovelsyre. Forlaget tilbake-titrertes med n/10 natronlut og metylrødt som indikator. Samtidig ble utført parallelle destillasjoner med tilsvarende mengder ren hexametylentetramin, tilsatt samme mengde formol og øvrige joner. Resultatet framgår av tabell 17.

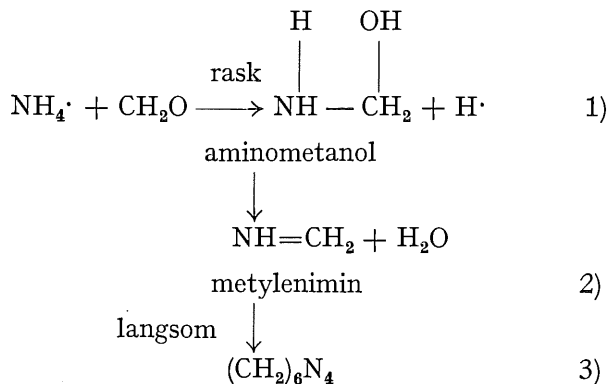
Tabell 17. *Destillasjon av ammoniumsalt tilsatt formol.*

Distillation of an Alkaline Mixture of Ammonium Salts and Formol.

Tilsatt mengde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12,84	mg N
Funnet ved formoltreringen	12,84	—
Avspaltet under destillasjonen	2,38	—
Avspaltet under dest. av hexametylentetramin	0,00	—

Som det vil framgå av tabell 17 vil en formoltrert oppløsning av et ammoniumsalt forholde seg vesensforskjellig fra en oppløsning av hexametylentetramin. Under en destillasjon med magnesiumoksyd, vil den formoltrerte ammoniumsaltoppløsning avspalte en mengde flyktig N tilsvarende 18—19 % av den tilsatte ammoniakkmengde, mens en oppløsning av hexametylentetramin under de samme betingelser ikke avspalter påvisbare mengder syrekonsumerende base.

Reaksjonen mellom ammoniakk og formalin forløper altså ikke under dannelse av kvantitative mengder hexametylentetramin. Reaksjonen må antas å være en tidsreaksjon og forløpe over mellomprodukter som er ubestandige under alkalisk destillasjon, eventuelt selv er flyktige baser. En kan anta at reaksjonen mellom et ammoniumsalt og formalin foregår etter skjemaet:



hexametylentetramin.

Dannelse av metylenimin, med frigjøring av syre, forløper øyeblikkelig og kvantitativt, da et ammoniumsalt lar seg formoltitrere kvantitativt umiddelbart etter formalintilsettingen.

Dannelsen av hexametylentetramin derimot må antas å være en tidsreaksjon, eller at reaksjonslikevekten under de givne betingelser ligger forskjøvet til venstre. (BAUR og RÜETSCHI, 1941).

Reaksjonsproduktet mellom *metylamin* og formalin er også ubestendig under en alkalisk destillasjon. Ved en 45 minutters destillasjon med MgO som alkaliseringsmiddel vil en finne igjen ca. 90 % av det tilsatte N i destillatet.

E. Om prøvetaing.

Ved prøvetaing av fiskepartier må man være oppmerksom på at flyktig N varierer fra fisk til fisk innen samme parti. I et tidligere arbeid (NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og BAKKEN 1944) er gjort rede for slike variasjoner av flyktig N i storsild, lagret i is. For sild, lagret 10 døgn i is (i alt ca. 13 døgn gammel sild) varierte total fl. N og trimetylamin N innen grensene:

Tot. fl. N. 29,1—52,1 mg N/100 g
Trimetylamin 10,1—29,6 —»—

Det er da lett forståelig at man ved for små gjennomsnittsprøver kan få helt misvisende resultater. I samme arbeid blir vist at man, ved en gjennomsnittsprøve bestående av 15 sild, må regne med en sannsynlig feil for henholdsvis:

Tot. fl. N 4—5 %
Trimetylamin N 6—7 %

Hos store eksemplarer av fisk, for eksempel av torsk, vil ikke variasjonene fra individ til individ være så store. I tabell 18 er gjengitt de individuelle variasjoner i et parti torsk (skrei) lagret 9—10 døgn i is:

Tabell 18. *Variasjoner i flyktig N i torsk.*
Variations in Volatile N from Cod.

Fisk nr.	Tot. fl. N mg N/100 g	Trimetylamin mg N/100 g	Ammoniakk mg N/100 g
1	18,0	5,3	12,7
2	20,2	6,4	13,8
3	20,8	6,9	13,9
4	21,4	7,7	13,7
5	21,9	6,5	15,4
6	22,0	8,1	13,9
7	22,4	8,0	14,4
8	23,0	9,1	13,9
9	24,9	9,8	15,1

En skulle altså kunne greie seg med et mindre antall fisk til en gjennomsnittsprøve av torsk enn av sild. En gjennomsnittsprøve bestående av 4—5 fisk skulle gi et noenlunde korrekt uttrykk for partiet, og man tar da ikke hele fisken, men skjærer ut et stykke av nakkepartiet.

