

RANNSÓKNASTOFNUN  
FISKIDNADARINS

# 1. RIT

REYKJAVÍK NÓVEMBER 1981

## HISTAMÍN Í FISKAFURÐUM

MAGNÚS MÁR KRISTJÁNSSON  
ALDA MÖLLER

RANNSÓKNASTOFNUN  
FISKIÐNADARINS

# 1. RIT

REYKJAVÍK NÓVEMBER 1981

## HISTAMÍN Í FISKAFURÐUM

MAGNÚS MÁR KRISTJÁNSSON  
ALDA MÖLLER

## ÁGRIP

Rætt er í inngangi um gildi histamíns í fiskafurðum, en það myndast við efnabreytingar (dekarboxýleringu) á aínósýrunni histidíni í fiskholdinu. Fjallað er um helstu þætti, sem stuðlað geta að mikilli histamín-myndun í vissum fiskafurðum og valdið geta svonefndri skombroíðeitrun.

Lýst er aðferð til að mæla histamín með flúorljómun.

Niðurstöður histamínmælinga í nokkrum fiskafurðum eru birtar. Athugað var hvernig histamín-innihald saltaðrar heilsíldar breyttist með verkun yfir 5 mán. tímabil. Histamínið jókst fyrstu 50-60 dagana og náði hæst 5.5 mg/100g síldar, en lækkaði lítið eitt upp úr því.

Histamín og TMA var mælt í mismunandi ferskri loðnu og könnuð fylgni í myndun þessara efna. Fylgni reyndist góð og virðist TMA-gildi geta gefið góða vísbendingu um histamín í loðnu.

Kannað var histamín-innihald nokkurra fiskmjölssýna. Ekki reyndust þessi sýni innihalda mikið histamín, en bent er á að fiskmjöl, sem unnið er úr skemmdu bræðsluhráefni geti innihaldið nokkuð mikið histamín.

Histamín var mælt í nokkrum lagmetistegundum; gaffalbitum, makrílflökum, túnfiski og sardínum. Öll þessi sýni innihéldu lítið histamín (minna en 0.5 mg/100g). Könnuð voru áhrif geymsluskilyrða, annars vegar geymslu í kæliskáp og hins vegar við stofuhita, á histamínmyndun í niðursoðnum túnfiski eftir að dós var opnuð. Samkvæmt niðurstöðum þessarar könnunar, sem stóð yfir í vikutíma, virðist ekki stafa mikil hætta af histamíni í þessari afurð, að því tilskyldu, að hráefni hafi fengið góða meðhöndlun fyrir niðursuðu. Þó getur eðli gerlaflórunnar sem nær sér á strik eftir að dós er opnuð ráðið miklu þar um. Eftir 4-7 daga geymslu verður histamínmyndun mun meiri í sýnum, sem geymd eru við stofuhita.

Ekkert histamín fannst í þorsk-ýsu-og karfaflökum, jafnvel í þorsksýnum sem höfðu TMA-gildi 35.2 mgN/100g.

## EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR .....	bls. 1
2. MÆLIADFERÐ .....	" 7
2.1. Tæki og efni .....	" 7
2.2. Vinnulýsing .....	" 7
2.2.1. Undirbúningur sýna .....	" 7
2.2.2. Hreinsun sýna .....	" 8
2.2.3. Mæling histamíns .....	" 8
2.2.4. Staðalmælingar .....	" 8
2.2.5. Útreikningar .....	" 9
2.2.6. Breytingar frá AOAC-aðferð .....	" 10
3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR .....	" 10
3.1. Histamín í saltaðri heil- sild í verkun .....	" 10
3.2. Histamín í mismunandi ferskri loðnu .....	" 12
3.3. Fiskmjöl .....	" 13
3.4. Histamín í nokkrum lagmetis- tegundum. Áhrif geymsluskil- yrða á histamínmyndun í nið- ursoðnum túnfisk eftir opnun dósa .....	" 14
3.5. Ferskfiskur .....	" 15
4. HEIMILDIR .....	" 16
Tafla I. Breytingar á histamín- og histidín- innihaldi við verkun saltaðrar heilsíldar ...	" 11
Tafla II. Histamín og TMA-mælingar í mis- munandi ferskri loðnu .....	" 12
Tafla III. Histamín-innihald nokkurra fiskmjölssýna	" 13
Tafla IV. Histamíninnihald nokkurra lagmetistegunda	" 14
Tafla V. Áhrif geymsluskilyrða á histamínmyndun í opnaðri dós af niðursoðnum túnfiski .....	" 14

## HISTAMÍN Í FISKAFURÐUM

Magnús Már Kristjánsson  
Alda Möller

### 1. INNGANGUR

Histamín og histamínlík efni eru talin vera helstu orsakir matareitrunar sem nefnd hefur verið Skombroíðeitrun (Scombroid-poisoning). Tilfella af Skombroíðeitrun hefur fyrst og fremst orðið vart eftir neyslu á fisktegundum af ættunum Scomberesocidae (geirnefja og hornfiskaætt) og Scombridae (makríla- og túnfiskaætt), þar sem helstu neyslufiskar eru makrill og túnfiskur. Þessar fisktegundir eiga það sameiginlegt m.a. að mikið er af óbundnu aminosýrunni histidín í fiskholdinu.

