

MINISTERIE VAN LANDBOUW
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek
Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek — Gent

PROEFSTATION voor ZEEVISSERIJ

Oostende

(Direkteur : P. Hovart)

**DE BEPALING VAN VRIJE AMMONIAK
IN VISSERIJPRODUKTEN
DOOR VERSNELDE MIKRODIFFUSIE**

door

W. VYNCKE

INLEIDING

Naast trimethylamine is ammoniak het meest typische bederfprodukt in vis, schaal- en weekdieren. Meestal wordt het samen met andere vluchtige stikstofbasen als totale vluchtige basische stikstof (TVB) bepaald. Men kan echter vooropstellen dat in produkten waar ammoniak bijzonder overvloedig gevormd wordt, de dosering van deze verbinding een nog beter inzicht in de versheidsgraad kan geven. Dit is vooral voor schaaldieren en kraakbeenvissen het geval.

Ammoniak kan tijdens het bederf door verschillende reakties gevormd worden. Het ontstaat door afbraak van ureum, door desaminering van vrije of van eiwitten afgesplitste aminozuren en verwante verbindingen (bv. creatine), door oxydatie van aminen en door afbraak van nucleïnebasen.

Voor de rechtstreekse bepaling van vrije ammoniak staan verschillende volumetrische (o.a. formoltitratie, jodometrie na oxydatie met hypobromiet enz.) en kolorimetrische methoden (o.a. met het Nessler-reagens, met phenol en hypochloriet enz.) ter beschikking.

In biologische weefsels en vloeistoffen komen echter meestal talrijke storende bestanddelen voor, zodat de ammoniak eerst moet worden afgezonderd. Dit kan gebeuren met ionenwisselaars of destillatie, maar in de meeste gevallen wordt de voorkeur aan de mikrodifusie gegeven.

In deze publikatie wordt dit procédé besproken en wordt tevens een nieuwe methode voor versnelde mikrodifusie met toepas-

singen voor de objektieve kwaliteitsbepaling van schaaldieren en kraakbeenvissen beschreven.

1. De mikrodiffusie.

1.1. Principe.

Ammoniak komt bij zure pH als ammonium-ion (NH_4^+) en bij alkalische pH als gasvormige verbinding (NH_3) voor. De mikrodiffusie geschiedt in drie fazen : (a) de ammoniak wordt in een hermetisch gesloten systeem (figuur 1) door toevoeging van base uit het analysevat A vrijgesteld ; (b) het gas diffundeert door de kamer B en (c) het gas wordt door een zuur (bv. H_2SO_4), in een absorptievat C, met vorming van een ammoniumzout. De dosering geschiedt dan door titratie of door kolorimetrie.

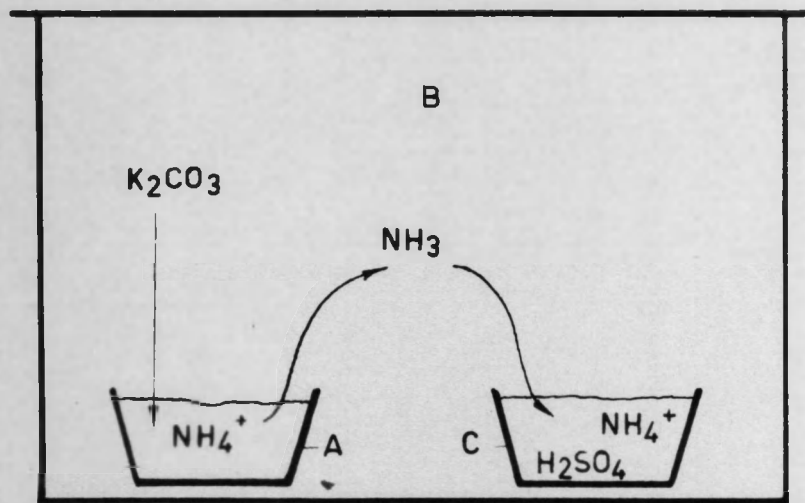
1.2. Factoren die de diffusiesnelheid beïnvloeden (1).

1.2.1. Diffusietijd.

De diffusietijd is evenredig met de dampdruk van de vluchtige verbinding in het analysevat ; hij wordt uitgedrukt in funktie van de beginkoncentratie a in het analysevat en de hoeveelheid x die na de tijd t gediffundeerd is volgens

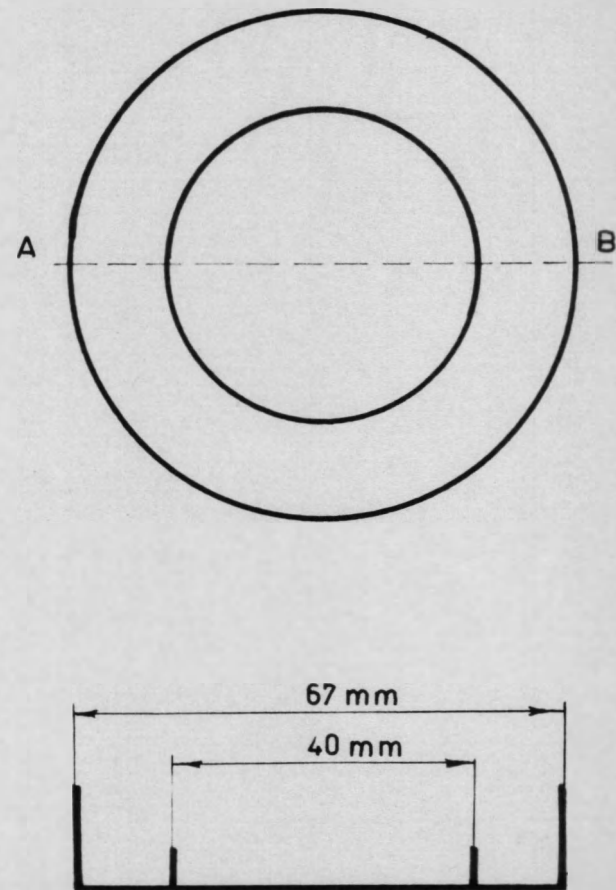
$$\log \frac{a}{a - x} = A \cdot t$$

waarbij A de absorptiesnelheid is. Hieruit volgt dat de relatieve hoeveelheid - en niet de absolute hoeveelheid - ammoniak die na de tijd t geabsorbeerd wordt, onafhankelijk is van de beginkoncentratie.