Har man på denne måte ved å prøveta et tilstrekkelig antall fisk, fått et tilnærmet uttrykk for *gjennomsnittsverdien* av flyktig N, må man alltid ha for øye de individuelle variasjoner når man skal bedømme partiet ut fra denne verdi. Hvis den øvre grense for innhold av trimetylamin i fisk som ennå kan tillates omsatt som ferskfisk settes til for eks. 10 mg N/100 g, så gjelder denne grense for *enkeltfisk*, og ikke for *fiskepartier*. Har man som gjennomsnittsverdi for et fiskeparti funnet 10 mg trimetylamin-N/100 g, så risikerer man at halvparten av partiet ligger over denne grense, og altså må betraktes som bedervet. Grensen må for gjennomsnittsverdier av fiskepartier settes noe lavere, for eks. ved 7 mg trimetylamin-N/100 g.

F. Framgangsmåte ved bestemmelse av flyktig N i fisk.

1. FRAMSTILLING AV JERNSERUM OG SYRESERUM.

Fiskekjøttet befries for skinn og ben og males 2 ganger på kjøttkvern, idet farsen blandes godt hver gang.

Av den homogeniserte farse innveies 100 g, slemmes opp med 400 ml vann og tilsettes saltsyre (1 : 1) til pH = 5,2.

Oppslemningen opphetes i vannbad til temperaturen er 60 ° C, og tilsettes 15 ml kolloid jernhydroksyd (10 %-ig, dialysert praktisk talt saltsyrefritt) under omrysting. Så opphetes videre til 70° C, og denne temperatur holdes i 5 minutter. Derpå avkjøles og filtreres gjennom grovt filter (SCHLEICHER & SCHÜLL nr. 520). For vanlige kontrollanalyser kan tilsetningen av kolloid jernhydroksyd sløyfes, slik at man etter korrigering av pH oppheter til 70° C, lar stå i 5 minutter, avkjøler og filtrerer.

2. DESTILLASJON.

100 ml serum pipetteres over i en Erlenmeyerkolbe på 750 ml, der fortynnes med 150 ml vann og tilsettes ca. 0,5 g magnesiumoksyd, samt noen dråper antiskummemiddel (sek. oktylalkohol, paraffinum liq., råolje eller liknende). Så påsettes luftkjøler (se fig. 2) og destilleres 45 minutter over i et forlag med 15 ml ca. n/10 svovelsyre fortynnet med ca. 10 ml destillert vann. Varmekilden reguleres slik at oppløsningen kommer i kok etter 12—13 minutter, og destillasjonstiden regnes da fra begynnende koking.

3. TITRERING.

Etter at forlaget er avkjølt tilsettes 5 dråper metylrødt (0,02 %-ig) og titreres med n/10 natronlut til gult omslag. Differensen mellom blindprøven og dette forbruk angir *total flyktig N*. Så tilsettes 15 ml formol (30—40 %-ig), som på forhånd er nøytralisert mot fenolftalein,

samt 10 dråper fenolftalein (2 %-ig), og man titrerer videre til svak rosa omslag på fenolftalein. Derved bestemmes *ammoniakk-N*, og differensen mellom total flyktig N og *ammoniakk-N* angir *trimetylammin-N*.

4. UTREGNING AV RESULTATER.

Resultatet angis som mg N/100 g farse. Ved utregning av resultatene forutsettes at 100 g farse og 400 ml vann gir 500 ml oppløsning. Tilsetter man for eks. 1 ml saltsyre og 15 ml kolloid jernhydroksyd under framstilling av serumet, får man, når man destillerer 100 ml serum, omregningsfaktoren 5,16.

G. Lagringsforsøk.

Der er utført en del lagringsforsøk med sild, torsk samt noen haiarter i is. Fisken ble pakket godt ned i is, og sto under lagringen på et rom med lufttemperatur + 2—4° C. Der ble tatt prøver hver annen dag. Av sild ble til hver prøve uttatt 10 stk., av torsk 2 stk. Haifiskene ble skåret opp i skiver à ca. 200 g, pakket inn i vokset papir på en sådan måte at pressaften ikke kunne renne vekk, og lagt i is. Til hver haifiskprøve uttas 2 skiver. Til lagringsforsøket med håbrand med og uten skinn samt klorbehandlet fisk, ble lagret 5 kgs stykker av fisken, og til hver prøve ble skåret av to stykker à ca. 200 g. Klorbehandlingen ble foretatt på den måte at fiskestykkene, befridd for skinn, fikk ligge noen minutter i klorvann, som inneholdt ca. 0,5 promille klor.

Destillasjon av haisera.

Ved destillasjon av seraer av haifisk, må man være oppmerksom på at disse inneholder betraktelige mengder urinstoff. Dette vil delvis spaltes under en vanlig destillasjon med MgO, og gi for høye verdier for flyktig N, hvilket framgår av tabell 19 som viser avspaltet flyktig N under en 45 minutters destillasjon av 250 ml urinstoffopløsning med MgO som alkaliseringsmiddel, ved atmosfæretrykk.

Tabell 19. *Avspalting av flyktig N fra urinstoff.*

The Splitting-off of Volatile N from Urea.