Histamín myndast við klofnun CO<sub>2</sub>-hóps frá histidíni (dekarboxýlering) með ensíminu histidín dekarboxýlase



Vissir gerlar sem í fiskholdið hafa komist hafa þetta ensím þó að histamín geti einnig myndast við sjálfmeltu (autolysis) á fiskholdinu, þ.e. vegna áhrifa ensíma í fisknum sjálfum. Sjálfmelta virðist þó ekki vera stór þáttur í myndun histamíns í miklu magni og myndar vart meira en 10-15 mg% við bestu meltuskilyrði í fiskum s.s. túnfiski sem er langt fyrir neðan þau mörk sem eitrun er venjulega miðuð við (100mg%) (Kimata, 1961). Þess ber þó að geta, að skráð eru tilfelli um, að í sýnum sem ekki höfðu orðið fyrir neinni gerlamengun hafi mælst allt að 300 ppm histamíns (30mg%) og telja höfundar, að histidín dekarboxýlasi úr blóði viðkomandi fisktegunda hafi valdið histamínmynduninni, en ekki gerlar (Wurziger & Dickhaut, 1978). Einnig hefur verið varað við að í meltu af makríl gæti myndast eitrunarmagn af histamíni

(Salguero & Mackie, 1979). Tilfellum af Skombroíð-eitrun virðist hafa fjölgað á síðari árum með aukinni neyslu á reyktum makríl og niðursoðnum túnfiski. (Skovgaard & Ellemann, 1978 ; Baxter et al 1980).

Helstu sjúkdómseinkenni Skombroíðeitrunar eru svipuð þeim, sem koma fram við histamíneitrun. Þau koma fram stuttu eftir að eittraðrar fæðu hefur verið neytt, yfirleitt innan einnar stundar og lýsa sér oftast sem roðnun á hálsi og í andliti, sem er vegna útvíkkunar háræða af völdum histamíns. Fólk fær hitatilfinningu, slæman höfuðverk og líður almennt illa. Algengt er líka, að hjartsláttur verði óreglulegur og oft kemur fram svimatilfinning, yfirlið, kláði, brunatilfinning í munni og hálsi, erfiðleikar við að kyngja og sterkur og veikur púls. Í u.þ.b. 25% tilfella, koma einnig fram meltingartruflanir, með magakrömpum og flökurleika, þó án uppkasta eða niðurgangs (Arnold & Brown, 1978).

Þótt einkennum Skombroíð-eitrunar svipi mjög til histamín-eitrunar og að líkur á eitrun standi í réttu hlutfalli við histamíninnihald þeirra matvæla, sem neytt er, hefur ekki verið sýnt óyggjandi fram á hlutverk histamínsins sjálfs í eiturverkuninni. Ef efnið er tekið inn, er það gert óvirkt í þörmunum og er ekki frásogað (Ienistea 1971). Skammtar allt að 180 mg af histamíni hafa verið gefnir mönnum án nokkurra eitrunareinkenna (Arnold & Brown, 1978). Þannig að svo virðist, sem mikið histamíninnihald eitt sér, sé ekki nægjanleg forsenda eitrunar, aðrir efnisþættir eða aðstæður þurfa að vera fyrir hendi svo eitrunareinkenni komi fram.

Athyglisvert er, að Hardy og Smith (1976) geta þess, að Hughes (1959) hafi fundið meira histamín í síld en þeir mældu í makríl við sömu aðstæður, en síld hefur aldrei verið bendluð við eitrun í heimalandi þeirra, Bretlandi. Þannig virðast einhverjir þættir vera til staðar í fiskum af fyrrnefndum tveim ættum, sem á einhvern hátt stuðla að eiturverkun histamíns, þættir, sem e.t.v. eru ekki til staðar í síld.

Nokkrir aðilar hafa mælt mikið histamín í makríl og túnfiski sem dæmdist neysluhæfur í ferskleikamati. Kimata (1961) bendir á, að notkun ammoníaks sem mælikvarða á geymslu fisks sé varasamt á hitabilinu 6-20°C, því þá er histamínmyndun mun hraðari en ammoníaksmyndun. Að hans dómi eru það ekki fyrr en

við u.þ.b. 35°C að ammoníak megi telja nothæfan mælikvarða. Skynmat, sem byggir á því, að niðursoðinn túnfiskur, sem inniheldur mikið histamín veldur áberandi "pipar-tilfinningu" í munni (Arnold & Brown, 1978), er heldur ekki nothæft mat á histamíni. Varasamt er líka að nota TMA (trimethylamín) sem vísbendingu um histamínmyndun, þar sem histamín hefur mælst mjög breytilegt í sýnum m.t.t. TMA (Kimata, 1961). Aðeins mæling á histamíni virðist því örugg.

Athyglisverð aðferð til ferskleikamats á túnfiski hefur komið fram (Mietz, 1977). Hún byggir á því, að mælt er magn histamíns, putrescins, cadaveríns, spermíns og spermidíns í viðkomandi sýnum með háþrýstivökvaskilju (HPLC). Út frá styrk þessara amína er reiknaður ákveðinn stuðull (index) sem er mælikvarði á ferskleika. Góð fylgni reyndist vera með niðurstöðum þessarar aðferðar og annarra s.s. skynmats, sem prófaðar voru til samanburðar. Ferencik (1970) nefnir helstu þætti sem stuðla að myndun mikils histamíns í fiski. Í fiskholdinu þurfa að vera: örverur með virkan histidín dekarboxýlasa, nægilegur styrkur af óbundnu histidíni og efni og aðstæður, sem stuðla að nýmyndun histidín dekarboxylasa, sem og vexti og viðkomu örveranna. Hér á eftir verður nánar rætt um þessa þætti. Margir gerlar hafa histidín dekarboxylasa-virkni, þó í mismiklum mæli sé, s.s. Escherichia, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Clostridium, Vibrio og Proteus-tegundir (Arnold & Brown, 1978). Nokkrar tegundir og stofnar greina sig þó nokkuð úr vegna mikillar virkni og skal þar fyrst nefna stofna af Proteus morganii og Hafnia (Ferencik, 1970).