Figuur 1. - Principe van de microdiffusie

- A: Analysevat
- B: Diffusiekamer
- C: Absorptievat



Figuur 2. - Conwayschaal

1.2.2. Volume van de vloeistoffen en afmetingen van de diffusiekamer.

Het volume van de absorberende vloeistof heeft weinig invloed, op voorwaarde dat de oppervlakte homogeen is. De reden hiervan ligt in het feit dat de absorberende vloeistof de dampspanning van de diffunderende stof tot nul terugbrengt ; wanneer het in overmaat aanwezig is, heeft een verandering van volume praktisch geen effect. De hoeveelheid V van de oplossing in het analysevat heeft daarentegen wel een beslissende invloed op de diffusiesnelheid. Alle andere factoren gelijk blijvende is deze snelheid omgekeerd evenredig met V. Dit volgt uit het feit dat de snelheid recht evenredig is met de dampdruk, dus met de concentratie van de vluchtige stof. De tijd t die nodig is voor een absorptie van 99,5 % bedraagt :

$$t = \frac{5,3 \cdot S \cdot V \cdot l}{k \sqrt{s \cdot s'}}$$

waarbij : S = oplosbaarheid (g/ml) voor een gaskoncentratie van 1 g/ml

s = oppervlakte vloeistof in analysevat

s' = oppervlakte vloeistof in absorptievat

l = gemiddelde afstand voor diffusie van de molekulen

k = diffusiecoëfficiënt (cm²/min) van het gas in de lucht.

Men heeft er dus belang bij V zo klein mogelijk te houden.

De vergelijking toont verder aan, dat men er nut bij heeft l zo klein mogelijk en s en s' zo groot mogelijk te nemen, nl. zo dat de respectievelijke volumes juist gans de oppervlakte kunnen bedekken.

1.2.3. Diepte van de laag in het analysevat.

De tijd nodig voor een diffusie van 99,5 % vanuit een oplossing op diepte a (in cm), bedraagt voor een dampspanning 0 aan de oppervlakte :

$$t = 2,05 \frac{a^2}{k'}$$

waarbij : k' = diffusiecoëfficiënt in water

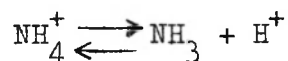
a is aldus van zeer groot belang en moet zo klein mogelijk gehouden worden.

1.2.4. Temperatuur.

De diffusiesnelheid vergroot met stijgende temperatuur. Zo vermindert de diffusieduur bv. van 40 % wanneer men de temperatuur opdrijft van 20 tot 38° C.

1.2.5. pH in het analysevat.

Ammoniak (NH_3) en ammoniumionen (NH_4^+) liggen steeds in evenwicht volgens



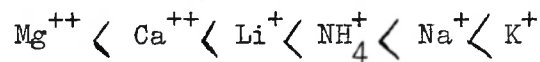
Dit evenwicht wordt bepaald door de pH van het milieu. De zuurexponent (pK) bedraagt 9,4. Tussen de pH van de oplossing, de pK en de dissociatiegraad α (1 = volledige ionisatie) bestaat volgende betrekking :

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} = 9,4 + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

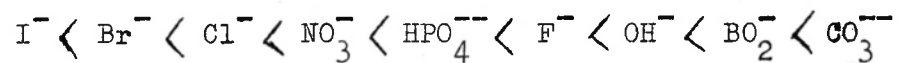
Hieruit kan men berekenen hoeveel ammoniak in geïoniseerde vorm voorkomt bij verschillende pH-waarden. Deze betrekking wordt grafisch in figuur 3 weergegeven. Men bemerkt dat de pH hoger dan 11 moet liggen om in optimale omstandigheden te werken.

1.2.6. Invloed van kationen en anionen.

Het vrijstellen van ammoniak hangt niet alleen van de pH, maar eveneens van bepaalde aanwezige ionen af, daar deze de dampdruk van ammoniak beïnvloeden. Bij de kationen neemt de aktiviteit als volgt toe :



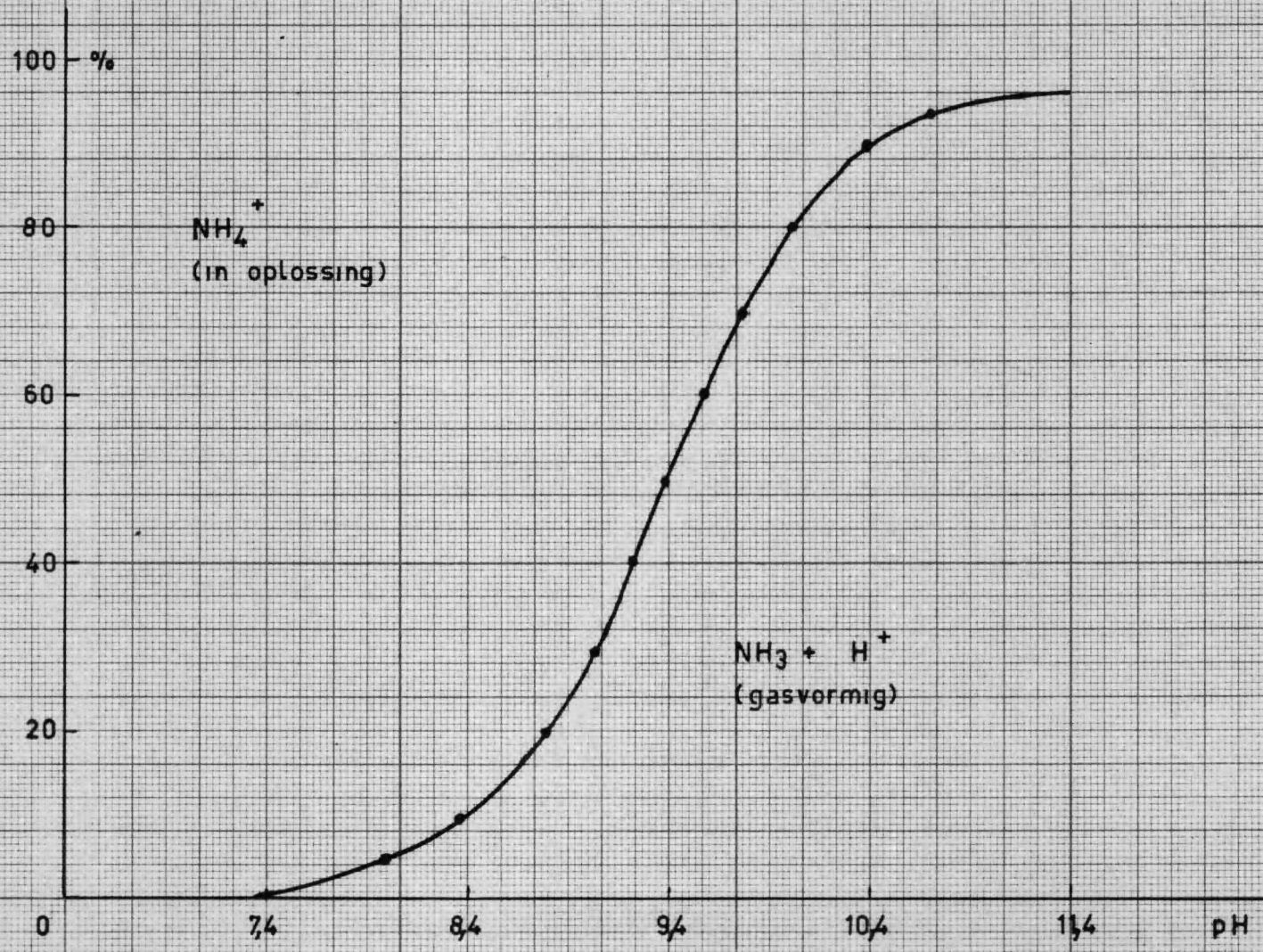
Voor de anionen heeft men :



