

FISKERIDIREKTORATETS SKRIFTER

Serie Teknologiske undersøkelser

(Reports on Technological Research concerning Norwegian Fish Industry)

Vol. II, No. 2.

Published by the Director of Fisheries

Anvendelse av mikrodiffusjon og vakuum-
destillasjon ved bestemmelse av flyktig N og
urinstoff N i fisk

(Determination of volatile N and urea N in fish by means of microdiffusion
and distillation in vacuo.)

Av

SVERRE HJORTH-HANSEN

(Afdeling for Mikrobiologi,

Fiskeridirektoratets Kjemisk-Tekniske Forskningsinstitut)

1 9 5 1

A.s John Griegs Boktrykkeri, Bergen

I n n l e d n i n g.

Fiskemuskulaturen og fiskenes organer inneholder, foruten eggehvitestoffer, også mange andre kvelstoffholdige stoffer. Karakteristisk for de fleste av dem er at de forekommer i meget små mengder, ofte med bare noen få mg pr. 100 g, mens de øvrige gjør seg sterkt gjeldende i kvantitativ henseende. I *benfisk* (*Teleostei*) finnes således trimetylaminoksyd og kreatin, i *bruskfisk* (*Elasmobranchii*) særlig meget trimetylaminoksyd, men også kreatin, betain og urinstoff, i blekkspruter (*Cephalopoda*) og i krepsdyr som reker, bokstavhummer, hummer og krabbe (*Decapoda*) er innholdet av trimetylaminoksyd ganske høyt. Forøvrig vet vi dessverre for lite, både kvalitativt og kvantitativt, om innholdet av disse stoffene i de forskjellige dyr i havet. Disse stoffene spiller en overmåte stor rolle for forståelsen av fiskens biokjemi og danner også grunnlaget for muligheten av å bestemme fiskeriproduktenes holdbarhet ved kjemiske metoder.

BOURY og SCHWINTE (1935), BEATTY og GIBBONS (1937), CONWAY og BYRNE (1935) har angitt analysemetoder som grunner seg på bestemmelser av flyktig N og HJORTH-HANSEN og BAKKEN (1947) gjennomgikk eksperimentelt slike metoder komparativt, således undersøkte de

- 1) destillasjon ved atm. trykk og i vakuum og
- 2) luftgjennomledning, mens de samtidig ga en oversikt over
- 3) diffusjon i lukket system slik som den gjennomføres ifølge CONWAY (1947).

De var avskåret fra å gjennomføre nærmere undersøkelser av mikrodiffusjonsmåten da det før nevnte arbeide pågikk under krigen.

De konkluderte med at korrekte bestemmelser av flyktig N i et hvert fall kunne utføres ved destillasjon ved atmosfæretrykk i sera framstilt ved hjelp av saltsyre eller dialysert kolloid jernhydroksyd ved fiskeeggehvitenens (hovedfraksjonens) isoelektriske punkt $\text{pH} = 5,2$.

Senere ble funnet at man fikk samme tall også når *farsen* ble underkastet destillasjon i vakuum mens der var visse vanskeligheter forbundet med anvendelsen av vannuttrekk. De to utveier var derfor enten de-

stillasjon av farse i spesielt vakuumpapparat eller destillasjon av serum enten i vakuum eller ved atmosfæretrykk. På grunn av spalting av urin-stoff under analysen måtte alle haiprøver destilleres i vakuum. Som bekjent har de fleste laboratorier apparatur for destillasjon ved atmosfæretrykk og hensyn hertil ble den gang derfor utslagsgivende ved angivelsen av metodikken for benfisk som utgjør størstedelen av alle analyseprøver.

Ved Avdeling for Mikrobiologi har vi etter krigen fortsatt undersøkelser og utvidet dem til også å gjelde visse andre N-holdige stoffer enn flyktig N og trimetylamin N, således trimetylaminoksyd og urin-stoff som etter spaltning dels er blitt oppfanget som flyktig N under destillasjon i vakuum, dels etter Conway-prinsippet, *to fremgangsmåter vi har funnet å ekvivalere hverandre*. De gir alltid samme resultater og utfyller hverandre på en utmerket måte. Hvis det haster meget med en analyse, bruker vi destillasjonsmetoden, gjelder det derimot masseanalyser utfører vi dem etter Conway-prinsippet idet vi starter analysene den ene dag og titrerer dagen etter. Fordelen ved å anvende Conway-prinsippet er at man, uten større vanskelighet, gjennomfører 80—90 analyser i løpet av en arbeidsdag. Analytikeren må da ha en medhjelper.