Í rannsókn þar sem gerlar úr skemmdum makríl og túnfiski voru einangraðir og greindir, reyndust 44 stofnar af 470 vera mjög virkir histamín-myndarar og voru greindir sem; Proteus morganii (21 stofn), Hafnia alvei (13 stofnar), Proteustegundir (3 stofnar), Klebsiellategundir (1 stofn) og óþekktir (6 stofnar) (Omura et al, 1978).

Proteus morganii er virkastur histamín-myndandi gerla og er það notað sem vísbending um Skömbroiðeutrun.

Samkvæmt Kimata (1961) eru histamín-myndarar ætíð til staðar á yfirborði ferskfisks sem 0.1-1.0% gerlaflórunnar og er Proteus morganii yfirleitt algengust. Histamín-myndarar eru venjulega í

meiri mæli í vöðvum, tálknum og innyflum fiska en á roði, og eru tálkn og innyfli trúlega uppspretta þessara gerla þar sem vöðvar eru yfirleitt gerlalausir í ferskum fiski (Omura, 1978).

Histamín-myndun af völdum gerla stendur í beinu hlutfalli við virkni histidín dekarboxýlasa þeirra og þættir, sem hafa áhrif á myndun og/eða virkni hans hafa því áhrif á histamín-myndunina ásamt þáttum, sem ákvarða lífsskilyrði gerlanna.

Það er vel staðfest, að óbundið histidín ræður miklu um virkni histidín-dekarboxýlasa. Rannsóknir sýna, að ensímið er mjög sérvirkt gagnvart óbundnu L-histidíni en dekarboxýlerar t.d. ekki acyl-afleiðu histidíns, aspartyl-histidín eða histidyl-histidín (Arnold & Brown, 1978). Þessi mikla sérvirkni og mikil virkni ensímsins er ráðgáta, því svo virðist sem histidín sé ekki nauðsynlegur vaxtarþáttur fyrir gerlana (Kimata, 1961).

Histamínmagn í hættumörkum er í flestum tilfellum bundið við fisktegundir með dökka vöðva, sem innihalda mikið magn af óbundnu histidíni í vöðvum sínum. Histidínmagn í þessum fiskum getur verið allt að 2000 mg/100g vöðva (Simidu, 1961). Óbundið histidín virðist örva nýmyndun histidíndekarboxýlasa. Ferencik (1970) kannaði hvernig histidín í æti í rækt af Proteus morganii, hafði áhrif á histidíndekarboxýlasa gerlanna, og komst að því að lágmarksmagn til að hefja nýmyndun ensímsins var 100-200 mg % histidíns, en það er breytilegt eftir gerlum, t.d. hærra fyrir Proteus morganii en Hafnia-stofna. Histamínið sjálft virðist ekki draga úr virkni ensímsins er það hleðst upp, en virðist þó draga úr nýmyndun þess í Proteus morganii er það nær ákveðnum styrk (0.05M), en frekari rannsóknar er þörf á þessum þætti (Omura et al, 1978).

Virkni histidín dekarboxýlasa virðist minnka nokkuð með geymslutíma við mismunandi hitastig (Edmunds & Eitenmiller, 1975; Salguero & Mackie, 1979).

Hitastig hefur, eins og búast má við, mikil áhrif á histamín-myndun. Kimata (1961) flokkar Proteus morganii í tvær undirtegundir (types), undirtegund I og II. Undirtegund I hefur kjörhitastig til vaxtar við 20-25°C en undirtegund II við 30°C. Sú fyrrnefnda vex ekki einu sinni við 30°C, en sú síðarnefnda dafnar vel við 35°C. Histamínmyndun fylgir vel vaxtarferli gerlanna og er hún mest í kringum stofuhitastigið 20-25°C, en lítil sem engin við 35°C. Við hitastig kringum frostmarkið er lítil sem engin histamínmyndun (Edmunds & Eitenmiller, 1975). Makrill, sem er

ísaður og geymdur við 0°C er neysluhafur í u.þ.b. 12 daga og er histamín-innihald hans þá aðeins u.þ.b. 4 mg/%. En geymsla við herra hitastig (15°C) hefur aftur á móti í för með sér hraða histamínmyndun, jafnvel meðan fiskurinn er enn metinn vel neysluhafur. (Murray et al, 1980).

Eina örugga ráðið, til að halda histamínmyndun í skefjum í fisktegundum, þar sem það á annað borð getur myndast í miklum mæli, er að halda fiskinum við hitastig neðan frostmarks fiskvöðvans (Arnold & Brown, 1978).

Kjörsýrustig til vaxtar Proteus morganii, bæði fyrir undirtegund I og II, er á bilinu pH 6-7, en þar virðast mynda mest histamín á pH-bilinu 5-6, þar sem undirtegund I myndar mest við lægri mörk þessa bils en undirtegund II mest við pH 6 (Kimata 1961).

Fundið hefur verið að hámarkshistamínframleiðsla hjá Proteus morganii er við pH 5.1, lægsta pH, sem vöxtur átti sér stað við. Á bilinu pH 5.5-7.3 höfðu gerlarnir u.þ.b. 50% af hámarksvirkni, en þeir sem uxu á bilinu pH 7.6-8.7 höfðu um 10% virkni (Arnold & Brown, 1978). Það virðist því sem daufsúrar aðstæður séu hagstæðastar fyrir histamín-myndun.