Hieruit volgt dat kaliumkarbonaat (K_2CO_3) en kaliummetaboraat (KBO_2) de meest geschikte verbindingen zijn. Meestal wordt de eerste verbinding gebruikt. Voor oplossingen die sterk zuur zijn, is het echter aan te raden het metaboraat te gebruiken om de sterke CO_2 -ontwikkeling te vermijden.

1.3. Mikrodifusietechniek.

Voor de praktische uitvoering van de mikrodifusie heeft de methode van Conway (1) brede toepassing gevonden, niet alleen voor de bepaling van ammoniak, maar eveneens van een ganse gamma andere verbindingen (aminen, zuren, aldehyden, enz.). Bij deze methode worden z.g.n. Conwayschalen gebruikt die uit glas, porselein of plastic vervaardigd zijn. Zij bestaan uit een binnen- en een



Figuur 3.—Invloed van de pH op de hoeveelheid gasvormig NH_3

buitenkuvet (figuur 2). De te onderzoeken ammoniakoplossing wordt in de buitenkuvet en het absorberend zuur in de binnenkuvet gepipeerd. Na toevoeging van loog aan de buitenste kuvet wordt het geheel hermetisch met een ingevette plaat gesloten.

Alhoewel deze methode relatief eenvoudig en zeer nauwkeurig is, bezit zij toch ernstige nadelen, nl. : (a) de cel is relatief duur, (b) het verwijderen van het vet, dat noodzakelijk is voor de luchtdichtheid, is niet altijd eenvoudig, (c) de diffusieduur is relatief lang, (d) het gebruik van kolorimetrie als doseringstechniek vereist het kwantitatief overhevelen van de absorptievloeistof.

Om deze moeilijkheden te omzeilen, hebben Seligson et al. (2) een versnelde mikrodiffusiemethode voor de bepaling van ammoniak in bloed voorgesteld. Bij deze methode worden als mikrodiffusiecellen kleine flessen (bv. penicillineflesjes), waarvan de stop van een glazen staaf met geradeerd uiteinde voorzien is, aangewend. Dit uiteinde wordt met zwavelzuur bevochtigd en vervangt aldus het absorptievat. De te analyseren oplossing komt in de fles te recht. Na alkalisering laat men de fles gedurende een korte tijd in horizontale positie in een rotator draaien, waardoor de oplossing gans de wand van de fles bevochtigt. Op deze wijze wordt het diffusieoppervlak aanzienlijk vergroot, terwijl het volume V en de diepte a minimaal gehouden worden (zie 1.2.2.). De diffusieduur wordt dan ook gevoelig verminderd. Na de diffusie wordt de ammoniak die door het zwavelzuur op de staaf gebonden werd, kolorimetrisch bepaald met Nesslerreagens.

Vyncke en Merlevede hebben deze methode aangepast voor schaaldieren en er het nut voor de objektieve kwaliteitsbepaling van aangetoond (3). In onderhavige publikatie werd de techniek nog verbeterd ; zij werd tevens op kraakbeenvissen toegepast.

2. Experimenteel gedeelte.

2.1. Modus operandi.

2.1.1. Reagentia.

Alle oplossingen dienen met ammoniakvrij water bereid te worden. Voor met ionenwisselaars gedemineraliseerd water is deze voorwaarde vervuld. Gewoon gedestilleerd water moet door een kolom Amberlite Monobed III (Röhm & Haas, Philadelphia, U.S.A.) of een analoog hars gezuiverd worden.

- Standaard ammoniak oplossing : 250 μ g N per ml (1,180 g ammoniumsulfaat per liter).
- Zwavelzuur 1 N.
- Kaliumkarbonaat, verzadigde oplossing.
- Nesslerreagens : volgende modifikatie bleek de grootste stabiliteit en gevoeligheid te geven :

Oplossing 1 : los 40 g rood HgI_2 p.a. en 30 g KI p.a. in 100 ml water ;

Oplossing 2 : los 95 g NaOH p.a. in 1.000 ml water.

Meng 1 en 2 en laat drie dagen staan. Dekanteer de klare bovenstaande vloeistof in een bruine fles en bewaar in het donker. Verdun 1 : 25 voor gebruik.

2.1.2. Apparatuur.

- Mikrodiffusieflesjes.

De door Seligson et al (2) voorgestelde penicillineflesjes werden na talrijke modifikaties uiteindelijk vervangen door flesjes met geroodeerde hals (B24), voorzien van doorboorde polyethyleen stop met glazen staaf. De staaf wordt vastgekleefd met gewone universeel-

lijm ; hierdoor is de stop tevens hermetisch dicht. Het uiteinde van de staaf is bolvormig verdikt en geroedeerd. De afmetingen zijn in figuur 4 vermeld. Met deze flesjes wordt het inbrengen en het verwijderen van de staaf zonder de wanden te raken door de B24-opening vergemakkelijkt. Deze opening is maximaal, daar men rekening moet houden met het relatief kleine volume van de diffusiefles.

- Mikrodifusierotator.