I det følgende beskrives metodikken for total flyktig N, trimetylamin N og urin-stoff N, mens metodikken for trimetylaminoksyd N blir omtalt i en spesiell publikasjon hvor en bekvem ny bestemmelsesmetode blir beskrevet (Hjorth-Hansen 1951 a).

Total flyktig N.

100 g farse av fiskemuskelatur, uten ben og uten skinn, tilsettes 200 ml vann. Der homogeniseres, tilsettes saltsyre eller kolloid jernhydroksyd til pH = 5,2 og vann til samlet veskevolum 400 ml. Etter oppvarming et øyeblikk til 70° C filtreres og avkjøles til 20° C.

Conway-prinsippet (Conway og Byrne).

1 ml serum pipetteres over i det ytre rom i en Conway-skål, 1 ml 0,02—0,01 n HCl i det sentrale rom, lokket legges på (kanten er smurt på forhånd med vaselin), 1 ml mettet KBO₂- eller K₂CO₃-oppløsning tilsettes med hurtigløpende pipette, lokket skyves på plass, veskene i ytre rom blandes ved rotering av skålen og skålen settes til side. Den anvendte saltsyre tilsettes ved framstillingen en skjermet indikator, f.e. bromfenolrødt eller metylrødt tilsatt xylen-cyanolblått FF som gir elegant omslag ved pH = 5,8, resp. 5,2 etter ved bromfenolrødt fra gult å ha passert en vakker og intens grønnfarge til sterk purpurfarge, omvendt ved metylrødt. (Hjorth-Hansen 1951 b).

Vakuumdestillasjon.

50 eller 100 ml serum eller 20 g farse bringes over i kokekolben i vakuumapparatet (Hjorth-Hansen og Bakken 1947, side 15) og tilsettes 0,5 g frisk brent magnesia, forlaget tilsettes 10 ml 0,05 n H_2SO_4 og evakueringen settes i gang. Ved ca. 15 mm og ved 45° C destilleres i 15 minutter.

Retitrering.

Ved Conway-prinsippet brukes 0,02—0,01 n natronlut fra en Bangbyrette med trang utløpsspiss, dog er en byrette uten etterløp absolutt å foretrekke, således Conway- eller Saundersbyretten (1946). En kan likevel oppnå ganske gode resultater med Bangbyrette eller endog med mikrobyrette direkte knyttet til en standflaske, og hvor alle forbindelsesdele er av glass. Ved vakuummetoden brukes 0,05 n NaOH, helst fra en 10 ml mikrobyrette og en av de før nevnte indikatorer som her kan tilsettes i dråper ved hver analyse.

Generelle eksempler på analysetall fra bestemmelser av total flyktig N, tatt tilfeldig fra et større materiale:

Blindprøver		Analyser		
I	II	I	II	III
1,023	0,842	0,780	0,720	0,508
1,020	0,842	0,780	0,730	0,508
1,021	—	0,780	0,720	0,512

Sammenlikninger.

Analyseobjekt	Diffusjon	Destillasjon
	mg N/100 g	
Lagret håbrand	43	43
	116	115
	190	188
Fersk torsk	12	12
Opptinet torskefilet av meget dårlig kvalitet	141	141

Av disse tall og av tall enhver kan erverve seg, vil man lett kunne bedømme nøyaktigheten av analysene når disse gjennomføres på en omsorgsfull måte.

Analysen av forskjellige produkter.

Tallene tjener til å gi et inntrykk av hvordan total flyktig N øker, dels når den ferske vare lagres for lenge før den nyttes til et eller annet øyemed, dels når den gjennomgår visse prosesser som salting, røking, koking og frysing.