Urinstoff mg N	Avspaltet mg N	Avspaltet %
28,5	1,09	3,82
57,0	2,08	3,65
85,5	3,19	3,73

Som det framgår av tabell 19, vil urinstoffet spaltes i en mengde av ca. 3,7 % under en 45 minutters destillasjon med MgO som alkaliseringsmiddel ved atm. trykk. Da haiartene inneholder ca. 1,7—1,8 % urinstoff, vil man ved destillasjoner av haiseraer på vanlig måte få resultater som ligger ca. 30 mg N/100 g

for høye. For å unngå dette, blir en nødt til å foreta en mer skånsom destillasjon av haiseraer, og vi foretrekker destillasjon i vakuum ved ca. 50° C i det tidligere beskrevne destillasjonsapparat (fig. 5). 100 ml serum tilsettes noen dråper sek. oktylalkohol og 0,5 g MgO, og destilleres i 15 minutter ved et trykk av ca. 15 mm Hg. Under disse betingelser vil der ikke skje noen avspalting av flyktig N fra urinstoffet.

Forandringen av flyktig N under lagringen framgår av lagringskurvene fig. 13 til fig. 18.

Lagringskurvene for sild og torsk viser omtrent det samme billede. Ammoniakk-N, og dermed tot. fl. N vil i begynnelsen av lagringsperioden *gå tilbake*, og først nå utgangsverdien igjen etter flere døgns lagring. Disse verdier er derfor utjennlige som indikasjon på fiskens friskhetstilstand, i hvert fall i den første tid av lagringsperioden. Trimetylamin-N, derimot, stiger under hele lagringstiden, i de første 10—12 døgn ganske jevnt, for siden når fisken begynner å bederves å nå inflasjonspunktet. Bestemmelse av trimetylamin vil altså kunne angi fiskens friskhetstilstand til en hvilken som helst tid av lagringsperioden.

Hva lagringskurvene for haifiskene angår, viser de en langsommere stigning av ammoniakk og trimetylamin enn tilfellet var for sild og torsk. Især brukte viste seg å være meget holdbar, hvilket kan tilskrives den store mengde melkesyre som dannes. Den lavest målte pH var 5,4 etter 13 døgns lagring i is, og selv etter 21 døgn luktet brukden svakt av melkesyre. Bedervelsen skjedde mellom det 21 og 25 døgn, hvor pH steg fra 5,84 til 6,96, samtidig som ammoniakkinholdet ble fordoblet (fra 36 til 78 mg N/100 g). Håkjerring og håbrand holdt seg friske i 16—18 døgn.

Innholdet av trimetylamin var meget lavt under hele lagringen, til tross for at haifiskene inneholder betraktelige mengder trimetylaminoksyd (220—300 mg N/100 g). Muligens skyldes det at bakteriefloraen i vesentlig grad består av urinstoffspaltere, som fortrenger trimetylaminoksyd-spaltere.

Når det faktisk er slik at pH i fiskemuskulaturen spiller en så stor rolle for stagnering av bakterievirksomheten, må en på en eller annen måte søke å opprettholde denne pH under lagringen. Det lar seg ikke gjennomføre i den praktiske fiskeribedrift å bibringe fisken den ønskete pH ved tilførsel av syre ved en direkte metode. Indirekte derimot kan vi, ved å ise fisken hurtigst mulig etter at den er brakt i lagringsmessig stand, bringe de prosesser som fører til at kjøttet igjen blir mer og mer alkalisk til å forløpe langsomt. Et annet viktig moment er at *skinnnet flåes* av med en gang, og at fisken etter flåingen spyles av, gjerne med klorvann. Betydningen av at fisk ikke får ligge med skinnnet på, framgår av fig. 18 som viser lagring i is av håbrand med og uten skinn, samt vasket i klorvann. Ved at fisken blir flådd vil den holde seg ca. 1 uke lenger i is enn med skinnnet på.

