

水产品中挥发性盐基氮测定方法的改良

陈培基, 李来好, 李刘冬, 杨贤庆, 刁石强, 吴燕燕

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

摘要:使用不同浓度的高氯酸溶液对罗非鱼(*Tilapia niloticus*)、蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)和近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*)4种水产品的肌肉样品进行前处理,并采用蒸馏法测定样品提取液中挥发性盐基氮(TVBN)的含量,研究了高氯酸溶液浓度、浸提时间和蒸馏前样品的放置时间对测定的结果影响。结果表明,以 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液均质样品2 min后测定4种水产品中TVBN,样品加标回收率在98.35%~100.80%,相对标准偏差在1.53%以下。这种方法所得结果与GB/T 5009.44蒸馏法相比,不存在显著性差异,且操作简便、快速。[中国水产科学,2006,13(1):146~150]

关键词:水产品;挥发性盐基氮;测定方法

中图分类号:S985.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0146-05

挥发性盐基氮(TVBN)通常作为蛋白性食品新鲜度的理化指标,鱼类等水产品在腐败过程中,由于细菌的生长繁殖和酶的作用,使蛋白质分解而产生胺类及氨等具挥发性的碱性含氮物质。这些挥发性盐基氮与水产品腐败程度之间有明显的对应关系,因此,测定水产品中TVBN的含量,有助于判定水产品的新鲜度和确定水产品质量^[1,2]。目前,水产品中TVBN的测定大多采用半微量蒸馏法或微量扩散法^[2~4],后者手续复杂、费时,前者虽然操作简单,但由于水产品在水中浸溶后胶黏性大,且容易腐败变质,用蒸馏法中的样品处理方法处理水产品,不仅会使样液过滤困难,而且会因样品处理时间或样液放置时间过长而引起测定结果偏高;其次在加样蒸馏时,碱的作用会使反应室内样液剧烈沸腾而发泡,带有氧化镁颗粒的泡沫往往会污染反应室顶部使其难以清洗,严重时还会溢入冷凝管而导致实验失败。为此,本研究拟用高氯酸溶液代替水溶液处理样品,用氢氧化钠溶液加消泡剂代替氧化镁溶液进行碱化蒸馏,以探讨其对水产品中TVBN测定结果的影响,从而建立一种适合于水产品中TVBN测定的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 高速均质机,半微量定氮器,微量滴定管(最小分度 0.01 mL)。

1.1.2 试剂 高氯酸溶液的浓度梯度为 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。硼酸吸收液($20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),氢氧化钠溶液($30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),硅油消泡剂,酚酞指示剂($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),混合指示剂(1份 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基红乙醇溶液与1份 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 次甲基蓝乙醇溶液混合),盐酸标准溶液($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$),氯化铵标准溶液(含氮量为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),所用试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水。

1.1.3 样品 罗非鱼(*Tilapia niloticus*)、蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)和近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*),全部购于广州市水产市场,除蓝圆鲹为冷冻品外,其他为鲜活水产品。

1.2 测定方法

1.2.1 样品处理 将鱼类去鳞、去皮沿背脊取肌肉部分切碎;对虾去头、去壳取肌肉切碎;牡蛎去壳后取肉和体液一起放入捣碎机内捣碎。称取混匀样品 10 g (精确到 0.01 g)于均质杯中,加入 100 mL 不同

收稿日期:2005-01-05; 修订日期:2005-05-20.

基金项目:农业部结构调整重大技术研究专项资助(2003-08-03A).

