

19. marts 2012  
Proj. nr.: 2000208-12

KIJ/LHAN

## **Kemisk beredskab**

**under**

**Beredskab af mikrobiologiske og kemiske metoder og laboratoriedrift**

**Årsrapport 2011**



Kirsten Jensen  
Hovedansvarlig for området

## Baggrund

For at gennemføre projektopgaver er det nødvendigt at kunne dokumentere kemisk sammensætning samt indhold af en række forskellige hjælpestoffer. Markedet for udvikling af nye metoder, laboratorieudstyr, materialer m.m. overvåges, og særligt interessante emner afprøves. Herved vedligeholder instituttets kemiske laboratorium kompetencen vedrørende moderne og effektiv laboratoriedrift, der kan imødekomme krav om hurtige og troværdige analysemetoder.

Laboratoriet råder over en række akkrediterede referencemetoder og desuden over en række specialanalyser, der anvendes i mindre omfang. I bilag 1 findes en oversigt over de analysemetoder, der er til rådighed. Principper, specialudstyr og særlige forhold for de enkelte analysemetoder er her kort beskrevet. Oversigten opdateres en gang årligt med ændringer til eksisterende metoder samt tilføjelse af nye kemiske metoder. Ændringer i bilag 1, i forhold til udgaven fra 2010, er anført med **mærket skrift**.

### Opdatering af eksisterende metoder

#### *Saltbestemmelse - Ny hurtigmetode*

Med henblik på at reducere analysetiden, og dermed omkostningsniveauet, er der indkøbt en hurtigmetode til saltbestemmelse (NaCl). Metoden, der er baseret på NMKL metode Nr. 178, blev akkrediteret af DANAK i juni 2011.

I forbindelse med indkøb af automatisk titreringsudstyr blev markedet afsøgt for en model, der gav mulighed for automatisk dataoverførsel til SQL\*LIMS, ver.5.1. Valget faldt på et system fra Mettler (Excellence Titrator T50, Rondo 20 prøveskifter, Lab X titration software). Det viste sig efterfølgende, at DMRI's LIMS system ikke kunne kommunikere med Mettlers software, og det var nødvendigt at udarbejde hjælpeprogrammer for at få et funktionsdygtigt system inden for disse rammer.

#### *Nitrit- og nitrat - egenfarve fra produkter*

Krydderier og andre tilsætningsstoffer kan på grund af egenfarve give anledning til fejlbehæftede resultater ved spektrofotometrisk måling af nitrit- og nitratindholdet i kødprodukter. Der er indført et trin i analysemetoden, der korrigerer for denne fejl.

Korrektionen udføres ved, at de farvede prøver først måles efter almindelig procedure. Efterfølgende gennemføres en måling, hvor det ene af farveregensnerne erstattes med vand. Differencen mellem de to målinger udgør bidraget fra indholdet af nitrit og/eller nitrat.

#### *Overfladefarvemåling - Sammenligning af DMRI's model og VideometerLabs farvemodul med Minolta målinger*

DMRI har gennem en årrække anvendt eget program til beregning af L, a og b værdier for målinger af overfladefarve med VideometerLab. VideometerLab har efterfølgende udviklet et program til beregning af farvekoordinaterne  $L^*a^*b$ . Der har været en forventning om at finde en lineær sammenhæng mellem såvel disse to skalaer indbyrdes og resultater fra måling med Minolta

udstyr, der betragtes som referencen. Ved et Videometer brugermøde i efteråret 2009 blev det erkendt, at dette ikke var tilfældet.

For at få klarlagt problemets omfang blev overfladefarvemålinger på kød- og kødprodukter sammenlignet mellem VideometerLabs farvemodul, DMRI's model og Minolta udstyr. Resultaterne fra VideometerLabs farvemodul viste, at skalaerne for  $a^*$  og  $b^*$ , henholdsvis  $a$  og  $b$ , ikke kunne bruges i deres nuværende form til kødprøver. DMRI's model var heller ikke optimal, hvilket kunne forklares med, at de anvendte beregningsformler er produktspecifikke. Derfor blev det anbefalet at anvende Minolta målinger, hvis resultater af  $a$  og  $b$  værdier skal kunne sammenlignes med referenceværdier. Resultaterne er beskrevet i [1].

VideometerLab har efterfølgende udviklet en ny software med en direkte fotometrisk farvemåling, udregnet på basis af CIEs følsomhedskurver. Egnetheden af dette program til kød- og kødprodukter vil blive afprøvet på DMRI.

*Stigesmeltepunkt -  
Afprøvning af smelte-  
punktsapparat (Buchi B-  
540)*

Der har været efterspørgsel på bestemmelse af stigesmeltepunkt i svinefedt. Stigesmeltepunktet, der er et kvalitetsmål for fedtets hårdhed, er den temperatur, ved hvilken en fedtsøjle indsmeltet i et åbent kapillarrør begynder at stige i røret.

