

FISKERIDIREKTORATETS KJEMISK-TEKNISKE  
FORSKNINGSINSTITUTT

Tilrettelegging av metode som kan avgjøre om et salt har vært brukt

ved

Norvald Losnegard, Gunnar Tertnes og Jan Larsen

R.nr. 136/74  
A. h. 52

BERGEN

Tilrettelegging av metode som kan avgjøre om et salt har vært brukt

ved

Norvald Losnegard, Gunnar Tertnes og Jan Larsen

### Innledning

Saltfiskutvalget har utarbeidet forslag til spesifikasjoner for salt til fiskeriformål. Disse spesifikasjonene ble den 19. januar 1973 tatt inn i § 9 i Fiskeridepartementets Forskrifter av 6. juni 1968 for behandling, tilvirkning, føring, pakking, lagring og transport av fisk som skal tilvirkes til eller er tilvirket til saltfisk eller klippfisk.

Kravet om at en til salting av fisk kun kan anvende ubrukt salt, reiser for det første spørsmålet om å definere hva som er bruksalt, dernest hvordan en skal avgjøre hvorvidt et salt har vært brukt. I denne sammenheng ser en bort fra at salt under lagring eller transport ved uhell eller uaktsomhet kan bli tilført forurensninger av en slik art og grad at det må regnes som uegnet.

Salt som har vært brukt til salting av fisk (eller kjøtt) må uten videre betraktes som bruksalt. Det vil i regelen være smittet av ekstraktivstoffer fra fisken, og lukt og farge vil kunne avvike fra det normale. Graden av forurensning kan være forskjellig. Nede i stabelen vil saltet komme i intim kontakt med fisken og den avrennende lake. Saltet på toppen av stabelen trenger ikke komme i en slik direkte kontakt. Det kan være vanskelig å påvise at dette saltet er brukt, enskjønt luktkomponenter nok kan adsorberes til saltet.

På denne bakgrunn er det behov for en objektiv metode som kan avgjøre om et salt inneholder ekstraktivstoffer fra fisk. I så fall må saltet karakteriseres som brukt. Etter anmodning fra Saltfiskutvalget er det søkt å tilrettelegge en slik metode.

Det var nærliggende å ta utgangspunkt i en ninhydrintest for påvisning av ammoniakk, aminosyrer, peptider og proteiner, som under salting utlakes fra fisken og smitter over på saltet. Standard-betingelsene ble søkt fastlagt gjennom innledende forsøk. I det videre arbeidet ble generelt anvendt den metodikk som er utførlig beskrevet i vedlegg.

Følgende prøveserier er blitt analysert:

1. Standard aminosyre
2. Standard aminosyre tilsatt variable mengder rent koksalt
3. Fortynningsserier etter fargeutvikling av prøver
4. Brukte og ubrukte fiskerisalt fra Fiskerilaboratoriets samling
5. Brukte og ubrukte fiskerisalt fra Industrilaboratoriet.

Resultater

Tab. 1. Ekstinksjonsverdier for standard aminosyre

Serin, µg/ml sluttløsning	E <sub>570 mµ</sub>							
	Serie: 1	2	3	4	5	6	7	8
0,2	0,033	0,025	0,038	0,027	0,024	0,031	0,025	0,045
0,5	0,084	0,059	0,082	0,067	0,061	0,078	0,081	0,108
1,0	0,159	0,118	0,178	0,145	0,150	0,167	0,176	0,190
2,0	0,366	0,237	0,358	0,299	0,309	0,345	0,341	0,360
4,0	0,701	0,521						0,710

Blindprøven selv ble avlest mot 50 % etanol som standard referanseprøve. 22 separat opparbeidete blindprøver hadde en gjennomsnitts ekstinksjon på 0,052 og variasjonsområde 0,029-0,089.