作者简介:陈培基(1954-),男,副研究员,研究方向:水产品质量安全和质量体系认识. E-mail:cpjcx@126.com

通讯作者:李来好. E-mail:lihai@163.com

浓度高氯酸溶液或蒸馏水均质提取,然后用滤纸过滤或离心分离的方法分离样液。

1.2.2 蒸馏滴定 将盛有 10 mL 硼酸吸收液($20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和 2~3 滴混合指示剂的锥形瓶置于冷凝管下端,并使其下端插入吸收液的液面下,准确吸取 5.00 mL 样液于蒸馏器的反应室内,加入酚酞指示剂 1~2 滴、硅油消泡剂 1 滴和氢氧化钠溶液($30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)5.0 mL(至样液显红色),迅速盖塞,加水以防漏气,然后通入蒸汽蒸馏 5 min。降下锥形瓶,使冷凝管末端移离吸收液的液面,再蒸 1 min,用少量水冲洗冷凝管末端至锥形瓶中。吸收液用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸标准溶液滴定至溶液呈蓝紫色。同时用 5.0 mL 高氯酸溶液(其浓度与该样品处理时相同)或蒸馏水代替样液进行空白试验。

1.2.3 计算方法 样品中 TVBN 的含量($\text{mg}/100\text{ g}$)按下式计算:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 14}{m \times 5/100} \times 100$$

式中: V_1 为样品消耗盐酸标准溶液体积, mL; V_2 为试剂空白消耗盐酸标准溶液体积, mL; c 为盐酸标准溶液的浓度, mol/L ; m 为样品的质量, g; 14 为与 1.00 mL 盐酸标准溶液($c(\text{HCl}) = 1\text{ mol}/\text{L}$)相当的氮质量, mg。

2 结果

2.1 高氯酸溶液浓度的影响

按照 1.2.1 样品处理的方法,在水产品样品中加入不同浓度的高氯酸溶液,均质 2 min 进行提取,过滤,然后测定样品的挥发性盐基氮,结果见表 1。

表 1 高氯酸浓度对水产品中 TVBN 测定的影响

Tab.1 Influence of HClO_4 concentration on TVBN content in muscles of four species

HClO_4 / $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	罗非鱼 <i>T. niloticus</i>		蓝圆鲈 <i>D. marulius</i>		南美白对虾 <i>L. vannamei</i>		近江牡蛎 <i>C. rivularis</i>	
	过滤效果 Filterability	TVBN/ $(\text{mg}\cdot$ $(100\text{ g})^{-1})$	过滤效果 Filterability	TVBN/ $(\text{mg}\cdot$ $(100\text{ g})^{-1})$	过滤效果 filterability	TVBN/ $(\text{mg}\cdot$ $(100\text{ g})^{-1})$	过滤效果 Filterability	TVBN/ $(\text{mg}\cdot$ $(100\text{ g})^{-1})$
0	困难 Harder	8.30	困难 Harder	19.62	困难 Harder	6.25	困难 Harder	7.28
0.2	较困难 Hard	9.13	较困难 Hard	21.58	较困难 Hard	6.82	困难 Harder	7.82
0.4	较容易 Easy	10.25	容易 Easier	23.77	较容易 Easy	7.71	较困难 Hard	8.50
0.6	容易 Easier	10.37	容易 Easier	23.82	容易 Easier	7.86	较容易 Easy	8.53
0.8	容易 Easier	10.38	容易 Easier	23.82	容易 Easier	7.88	较容易 Easy	8.51

从表 1 可知,水产品在水中经均质后,由于蛋白质等可溶性物质的大量溶出,在提取液中形成很强的胶黏性,从而影响了提取液的过滤和阻碍了水产品肌肉中 TVBN 析出。随着高氯酸的加入,样品溶液中的蛋白质随之发生变性而沉淀,降低了提取液的黏稠性,有利于样品过滤及其 TVBN 的溶出。当高氯酸的浓度升至 $0.6\text{ mol}/\text{L}$ 时,各种水产品的样

品均过滤容易,而且对 TVBN 的提取也达到了很好效果。

2.2 浸提时间的影响

按照 1.2.1 样品处理方法,在水产品样品中加入 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液,均质 2 min 后再浸提不同时间,测得的挥发性盐基氮见表 2。

表 2 浸提时间对水产品中 TVBN 含量的影响

Tab.2 Influence of extracting time on TVBN content in muscles of four species

浸提时间 Extracting time/min	mg/(100 g)			
	罗非鱼 <i>T. niloticus</i>	蓝圆鲈 <i>D. marulius</i>	南美白对虾 <i>L. vannamei</i>	近江牡蛎 <i>C. rivularis</i>
0	10.34	23.86	7.84	8.60
15	10.34	23.88	7.85	8.62
30	10.36	23.88	7.86	8.63