Den eksisterende metode, der blev anvendt tilbage i 70'erne (SF metode, blad nr. 32), er forholdsvis tidskrævende. Det var derfor oplagt at finde en mere tidssvarende metode, og smeltepunktsapparatet Buchi B-540 blev afprøvet. Resultaterne herfra viste, at dette udstyr ikke var velegnet til bestemmelse af fedts stigesmeltepunkt. Varmepåvirkningen var ikke kraftig nok til at smelte fedtsøjleens ydre lag, før hele prøven i røret var smeltet, og der kunne derfor ikke registreres en stigning i røret.

*Kvantificering fedtsyrer  
FAME*

I forbindelse med indførelse af fedtafgift pr. 1. juli 2011 var det forventet, at der ville være et behov for kvantificering af fedtsyrerindholdet i kød- og kødprodukter. Arbejdet med implementering af analysemetode blev derfor påbegyndt. De indledende forsøg viste, at valg af intern standard var problematisk, og at det ville kræve en række afprøvninger og efterfølgende dokumentation, før metoden kunne tages i anvendelse.

Der var ikke tilstrækkeligt med ressourcer i projektet til videreførelse af arbejdet i 2011. En kvantitativ metode til fedtsyrebestemmelse har dog forsat en høj prioritet i rækken af kommende udviklingsopgaver.

*Ornelugt -  
opdatering af analyse-  
metode*

DMRI's analyseforskrift til bestemmelse af ornelugt er en HPLC metode til samtidig bestemmelse af androstenon, skatol og indol (ASI) i rygspæk. Metoden er blevet opdateret, og der er indført forbedringer af kvalitetssikrin-

gen. De indførte ændringer er bl.a. baseret på anbefalinger beskrevet i [2].

Der har vist sig behov for yderligere optimering af analysemetoden til bestemmelse af ASI i rygspæk. Samtidig hermed er der påbegyndt metodeudvikling under F&U projektet "Anvendelse af lugtende hangrisekød" til bestemmelse af ornelugt i fersk kød.

#### *Aroma*

I forbindelse med et diplomafgangsprojekt for ingeniørstuderende vedrørende kvalitet og holdbarhed af fermenterede pølser konserveret med planteekstrakter og almindelige tilsætningsstoffer er GC-MS udstyr og metodeopsætning klargjort til bestemmelse af oxidationsprodukter dannet under et lagringsforsøg.

#### *Faglige arrangementer*

Der er deltaget i to netværksmøder for analytisk kemi (Eurolab Danmark), hvor fedtafgiften var på dagsorden, herunder analysemetoder til kvantificering af FAME.

Der er deltaget i seminar arrangeret af VWR vedrørende nyheder inden for kemiske analysemetoder.

#### **Implementering af nye analysemetoder med bidrag fra nærværende projekt**

#### *Bioaktive komponenter - assays til screening*

Der er bidraget med færdiggørelse af metoder til bestemmelse af aktiviteten af bioaktive komponenter i proteinhydrolysater. Dels et assay til screening af den inhiberende effekt mod et angiotensin-I konverterende enzym (ACE), der har en funktion ved regulering af blodtrykket. Desuden to metoder til screening af antioxidativ effekt. Den ene, ved hjælp af en oxygen microsensor (Clark elektrode), der måler iltforbruget ved en oxidationsproces. Den anden er et DPPH assay, hvormed omdannelsen af det stabile frie radikal DPPH til en farveløs forbindelse bestemmes som et udtryk for teststoffets antioxidative aktivitet .

#### *Referencer*

- [1] VideometerLab - farvekoordinater. Indbyrdes sammenligning mellem VideometerLab og Minolta 300/400 målere. DMRI L a b Henholdsvis Videometer L\*a\*b, beregninger og Minolta L\*a\*b værdier. DMRI rapport, Januar 2011 Kvalitetssikring af hangrisekød - Optimering af analysemetoder.
- [2] Optimering af ASI metode. Annette Schäfer og Chris Claudi-Magnussen. DMRI rapport, juni 2010.

**Oversigt over kemiske analysemetoder på DMRI marts 2012  
incl. beskrivelse af principper og specialudstyr**

- seneste opdateringer fremhævet med

## Akkrediterede analysemetoder på DMRI

### **Fedtbestemmelse**

*Princip: Kødet hydrolyseres med saltsyre for at frigøre fedt, der er bundet til protein, kulhydrat og calcium. Prøven tørres og ekstraheres med diethylether. Det materiale, der ekstraheres med diethylether, defineres som prøvens fedtindhold.*

Analysemetoden blev dokumenteret og akkrediteret i 1998. Metoden valideres løbende ved deltagelse i ringtest (FAPAS).

Siden først i 1980'erne har instituttets fedtanalyser været udført på Tecator Soxtec HT<sup>+</sup>, dvs. en modificeret SBR-bestemmelse. Der har gennem flere år været arbejdet på at finde en alternativ analysemetode.