Tab. 2. Ekstinksjonsverdier for standard aminosyre tilsatt koksalt

Serin, µg/ml sluttløsning	Koksalt mg/ml sluttløsning	E <sub>570 mµ</sub>	
		Serie 1	Serie 2
2	0	0,366	0,383
2	4	0,343	0,360
2	10	0,333	0,350
2	40	0,248	0,265
4	0	0,701	
4	4	0,706	
4	10	0,711	
4	20	0,671	
4	40	0,629	

Tab. 3. Ekstinksjonsverdier ved fortynning av prøver etter fargeutvikling

Prøve	E <sub>570 mµ</sub>			
	Ufortynnet	Fortynning:		
		1:2	1:4	1:10
Serin, 2 µg/ml sluttløsning	0,366	0,187	0,095	0,039
" 2 µg/ml sluttløsn.+40mg koksalt/ml	0,248	0,128	0,060	0,025
" 4 µg/ml	0,701	0,345	0,171	0,067
" 4 µg/ml + 4 mg koksalt/ml	0,706	0,360	0,180	0,071
" 4 µg/ml + 40 mg koksalt/ml	0,629	0,310	0,160	0,059
Salt nr. 23/69	0,706	0,373	0,182	0,073

Tab. 4. Ekstinksjonsverdier for saltprøver fra Fiskerilaboratoriets samling

Prøve merket	E <sub>570 mμ</sub>	Prøve merket	E <sub>570 mμ</sub>
<u>Angivelig ubrukke saåt:</u>			
1/68 Ibiza	0,043	38/69 St. Pola	0,030
2/68 Vakuumsalt, engelsk	0,034	40/69 Trapani	0,032
3/68 Trapani	0,040	1/70 Vakuumsalt, engelsk	0,029
4/68 Sifto, kanadisk	0,027	2/70 l'Esquineau	0,020
6/68 Trapani	0,050	1/71 Vakuumsalt, engelsk	0,020
7/68 Bergsalt	0,036	2/71 Granular, ICI, engelsk	0,015
1/69 Trapani	0,025	3/71 Tunis	0,012
2/69 Trapani	0,024	4/71 Dendritisk, engelsk	0,011
3/69 l'Esquineau	0,040	5/71 Vakuumsalt, engelsk	0,009
10/69 Sifto, kanadisk, grovt	0,029	6/71 Bergsalt, tysk	0,013
11/69 Sifto, kanadisk, fint	0,025	1/72 l'Esquineau	0,013
12/69 Broxo, hollandsk	0,037	2/72 Vakuumsalt	0,019
13/69 Tunis	0,039	3/72 Tysk	0,014
14/69 Ukjent	0,045	5/72 Tysk	0,054
15/69 Ibiza	0,037	1/73 Macau	0,012
16/69 Ibiza	0,021	2/73 Macau	0,017
17/69 Ibiza	0,023	3/73 Macau	0,013
18/69 Almeria	0,036	4/73 Macau	0,019
19/69 Almeria	0,021	5/73 Macau	0,013
20/69 Almeria	0,033	6/73 Tunis	0,022
22/69 St. Pola	0,155		
24/69 Torrevieja	0,036	<u>Angivelig brukte salt:</u>	
26/69 Ukjent	0,045	4/69 l'Esquineau	0,564
27/69 Ukjent	0,037	5/69 St. Pola	0,383
29/69 Ukjent	0,040	21/69 Almeria	0,646
30/69 Ukjent	0,048	23/69 St. Pola	0,666
31/69 Ukjent	0,021	25/69 Torrevieja	0,384
32/69 Ukjent	0,025	28/69 Ukjent	0,588
33/69 St. Pola	0,037	41/69 Ukjent	0,376
34/69 Bergsalt	0,035	42/69 Ukjent	0,348
35/69 St. Pola	0,162	7/71 Ukjent "forurenset"	0,084
36/69 Ukjent	0,035	4/72 Tysk	0,578
37/69 Ukjent	0,019		