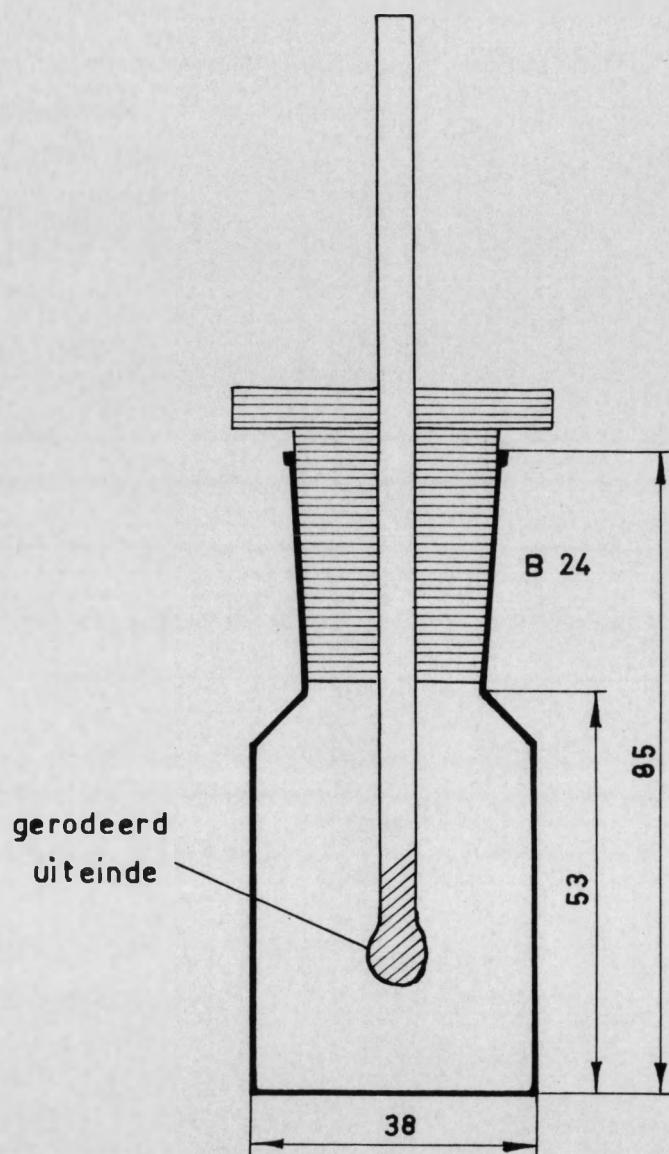
De mikrodifusierotator "Multi-Purpose Rotator" Model 150 V (Scientific Industries, New York, U.S.A.) werd eerst beproefd, doch het vasthechtingssysteem met klemmen voor de flesjes bleek **niet** geschikt te zijn. De rotatiekop werd dan ook vervangen door een zelfontworpen model (figuur 5). Dit model bestaat uit drie schijven uit plexiglas van 27 cm diameter. De eerste schijf dient als grondplaat voor de flesjes ; de tweede is voorzien van 12 openingen van 4 cm diameter. Deze twee schijven zijn op de centrale as, op een afstand van 3,5 cm van elkaar bevestigd. De derde plaat heeft 12 openingen van 1 cm diameter die juist over de glazen staven passen en komt op de stoppen van de flesjes te rusten. Het geheel wordt door middel van een vlindermoer vastgedraaid. De flesjes staan aldus in de rotatiekop stevig vast en zijn terzelfdertijd hermetisch gesloten. De rotator kan zowel in horizontale als in verticale stand gedraaid worden (figuren 5 en 6).

- Kolorimeter.

Vitatron Model UC 100 (Bergen op Zoom, Nederland) met vierkante kuvetten van 10 mm lichtweg.

2.1.3. Werkwijze.

Tien g vis worden gedurende 2 min met 400 ml water gehomogeniseerd ; 1 ml van de bovenstaande vloeistof (filtreren is over-



Figuur 4. — Mikrodiffusiefles
(afmetingen in mm)

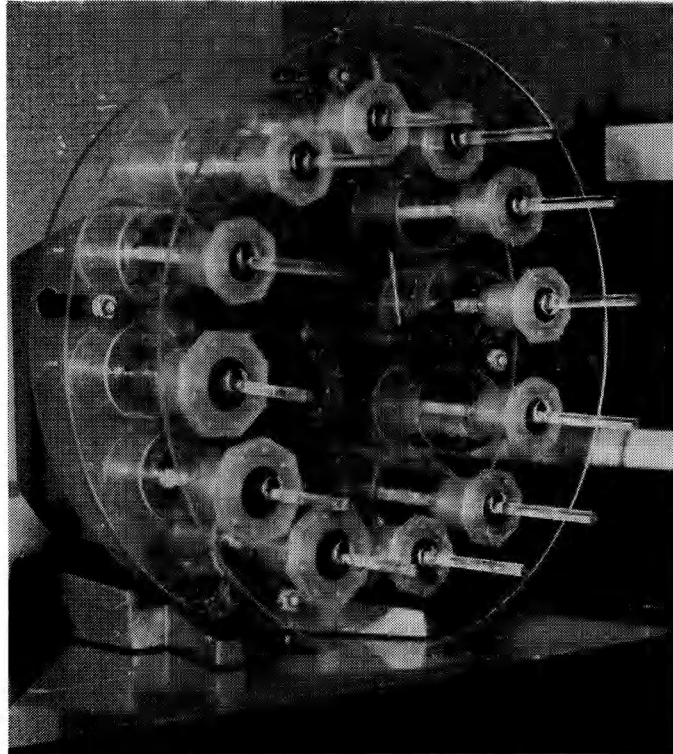


Fig. 5 — Mikrodifusierotator in vertikale stand

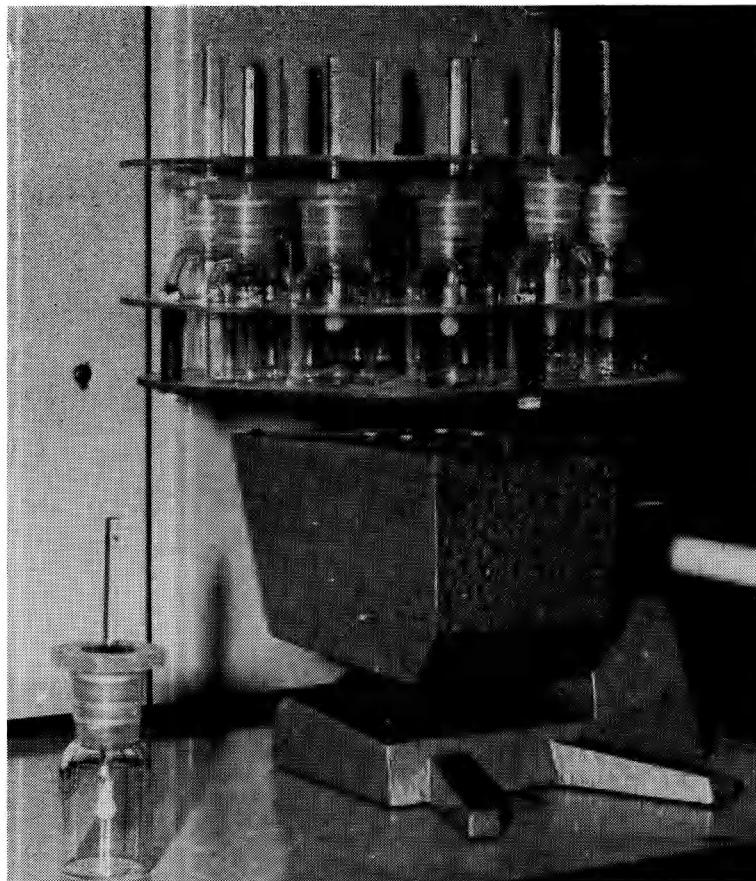


Fig. 6 — Mikrodifusierotator in horizontale stand

bodig) wordt in een mikrodiffusieflesje gepipeteerd. Eén ml verzadigde kaliumkarbonaatoplossing wordt toegevoegd en onmiddellijk daarop wordt het uiteinde van de glazen staaf over ca 5 mm in 1 N zwavelzuur gedompeld ; het overtollige zuur wordt afgeschud en de stop wordt op het flesje geplaatst zonder de wanden te raken. De flesjes worden in horizontale stand in de rotator geplaatst en vastgeschroefd.