### **Superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraktion**

Superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraktionsudstyr, LECO<sup>R</sup> FA 100, blev afprøvet i 1997. Det var svært at opnå resultater på samme niveau som med Soxtec-analyserne, og repeterbarheden var tillige dårlig. Metoden blev fravalgt.

### **NMR-udstyr**

Nuklear Magnetisk Resonans-udstyr (NMR) MARAN-23 fra Resonance Instruments Ltd. blev afprøvet i 2001 og senere i 2002. Analyseusikkerheden var utilfredsstillende som følge af såvel dårlig reproducerbarhed som repeterbarhed. Da der er tale om en indirekte metode, var der samtidig et tilbagevendende problem med kalibrering af udstyret. Metoden blev fravalgt.

### **Accelereret solvent ekstraktion**

Accelereret solvent ekstraktion (ASE) blev afprøvet i 2001. Metoden blev fundet uegnet til kulhydratholdige prøver. Der var samtidig en uacceptabel lang analysetid. Metoden blev fravalgt.

### **FOSS Soxcap/Avanti**

FOSS Soxcap hydrolyseenhed med Soxtec 2050 Avanti ekstraktionsenhed blev afprøvet i 2004. Hydrolysetrinnet var meget omstændeligt og ikke nogen forbedring i forhold til det mere end 20 år gamle Soxtec udstyr. Metoden blev fravalgt.

### **pH-måling i kød og kødprodukter**

*Princip: pH måles med kombinationselektrode og pH-meter i opslæmninger af hakket eller blendet kød i fysiologisk saltvand.*

Analysemetoden blev dokumenteret og akkrediteret i 1998.

Analyseforskriften blev revideret i 2009, hvor der bl.a. er indført en ekstra kontrolparameter som erstatning for linearitetstesten.

<i>Temperaturafhængighed</i>	Der er foretaget undersøgelse af temperaturafhængighed i 2005. Konklusionen blev, at pH-målinger skal gennemføres ved $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ for at kunne overholde den dokumenterede analyseusikkerhed.
<i>Frostlagring</i>	I 2005 blev indflydelsen af frostlagring undersøgt. Konklusionen blev, at vakuumpakkede <b>hele</b> prøver af kød og kødprodukter kan opbevares ved $-20^{\circ}\text{C}$ og $-80^{\circ}\text{C}$ i minimum 1 måned. For fermenterede kødprodukter gælder, at opbevaringen skal foregå ved $-80^{\circ}\text{C}$ .
<i>pH, indstikselektrode (ikke akkrediteret)</i>	Der er indført nye certificerede kontrolbuffer, samt procedurer for godkendelse af analyseresultater fra pH-målinger, med de indstikselektroder der anvendes af forsøgsteknikkerne på slagterierne.
<b>Pigment</b>	<p><i>Princip: Kødets pigmentindhold udtrækkes af hakket kød med acetone-saltsyreblending. Indholdet bestemmes spektrofotometrisk ved 640 nm, udtrykt i ppm hemin.</i></p> <p>Analysemetoden blev dokumenteret og akkrediteret i 1999.</p> <p>Akkrediteringen blev af praktiske grunde midlertidigt indstillet i juni 2010, da efterspørgsel på metoden var meget begrænset.</p>
<i>Nyt spektrofotometer</i>	Der er indkøbt nyt spektrofotometer (Lambda 25, UV/VIS, Perkin Elmer) i 2007. Indkøring af metoden til bestemmelse af hemin er påbegyndt. Er stillet i bero på grund af begrænset prøveantal.
<b>Proteinbestemmelse</b>	<p><i>Princip: Prøven foraskes med koncentreret svovlsyre og en katalysator-blending. Kvælstof omdannes til ammoniumioner. Ammoniak frigøres ved tilsætning af natriumhydroxyd, og det destilleres over i et forlag indeholdende borsyre med indikator. Der titreres til ligevægt med en 0,1 N saltsyre.</i></p> <p>Analysemetoden blev dokumenteret og akkrediteret i 1996. Metoden valideres løbende ved deltagelse i ringtest (FAPAS). Ud over indkøring af nedenstående udstyr er der ikke foretaget væsentlige ændringer eller afprøvninger siden metoden blev dokumenteret.</p> <p>Udstyr: Tecator-destruktionsblok (Tecator 2020, FOSS)  Udsugningssystem 2001, scrubber unit (FOSS)  Destillations- og autosamplerenhed, Kjeltex 1035 (FOSS)</p> <p>Ved indkøring af destillations- og autosamplerenheden var der igennem flere år tilbagevendende problemer. FOSS foretog en gennemgribende fejlfinding i 2002. Flere vitale dele blev udskiftet, hvorefter udstyret har kørt tilfredsstillende.</p>

*Afprøvning af nyt udstyr (SPRINT)*

En hurtigmetode til proteinbestemmelse (SPRINT, VWR), i bl.a. kød- og kødprodukter er blevet afprøvet. Udstyret markedsføres som meget automatiseret, renligt, miljøvenligt og enkelt at betjene. Resultaterne fra afprøvningen viste imidlertid en væsentlig dårligere præcision, end Kjeldahl metoden kan præstere. Omregnet til analyseusikkerhed for en dobbeltbestemmelse, betyder det en forøgelse fra  $\pm 0,53$  til  $\pm 1,2$  % protein (absolut værdi). Metodens fortrin kunne således ikke opveje de krav DMRI stiller til analyseusikkerhed på proteinanalyser.