Tab. 5. Ekstinksjonsverdier for saltprøver fra Industrielaboratoriet

Prøve merket	E <sub>570</sub> mμ	
	Analytiker 1	Analytiker 2
Serie I		
1 Bruksalt, Gryllefjord 10.2.1973	0,345	0,290
2 Bruksalt, Gryllefjord, 10.2.1973	0,358	0,319
3 Bruksalt, Silda Fryseri	0,023	0,032
4 Bruksalt, N 437	0,161	0,117
5 1. gangs bruksalt, Stabburet, Svolve	0,007	0,036
6 Ubrukt og brukt, N 484, Reine 19.2.1973	0,215	0,206
7 Ubrukt og brukt, N 519, Reine 19.2.1973	0,031	0,067
8 Brukt til lakesalting, N 519, Reine 19.2.1973	0,181	0,116
Serie II		
1	0,473	0,427
2	0,288	0,294
3	0,228	0,222
4	0,010	0,011
5	0,148	0,152
6 Det er ikke gitt nærmere opplysninger	0,244	0,190
7 om prøvene i denne serien.	0,005	0,003
8	0,123	0,099
9	0,222	0,242
10	0,008	0,001
11	0,198	0,261
12	0,170	0,160

#### Kommentarer

Tab. 1. Opparbeidingen var ikke i alle detaljer lik for samtlige serier. Ekstinksjonsverdiene trenger derfor ikke være direkte sammenliknbare fra serie til serie. Selv om blindprøven er noe variabel, avlest mot 50 % etanol som standard referanse, synes det å være godt samsvar mellom aminosyrekonsentrasjon og ekstinksjon innen hver serie.

Tab. 2. Koksalt i konsentrasjoner inntil 10 mg/ml sluttløsning gir ikke entydig nedgang i ekstinksjon, mens 40 mg/ml gir lavere ekstinksjon.

Tab. 3. Resultatene viser at ved fortytning av prøver etter fargeutvikling er det lineær sammenheng mellom fortytningsgrad og ekstinksjon.

Tab. 4. Målt i samme konsentrasjon har 51 av de 53 prøver av ubrukke salt fra Fiskerielaboratoriets samling ekstinksjoner i området 0,009-0,054 og med gjennomsnitt 0,028, mens de 2 øvrige prøvene har ekstinksjonsverdier på henholdsvis 0,155 og 0,162 uten å være synlig forurenset. Bruksaltprøve 7/71, var sterkt gulfarget og luktet av olje. Dens ekstinksjonsverdi er likevel bare 0,084. De øvrige 9 bruksaltene har ekstinksjonsverdier i området 0,348-0,666.

Tab. 5. Opplysningene om saltprøvene i serie I er til dels uklare.

Prøvene 6 og 7 er hver for seg merket med "Ubrukt og brukt salt fra samme parti".

Prøvene 3 og 5 (serie I) har betydelig lavere ekstinksjonsverdier enn en måtte vente hos salt som har vært brukt. Trass i karakteristikken bruksalt, kan disse prøvesaltene ha hatt lite direkte kontakt med fisken eller dens ekstraktivstoffer. De øvrige prøver i serie I er bruksalt, og det er også den konklusjon en ville ha trukket av analyseresultatene.

Saltprøvene i serie II er det ikke gitt opplysninger om. Analyseresultatene peker her ut prøvene 4, 7 og 10 som ubrukte salt og de øvrige som brukt-salt.

Resultatene viser at med få unntak har den anvendte metode gitt klart forhøyete ekstinksjonsverdier for angivelig brukte salt i forhold til verdiene for ubrukte salt. Langt på vei kan et salt defineres som brukt når det gir klart positiv reaksjon på ninhydrinreaktive stoffer.