De rotatiekop wordt in vertikale positie gewenteld, de motor wordt aangeschakeld en op 50 toeren per minuut geregeld. Na 30 min wordt het roteren stopgezet.

De staafjes worden uit de flesjes verwijderd, zonder de wanden te raken en in een beker van 10 ml, die 5 ml Nesslerreagens 1 : 25 bevat, geroerd. De extractie van de oranje-gele oplossing wordt bij 403 m μ gemeten. De concentratie wordt van een ijkcurve afgelezen die met respectievelijk 2,5 ; 5 en 7,5 μ g NH₃ - N opgesteld werd.

Alle mikrodiffusiebepalingen moeten in strikt gestandaardiseerde omstandigheden worden uitgevoerd. Het volume van de diffusieflesjes, de diffusieoppervlakten en de rotatiesnelheid kunnen gemakkelijk konstant gehouden worden en zijn daarom van minder belang. Sterke variaties in kamertemperatuur dienen echter vermeden te worden. vermits de diffusieduur hierdoor beïnvloed wordt (zie 1.2.4.).

2.2. Experimentele studie van de methode.

2.2.1. Diffusiecurve.

Het toevoegen van 1 ml verzadigde kaliumkarbonaatoplossing brengt de pH op 12,2 à 12,3, hetgeen een optimale diffusie verzekert (zie 1.2.5.).

De diffusiecurven van een zuivere ammoniakoplossing en van visextract werden bepaald (figuur 7). Hieruit blijkt, dat beide kurven een analoog verloop hebben en dat bij visextract geen hydrolyse optreedt.

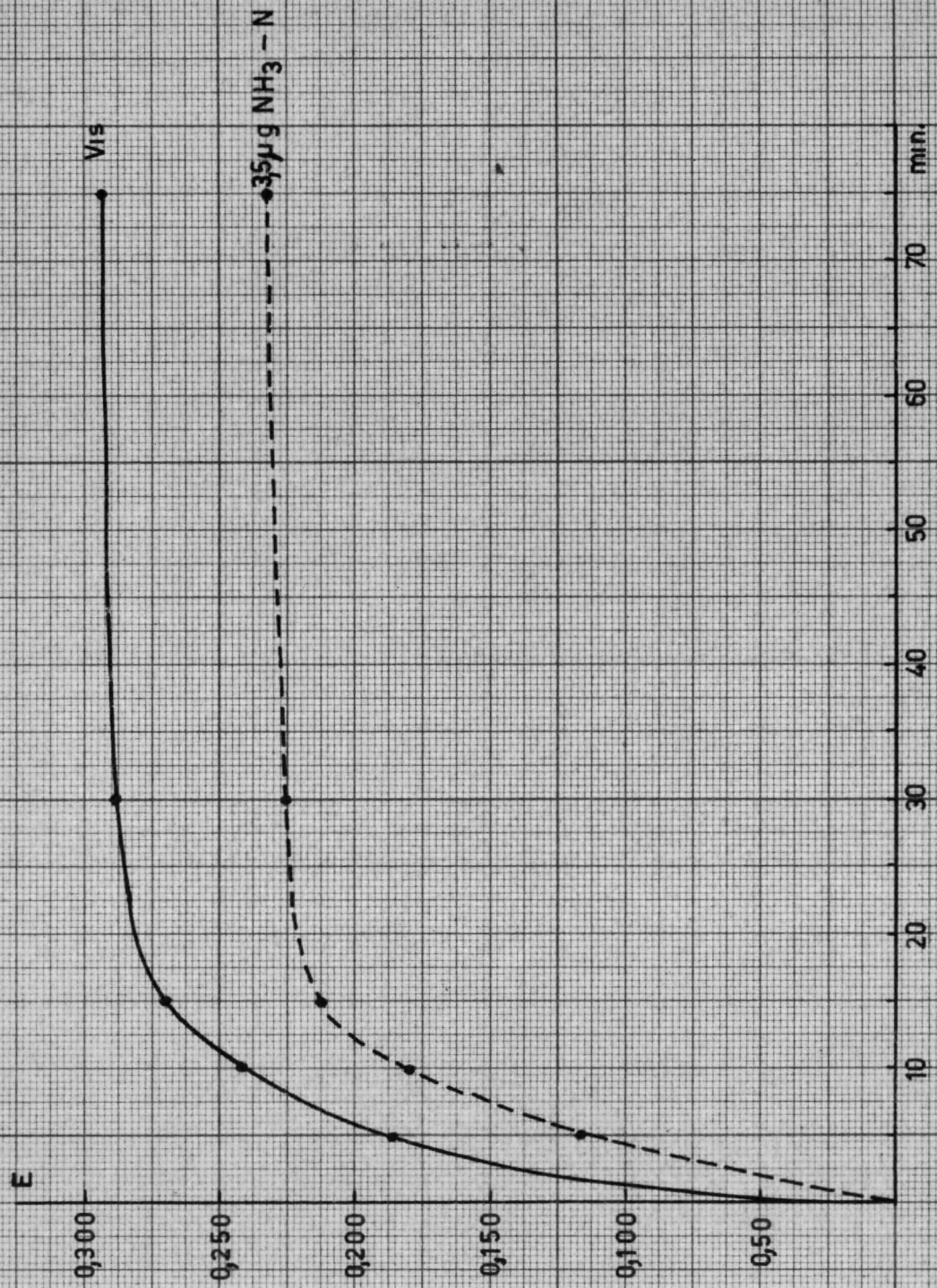
De diffusie is na ongeveer 75 min beëindigd, maar ca 92 % en 98 % ammoniak komen respectievelijk in 15 en 30 min over. Er valt op te merken, dat wanneer de flesjes niet geroteerd worden, de diffusie 18 à 24 uur duurt.