结果显示,在高氯酸存在下,样品均质 2 min 基本上就可将其 TVBN 全部提出,所以浸提时间的长短对水产品中挥发性盐基氮的测定结果影响甚小,因此采用 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液均质样品 2 min 的方法进行样品处理,可满足不同水产品测定的要求。

2.3 提取液放置时间的影响

提取液中含有丰富的可溶性蛋白质,在存放过程中因细菌和酶的作用,容易分解成胺等含氮物质,

使样液中的挥发性盐基氮增高,从而影响了样品测定结果的准确性,其影响大小除了与水产品品种有关外,也与样品提取液的提取方法、放置时间和温度有关。本实验选择罗非鱼、蓝圆鲈两种水产品为实验对象,用 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液均质提取或水浸提的方法处理样品,所得样品提取液在不同的温度下放置保存,然后测定不同放置时间两种水产品挥发性盐基氮,结果见表 3。

表 3 提取液放置时间对水产品中 TVBN 的影响

Tab.3 Influence of keeping time on TVBN content in fishery products		mg/(100 g)										
样品 Sample	方法 Method	温度 T/℃	放置时间/h Keeping time									
			0	1	2	4	12	24	48	96	144	192
罗非鱼 <i>T. niloticus</i>	酸法 HClO_4	5	10.30	10.30	10.31	10.33	10.36	10.41	10.50	10.64	10.83	11.40
		20	10.30	10.32	10.34	10.37	10.52	10.78	11.30	12.42		
		30	10.30	10.35	10.42	10.56	10.75	11.25	12.40			
	水浸提 H_2O	5	10.22	10.24	10.27	10.30	10.45	10.66	11.12	12.78		
		20	10.22	10.32	10.46	10.78	16.63					
		30	10.22	10.38	10.62	11.40						
蓝圆鲈 <i>D. maruadsi</i>	酸法 HClO_4	5	23.56	23.57	23.59	23.62	23.72	23.85	24.10	24.67	25.25	26.52
		20	23.56	23.60	23.66	23.77	24.15	24.73	26.15			
		30	23.56	23.64	23.72	23.91	24.66	25.86	28.43			
	水浸提 H_2O	5	23.50	23.54	23.59	23.68	24.02	24.58	25.74	28.10		
		20	23.50	23.77	24.10	24.81	27.46					
		30	23.50	23.89	24.52	26.06						

注:提取液中的 TVBN 增加 10% 后不再作测定。

Note: TVBN content in extract is not determined after increased by 10%.

由表 3 可知,无论采用高氯酸提取或水浸提的方法处理样品,两种水产品的 TVBN 变化是随提取液的放置温度升高和放置时间延长而增高,且两种水产品在放置过程中 TVBN 的变化趋势和速度有类似的规律。但样品处理方法不同,其提取液的 TVBN 变化差异甚大。如用酸提取的样液在 5℃ 放置 144 h,两种鱼类的 TVBN 分别增加 5.14% 和 7.17%,而用水浸提的样液在此温度下放置仅 48 h,两种鱼类的 TVBN 则分别增加了 8.81% 和 9.53%,两种方法的 TVBN 变化速度至少相差 3 倍,尤其在高温保存时,这种变化差别更加明显。所以样液在同等温度和条件下保存,采用酸法提取的 TVBN 的变化速率远比水浸提法的慢,这表明高氯酸能有效地抑制细菌对样液中蛋白质的分解,从而达到延长放置时间的目的。本实验按照国家标准^[3]对两样测定的相对偏差允许小于或等于 10%

的规定确定样液的放置时间,即 5℃ 时的放置时间可达 6 d,20~30℃ 的温度下也可放置 1~2 d。

2.4 准确度

在不同的水产品样品中,分别加入一定量的 NH_4Cl 标准溶液,按照 1.2 测定方法和实验确定的条件测定加标前后样品的 TVBN 含量,然后计算其回收率(表 4)。结果样品的加标回收率在 98.35%~100.80%,平均回收率为 99.52%,其方法的准确度符合分析的要求。