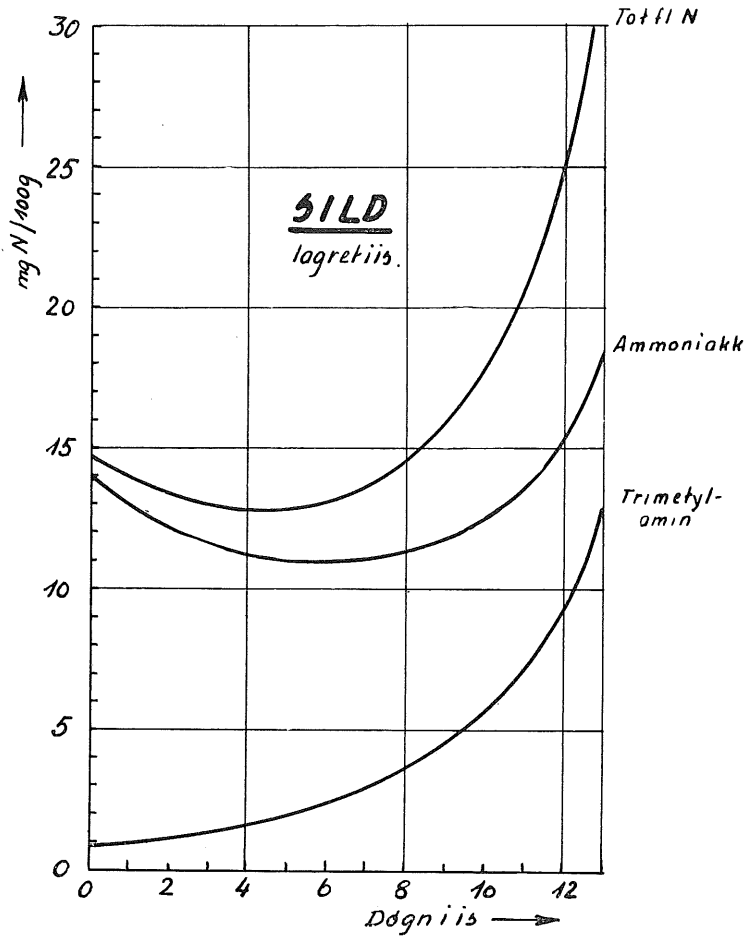


Fig. 13. Lagringskurve for vintersild i is.
Storage of Winterherrings in Ice.

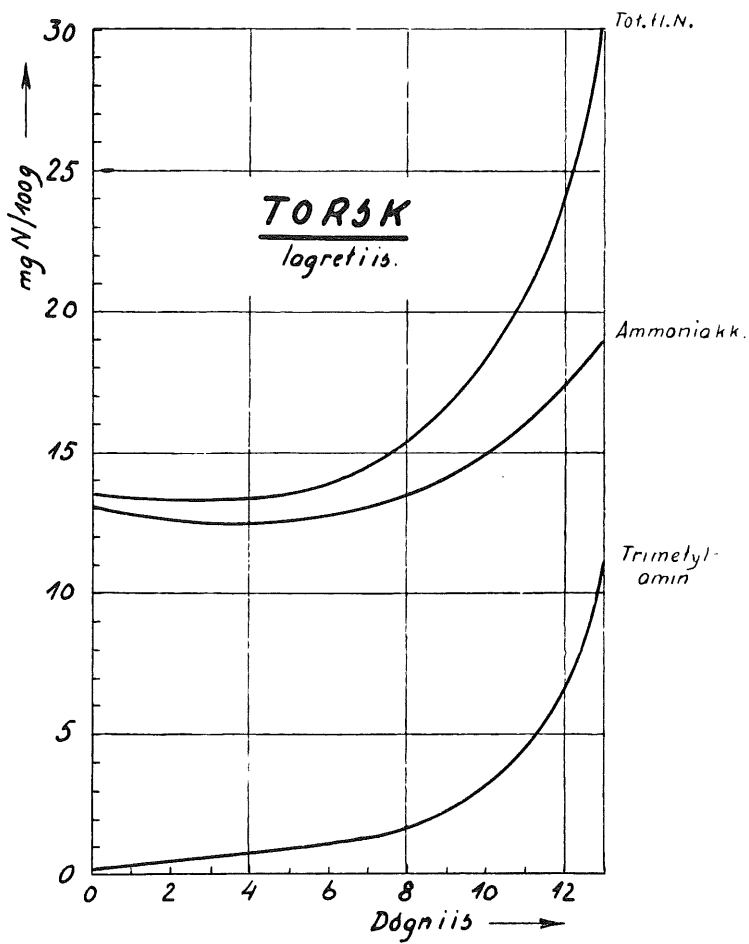


Fig. 14. Lagringskurve for torsk i is.
Storage of Cod in Ice.