De diffusiecurven zijn zeer reproduceerbaar en in principe kan dan ook een korte diffusieduur (bv. 10 min) genomen worden. Het is echter aan te raden 30 min te nemen, daar in deze omstandigheden de rotatieduur niet nauwkeurig moet worden in acht genomen. Daarenboven zijn, in dit geval, kleine fluktuaties in draaisnelheid zonder belang (2).

2.2.2. Storende bestanddelen.

Naast ammoniak produceren ook diverse andere verbindingen een kleur met het Nesslerreagens. Voor vis betreft het vooral dimethylamine en trimethylamine, die samen met ammoniak door de alkalisering vrijkomen, diffunderen en als sulfaat op het staafje worden gebonden. Uit controleproeven uitgevoerd met 10 ~~mg~~ mg N van beide verbindingen, overeenkomend met 40 mg N per 100 g vis, bleek dat in de gegeven omstandigheden het Nesslerreagens niet gekleurd werd, en dat het blijkbaar niet gevoelig genoeg is voor deze verbindingen. Dimethylamine en trimethylamine storen dan ook de ammoniakbepaling niet.

In schaaldieren en vooral in kraakbeenvissen (bv. doornhaai, rog) komen grote hoeveelheden ureum voor, nl. tot 2000 mg per



Figuur 7. — Diffusiecurven van vis en ammoniak

100 g vis (4). Door alkalisering kan dit ureum door hydrolyse ammoniak vrijstellen, hetgeen de bepaling zou vervalsen.

Uit controleproeven, uitgevoerd met 500 μ g ureum bleek geen ammoniak vrij te komen, hetgeen ongetwijfeld aan de zeer korte diffusieduur te wijten is. Dit is een belangrijk voordeel, gezien de methode aldus toelaat vrije ammoniak te bepalen in ureumrijke vissen, hetgeen met de meeste andere methoden (bv. destillatie) niet mogelijk is.

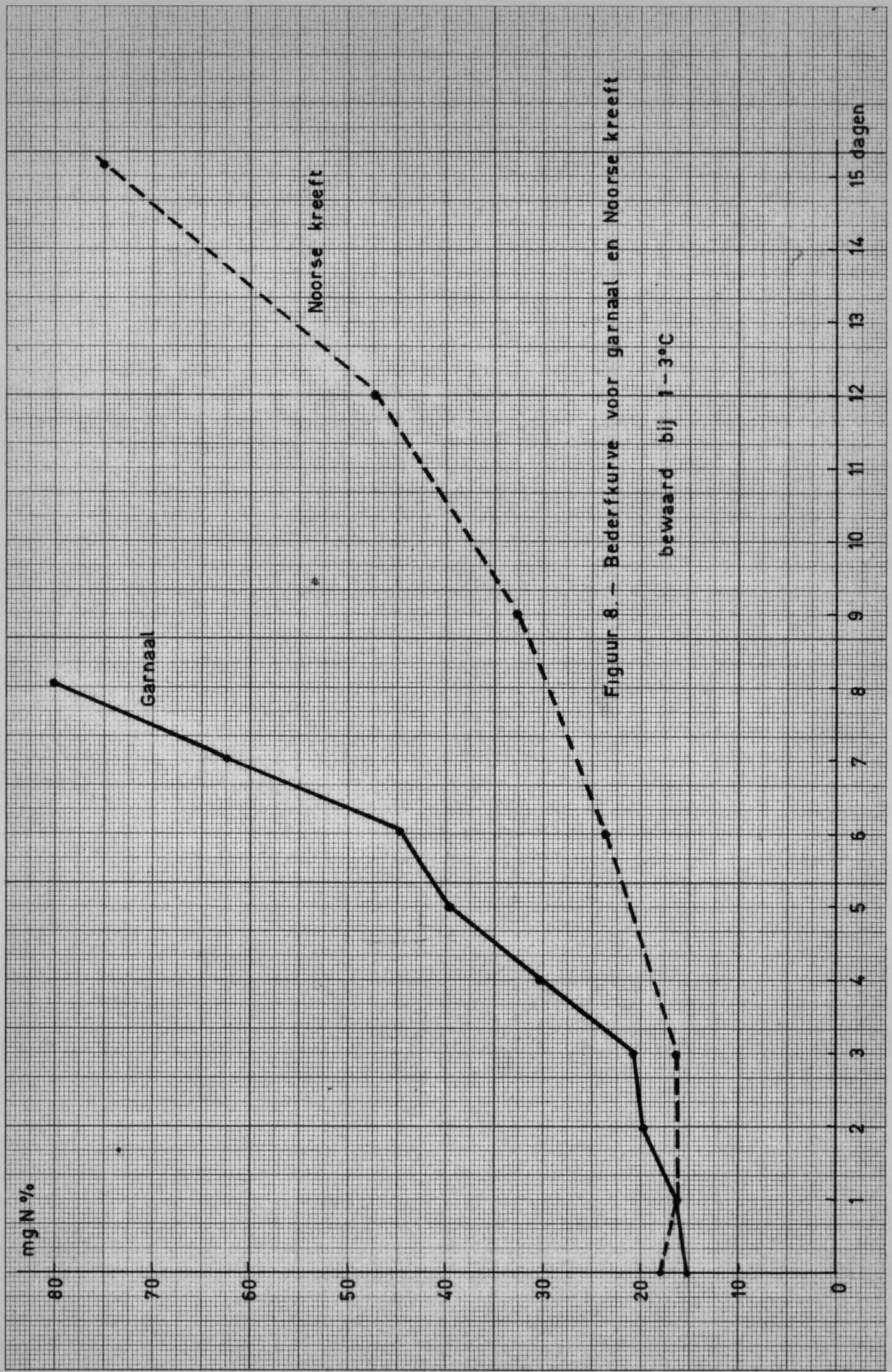
2.2.3. Stabiliteit van de kleur.

De extinktie van de oranje-gele Nessleroplossing bleek gedurende ca 30 min stabiel te zijn. Wanneer de kolorimetrische bepaling niet onmiddellijk kan geschieden, moet de oplossing van de lucht afgeschermd worden. In 30 min vermindert de extinktie anders met ca 8 %.

2.3. Toepassingen voor de objektieve kwaliteitsbepaling.

2.3.1. Garnaal en Noorse kreeft.

In een vorige publikatie (3) werd het nut van de methode voor de objektieve kwaliteitsbepaling van garnaal (*Crangon vulgaris* F) en Noorse kreeft (*Nephrops norvegicus* L) aangetoond. Het ammoniakgehalte bleek met de organoleptische keuring goed overeen te komen. Figuur 8 geeft typische bederfcurven voor gepelde garnaal en ongepelde Noorse kreeft die bij 1 à 3° C bewaard werden. Men bemerkt dat garnaal veel vlugger bederft dan Noorse kreeft. De grens voor bederf blijkt rond 45 mg N per 100 g te liggen.