Ýmsir aðrir þættir geta haft áhrif á histamín-myndun t.d. veldur viðbót af glúkósa og frúktósa í æti gerlanna hraðari histamínmyndun, trúlega sem orkugjafar, nauðsynlegir gerlunum til líf-efnamyndunar (Arnold & Brown, 1978).

Aminósýrurnar cystín, cystein og methionín, örva histamín-myndun í Proteus morganii og er það trúlega vegna þess að þessi efni lækka redox-spennu í umhverfi gerlanna. Natrium-thioglykolat og askorbínsýra, sem einnig eru spennulækkarar, örva einnig histamínmyndun (Arnold & Brown, 1978).

Saltstyrkur (NaCl) hefur einnig áhrif á histamínmyndun og vöxt Proteus morganii. Hagstæðast til vaxtar er um 1% NaCl en til histamínmyndunar milli 2 og 3%. Enginn munur er á undirtegundum I og II í þessu tilliti (Kimata, 1961). Sumir gerlar geta sundrað histamíni með ensíminu histamínasa (diaminoxidasa). Fremur litlar upplýsingar liggja þó fyrir um histamínsundrandi gerla. Histamínasavirkni hefur þó verið lýst í nokkrum gerlategundum innan: Pseudomonas, Proteus, Escherichia, Vibrio, Clostridium og Klebsiella (Arnold & Brown, 1978). Líklegt er talið, að histamínsundrandi gerlar geti haft mikil áhrif í matvælum sem innihalda mikið

histamín, jafnvel er haldið að við ákveðinn histamínstyrk komist á jafnvægi milli myndunar og sundrunar. Kjörsýrustig histamín-sundrunar er í kringum pH 7 (Ienstea, 1971).

Ekki er kunnugt um lög eða reglugerðir, sem kveða á um leyfileg hámark af histamíni í matvælum. Almennt er talið að:

Minna en 10 mg histamíns í 100 g fæðu valdi ekki neinum eitrunareinkennum.

5 - 10 mg histamíns í 100 g fæðu geti valdið óþægindum, háð inntöku og líkamlegu ásigkomulagi neytandans.

50 - 100 mg histamíns í 100 g og yfir, má ætla að valdi eitrun í öllum tilfellum (Skovgaard & Ellemann, 1978).

Yfirleitt er miðað við 100 mg % sem eitrunarmörk og margir líta á 10 mg %, sem það hámark sem leyfa megi í matvælum (Arnold & Brown, 1978). Sumir leggja til, að histamín skuli ekki vera yfir 5 mg % í fiski til vinnslu (Murray et al, 1980).

Nokkrar aðferðir hafa komið fram til að mæla histamín. Þar má nefna lífeðlisfræðilega mælingu (bioassay), þar sem mældur er samdráttur í marsvínsgörn, sem viðbrögð við histamíni. Þessi aðferð var fyrst notuð af Geiger árið 1944 (Arnold & Brown, 1978). Flúorljómunarmælingar eru þær, sem mest eru notaðar. Byggja þær flestar á s.k. Shore-aðferð, þar sem histamín er hvarfað við o-phtalaldehýð og myndast þá stöðugt flúorljómandi myndefni og er flúorljómun þess mæld (Shore, 1971; Lerke & Bell, 1976; Staruszkiewicz, 1977; Taylor et al, 1978).

Aðrar mæliaðferðir eru t.d. litarísogsmælingar (Colorimetriskar mælingar) (Anon, 1980a), mælingar á þunnlagsskilju (thin-layer chromatography) (Schutz et al, 1976), auk aðferða fyrir aminosýrugreini og gasskilju (gas chromatography).

Taylor og Lieber (1977) báru saman sérvirkni og næmni sjö histamínmæliaðferða og reyndist Shore-aðferðin vera sú næmasta.

## 2. MÆLIADFERÐ

Í þeim mælingum, sem við framkvæmdum, var aðferð Staruszkiewicz (1977) notuð, sem er sú aðferð sem AOAC mælir með. Aðferðin byggist á því að fiskur er hakkaður og histamínið síðan dregið út með metanóli. Síuð metanól-launsin er síðan hreinsuð á anjónaskiptasúlu. Ákveðið rúmmál af safnvökvanum (eluate) er svo hvarfað við o-phtaldialdehýð (OPT). Við hvarfið, sem er mjög sérvirkt fyrir histamín, myndast efnasamband með flúorljómun, sem er mælt á flúorljómunarmæli (Fluorescence Spectrophotometer).

Smávægilegar breytingar voru gerðar á AOAC-aðferðinni eins og getið verður síðar.

### 2.1. Tæki og efni

Flúorljómunarmælir (Fluorescence Spectrophotometer). Perkin-Elmer model 650-10 M með Perkin-Elmer Xenon-lampa, model 150.

Jónaskiptasúla. Dowex-2, 8 % krosstengt. 20-50 mesh (Sigma Chemical Company). Súludefninu var breytt í OH-form og súla hlaðin sem var 8 cm á hæð og 1 cm í þvermál. Súlan var skoðuð vel með vatni.

Fosfórsýra - 3.57 N. 121.8 ml af 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> var þynnt í 1 l með vatni. Launsin var stöðluð með 1.00 N NaOH.

o-phtaldialdehýð (OPT)- lausn-0.1%. 100 mg OPT voru leyst í 100 ml af metanóli (Merck).

Histamín-staðallausnir. (1) Geymslustaðall I: 1 mg / ml. Nákvæmlega voru vigtuð 169.1 mg af histamín 2HCl (Merck) í 100 ml mæliflösku, leyst og fyllt að marki með 0.1 N HCl.

(2) Geymslustaðall II-10 µg/ml. 1.0 ml var pípettaður af geymslustaðli I í 100 ml mæliflösku og fyllt að marki með 0.1N HCl.