**Saltbestemmelse**

*Princip: Natriumklorid ekstraheres med varmt vand. Efter tilsætning af salpetersyre fældes klorid ved titrering med sølvnitrat. Ved titreringen måles endepunktet potentiometrisk.*

Analysemetoden blev dokumenteret og akkrediteret i 1996. Metoden valideres løbende ved deltagelse i ringtest (FAPAS).

Det er dokumenteret, at holdbarheden af de filtrerede ekstrakter der anvendes til bestemmelse af saltindholdet i prøven, kan opbevares på køl i op til 13 dage.

Hurtigmetode til saltbestemmelse (NaCl), mod.e. NMKL Nr. 178 er indkørt. Metoden blev akkrediteret i juni 2011.

I forbindelse med indkøb af automatisk titreringsudstyr blev markedet afsøgt for en model, der gav mulighed for automatisk dataoverførsel til SQL\*LIMS, ver.5.1. Valget faldt på et system fra Mettler (Excellence Titrator T50, Rondo 20 prøveskifter, Lab X titration software). Det viste sig efterfølgende, at DMRI's LIMS system ikke kunne kommunikere med Mettlers software, og det var nødvendigt at udarbejde hjælpeprogrammer for at få et funktionsdygtigt system inden for disse rammer.

**Kollagen**

*Princip: Hydroxyprolin er kvantitativt et mål for indholdet af kollagen i kød og kødprodukter. Prøven hydrolyseres i svovlsyre ved 108°C, filtreres og fortyndes. Hydroxyprolin oxideres med Chloramin-T til pyrrol. Ved tilsætning af 4-dimethylamino-benzaldehyd dannes en rød-farvet forbindelse, der måles på spektrofotometerisk ved 560 nm.*

Analysemetoden blev dokumenteret og akkrediteret første gang i 1998. Nyt udstyr indkøbt i 2001 medførte en fornyelse af akkrediteringen i 2005. Metoden valideres ved deltagelse i ringtest (FAPAS).



Udstyr: Tecator-destruktionsblok (Tecator 2020, FOSS)  
Usugningssystem 2001, scrubber unit (FOSS)  
Lachat QuikChem FIA+, 8000 Series, Flowinjection system  
(FIA) med opsætning til hydroxyprolinbestemmelse  
Lachat Reagent Pump, RP-100 series (SF 70955)  
Lachat XYZ Autosampler (SF 70956)

En revurdering af metodedokumentationsmaterialet har vist, at repeterbarheds- og reproducerbarhedsspredningen er afhængig af koncentrationsniveauet. Der er genereret ligninger for repeterbarheds- henholdsvis reproducerbarhedsspredninger som funktion af kollagenindhold i prøven. Ligningerne anvendes nu som basis for beregning af analyseusikkerheden.

Prøvemængden er blevet ændret for kødprøver med lavt kollagenniveau, fra 2 til 5 g. Det har haft en positiv effekt på spredningen, men var ikke tilstrækkeligt til at reducere kvantificeringsgrænsen til et acceptabelt niveau.

Med henblik på at reducere kvantificeringsgrænsen yderligere, blev der gennemført forsøg, hvor kurveforløbet fra de spektrofotometriske målinger er anvendt som basis for beregningerne. Der blev hermed opnået en kvantificeringsgrænse på 0,05 % kollagen, der er realistisk i forhold til matricer med lavt kollagenindhold (klump, filet, yder- og inderlår samt mørbrad fra svin).

### **Vandbestemmelse**

*Princip: Prøven tørres ved 102-105°C, indtil konstant vægt er opnået. Vægttabet angiver indholdet af vand.*

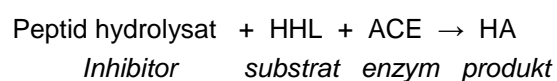
Analysemetoden blev dokumenteret og akkrediteret i 1996. Metoden valideres løbende ved deltagelse i ringtest (FAPAS). Ud over indkøring af automatisk dataoverførsel i 2006 er der ikke foretaget ændringer eller afprøvninger.

### **Ikke akkrediterede analysemetoder på DMRI**

#### **Angiotensin-I konverterende enzym (ACE) - assay til screening af inhiberende effekt**

Assay til screening af den inhiberende effekt, i f.eks. proteinhydrolysater, mod et angiotensin-I konverterende enzym (ACE).

Spektrofotometrisk metode, hvor enzymatisk omdannelse af hippuryl-L-histidyl-L-leucin (HHL) til hippursyre (HA) ved hjælp af et angiotensin I konverterende enzym, (ACE) måles ved 228 nm.