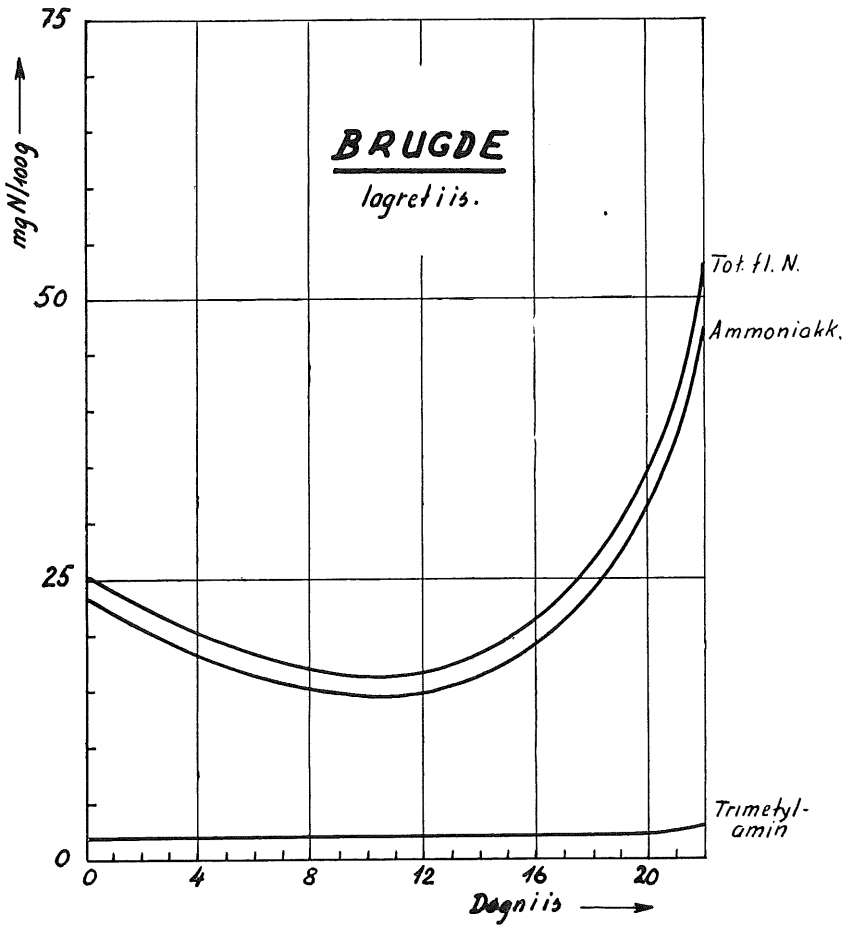


Fig. 15, Lagringskurve for brugde i is.
Storage of Basking Shark in Ice.

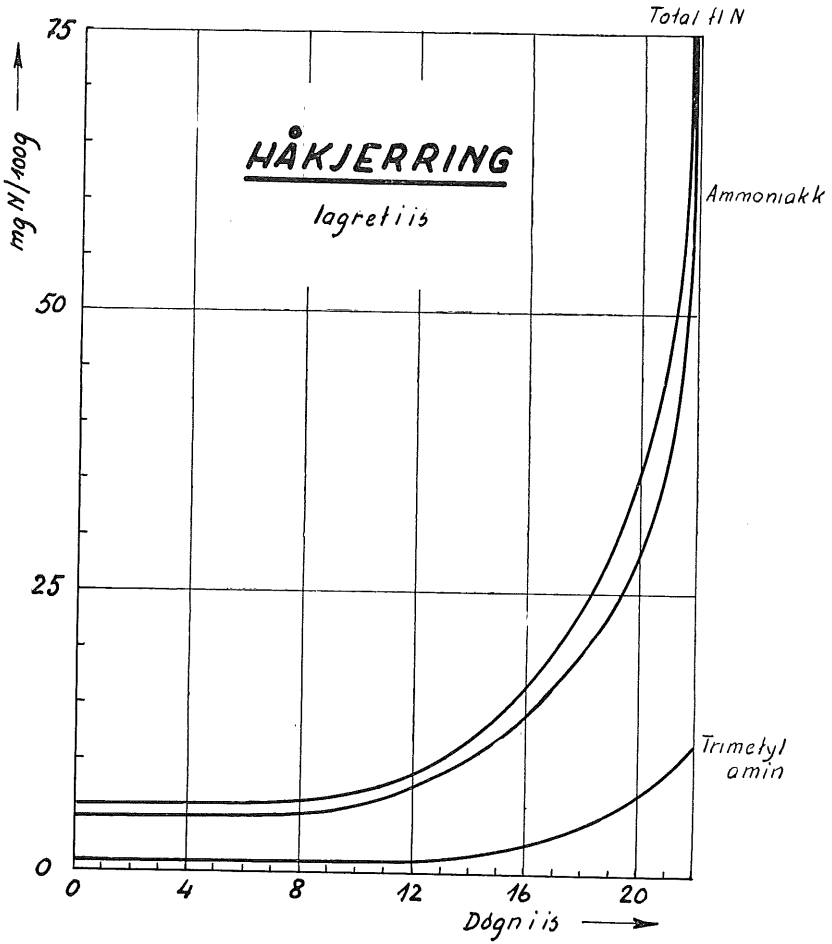


Fig. 16, Lagringskurve for håkjerring i is.
Storage of Greenland Shark in Ice.