2.5 精密度

按照 1.2 测定方法和实验确定的条件对不同水产品样品的 TVBN 含量分别进行 6 次平行测定(表 5),结果 6 次测定的标准偏差在 7.62×10^{-2} ~ 13.56×10^{-2} ,相对标准偏差在 1.53% 以下,其方法的精密度符合分析的要求。

表4 样品加标(TVBN)的回收率

Tab.4 Recovery of adding standard material (TVBN) in sample

样品 Sample	样品含量/ [mg·(100g) ⁻¹] Content in sample	标准加入量/ [mg·(100g) ⁻¹] Addition of standard material	样品加标后含量/ [mg·(100g) ⁻¹] Content after adding standard material in sample	回收率/% Recovery
罗非鱼 <i>T. niloticus</i>	9.86	20	29.91	100.25
		40	49.72	99.65
		100	108.54	98.68
蓝圆鲷 <i>D. maruadsi</i>	23.35	20	43.51	100.80
		40	63.38	100.08
		100	122.47	99.12
南美白对虾 <i>L. vannamei</i>	7.90	20	27.86	99.80
		40	47.63	99.33
		100	106.80	98.90
近江牡蛎 <i>C. rivularis</i>	8.57	20	28.48	99.55
		40	48.48	99.78
		100	106.92	98.35

表5 样品测定的精密度

Tab.5 Precision of sample determination

样品 Sample	TVBN/[mg·(100 g) ⁻¹]							标准偏差 SD×10 ⁻²	相对标准偏差 RSD/%
	测定值 Determinate value						平均值 Average		
罗非鱼 <i>T. niloticus</i>	10.10	10.05	10.23	10.03	10.08	10.17	10.11	7.62	0.75
蓝圆鲷 <i>D. maruadsi</i>	24.10	24.25	23.97	24.20	23.95	24.25	24.12	13.56	0.56
南美白对虾 <i>L. vannamei</i>	7.92	7.88	8.06	7.86	8.06	7.98	7.96	8.76	1.10
近江牡蛎 <i>C. rivularis</i>	8.45	8.30	8.53	8.24	8.49	8.21	8.37	12.79	1.53

2.6 方法比较

为进一步验证方法的可靠性,采用 GB/T 5009.44 蒸馏法分别测定水产品中的 TVBN 6 次,然后与本法测定结果比较,两种方法的 TVBN 平均

含量及标准偏差列于表6。经 t 检验^[5],4 种样品的检验结果均 $t < t_{0.95}$,说明两种测定方法不存在显著性差异。

表6 两种方法测定样品中 TVBN 含量的比较

Tab.6 Comparison of TVBN content in sample determined by two methods

样品 Sample	方法 Method	TVBN/ mg·100g ⁻¹	$S \times 10^{-2}$	t 检验 t -test	显著性 Significance
罗非鱼 <i>T. niloticus</i>	本法 This method	10.11	7.62	$t = 1.22 < t_{0.95} = 2.31$	不显著 Not significant
	GB/T 5009.44	10.05	7.97		
蓝圆鲷 <i>D. maruadsi</i>	本法 This method	24.12	13.56	$t = 2.05 < t_{0.95} = 2.31$	不显著 Not significant
	GB/T 5009.44	23.94	14.22		
南美白对虾 <i>L. vannamei</i>	本法 This method	7.96	8.76	$t = 0.74 < t_{0.95} = 2.31$	不显著 Not significant
	GB/T 5009.44	8.00	8.24		
近江牡蛎 <i>C. rivularis</i>	本法 This method	8.37	12.79	$t = 1.69 < t_{0.95} = 2.31$	不显著 Not significant
	GB/T 5009.44	8.23	13.37		

注:用 GB/T 5009.44 的方法测定时,由于过滤困难,改用离心分离的方法分离样液。

Note: When the TVBN was determined by distillation in GB/T 5009.44, because of the difficulty of filter, centrifugation was used to separate the extract from the sample solution.