Ved sammenligning af absorptionskurver for substrat med og uden teststof (inhibitor) fås et udtryk for teststoffets ACE inhiberende effekt.

**Acetat, D-glukose,  
D- og L-laktat,  
Sucrose/D-Glucose/D-  
Fructose,  
Mono sodium glutamat  
(MSG)**

*Princip: Metoden er baseret på et enzymatisk testkit til spektrofotometrisk bestemmelse af analyt. Der anvendes sædvanligvis et vandigt ekstrakt fremstillet efter forskrift til saltbestemmelse.*

Laboratoriet har god erfaring med testkit fra Boehringer Mannheim, Roche. Der er tidligere oplevet tidskrævende problemer med testkit fra Diffchamp til acetatbestemmelse (Enzytec, acetic acid). Testkit fra Diffchamp til enzymatiske, kemiske analyser blev fravalgt.

**Androstenon, skatol,  
indol (ornelugt)**

*Princip: Androstenon, skatol og indol ekstraheres fra rygspæk med methanol. Efter derivatisering bestemmes indholdet ved HPLC med en fluorescens detektor.*

Analysemetoden blev udviklet på SF i 1993. Efter en kortere periode faldt efterspørgslen på analyser, og metoden blev stillet i bero i en årrække. Siden 2007 har der været flere henvendelser om analyseopgaver.

Metoden er blevet opdateret i 2011, og der er indført forbedringer af kvalitets sikringen.

Der har dog vist sig behov for yderligere optimering af analysemetoden. Samtidig hermed er påbegyndt metodeudvikling under F&U projektet "Anvendelse af lugtende hangrisekød" til bestemmelse af ornelugt i fersk kød.

**Antioxidativ aktivitet  
Clark elektro-  
de/DPPH/TEAC**

To metoder er til rådighed til fastlæggelse af et teststofs antioxidative effekt:

Metode baseret på en oxygen microsensor (Clark elektrode), hvor aktiviteten følges ved en oxidationsproces, ved at registrere iltforbrug over passende tidsintervaller.

Assay hvor omdannelsen af det stabile frie radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl), DPPH•, fra en dyb violet farve til en farveløs forbindelse, er udtryk for teststoffets antioxidative aktivitet.

En tredje metode, TEAC (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) =ABTS) er tilgængelig, men anvendes pt. ikke som rutineanalyse.

**Aromastoffer, lugtstoffer eller migrerede flygtige stoffer (GC-MS/GC-O)**

*Princip: Analysen kan bruges til at bestemme sammensætningen af lugtstoffer i headspace over en prøve. Den omfatter flere forskellige typer prøver lige fra fersk kød, tilberedt kød, plastmaterialer og direkte opsamling af lugtstoffer i staldmiljøer. Opsamling fra luft sker direkte til adsorptionsrøret, mens opsamling fra emballage eller kød sker ved at placere prøven i en beholder, som opvarmes. Frigivne flygtige stoffer overføres fra headspace over prøven til et adsorptionsrør, hvor de fastholdes indtil analyse. Analyse af, hvilke stoffer duften eller lugten består af, sker ved Automatisk Termisk Desorption (ATD) og efterfølgende analyse ved Gas Kromatografi (GC) med Masse Spektrometri (MS) eventuelt kombineret med Olfaktometri (O). Lugtstofferne identificeres ved massespektrometri, og deres betydning for det samlede lugtbidrag vurderes ved olfaktometri, hvor et panel af dommere sidder og bedømmer lugten af de enkelte stoffer. Den kvantitative mængde af et stof er ikke afgørende for stoffets bidrag til det samlede lugtindtryk. Det er derimod kombinationen af mængden og især stoffets lugttærskelværdi, som udtrykker, ved hvilken koncentration stoffet lugter. Denne koncentration er meget lav for nogle stoffer.*

Udstyr I: Perkin Elmer ATD400

Agilent GC/MS 6890N/5973

Gerstel ODP2 porte

Udstyr II: Gerstel TDS A2

Agilent GC/MS 6890N/5975

FPD H9251

GC/MS'en på udstyr I blev i 2004 udstyret med to sniffporte (Gerstel ODP2). Kombinationen af massespektrometri og olfaktometri, oven i købet to stk., eksisterer meget få steder og er et stærkt analyseinstrument, samtidig med at det reducerer arbejdsmængden ved disse typer analyser. Metoder er udviklet og optimeret for aromastoffer i kød og lugtstoffer fra staldluft, og panellister er uddannet og trænet på relevante lugtstoffer.

Metoden til opsamling af lugtstoffer (Dynamisk Headspace opsamling) blev i 2004 udbygget til at omfatte 6 prøver mod før 1.

GC-MS udstyr og metodeopsætning er opdateret og justeret i 2011.