Figuur 8. - Bederfcurve voor garnaal en Noorse kreeft
bewaard bij 1-3°C

Ook voor het vergelijkend onderzoek bleek de methode waardevol te zijn. Zij werd reeds toegepast voor de studie van de bewaar-temperatuur van garnaal (5) en voor het testen van diverse factoren (zoutgehalte van het kookwater, wijze van verpakking enz.) tijdens de bewerking van Noorse kreeft (6).

2.3.1. Doornhaai.

De kwaliteitsbepaling van doornhaai (*Squalus acanthias* L) - zoals van alle kraakbeenvissen - stelt bijzondere problemen. Zoals reeds werd vermeld, bevat deze vis immers een grote hoeveelheid ureum die in gans het lichaam (spieren, ingewanden, bloed, slijm) voorkomt. Onder invloed van een bacterieel enzym, de urease, wordt ureum tot kooldioxyde en ammoniak afgebroken :



De ontbinding van ureum begint vóór de desaminering van de aminozuren, hetgeen een relatief hoog gehalte aan ammoniak in het beginstadium van het bederf geeft en een vluggere alkalisering bij de kraakbeenvissen dan bij de beenvissen veroorzaakt (7).

Door de aanwezigheid van ureum kunnen klassieke methoden, zoals de TVB-bepaling en de bepaling van de vluchtige zuren niet toegepast worden, daar tijdens het destilleren ureum eveneens in ammoniak en kooldioxyde gesplitst wordt. Zoals reeds werd geciteerd, blijkt dit tijdens de versnelde mikrodifusie niet het geval te zijn.

Vooraleer de vluchtige ammoniak te bepalen, dienen echter enkele voorzorgen genomen te worden.

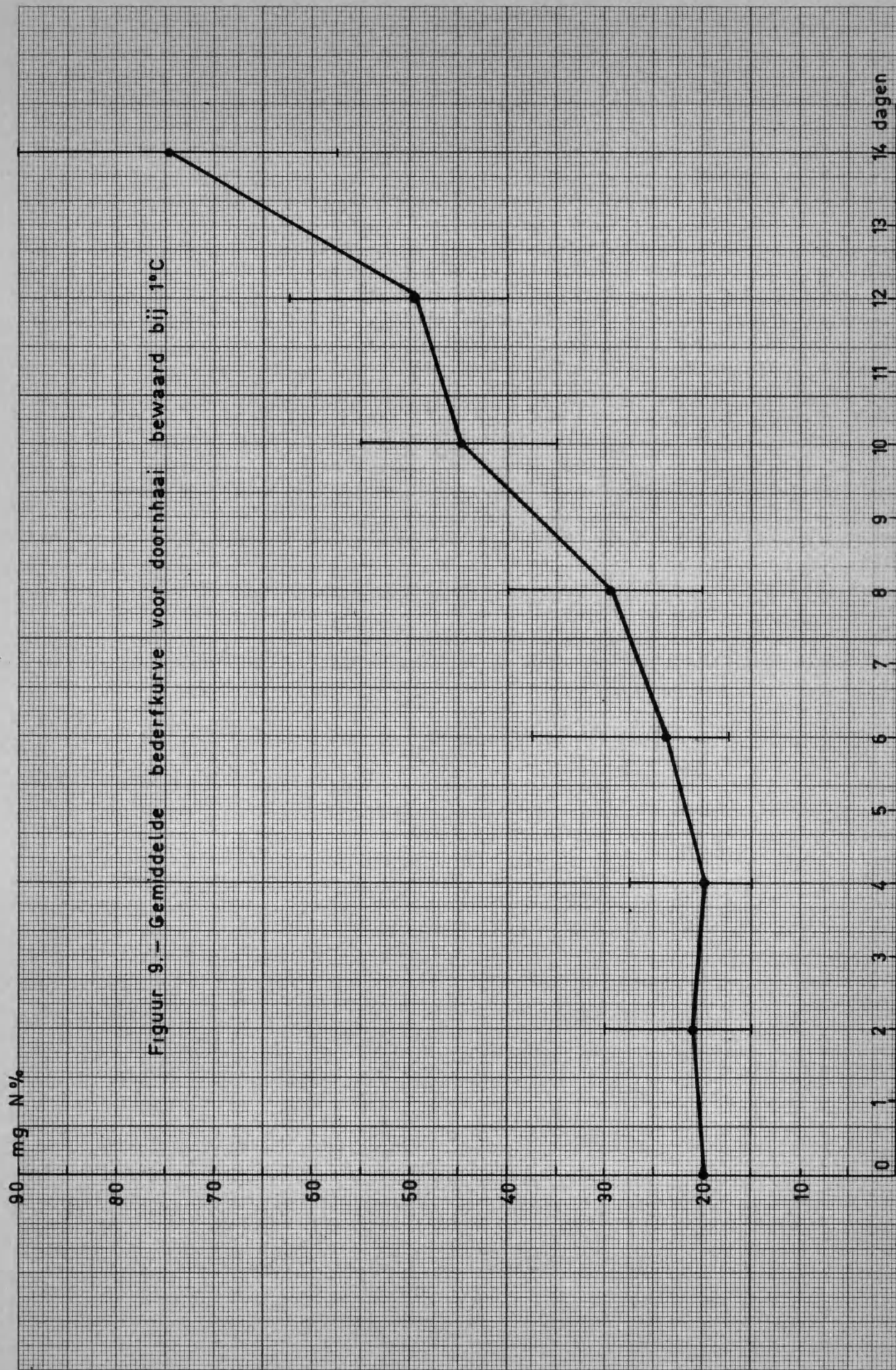
In het slijm en het bloed die zich op de huid van de doornhaai bevinden, wordt gemakkelijk ammoniak gevormd, vooral wanneer de vis enige tijd aan hogere temperaturen werd blootgesteld, zoals bv. op het dek van het schip vóór het stuwen in het ruim en in de vismijn vóór de verkoop. De ammoniak is dan zeer gemakkelijk organoleptisch waar te nemen, maar dit betekent evenwel nog niet altijd dat de vis van mindere kwaliteit is ; in het vlees zelf kan immers weinig of geen ammoniak gevormd zijn. Vóór de monstername moet de vis dan ook goed met gekoeld water gespoeld worden.