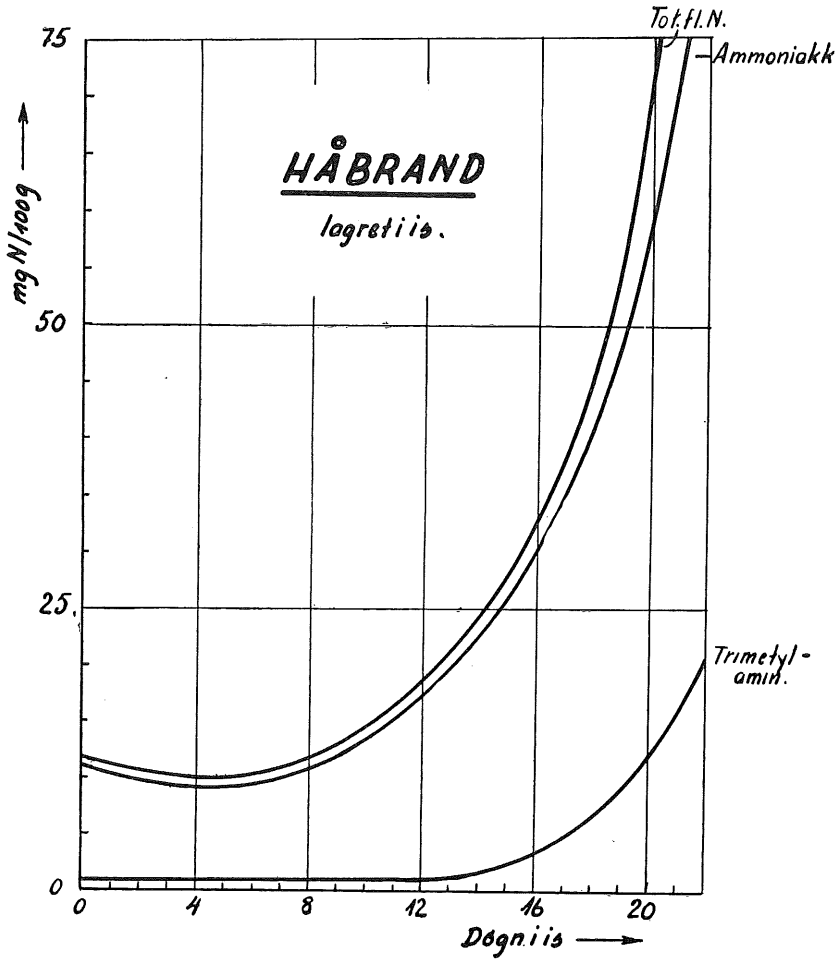


Fig. 17. Lagringskurve for håbrand i is.
Storage of Porbeagle in Ice.

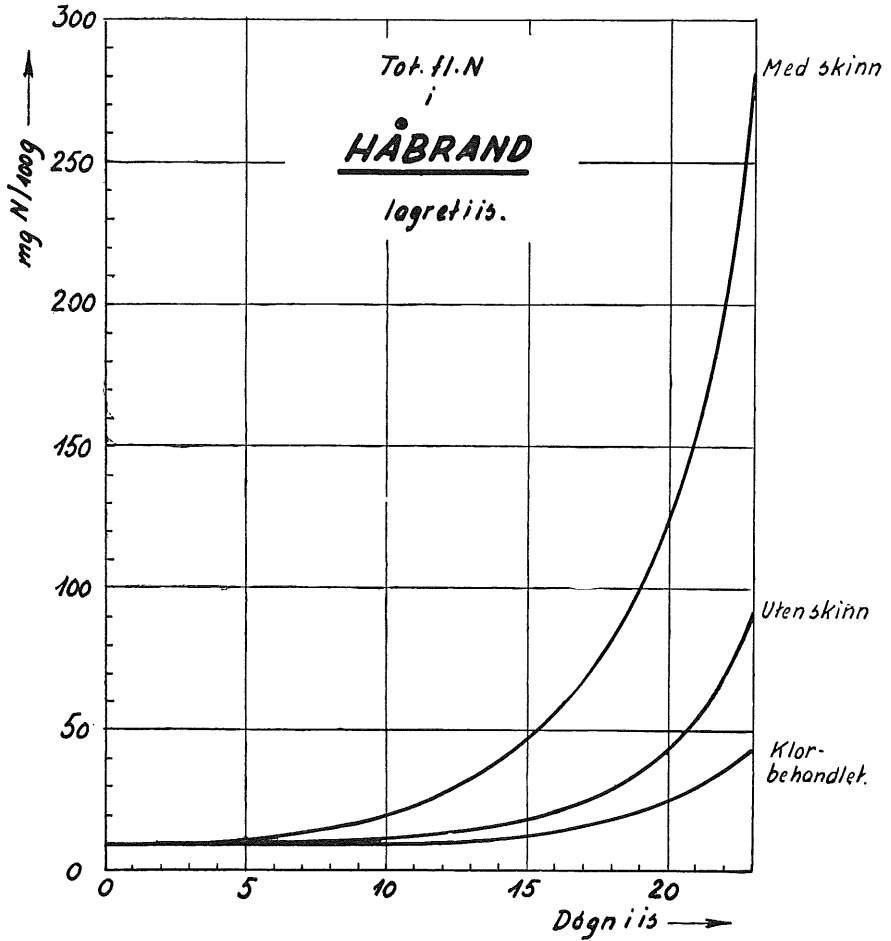


Fig. 18. Lagringskurve for håbrand, med og uten skinn, i is.
Storage of Porbeagle with and without Skin, in Ice.

H. Sammendrag.

Nesten alle som anvender en objektiv bedømmelsesmetode som støtte for organoleptiske iakttagelser av fisks ferskhet har valgt bestemmelse av flyktig N. Dette er et samlebegrep for ammoniakk og metyl-derivatene av denne. En av dem: trimetylamin, synes særlig egnet for øyemedet da mengden av den stiger svært langsomt så lenge fisken er god menneskeføde og deretter tiltar i stadig økende målestokk. Man får en glatt og karakteristisk kurve for trimetylamin, mens ammoniakkkurven forløper på en måte som gjør den lite egnet. De øvrige, mono- og dimetylamin er kvantitativt sett av mindre interesse, om enn dimetylamin tillegges en viss betydning.

Da bestemmelsesmetodene og i det hele tatt framgangsmåten hos de forskjellige som driver undersøkelser over fiskens friskhet avviker ikke så lite og derfor kan være årsaken til uoverensstemmelser ved bedømmelsen, fant vi det av betydning å gå metodene etter i sømmene. Resultatet kan kort resymeres slik:

Såvel muskelfarse som jernserum« framstilt av denne kan analyseres med hensyn på flyktig N. Vannekstrakter og pressafter synes ikke å egne seg.