**Aske**

*Princip: Prøven foraskes i muffelovn ved 550°C, indtil konstant vægt er opnået. Der benyttes evt. prøver fra en forudgående vandanalyse.*

Analysemetoden er ikke-akkrediteret, men valideres 2 gange årligt ved deltagelse i ringtest (Fødevarerdirektoratet, FAPAS). Efterspørgslen på analysemetoden er begrænset.

**Fedtsyresammensætning** *Princip: Efter ekstraktion/afsmeltning og forsæbning omestres fedtsyrerne til fedtsyre-methylestre og analyseres ved hjælp af Gas Kromatografi med Flamme Ionisations Detektor (GC/FID).*

Analyse for fedtsyresammensætning kan ske i:

- Spæk og talg (total fedtsyresammensætning)
- Intramuskulært fedt (total fedtsyresammensætning)
- Intramuskulært fedt (delt op på neutrale lipider og phosphorlipider)

Spæk og talg afsmeltes i mikrobølgeovn. Fedtsyresammensætningen i det intramuskulære fedt bestemmes ved at ekstrahere fedtet fra kødet med dichlormethan/methanol. Skal fedtsyresammensætningen af det intramuskulære fedt deles i neutrale lipider og phosphorlipider, sker det ved at skille de to grupper af lipider ved hjælp af fastfase-kromatografi.

Udstyr: Agilent GC/FID 6890

Databehandlingen er forbedret og optimeret i form af forbedrede regneark. En kvantificeringsgrænse er fastlagt for fedtsyrerne. Resultaterne afrapporteres som areal%.

Optimal opbevaring og forbehandling af spæk/talg er fastlagt. Afsmeltet fedt kan opbevares en uge ved 5°C. Ved længere tids opbevaring skal spækprøven vakuumpakkes og opbevares på frost ved -18°C eller -80°C.

I forbindelse med indførelse af fedtafgift pr. 1. juli 2011 var det forventet, at der ville være et behov for kvantificering af fedtsyrerindholdet i kød- og kødprodukter. Arbejdet med implementering af analysemetode blev derfor påbegyndt. De indledende forsøg har vist, at valg af intern standard er problematisk, og at det ville kræve en række afprøvninger og efterfølgende dokumentation, før metoden kan tages i anvendelse.

### **Jodtalsbestemmelse**

På foranledning af møde mellem repræsentanter fra Slagteribranchen, L&F, DJF, og DMRI, blev der taget initiativ til at standardisere metoden til jodtalsbestemmelse i svinefedt (spæk) og foderstoffer på basis af fedtsyrebestemmelse. Formålet var at kunne sammenligne resultater på tværs af analyselaboratorier. I samarbejde med Forskningscenter Foulum, Aarhus Universitet, er der udarbejdet en standardiseret procedure.

### **Frie fedtsyrer**

*Princip: Fedtstoffet ekstraheres med chloroform. Filtratet tilsættes ethanol, og blandingen titreres med natriumhydroxyd til omslagspunkt.*

Der er i 2007 arbejdet med en ny metode til meget fedtholdige produkter, hvor mængden af opløsningsmiddel er reduceret væsentligt. På sigt skal chloroform substitueres med et miljøvenligt alternativ.

### **Konsistens**

*Princip: Fysisk målemetode baseret på tryk eller træk med forskellige former for knive og prober.*

Traditionelt forbindes konsistensmålinger med mørhedsbestemmelse af kød. Igennem de senere år er anvendelsesområdet udvidet med nye applikationer, f.eks. bestemmelse af brudstyrke i ribben, pølsers "knæk", farsvarers hårdhed, sammenhængsevne i skiver af kogeskinke og skærefasthed i bacon.

Udstyr: Texture Analyser TA-HDi (50 kg loadcelle)  
Softwareversion fra 2007

### **Natrium**

*Princip: Natrium ekstraheres i varmt vand. Protein fældes og filtreres fra. Natriumindholdet i ekstraktet bestemmes med en ion selektiv elektrode (Na-ISE), på baggrund af en standardkurve.*

Udstyr: Na-selektiv elektrode, polymer membran ISE (6.0508.100, Metrohm)  
pH-meter

Metoden har vist sig mindre velegnet til ferske kødprøver, hvori det naturlige saltindhold er lavt.

### **Nitrit/nitrat**

*Princip: Nitrit og nitrat ekstraheres med varmt vand. Protein fældes, og opløsningen filtreres. Nitrit omdannes ved en kemisk reaktion til et rødt azofarvestof. Intensiteten måles spektrofotometrisk ved 520 nm. Nitrat bestemmes indirekte efter reduktion til nitrit med en cadmiumkolonne.*

Udstyr: Lachat QuikChem FIA+, 8000 Series, Flowinjection system (FIA) med opsætning til nitrit/nitratbestemmelse  
Lachat Reagent Pump, RP-100 series (SF 70955)  
Lachat XYZ Autosampler (SF 70956)

På grund af egenfarve kan krydderier og andre tilsætningsstoffer give anledning til fejlbehæftede resultater. Korrektion for denne fejlkilde udføres, ved at de farvede prøver først måles efter almindelig procedure. Efterfølgende gen-

nemføres en måling, hvor det ene af farvereagenserne erstattes med vand. Differencen mellem de to målinger udgør bidraget fra indholdet af nitrit og/eller nitrat.