3 讨论

3.1 准确度与重现性

以上的实验结果表明,改良后的方法无论在测定准确度或在测定的重现性方面稍优于国标蒸馏法(GB/T 5009.44)。其原因一方面是在样品处理时,改良法是通过高速均质机充分均质提取挥发性盐基氮,不存在因样品颗粒大小不一或振荡强度与频率不同而影响其挥发性盐基氮的提取效果;另一方面在蒸馏时,改良法是以均匀的氢氧化钠溶液进行碱化,而国标法则采用弱碱性氧化镁混悬液碱化,由于氧化镁混悬液不是一种均匀液体,且容易产生沉降,所以在每次测定时,都很难保证吸取到均一的氧化镁混悬液,这样也是影响其蒸馏效果不稳定的因素之一。

3.2 样品中挥发性盐基氮的提取效率

在样品处理时,本法采用高氯酸溶液代替水溶液,结合高速均质机破碎肌肉组织的提取方法,不仅解决了国标法存在的过滤困难问题,而且提高了样品中挥发性盐基氮的提取效率,样品均质 2 min 就基本上能使其中的挥发性盐基氮提取完全,缩短了样品处理时间。

3.3 高氯酸前处理对样品有效期的延长作用

在进行大量样品实测时,用国标法处理样品往往会因样品处理时间或样液放置时间过长而影响测定结果的准确性。用高氯酸这一强酸溶液作为水产样品的前处理,除了能减少样液中的蛋白质含量外,

还具有杀菌和抑制细菌对样液中蛋白质的分解作用。实验表明,用高氯酸提取的样液在 5℃ 放置 6 d 或在 20~30℃ 放置 1~2 d 后测定,几乎不影响测定结果。

3.4 氢氧化钠溶液加消泡剂进行蒸馏的优势

在样品测定时改用氢氧化钠溶液加消泡剂进行蒸馏,既能保证样品中挥发性盐基氮的蒸馏效果,又起到减少或消除泡沫的作用,从而避免了蒸馏过程样液泡沫溢入冷凝管而导致的实验失败,同时不存在氧化镁颗粒污染反应室顶部而造成清洗困难。

综上所述,应用本法测定水产品中的挥发性盐基氮,操作简便、快速,适合于大批量样品的处理和检测。该方法有很高的准确度和精密度,对水产品中的挥发性盐基氮的测定具有很高的可靠性和较强的实用性,值得在水产行业中推广使用。

参考文献:

- [1] 王秉楠. 动物性食品卫生理化检验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989. 290~292.
- [2] 刘福时,戴行钧. 食品物理与化学分析方法[M]. 北京:轻工业出版社,1987. 508~512.
- [3] GB/T 5009.44-2003. 肉与肉制品卫生标准的分析方法[S].
- [4] Commission Decision of EC. Fixing the total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used[J]. Official Journal, 1995, L97, 84~87.
- [5] 邓 勃. 数理统计方法在分析测试中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,1984. 11.

Improvement on determination of total volatile basic nitrogen in fishery products

CHEN Pei-ji, LI Lai-hao, LI Liu-dong, YANG Xian-qing, DIAO Shi-qiang, WU Yan-yan

(South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Muscles of four species of fishery products such as *T. niloticus*, *D. maruadsi*, *L. vannamei* and *C. rivularis* were pretreated by different concentration perchloric acid (HClO_4) solutions to extract the total volatile basic nitrogen (TVBN), which was determined by distillation. The influence of concentrations of HClO_4 solution, extracting time and keeping time of the extract before distillation on determination was studied. The results showed that the recovery was between 98.35% and 100.80%; RSD was below 1.53%, by determining the TVBN in fishery products after the samples had been homogenized for 2 min in $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HClO_4 solution. The result of this method had no significant difference compared with the distillation in GB/T 5009.44, and the operation was easy and took shorter time. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 146~150]

Key words: fishery products; TVBN; determination

Corresponding author: LI Lai-hao. E-mail: laihao@163.com