Flyktig N fjernes fra farseoppslemning ved hjelp av destillasjon i vakuum, fra serum ved hjelp av destillasjon, gjennomluftning og diffusjon. Destillasjonen kan foretas i vakuum og ved vanlig trykk. Foretas den i vakuum, er en temperatur av 50 ° C og et trykk av 15 mm Hg å anbefale.

Destillasjon ved vanlig trykk kan bare foretas med sera av *urinstofffri* fisk, det vil si benfisk, i andre tilfelle må enten vakuummethode, gjennomledning av luft eller diffusjon i lukkede skåler anvendes.

Letttest flyktig er trimetylamin, så følger ammoniakk, dimetylamin og monometylamin.

Trimetylamin destillerer kvantitativt i løpet av kort tid, således 30 minutter ved vanlig trykk og 5 minutter i vakuum. Ingen av metodene er så raske å utføre som vakuummethode.

Ved gjennomluftningen er av viktighet å holde volumet så lite

som praktisk mulig. Det bør etter halvmetting med pottaske som alkaliseringmiddel ikke overstige 30 ml. 200 liter syrevasket luft trekkes gjennom og av hensyn til raskhet ved utførelsen av analysen bør luftstrømmen være kraftig.

Ved vakuummeteroden kan alle alkaliseringmidler anvendes, dog med unntagelse av alkalihydroksyder.

Ved gjennonledning av luft og ved diffusjon har vi funnet pottaske tilfredsstillende som alkaliseringmiddel.

Jernsera, som er holdbare i kjøleskap i 5—6 dager, er bekvemme å arbeide med, da de tillater fiksering av det flyktige N på et hvilket som helst tidspunkt.

Ved destillasjon av jernsera ved vanlig trykk dannes der en ubetydelig mengde flyktig N som består av ammoniakk. Den trimetylamin N en finner, er den som fisken virkelig inneholder.

Ved destillasjon av farse ved vanlig trykk dannes der meget flyktig N, som ved mager fisk, som torsk og sei, nesten totalt består av ammoniakk, ved den fete fisk sild derimot, av både ammoniakk og trimetylamin.

For å atskille de enkelte komponenter i det flyktige N har vi blant annet prøvet behandling med salpetersyrling. Denne reagerer kvantitativt med ammoniakk, mono- og dimetylamin, men da vi fant at den også til en viss grad reagerte med trimetylamin, måtte metoden forlates som uskikket for isolering av denne amin.

Det ble påvist en effekt tilsvarende den HENRIQUES og SØRENSEN fant ved titrering av en blanding av aminosyrer og ammoniakk samt ved en blanding av monometylamin og ammoniakk.

I nærvær av fenolftalein som indikator formoltitreres ammoniakk og monometylamin kvantitativt mens dimetylamin krever en indikator som har sitt omslag på mer alkalisk område. Reaksjonen mellom ammoniakk og formaldehyd er påvist å være en trinreaksjon.

Urinstoff spaltes ved koking i nærvær av magnesiumoksyd. Der avgis flyktig N i en mengde av 3,7 % pr. 45 min.

Der ble utført lagring av benfiskene torsk og sild, av brusfiskene brugde, håkjerring og håbrand (den siste såvel med som uten skinn) i is. Kurveforløpene for total flyktig N, ammoniakk N og trimetylamin N er angitt. For haiartene framgår det interessante forhold at de viser større holdbarhet enn benfiskene. Ved håbrand ser man at fjernelsen av skinnen ytterligere har øket holdbarheten. Når den gjengse oppfatning er at haiartene ødelegges meget hurtig, er nok dette riktig slik som disse fisk dessverre ofte behandles, idet de ises for sent. Men den hurtige ødeleggelsen kan unngås slik som disse forsøk viser.

I. Summary.

In all countries interested in the transport and storage of fresh fish and processed fish products an objective method of controlling the freshness of the fish, viz. the estimated content of volatile N or one of its components, especially trimethylamine N, has now generally been adopted. Owing to different methods of sampling and performing analyses, comparison between the results of different investigators can not be easily drawn. We therefore decided to make some research concerning the volatile forms of nitrogen appearing as decomposition products in the bacterial breakdown of fish, and with special respect to analytical procedure. The results of this work are laid down in this paper.

We found that either the minced muscle or an »iron serum« should be used in estimating content of volatile N, and not water extracts or pressjuices.

All kinds of muscle suspensions must be distilled in vacuo.

The isolation of volatile N from sera may be done by distillation, aeration or diffusion. We may distill as well in vacuo as at atmospheric pressure, but with one reservation: only sera from urea-free fish can be distilled at atmospheric pressure.

When distilling in vacuo most kinds of alkalizers may be used, with the exception of the hydroxides of the alkalies. At atmospheric pressure calcined magnesia may find application.

The volatility of methylamines and ammonia decreases from trimethylamine over ammonia and dimethylamine to monomethylamine.

At atmospheric pressure the distillation period of the trimethylamine in the presence of magnesia should be 30 min., in vacuo 5 min. at 50° C.