### **Non-protein-nitrogen (NPN)**

*Princip: Non-protein-nitrogen (NPN) inkluderer komponenter som urea, ammoniumsalte og aminosyrer samt små peptider og nukleotider. Vandopløselige proteiner fældes med trichloreddikesyre. Det resterende N-indhold (NPN) i det klare ekstrakt bestemmes med Kjeldahlmetoden.*

Metoden blev indkøbt i 2007, da der var behov for at kunne bestemme NPN i gødnings- og tarmprøver.

### **Opløseligt CO<sub>2</sub>**

*Princip: Indholdet af opløseligt CO<sub>2</sub> i MA-pakket kød frigøres ved tilsætning af perchlorsyre. Gassen fældes i et forlag med en kendt mængde bariumhydroxyd. Det overskydende bariumhydroxyd titreres med saltsyre, og indholdet af CO<sub>2</sub> kan beregnes indirekte.*

Formålet med metoden er at bestemme absorptionskapaciteten for CO<sub>2</sub> i kødprodukter. Herved bliver det muligt at beregne det nødvendige overskud, der skal tilsættes pakningen, for at hindre kollaps, når der pakkes med et højt CO<sub>2</sub> indhold.

### **Overfladefarvemåling (Videometer)**

*Princip: Ved lysrefleksionsmålinger på overflader af kødprodukter kan farvekoordinaterne i Hunter L, a, b systemet beregnes. L betegner lysheden i produktet, a og b værdien henholdsvis rød/grøn og blå/gul farvetone.*

Udstyr: VideometerLab

Metoden blev akkrediteret i 2001 med Datacolor Dataflash 2000. I 2005 opstod driftsforstyrrelser på udstyret, og akkrediteringen blev trukket tilbage. Der blev indkøbt et VideometerLab udstyr, der er baseret på en væsentlig anderledes måleteknologi. Det var derfor ikke muligt direkte at overføre erfaringer fra den tidligere metodedokumentation, og det blev midlertidigt besluttet at køre analysemetoden som ikke-akkrediteret.

Der er udviklet en metode og algoritme til bestemmelse af overfladefarvemåling (L, a og b værdier), baseret på målinger fra kogt skinke. Der er desuden udviklet en metode til at eliminere fedt fra optagelserne, der kan give støj i beregningerne af L, a og b værdier.

Udstyrsproducenten har ligeledes udviklet modul til bestemmelse af overfladefarve. Den tilgrundliggende algoritme er ikke udviklet specielt til bestem-

melse af L, a og b i kød.

Resultaterne fra en sammenligning af Videometers modul og instituttets software med Minolta målinger som referencemetode har ikke været overbevisende. Begge metoder havde således en tendens til niveauforskydninger i forhold til resultaterne fra Minolta målingerne, der betragtes som reference.

For at få klarlagt problemets omfang blev overfladefarvemålinger på kød- og kødprodukter systematisk sammenlignet mellem VideometerLabs farvemodul, DMRI's model og Minolta udstyr. Resultaterne fra VideometerLabs farvemodul viste, at skalaerne for a\* og b\*, henholdsvis a og b, ikke kunne bruges i deres nuværende form til kødprøver. DMRI's model var heller ikke optimal, hvilket kunne forklares med, at de anvendte beregningsformler er produktspecifikke. Derfor blev det anbefalet at anvende Minolta målinger, hvis resultater af a og b-værdier skal kunne sammenlignes med referenceværdier.

VideometerLab har efterfølgende udviklet en ny software med en direkte fotometrisk farvemåling udregnet på basis af CIEs følsomhedskurver. Egnetheden af dette program til kød- og kødprodukter vil blive afprøvet på DMRI.

**Peroxidalsbestemmelse** *Princip: Fedtstoffet ekstraheres med chloroform. Peroxidilten i fedtstoffet ilter kaliumjodid til frit jod, som titreres med natriumthiosulfat med stivelse som indikator.*

På sigt skal chloroform substitueres med et miljøvenligt alternativ. Afprøvning af ISO metode til peroxidalsbestemmelse, med henblik på at forbedre arbejdsmiljøet ved en udfasning af chloroform, er en mulighed.

**Prøver med lavt fedtindhold** Der er arbejdet med optimering af metode til peroxidalsbestemmelse i kødprodukter med lavt fedtindhold. Midlertidige resultater viste, at den nedre grænse for at gennemføre analysen, er et fedtindhold på ca. 5 %.

**Reducerende kulhydrat** *Princip: Fehlings metode til bestemmelse af kulhydrater i kødprodukter.*

Med denne metode bestemmes det totale indhold af reducerende sukkerarter efter syrehydrolyse. Metoden kan anvendes til alle kødprodukter.