Helt fersk <i>sild</i>	9, 12, 15 mg N
3—4 dager gammel sild	16, 18, 22 » »
Fersk sild, saltet under kontroll	15 » »
Gammel bedervet sild	76 » »
Nyrøkt sild } fra markedet	39 » »
Kokt nyrøkt sild }	39 » »
Nyrøkt sild } franstilt av fullsaltet sild	18 » »
Kokt nyrøkt sild } under kontroll	20 » »
Røket sild av dårlig kvalitet	90 » »
Kippers (god vare)	21 » »
Kippers (mindre god vare)	68, 71, 91 » »
Helt fersk <i>torsk</i>	8 » »
Kokt hermetisert torsk (fin vare)	17 » »
Kokt iset torsk, mindre god vare	42 » »
Kokt herm. torsk (utenlandsk)	141 » »
Torsk, utjenlig til frysing	26 » »
Saltet torsk (fin vare)	16, 16, 16, 16, 18 » »
Saltet torsk (dårlig vare)	51 » »
Helt fersk <i>hyse</i>	12 » »
Kokt hermetisert hyse (dårlig vare)	52 » »
Kokt iset hyse (mindre god vare)	60 » »
Helt fersk <i>hummer</i> (nettopp drept)	14 » »
Helt fersk hummerrogn	13 » »
Helt fersk <i>marulk</i>	14 » »
Gammel iset marulk	86 » »
Fersk <i>håbrand</i>	12, 14 » »
Lagret håbrand 0° C, 2 døgn	16 » »
5 »	18 » »
8 »	29 » »
11 »	43 » »
14 »	66 » »
19 »	115 » »
22 »	190 » »
2 dager gammel håbrand	17 » »
Helt fersk <i>makrell</i>	12 » »
Kokt makrell (ikke god vare)	85 » »

Fersk <i>seimelke</i>	15 mg N
Gammel seimelke	48 » »
Fersk <i>seirogn</i>	6 » »
Helt fersk <i>steinbit</i>	11 » »
Helt fersk <i>bokstavhummer</i>	21 » »
Iset fersk <i>rødfisk</i>	17 » »
Helt ferske <i>blåskjell</i>	12, 12 » »
Friske kokte <i>reker</i>	7, 8, 10, 11, 12, 12, 12, 13 » »
Pillete reker, nedlagt på glass (fin vare)	16 » »
Nykokte reker (under kontroll)	11 » »
Samme lagret 0° C 10 døgn	15 » »
— 30 »	28 » »
4 dager gammel <i>håkjerring</i> etter forsendelse 20 timer, oppr. med is, ved ankomsten uten tydelig lukt av NH ₃	11 » »
Etter 4 døgn	44 » »
» 7 »	153 » »
» 10 »	319 » »
Frossen frisk <i>brisling</i>	12, 12, 13, 15 » »
Frosset <i>hvalkjøtt</i>	22 » »
Samme etter 4 døgn ved 20° C	92 » »
Frosset <i>sei</i> , beviselig gammel da den ble frosset	24 » »

Trimetylamin N

Metodikken er beskrevet både av Beatty og Gibbons (1936) og hos Conway (Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 2 edition, 1947, London) så det skulle egentlig være overflødig å nevne den her. Men for å samle alle disse metodene lett tilgjengelige og med de modifikasjoner som er funnet hensiktsmessige å innføre her, nevnes den likevel.

Conwayprinsippet (Beatty og Gibbons).

Av samme serum som er nevnt under total flyktig N pipetteres 1 ml over i det ytre rom i Conway-skåler, der tilsettes 1/2 ml nøytral formalin i samme rom og 1 ml 0,02—0,01 n saltsyre i det centrale rom. Lokket legges på og 1 ml mettet KBO₂- eller 1 ml mettet K₂CO₃-oppløsning bringes hurtig inn. Skålen behandles som før nevnt og settes bort.

Vakuumdestillasjon.

50 ml serum tilsettes 15 ml nøytral formalin (40 %) og 0,5 g magnesiumoksyd og destilleres som før nevnt. Når det gjelder mengder under 1 g N/100 g enten den nå utføres etter Conwayprinsippet eller ved

destillasjon i vakuum er denne metoden ikke særlig nøyaktig, men ved litt større mengder er den bra og ved riktig store mengder er den utmerket.

Sammenlikninger.

Analyseobjekt	Diffusjon	Destillasjon
	mg N/100 g	
Lagret håbrand	2	2,5
	9	8
	11	11

Overensstemmelsen mellom metodene må sies å være tilfredsstillende.

Analysen av forskjellige produkter.

Helt fersk <i>sild</i> , egen behandling og kontroll	0,5—2 mg
Lettsprengt sild	1—2 »
Koldrøkt sild	3—5 »
Koldrøkt sild, handelsvare	4 »
Koldrøkt sild, dårlig handelsvare	14 »
Koldrøkt sild frosset, tinet og lagret 5 døgn ved 20° C	59 »
Helt fersk <i>torsk</i>	0,5, 0,6, 0,8, 0,8 »
Lettsprengt torsk, fin kvalitet	4, 4, 4, 5, 5 »
Lettsprengt torsk, særlig dårlig kvalitet	32 »
Helt fersk <i>håkjerring</i>	0,9, 1,5 »
Fersk håkjerring 4 døgn i is	4 »
6 »	16 »
9 »	34 »
Helt fersk <i>sei</i>	1 »
Frossen sei, »gammel«	6 »
Helt fersk <i>brising</i>	0,8 »
<i>Brugde</i> (sendt frossen, mottatt opptint)	27 »
<i>Brugde</i> (sendt frossen, opptint i laboratoriet)	8 »
Samme, etter 3 døgn ved 20° C	64 »
Helt ferske rå <i>reker</i>	0,8 »
Helt ferske rå <i>bokstavhummer</i>	0,5 »

U r i n s t o f f N.