When using the aeration method, the main thing is to keep the volume of the solution as small as is practically possible, the total not to exceed 30 ml, after adding potassium-carbonate until half saturation has been reached, 200 liters of air should be passed through the solution. The isolation of the volatile N will then be accomplished before long.

In an ice chest the iron sera will keep at least for 5 to 6 days.

Therefore, the making of iron sera enables us to fix the volatile N mirror any time desired.

When distilling sera of urea-free fish at atmospheric pressure, only traces of volatile N are splitted off while in minced muscle a large amount of volatile N will always be produced. In meager fish this volatile N will consist of ammonia only, but in herring also of trimethylamine.

On treating the volatile N in the distillate with nitrous acid, the acid react not only to ammonia, mono- and dimethylamine, but also to a certain degree to trimethylamine, which indicate that this method is not practicable for quantitative isolation of trimethylamine.

In the presence of phenolphthalein as indicator ammonia and monomethylamine are *quantitatively* formol titrated. On the other hand, dimethylamine, when titrated in the same way, needs a still more basic indicator.

Urea will decompose in an aqueous solution, after being boiled in the presence of magnesia, giving off volatile N at a rate of 3,7 % in 45 min.

Whole cod and herring, and pieces of muscle from the following species of shark: greenland shark, basking shark and porbeagle (the porbeagle with and without skin), were stored in ice for several days. Analyses were conducted on samples which had as much as possible been selected with a view to avoid the influence of variation of single individuals.

The curves show that it will be possible to store shark muscle in a fresh state for a much longer time than when storing the urea-free bonefish muscle of cod and herring. This result, however, may only be arrived at by icing the sharks immediately after capture. By skinning the sharks before icing them, the storage time may be still further prolonged.

Litteratur.

- BAUR og RÜETSCHI (1941): *Helv. Chim. Acta*, 24, 754.
BEATTY (1938): *J. Fish. Res. Bd. Can.* 4, 63.
BEATTY og GIBBONS (1936—1937): *J. Biol. Bd. Can.* 3, 77.
BOURY og SCHWINTÉ (1935): *Rev. Trav. Office Pêches Mar.* 8, 282.
BOURY (1936): *Rev. Trav. Office Pêches Mar.* 9, 401.
BUDAI (1913): *Z. Physiol. Chem.* 86, 107.
CANZANELLI, GUILD og RAPPORT (1944): *Science*, 99, 414.
CONWAY og BYRNE (1933): *Biochem. J.* 27, 419.
Den departementale analysekomité. Forslag no. 2. Forl. av *Teknisk Ukeblad*, Kristiania, 1924.
DOWDEN (1938): *Biochem. J.* 32, 455.
DYER (1943): *Fish. Res. Bd. Can. Prog. Rep.* no. 34, 4.
DYER (1945): *J. Fish. Res. Bd. Can.* 6, 351.
DYER og MOUNSEY (1945): *J. Fish. Res. Bd. Can.* 6, 359.
EGNÉR og JOHANSSON (1938): *Lantbruk-Högskolans Annaler*, 5, 113.
FOLIN (1902): *Z. Physiol. Chem.* 37, 161.
GLASSMANN og ROCHWARGER (1929): *Z. Unters. Lebensm.* 58, 585.
HANSEN (1930): *Zentralbl. Bakt.* I. 115, 391.
HENRIQUES og SØRENSEN (1910): *Z. Physiol. Chem.* 64, 120.
JÄGER (1909): *Hoppe Seyler*, 62, 333.
KATTWINKEL (1922): *Gas und Wasserfach*, 65, 186.
LAPIN og HEIN (1934): *Z. anal. Chem.* 98, 236.
LEGLER (1883): *Berichte*, 16, 1333.
MAKRIS (1930): *Z. anal. Chem.* 81, 212.
Mezincescuc og Szabo (1936): *J. Biol. Chem.* 115, 131.
NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og KARLSEN (1942): *Fiskeridir. Skrifter, Ser. Unders.* ved Statens Fiskeriforsøksstasjon, I, no. 3.
NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og BAKKEN (1944): *Tidsskr. f. Kjemi, Bergvesen og Metallurgi*, 4, 59.
OKOLOFF (1932): *Z. Unters. Lebensm.* 63, 129.
PRATER, COWLES og STRAKA (1942): *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 14, 703.
RICHTER (1938): *Biochem. J.* 32, 1763.
RICHTER, LEE og HILL (1941): *Biochem. J.* 35, 1225.
SHEWAN (1938): *Rep. Food Invest. Bd. Gr. Br.* 1937. 75.
— (1939): *Rep. Food Invest. Bd. Gr. Br.* 1938. 79.
TARR (1939): *J. Fish. Res. Bd. Can.* 4, 367.
— (1940): *J. Fish. Res. Bd. Can.* 5, 187.
VOIT (1929): *Zeitschr. f. Biol.* 89, 114.
WATSON (1939): *J. Fish. Res. Bd. Can.* 4, 252, 267.
WIRTH og ROBINSON (1933): *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 5, 293.
ZENGHELIS (1921): *Compt. rend. Paris*, 173, 153.