**Salt- og vandopløseligt protein (Biuret)** *Princip: De salt- og vandopløselige proteins opløselighed er et udtryk for kødets saftbindeevne og dermed kødets kvalitet. Proteinerne bestemmes spektrofotometrisk ved hjælp af Biuret-metoden. Høje værdier svarer til god kødkvalitet (god saftbindeevne). Metoden anvendes til fersk kød.*

Metoden blev akkrediteret i 1998. I 2000 blev akkrediteringen trukket tilbage på grund af problemer med standarder. Samtidig var der ikke længere efterspørgsel på analysemetoden.

### **Salt- og vandopløseligt protein (Bradford)**

*Princip: Farvebindingsmetode med kompleksdannelse mellem proteiner og farvestoffet Brilliant Blue G. Prøven blandes med Bradfordreagens og aflæses i spektrofotometer ved 595 nm efter kortvarig inkubation. Metoden kan anvendes til forarbejdede produkter.*

Biuretmetoden, som anvender fosfatbuffer, har været anvendt til fersk kød. Til produkter ønskes en buffer uden fosfat, da det påvirker protein-ekstraktionen. Der benyttes en MES buffer.

Bradfords metode er forholdsvis ufølsom over for diverse forstyrrende salte, sukker m.m.

### **Sarcomerlængde måling**

*Princip: Tynde frysesnit af kød belyses med laserlys. Kødet virker som et optisk gitter over for lys. Brydningsmønsteret opfanges og omregnes til sarcomerlængde.*

Analysemetoden er indkørt med opdateret software samt ny frysemicrotom til præparation af frysesnit af kød.

### **Stegemutagener**

*Princip: Analyse for heterocycliske aminer (HCA) ved ekstraktion og oprensning med en mikroekstraktionsteknik (LPME – Liquid Phase Micro Extraction), hvor ekstraktion og opkoncentrering sker i et trin på en lille fiber. Ekstraktet analyseres ved væskechromatografi med massespektrometri (LC-MS/MS).*

Metoden er indkørt på grillstegte kødprodukter. Metoden er p.t. ude af funktion.

### **Stigesmeltepunkt- Afrøvning af smelte- punktsapparat (Buchi B- 540)**

Stigesmeltepunktet, der er et kvalitetsmål for fedtets hårdhed, er den temperatur, ved hvilken en fedtsøjle indsmeltet i et åbent kapillarrør begynder at stige i røret.

Den eksisterende metode, der blev anvendt tilbage i 70'erne (SF metode, blad nr. 32), er forholdsvis tidskrævende. Det er derfor forsøgt at finde en mere tidssvarende metode, og smeltepunktsapparatet Buchi B-540 er blevet afprøvet. Resultaterne herfra viste, at dette udstyr ikke var velegnet til bestemmelse af fedts stigesmeltepunkt. Varmepåvirkningen var ikke kraftig nok



til at smelte fedtsøjleens ydre lag, før hele prøven i røret var smeltet, og der kunne derfor ikke registreres en stigning i røret.

**Thiobarbitursyre reaktive substanser - TBARS** *Princip: TBARS er et mål for lipidoxidation i levnedsmidler. Ved lipidoxidation dannes bl.a. malonaldehyd og glucolaldehyd (sekundære nedbrydningsprodukter), der reagerer med thiobarbitursyre under dannelse af et rødt pigment, der har maksimal absorbans ved 532 nm. Mængden af dette pigment ligger til grund for beregningen af TBA-tallet.*

Udstyr: Lamda 25, UV/VIS, Perkin Elmer

**Thiol-forbindelser, frie** *Princip: Frie thiol er et mål for proteinoxidation. Ellmans reagens (DTNB) anvendes til bestemmelse af sulfhydrylgrupper/frie thiol i proteiner. DTNB danner en disulfidbinding med thiolen og frigiver en farvet thiolat-ion, der bestemmes spektrofotometrisk ved 412 nm. Høj absorbans indikerer højt niveau af frie thiol og dermed lavt oxidativt stressniveau i prøven. Analysemetoden blev kørt ind i 2007 i forbindelse med en specialeopgave.*

**Totalindholdet af flygtige basiske kvælstof-forbindelser (TVN)** *Princip: Trimethylamin og ammoniak frigøres fra prøven ved tilsætning af magnesiumoxid og destilleres over i et forlag indeholdende borsyre med indikator. Der titreres til ligevægt med saltsyre.*

**Vandaktivitet -  $a_w$**  *Princip: Vandaktiviteten ( $a_w$ ) er et mål for den del af vandet i en prøve, som er tilgængelig for mikrobiologisk vækst. Den relative fugtighed i luften omkring prøven angives, efter at der er opnået ligevægt med hensyn til såvel temperatur som fugtighed.*

Udstyr: Vandaktivitetsmåler, AquaLab Series 3TE

Det nuværende udstyr, der er baseret på en dugpunktsmåling, har erstattet en anden måleteknik (Rotronic BT-RS1), da der var en formodning om, at AquaLab udstyret var mere følsomt.