Angående bestemmelser av urinstoff N i haisera, se Hjorth-Hansen og Bakken (1947). Da bestemmelsen altså *ikke* kan skje ved destillasjon ved atmosfæretrykk selv om man bruker serum, *må* analysen utføres enten etter Conway-prinsippet eller ved hjelp av vakuumdestillasjon.

Conway-prinsippet (Conway).

1 ml serum overføres med pipette i det ytre rom i en Conway-skål og tilsettes 2—3 dråper av en 5 g/100 g ureasepulver-oppslemming i vann, for eks. Jack Beanpulver fra The Arlington Chemical Company, Urease Dunning fra Hynson, Westcott & Dunning Inc. eller Urease Leo fra Lövens Kemiske Fabrik. Etter blanding henstår skålen ca. 20 minutter hvoretter man videre går fram som beskrevet under total flyktig N. Samtidig gjør man blindprøve.

Vakuumdestillasjon.

50 ml serum tilsettes 2 ml 5 g/100 g ureaseoppslemning og etter 1 times henstand 0,5 g brent magnesiumsoksyd. Der destilleres som nevnt under total flyktig N.

Man har ytterligere en metode, nemlig den som anbefales av fremstillerne av Urease Dunning preparatene for urin. Uten å foreta destillasjon kan man titrere to alikvote porsjoner av serumet til samme pH med saltsyre idet den *ene* prøve først tilsettes urease, den *annen* ikke. Differansen multiplisert med de resp. faktorer gir urinstoffmengden. Metoden utføres ved *kolorimetrisk* indikering, men naturligvis er det intet i veien for å anvende *elektrometrisk* indikering.

Sammenlikninger.

Analyseobjekt	Direkte titrering		Destillasjon	Diffusjon
	Kolorimetrisk	Elektrometrisk		
mg N / 100 g				
Håbrand	0,714	—	—	0,714
»	0,648	—	0,655	0,644
»	0,716	—	—	0,725
»	0,570	—	—	0,574
»	0,696	—	—	0,705
»	0,770	0,772	—	—
»	0,772	—	0,765	—

Overensstemmelsen mellom metodene er tilfredsstillende.

Analysen av forskjellige produkter.

Alle prøver er analysert i så friskt materiale som mulig.

<i>Håbrand</i>	0,950 g/100 g	
	0,970	—
	0,763	—
	0,780	—
<i>Brugde</i>	0,760	—
<i>Håkjerring</i>	0,560	—
<i>Skate</i>	0,747	—
<i>Havmus</i>	0,622	—
<i>Pigghåeggeblommer</i>	0,627	—
<i>Andeeggeblommer</i>	0	mg/100 g
<i>Hummerrogn</i>	4	—
<i>Seirogn</i>	5	—
<i>Sild</i>	4	—
<i>Sei</i>	7	—
<i>Torsk</i>	8	—
<i>Havål</i>	14	—
<i>Hummer</i>	7	—

D i s k u s j o n .

Bestemmelse av total flyktig N, trimetylamin N og urinstoff N i sjødyr, kan etter alkalisering av prøven utføres ved destillasjon eller mikrodiffusjon. Analyseobjektet må foreligge som tabellen viser:

Metode	Analyseobjekt	
	Farse	Serum
Mikrodiffusjon	—	Benfisk, Bruskfisk
Destillasjon: 1. Atmosfæretrykk	—	Benfisk
2. Redusert trykk	Benfisk, Bruskfisk	Benfisk, Bruskfisk

Mikrodiffusjon er å foretrekke ved masseanalyser, vakuumdestillasjon når det gjelder hurtiganalyser.

R e s y m é .

Analysemetodikken for total flyktig N, trimetylamin N og urinstoff N i fisk er beskrevet og analyseresultater fra fersk fisk og fiskeprodukter er angitt. Total flyktig N i *helt fersk* fisk synes i alminnelighet å ligge mellom 7—15 mg/100 g, trimetylamin N er mindre enn 1 mg, benfisk inneholder ubetydelige mengder urinstoff.