Generelt må en kunne si at så sant et salt inneholder ninhydrinreaktive stoffer i kvantitativt målbare mengder, vil metoden også registrere dette. Her ligger samtidig metodens begrensning. Som nevnt i innledningen trenger ikke saltet på toppen av en fiskestabel komme i direkte kontakt med fisken og dens ekstraktivstoffer. Metoden vil derfor ikke registrere dette som bruksalt. På den annen side kan et ubrukt salt ha blitt tilført ninhydrinreaktive stoffer, f.eks. ammoniakk ved lekkasje, og kan derved få forhøyet ekstinksjonsverdi i klasse med bruksalt. En sensorisk bedømmelse av lukt, farge og fremmedpartikler vil da være et verdifulle supplement når et salt skal vurderes.

Metoden, slik den er beskrevet i vedlegget "Bestemmelse av ninhydrinreaktive stoffer i bruksalt", skulle være godt egnet som rutinemetode. Den er enkel og hurtig, og det kan kjøres større serier.

Bergen, 3.4.1974

## Bestemmelse av ninhydrinreaktive stoffer i bruksalt

### Litteratur:

1. Cocking, E.C. og Yemm, E.W.: Estimation of amino acids by ninhydrin. Biochem. J. 58 (1), s. XII, 1954.
2. Larsen, H., Kjosbakken, J., Brinchmann, H.J. og Kristiansen, T.: Post-mortale forandringer i fisk I, 13-14, 1968. Rapport til NTNF for tiden 15/8-31/12.1967.

### Prinsipp:

Aminosyrer dekarboksyleres kvantitativt av ninhydrin, og det dannes aldehyd,  $\text{CO}_2$  og  $\text{NH}_3$ . Ved pH større enn 4 reagerer ammoniakken med overskytende ninhydrin, og det dannes et blått fargestoff, som gir grunnlag for kolorimetrisk bestemmelse.

### Reagenser:

1. 0,2 M sitronsyre-citrat-puffer, pH 5,0 (1 del 0,2 M sitronsyre + 3 deler 0,2 M triNa-citratløsning). Like før bruk tilsettes 1,2 mg  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pr. ml pufferløsning.
2. 2,5 % w/v ninhydrin i dimetylsulfoksyd.
3. 50 % v/v etanol i vann.
4. Standard aminosyreløsning, henholdsvis 50  $\mu\text{g}$  og 10  $\mu\text{g}$  serin pr. ml.

### Utførelse:

5 g av det ukjentesalt løses til 50 ml med vann og filtreres. 4 ml av løsningen fortynnes med 6 ml vann. Fortynningen får en saltkonsentrasjon på 40 mg/ml. 1 ml av denne løsningen overføres til reagensrør og tilsettes 1 ml citratpuffer (med  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) og 0,5 ml ninhydrinreagens. Prøven stilles på kokende vannbad i 15 minutter, deretter avkjøles i springvann. Volumet justeres til 10 ml med 50 % etanol, og ekstinksjonen avleses i spektrofotometer ved 570 m $\mu$  mot blindprøve (1 ml 4 % p.a.-koksalt + reagenser) som har gjennomgått samme prosedyre.

### Kalibreringskurve:

En saltprøves innhold av ninhydrinreaktive stoffer kan uttrykkes i aminosyre (serin)-enheter, som avleses av kalibreringskurve:

I reagensrør utmåles henholdsvis 0-2-5-10-20 og 40  $\mu\text{g}$  serin. Volumene justeres til 1 ml med vann. Prøvene tilsettes reagenser og opparbeides og avleses som beskrevet under Utførelse. Avleste ekstinksjonsverdier tegnes av på millimeterpapir som funksjon av total mengde serin i sluttløsningen på 10 ml.

Beregning:

Konsentrasjonen ninhydrinreaktive stoffer (= X) i saltprøven, uttrykt som  $\mu\text{g}$  serin/g salt (= ppm), beregnes etter formelen

$$X = \frac{a_E}{A} \text{ ppm}$$

der  $a_E$  er den mengde serin i  $\mu\text{g}$  som ifølge kalibreringskurven svarer til prøvens ekstinksjon E. A er utmålt prøvemengde salt i gram, her standardisert til 0,04 g, som gir konsentrasjonen  $X = 25 a_E$  ppm.