(3) Vinnustaðlar - 0.5, 1.0 og 1.5 µg/5ml. Pípetteraðir voru 1.0, 2.0 og 3.0 ml af geymslustaðli II í 100 ml mæliflösku og fyllt að marki með 0.1N HCl.

### 2.2. Vinnulýsing

2.2.1. Undirbúningur sýna. Vigtuð voru 10 g af fiskhakki í bikarglas og 50 ml af hreinu metanóli bätt í. Þetta var síðan hrært með segulhræru í u.þ.b. 15 mín. Fyrir hvert sýni var einnig útbúið staðalbätt sýni ("spiked"sýni), með því að pípettera 1 ml af hist-

amíngeymslustaðli I út í fisk-metanól-lausrnina í upphafi. Þessi viðbót samsvarar 100mg histamíns í 100 g af fiski í lokamælingunni. Blandan var færð yfir í 100 ml mæliflösku með metanólskoli. Mæliflöskurnar voru því næst settar í 60°C hitabað í 1 tíma, kældar í 20°C og fylltar að marki. Að lokum var svo síað gegnum Whatman nr. 1 pappír. Metanól-filtratið geymist í nokkrar vikur í kælikáp.

2.2.2. Hreinsun sýna. Í 50 ml mæliflöskur, voru pípettaðir 5.0 ml af 1.0 N HCl. Í þessa mæliflösku var safnvökvin látinn drjúpa. 1.0 ml sýnis var settur á jónaskiptasúluna, síðan 4-5 ml af eim-uðu vatni og rennsli hafið samstundis. Þegar vökvaborðið var um 2 mm fyrir ofan súluefnið var öðrum 4-5 ml vatnsskammti bætt á. Þessu var haldið áfram þar til 40-45 ml hafði verið safnað, þá var rennsli stöðvað og mæliflaska fyllt að marki.

2.2.3. Mæling histamíns. 5.0 ml sýnis og 10.0 ml af 0.1 N HCl voru pípetteraðir í 50 ml kolbu og þetta hrist vel. Því næst voru 3.0 ml af 0.1 N NaOH pípetteraðir út í og hrist vel. Innan 5 mín. var 1.0 ml af OPT-lausrninni settur út í og hrist vel samstundis. Eftir nákvæmlega 4 mín var svo 3.0 ml af 3.57 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bætt í og hrist vel samstundis. Nauðsynlegt er að hrista vel eftir hverja viðbót og a.m.k. einu sinni meðan OPT-hvarfið á sér stað. Flúorljómun var síðan mæld (innan 1 1/2 klst.) við örvarbylgjulengd (excitation wavelength) 350 nm og útgeislunarbylgjulengd (emission wavelength) 444 nm

Í tómasýni voru 5.0 ml af 0.1 N HCl notaðir í stað sýnis. Tækið var stillt með eimðu vatni.

Ef í sýninu er meira en 15 mg histamíns í 100g fisks er 1.0 ml af sýnis/OPT-lausrninni settur í 10 ml bikar og síðan 2.0 ml af tómasýnis/OPT-lausrninni bætt í, hrist vel saman og flúorljómun mæld sem fyrr.

2.2.4. Staðlamælingar. Staðallína var vel línuleg fyrir þá vinnustaðla, sem mældir voru (0.5, 1.0 og 1.5 µg histamín/5 ml), en gekk þó yfirleitt ekki nákvæmlega í gegnum núllpunkt línuritsins (flúorljómun gegn histamínstyrk).

Staðallína var fundin fyrir hverja histamín-mælingu og reiknuð "jafna bestu línu" og staðallínan teiknuð samkvæmt henni. Gott samræmi var á milli einstakra mælinga.

Kannaðar voru heimtur staðla af jónaskiptasúlu og reyndust þær vera um 100% ef 40-45 ml var safnað af súlunni.

Til að kanna heimtur í sýnum voru útbúin staðalbætt sýni (sbr. 2.2.1.). Heimtur reyndust nokkuð mismunandi milli sýna, þ.a. ákveðið var að nota staðalbætt sýni fyrir allar mælingar auk sýna. Heimtur í staðalbættu sýnunum voru að meðaltali um 85%.

2.2.5. Útreikningar. Staðallína var teiknuð upp sem flúorljómun gegn histamín-styrk vinnustaðlanna í  $\mu\text{g}$  histamín/5 ml. Þetta á að vera bein lína með hallatölu:

$$m = [(I_a/1.5) + I_b + 2I_c] / 3$$

Styrkur er síðan reiknaður:

$$\text{mg histamín}/100\text{g} = 10 \cdot F \cdot 1/m \cdot I_s$$

þar sem :

$I_s$  = Aflestur á flúorljómun sýnis

$I_a$  = Aflestur á flúorljómun 1.5  $\mu\text{g}$  vinnustaðals

$I_b$  = Aflestur á flúorljómun 1.0  $\mu\text{g}$  vinnustaðals

$I_c$  = Aflestur á flúorljómun 0.5  $\mu\text{g}$  vinnustaðals

F = Þynningarþáttur og er 1 fyrir óþynnt sýni

Ef staðallínan er ekki fullkomlega línuleg, þá er styrkur óþekktu lausnarinnar fundinn beint af henni. Ef W táknar  $\mu\text{g}$  histamíns í 5 ml sýnis þá er styrkurinn reiknaður:

$$\text{mg histamín}/100\text{g} = 10 \cdot F \cdot W$$

Þar sem heimtur voru ekki fullkomnar í þeim mælingum sem hér verður rætt um, var tekið tillit til þeirra í útreikningum:

$$\text{mg histamín}/100\text{g} = 10 \cdot F \cdot W/H$$

þar sem H eru heimtur, reiknaðar samkvæmt:

$$H = \frac{W_{stb} - W_s}{W_{st}}$$

þar sem:

- $W_{stb}$  = fundinn styrkur staðalbattu  
sýnanna í  $\mu\text{g}$  histamín/ 5 ml
- $W_s$  = fundinn styrkur sýna í  $\mu\text{g}$   
histamín/5 ml
- $W_{st}$  = styrkur viðbætta staðalsins  
í  $\mu\text{g}$  histamín/100g. Í okkar  
mælingum er hann  $1.0\mu\text{g}/5\text{ ml}$

2.2.6. Breytingar frá AOAC-aðferð. a) Í AOAC-aðferðinni er notað súluefnið AG 1-x8 (Bio-Rad) eða Dowex 1-x8, en þar eru sterkari anjónaskiftar en Dowex-2.

b) Hræritími í útdrætti var lengdur úr 2 mín í 15 mín. og notuð var segulhræra en ekki háhraða blandari (high-speed blender) eins og aðferð gerir ráð fyrir.

c) Hitunartími var lengdur úr 15 mín. í 1 tíma, þó að ekki sé víst að það hafi verið nauðsynlegt.

d) Safnað var 40-45 ml af jónaskiptasúlu í stað 35 ml.

e) AOAC-aðferðin gerir ekki ráð fyrir staðalbættum sýnum eins og við notuðum.

Að öðru leyti var AOAC-aðferð fylgt í smáatriðum (Anon, 1980 a)

### 3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR

Athugað var, hvort histamín fyndist í fiskafurðum sem ætla má að innihaldi histamín öðrum afurðum fremur. Einnig var athugaður þorskur, bæði ferskur og skemmdur. Mælt var í:

1. Saltaðri heilsíld á mismunandi verkunarstigum.
2. Mismunandi ferskri loðnu og kannað samband histamíns og TMA.
3. Fiskmjöli.
4. Nokkrum lagmetistegundum og könnuð áhrif mismunandi geymsluskilyrða á niðursoðinn túnfisk eftir að dós hefur verið opnuð.
5. Ferskfiski.

#### 3.1. Histamín í saltaðri heilsíld í verkun

Ekki er vitað til að síld hafi valdið skombroíð-eitrun, þó mælst hafi fremur mikið histamín í síld og að síld innihaldi tiltölulega mikið af óbundnu histidíni. Hughes, (1959) kannaði

breytingar á magni aminosýra í síld og fann að histidíninnihaldið var mjög breytilegt eftir árstíma, eða allt frá 26.5 mg/100g síldar í lok október, upp í 160.2 mg/100g í lok maí. Meðaltal var u.þ.b. 85 mg/100g síld.

Við geymslu fisks minnkaði histidín verulega, en histamín fór að myndast og náði hæst 30-40 mg/100g síldar eftir 3-4 daga geymslu við 10-13°C.

Í síld má því búast við nokkurri histamínmyndun og var athugað hvernig histamínið breyttist með verkunartíma. Sýni af saltaðri heilsíld voru tekin öðru hvoru og alltaf úr sömu tunnunni til histamínmælinga. Fyrir lágu mælingar á histidíni með aminosýrugreini í nokkrum þessara sömu sýna. Niðurstöður mælinga eru sýndar í töflu I.

Tafla 1. Breytingar á histamín- og histidín-innihaldi við verkun saltaðrar heilsíldar.

Verkunar (Geymslu)- tími (dagar)	mg Histamín/100g	mg Histidín/100g
0	0.21	93.8
11	3.33	64.2
25	3.41	57.5
39	5.48	47.2
53	5.51	62.0
68	4.80	-
89	4.10	-
110	3.56	-
146	3.79	-

Greinilegt er að histamín-innihald vex fyrstu 50-60 dagana, en virðist síðan minnka. Síldarsýnin voru næstum gerlalaus svo að líkur eru á að histamínmyndun sé fyrst og fremst vegna sjálfsmeltu í fiskholdinu.

Athyglisvert er að Hughes (1959) fékk mjög svipaðan feril fyrir histamínmyndun í ósaltaðri síld, þó þar væru histamín-gildi hærri og aðstæður aðrar. Erfitt er að geta sér til um hvað veldur lækuninni, vera má að histamín skolist að einhverju leyti út í þækilinn og ekki er heldur útilokað að til staðar séu ensím í

fiskholdinu, sem sundrað geti histamíni, þó í raun sé ekkert hægt að segja um það á þessu stigi.

Histidín-styrkur fellur stöðugt fyrstu vikur verkunar, en þá hækka niðurstöður, hvort sem það er marktækt eða ekki, en fleiri mælingar voru ekki gerðar.

Ekki umbreytist histidín magnbundið í histamín, heldur eru greinilega önnur sundrunarferli inni í myndinni, auk þess sem skolun út í þakilinn á trúlega einnig nokkurn þátt í lækuninni, alla vega í upphafi verkunar.

Síldin var fullverkuð eftir u.þ.b. 2 1/2 mánuð. Þá hefur histamíninnihald síldarinnar verið u.þ.b. 4-5 mg/100g.

### 3.2. Histamín í mismunandi ferskri loðnu

Histamín var mælt í loðnusýnum, sem geymd höfðu verið mismunandi lengi í kælikáp. TMA (trimethylamín) var einnig mælt í loðnunni á sama hátt og tíðkast á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins ( Anon 1980 b )

Niðurstöður mælinga eru sýndar í töflu II.