Doornhaai wordt meestal korte tijd na de openbare verkoop ontkopt en gestroopt en in deze vorm in de handel onder de benaming "zeepaling" gebracht. Door deze bewerking komt veel bloed aan de oppervlakte vrij (de rode kleur is trouwens een kenmerk van versheid), dat gemakkelijk ammoniak kan afgeven. Om deze reden is het ook in dit geval aan te raden de vis goed vóór de monstername te spoelen.

Figuur 9 geeft een gemiddelde bederfcurve voor doornhaai, die vanaf de vangst bij 1° C in ijs in gegutte toestand bewaard werd. De vissen waren afkomstig van de visserijsector Noordzee-Zuid en werden in de periode oktober-januari gevangen.

Ieder punt op de grafiek is het gemiddelde van een dertigtal waarnemingen. De spreidingsbreedte werd tevens aangeduid.

Men bemerkt dat de ammoniakontwikkeling gedurende de eerste acht dagen gering is, om dan vlug op te lopen. De grens van bederf kan voorlopig op ca 60 mg N % gesteld worden.



Figuur 9. — Gemiddelde bederfcurve voor doornhaai bewaard bij 1°C

De ammoniakwaarden kwamen met de organoleptische keuring goed overeen.

Ook voor het vergelijkend onderzoek blijkt de methode waardevol te zijn. Zij werd reeds toegepast voor de studie van de invloed van de temperatuur op de houdbaarheid van doornhaai (8) (9).

2.4. Andere toepassingen van de mikrodifфуsie van ammoniak.

2.4.1. Bepaling van ureum in vis.

- Principe : men voegt aan de te onderzoeken oplossing een weinig urease toe, waardoor het aanwezige ureum kwantitatief in ammoniak wordt omgezet. De optimale pH ligt tussen 7 en 8. Een eenvoudige omrekening geeft het procent ureum. Deze bepaling die met Conwayschalen kan worden uitgevoerd (1), werd hier aan de versnelde mikrodifфуsiemetode aangepast.

- Uitvoering : men homogeniseert 10 g vis in 400 ml ammoniakvrij water en verdunt vervolgens 1 ml filtraat tot 50 ml. Men pipeteert hiervan 1 ml in een diffusieflesje en voegt 0,5 ml urease-fosfaatoplossing toe. Deze oplossing wordt bereid door 50 mg urease (Merck) in 100 ml fosfaatbuffer pH 7 op te lossen. Men laat 15 min bij kamertemperatuur staan, voegt 1 ml verzadigde kaliumcarbonaatoplossing toe en voert verder de ammoniakbepaling zoals hoger beschreven uit. Men bepaalt terzelfdertijd in een blanco-proef het oorspronkelijk ammoniakgehalte dat dan van het proefresultaat dient afgetrokken te worden vooraleer het ureumgehalte te berekenen.

2.4.2. Bepaling van de urease-aktiviteit in vis.

Onder urease-aktiviteit verstaat men de hoeveelheid

ureum die door het enzym in een bepaalde tijd afgebroken wordt.

Deze bepaling geeft een goed beeld van de aanwezige hoeveelheid urease en kan van belang zijn voor dieper doorgevoerde bederfstudies van vis.

De klassieke methode van Sunner en Hand (10) werd aan de versnelde mikrodiffusie aangepast.

Vijftig g vis worden in 200 ml water gehomogeniseerd. Men pipeteert 1 ml filtraat in een maatkolf van 50 ml, plaatst de kolf in een thermostatisch waterbad op $20^{\circ} \pm 0,1^{\circ} \text{ C}$ en voegt achtereenvolgens 1 ml fosfaatbuffer pH 7 en 1 ml 3 % ureumoplossing toe. Deze oplossingen werden vooraf op 20° C gebracht. Men vermengt de oplossingen en laat juist 5 min in het waterbad staan. Men voegt dan 1 ml 1N HCl toe en schudt. Men vult aan tot de merkstreep en onderwerpt 1 ml aan de mikrodiffusie volgens de gewone methode. Men drukt de aktiviteit uit in mg ureum/uur.

SAMENVATTING.

Na het bespreken van het principe van de mikrodiffusie-methode voor de bepaling van vrije ammoniak wordt een nieuwe methode voor versnelde mikrodiffusie met toepassingen voor de objektieve kwaliteitsbepaling van schaaldieren en kraakbeenvissen beschreven.

Voor de methode worden kleine diffusieflessen gebruikt waarvan de polyethyleen stop van een glazen staaf met bolvormig ge-

rodeerd uiteinde voorzien is. Dit uiteinde wordt met zwavelzuur bevochtigd. Het te analyseren extract wordt in de fles gepipeteerd en gealkaliseerd. Door het roteren van de flessen in een speciale microdiffusierotator wordt de diffusietijd aanzienlijk verminderd (30 min). De ammoniak wordt door het zwavelzuur gebonden en kolorimetrisch met Nesslerreagens bepaald.

Er treedt geen hydrolyse op van ureum of peptiden en dimethylamine en trimethylamine storen de bepaling niet.

De methode kan ook voor de bepaling van ureum en urease gebruikt worden.

De methode werd op garnaal (*Crangon vulgaris* F), Noorse kreeft (*Nephrops norvegicus* L) en doornhaai (*Squalus acanthias* L) toegepast. De organoleptische keuring kwam met de ammoniakbepalingen goed overeen.

LITERATUUR.

- (1) E. Conway - Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 5de Uitg., Crosby Lockwood & Son Ltd, London, 1962.
- (2) D. Seligson en H. Seligson - A microdiffusion method for the determination of nitrogen liberated as ammonia - Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 38, 324, 1951.
- (3) W. Vyncke en E. Merlevede - Spoilage of fish and crustaceans ; Rapid determination of volatile ammonia by accelerated microdiffusion - Archives Belges de Médecine Sociale, Hygiène, Médecine du Travail et Médecine Légale, 21 (3), 147, 1963.

- (4) W. Simidu en K. Oisi, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 16, 547, 1951.
- (5) W. Vyncke - Studie van de factoren die de houdbaarheid van garnalen beïnvloeden - Landbouwtijdschrift, 19, 815, 1966.
- (6) P. Hovart en W. Vyncke - Handling and processing Norway lobsters - Fishing News International, 3, 117 en 221, 1964.
- (7) F. Soudan - La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques, J. Baillièrè et fils, Paris, 1965.
- (8) W. Vyncke - The influence of temperature on fish as measured by objective quality methods - Fishing News International, 6, 39, 1967.
- (9) W. Vyncke - De invloed van de temperatuur en de objektieve kwaliteitsbepaling van vis - Ministerie van Landbouw, Proefstation voor Zeevisserij, Oostende, publikatie nr. 12, 1966.
- (10) J. Sumner en D. Hand - Journal of Biological Chemistry, 76, 149, 1928.

November 1967.