Tafla II. Histamín og TMA-mælingar í mismunandi ferskri loðnu.

Sýni	Geymslutími (dagar) (við 4°C)	TMA-mgN/100g	mg Histamín/100g
I	~ 10	70.1	6.67
II	6 - 7	63.2	4.21
III	6 - 7	64.7	4.42
IV	< 3	65.9	4.77
V	< 3	1.0	0.05
VI	< 3	10.8	0.00
VII	< 3	5.0	0.00

Reiknaður var fylgnistuðull (Correlation coefficient) milli TMA og histamíns og reyndist hann vera 0.97 (við 99.9% öryggismörk).

Samkvæmt þessum niðurstöðum virðist TMA-gildi geta verið nokkuð góð vísbending um histamín í loðnu, alla vega þegar hún er farin að skemmast.

### 3.3. Fiskmjöl

Tilgátur hafa verið uppi um það hvort histamín í fiskmjöli, sem notað er í fóður alifugla, geti dregið úr vexti þeirra og hugsanlega valdið svonefndri "sarpsertingu" (gizzard erosion) í þeim.

Sýnt hefur verið fram á, að fóður, sem innihélt 60% af skemmdum túnfiski, þar sem histamín var um 120 mg/100g, dró verulega úr vexti nýfæddra japanskra kornhæna (Japanese quail). Svipaðar niðurstöður fengust ef 3.6 grömmum af histamíni var bætt í hvert kg (360 mg/100g fóður) af venjulegu kjúklingafóðri (Blonz & Olcott, 1978). Ekki er vitað á hvern hátt histamínið dregur úr vexti.

Þar sem fiskmjöl er notað í dýrafóður, m.a. alifuglafóður hér á landi, er nauðsynlegt að hafa hugmyndir um histamín-innihald þess. Histamín var mælt í nokkrum fiskmjölssýnum. Sýni voru tekin af loðnumjöli, þorskmjöli og karfamjöli. Tafla III sýnir niðurstöður mælinga. Loðnumjölssýnin voru bæði metin sem nokkuð gott mjöl, en þó var sýni B öllu lyktsterkara.

Tafla III. Histamín-innihald nokkurra fiskmjölssýna

Sýni	mg histamín/100g
Loðnumjöl A	1.32
Loðnumjöl B	2.89
Þorskmjöl	2.67
Karfamjöl	8.40

Samkvæmt þessum mælingum er ekki mikið histamín í mjölsýnunum. Full ástæða er þó til að vera á verði gagnvart bræðsluhráefni, sem farið er að skemmast. Ætla má að karfamjölið hafi verið unnið úr skemmdu hráefni.

3.4. Histamín í nokkrum lagmetistegundum. Áhrif geymsluskilyrða á histamínmyndun í niðursoðnum túnfiski eftir opnun dósa.

Mælt var í nokkrum algengum lagmetistegundum; íslenskum gaffalbitum, portúgölskum makrílflökum, þýskum túnfiski í olíu-sósu og sardínunum í tómatsósu frá Noregi. Tafla IV sýnir niðurstöður mælinga.

TAFLA IV. Histamín-innihald nokkurra lagmetistegunda.

Sýni	mg histamín/100g
Gaffalbitar	0.48
Makrílflök	0.11
Túnfiskur	0.40
Sardínur	0.32

Eins og fram hefur komið er mest hættu á miklu histamíni í makríl og túnfiski og fer histamín-innihaldið mest eftir meðhöndlun hráefnisins, Sýnin, sem mælt var í, hafa því verið unnin úr fersku hráefni. Fróðlegt þótti að athuga áhrif geymsluskilyrða á histamínmyndun eftir að dós hafði verið opnuð, með hliðsjón af því, að fólk geymir oft afganga til síðari nota. Túnfiskur var valinn til þessarar athugunar og var hann geymdur annars vegar í kælikáp og hins vegar við stofuhita. Tafla V sýnir niðurstöður geymsluathugunar.

TAFLA V. Áhrif geymsluskilyrða á histamínmyndun (mg/100g) í opnaðri dós af niðursoðnum túnfiski

Geymslutími (dagar)	Í kælikáp	Við stofuhita
0	0.40*	0.40
1	0.51	0.52
2	0.32	-
3	0.42	-
4	0.54	0.45
7	0.79	2.28

\*Mælt var í heildarinnihaldi dósar, þar sem fiskur var um 81% af vigt.

Histamínmyndun var svipuð í kæli og við stofuhita fyrstu fjóra dagana, en síðan myndaðist histamín mun hraðar í sýnum við stofuhita. Gera má ráð fyrir, að niðursuðan eyði histamínmyndandi gerlum og ensímum í fiskinum. Histamínmyndun er því hæg til að byrja með. Eftir að dósir eru opnaðar, komast gerlar úr umhverfinu í sýnin og gætu sumir haft histidín dekarboxýlasavirkni. Þessir gerlar eru að fjölga sér í nokkra daga og þá hraðar við stofuhita en í kælikáp. Eftir 4-7 daga kemur þessi mismunur í fjölda (eða mismunandi samsetning gerlaflórunnar) fram sem mun meiri histamínmyndun við stofuhita.

Samkvæmt þessum niðurstöðum virðist ekki stafa mikil hættu af histamíni í niðursoðnum túnfiski, sem geymdur er eftir að dós er opnuð, ef hráefni hefur fengið góða meðferð fyrir niðursuðu, því fiskur var orðinn greinilega skemmdur, þegar histamín fór að aukast í einhverjum mæli. Þó má ætla að eðli gerlaflórunnar, sem nær sér á strik eftir opnun dósar, ráði miklu.

### 3.5. Ferskfiskur

Mælt var histamín í mismunandi ferskum þorskflökum (TMA-gildi frá 0.5-35.2 mg N/100g). Reyndist ekkert histamín að finna í þessum sýnum. Sama er að segja um karfa og ýsuflök (TMA < 10 mg N/100g), sem mælt var í.

Þessar niðurstöður eru í samræmi við það, að histamín finnst í mjög litlum mæli í fiskum með ljósa vöðva (þó að karfi falli strangt ekki undir þá skilgreiningu). Histamín fer yfirleitt ekki að myndast fyrr en fiskur er orðinn það skemmdur, að hann telst óneysluhæfur. Þorskur inniheldur t.d. lítið eða ekkert óbundið histidín, þ.a. forveri histamíns í þorski er trúlega histidín, sem losnað hefur úr vöðvapróteinum við sundrun gerla (Kimata, 1961).

4. HEIMILDIR

- Anon, 1980a Off. Methods of Analysis of the AOAC ( ed. Horowitz, W.)  
13th edition Washington D.C. bls. 294-296
- Anon, 1980b Off. Methods of Analysis of the AOAC ( ed. Horowitz, W.)  
13th edition Washington D.C. bls 289
- Arnold, S.H. og Brown, W.D. 1978. Histamine (?) toxicity from  
fish products. Adv. Food Res. 24: 114-154.
- Baxter, A.J.; Murray, C.K. og Hobbs, G. Some bacteriological  
aspects of Scombrotoxin and the spoilage of mackerel  
(*Scomber scombrus*). Óbirt skýrsla flutt á 10. ársfundi  
WEFTA (West European Fish Technologists' Association),  
15.- 18. sept. 1980 í Gautaborg.
- Blonz, E.R. og Olcott, H.S. (1978). Effect of histamine, put-  
rescine and of canned spoiled tuna on growth in young  
Japanese quail. J. Food Sci. 43, 1390-1391.
- Edmunds, W.J. og Eitenmiller, R.R., 1975. Effect of storage time  
and temperature on histamine content and histidine decarboxy-  
lase activity of aquatic species. J. Food Sci. 40, 516-519.
- Ferencik, M., 1970. Formation of histamine during bacterial  
decarboxylation in the flesh of some marine fishes. J.  
Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 14. 52-60.
- Hardy, R. og Smith, J.G.M., 1976. The storage of mackerel  
(*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity  
J. Sci. Food Agric. 27, 595-599.
- Hughes, R.B., 1959. Chemical studies on herring (*Clupea harengus*).  
II The free amino acids of herring flesh and the behaviour  
during post-mortem spoilage. J. Sci. Food Agric. 10, 558-564.
- Ienistea, C. 1971. Bacterial production and destruction of hist-  
amine in foods, and food poisoning caused by histamine  
Nahrung 15, 109-113.
- Kimata, M. 1961. The histamine problem. Fish as Food (G. Borgstrom,  
ed.), Vol. I, bls. 329-352. Academic Press, New York.

V.) Lerke, P.A. og Bell, L.D., 1976. A rapid fluorometric method for the determination of histamine in canned tuna. J. Food Sci. 41, 1282-1284.

W.) Mietz, J.L. 1977. Chemical quality index of canned tuna as determined by high pressure liquid chromatography. J. Food Sci. 42, 155-158.

Murray, C.K.; Baxter, A. og Hobbs, G.<sup>1980</sup> Scombrotoxic and associated fish poisoning incidents in the United Kingdom (1976-1980). Óbirt skýrsla flutt á 10. ársfundi WEFTA (West European Fish Technologists' Association), 15.-18. sept. 1980, í Gautaborg.

Omura, Y.; Price, R.J. og Olcott, H.S., 1978. Histamine-forming bacteria from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. J. Food Sci. 43, 1779-1781.

oxy- Salguero, J.F. og Mackie, I., 1979. Histidine metabolism in mackerel (*Scomber scombrus*). Studies on histidine decarboxylase activity and histamine formation during storage of flesh and liver under sterile and nonsterile conditions. J. Fd. Technol. 14, 131-139.

Schutz, D.E.; Chang, G.W. og Bjeldanes, L.F., 1976. Rapid thin-layer chromatographic method for detection of histamine in fish products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59, 1224-1225.

ty Shore, P.A., 1971. The chemical determination of histamine. Methods Biochem. Anal. Supp. Vol., bls 89-97.

s). Simidu, W., 1961. Non-protein nitrogenous compounds. I "Fish as Food" (G. Borgstrom, ed) Vol. I, bls. 353-384. Academic Press. New York.

t- Skovgaard, N. og Ellemann, G., 1978. Levnedsmiddelbåren histaminforgiftning. Ugeskr. Læg. 140, 313-316.

rom, Staruszkiewicz, W.F., Jr., Waldron, E.M., og Bond, J.F., 1977. Fluorometric determination of histamine in tuna: Development of method. J. Ass. Off. Anal. Chem. 60, 1125-1130.

Staruszkiewicz, W.F., Jr., 1977. Fluorometric determination of histamine in tuna: Collaborative study. J. Ass. Off. Anal. Chem. 60, 1131-1136.

Taylor, S.L. og Lieber, E.R., 1977. Specificity and sensitivity of seven histamine detection methods. J. Food Sci. 42,1584-1586.

Taylor, S.L., Lieber, E.R. og Leatherwood, M., 1978. A simplified method for histamine analysis of foods. J. Food Sci. 43,247-250.

Wurziger, J. og Dickhaut, G., 1978. Estimation of histamine in fish and fish products in the light of food regulations. Fleischwirtschaft, 58, (6), 963-964; 989-994.

