



# Rapport

## Krav til fødevarekvalitet kemisk/fysisk dokumentation

### Optimering af kollagenanalyse

3. januar 2025  
Proj.nr. 2011306  
Init. DBRE/MT/LME

#### *Baggrund*

Kollagen er et protein, der bl.a. findes i svær, sener, brusk og bindevæv hos grise, og kollagen er dermed til stede i forskellige udskæringer og kødprodukter. Når laboratoriet skal analysere kødprøver for kollagen, er det derfor vigtigt at have en robust analysemetode. Kollagen er hovedsageligt sammensat af tre forskellige aminosyrer: prolin, hydroxyprolin og glycin. Hydroxyprolin er kendetegnende for kollagen, og analyser, der har til formål at bestemme kollagenindholdet, beror ofte på kvantificering af 4-hydroxyprolin.

I laboratoriet er der tidligere benyttet apparatet QuikChem 8000 FIA+ til at måle kollagenindholdet i kødprodukter. QuikChem måler typisk kolorimetrisk, dvs. hvor meget lys prøven absorberer ved en bestemt bølgelængde, her 560 nm. Apparatet er dog omstændeligt at starte op samt vedligeholde, og det er derfor ikke egnet til at måle på få prøver ad gangen. Dertil har QuikChem et stort forbrug af kemikalier, bl.a. til at skylle og rense systemet og føre prøven igennem. Der var derfor et ønske om at finde en metode, der er mere egnet til få prøver, og samtidig er det et mål for laboratoriet at reducere forbruget af kemikalier.

I forhold til at opnå et let skifte til andet instrument/metode er der et ønske om at bibeholde så meget som muligt af den anvendte prøveforberedelse inkl. de anvendte kemiske reaktioner, så der ikke skal udvikles og valideres en ny metode.

Det naturlige valg faldt derfor på en metode baseret på måling med spektrofotometer, idet det grundlæggende måleprincip er identisk med QuikChem, hvilket giver mulighed for næsten uændret at bibeholde den oprindelige prøveforberedelse. Dertil kan ønsket om nem håndtering af færre prøver og et reduceret kemikalieforbrug indfries.

#### *Formål*

Formålet med skiftet i analysemetode er at:

- Indkøre en metode til analyse af kollagen, der kan håndtere få prøver ad gangen
- reducere kemikalieforbruget i analysen for kollagen

Formålet med nærværende notat er at beskrive tankerne og arbejdet bag skiftet fra QuikChem til Spektrofotometer. Beskrivelsen kan også tjene som inspiration til optimering af andre analysemetoder.

### Metodebeskrivelse **QuikChem 8000 FIA +**

QuikChem 8000 benytter flowinjektionsanalyse FIA og et kontinuert væskeflow for hurtigt at kunne analysere prøver. Alle reagenser pumpes simultant rundt i systemet. Når prøven påføres systemet via en autosampler (ikke vist på billedet) føres den ind i et reaktionsmodul, hvor prøven kan behandles. Her tilsættes reagenserne automatisk, og prøven fortyndes om nødvendigt (nærmere beskrevet nedenfor).

Herefter måles prøvens absorbans ved 560 nm, og ved hjælp af en standardkurve beregnes koncentrationen af 4-hydroxyprolin.

Før brug skal slangerne skylles igennem med reagenserne, og efter endt brug skal systemet renses med blandt andet ethanol.



Figur 1. QuikChem 8000 FIA+.

### Spektrofotometer

I spektrofotometeret sidder en lampe, hvorfra lyset føres gennem et prisme, som spalter lysstrålen i forskellige bølgelængder. Ved at dreje prismet og sende lyset gennem en spalte kan man meget præcist styre, hvilken bølgelængde man måler ved. Efter spalten sendes lysstrålen gennem en kuvette, figur 2, og dernæst ind i en fotosistor, som kan måle, hvor meget af lyset der er absorberet i prøven. Fordi der er en lineær sammenhæng mellem absorbansen og prøvens koncentration af 4-hydroxyprolin (op til et vist niveau), kan man ved sammenligning med en standardkurve beregne koncentrationen af 4-hydroxyprolin i prøven.



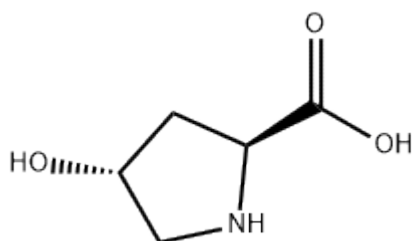
Figur 2. Plastkuvette.

### Analyseprincip

Da analyseprincippet er ens for QuikChem 8000 og Spektrofotometer, kan der som udgangspunkt benyttes samme prøveforberedelse. Til spektrofotometeret skal de enkelte trin dog udføres manuelt, hvor QuikChem tilsætter reagenser automatisk.

Prøveforberedelse/Destruktion: Prøven koges i svovlsyre ved 108°C natten over, og efter fortynding og afkøling filtreres den. Kogningen med svovlsyre nedbryder kollagenet, og herved frigøres 4-hydroxyprolin.

Som tidligere nævnt er 4-hydroxyprolin en karakteristisk aminosyre for kollagen. Den findes normalt ikke i andre proteiner og kan derfor anvendes som et kvantitativt mål for indholdet af kollagen i kød og kødprodukter.



Figur 3. 4-hydroxyprolin.

Dernæst oxideres 4-hydroxyprolin med Chloramin-T til pyrrol. Der dannes en rød-farvet forbindelse ved tilsætning af 4-dimethylamino-benzaldehyd, som absorberer ved 560 nm.

#### Selektivitet

Derivater af pyrrol, pyrrolidin og indol vil interferere i målingen, da disse også reagerer med 4-dimethylamino-benzaldehyd. Dette har dog ingen betydning i praksis, da disse forekommer i ubetydelige mængder i kollagenet i forhold til 4-hydroxyprolin.

Andre aminosyrer reagerer også med 4-dimethylamino-benzaldehyd, men disse forbindelser er ustabile ved de aktuelle temperatur- og pH-forhold.

#### Kvalitetskontrol

##### Indkøring af analysemetode for kollagen på spektrofotometer

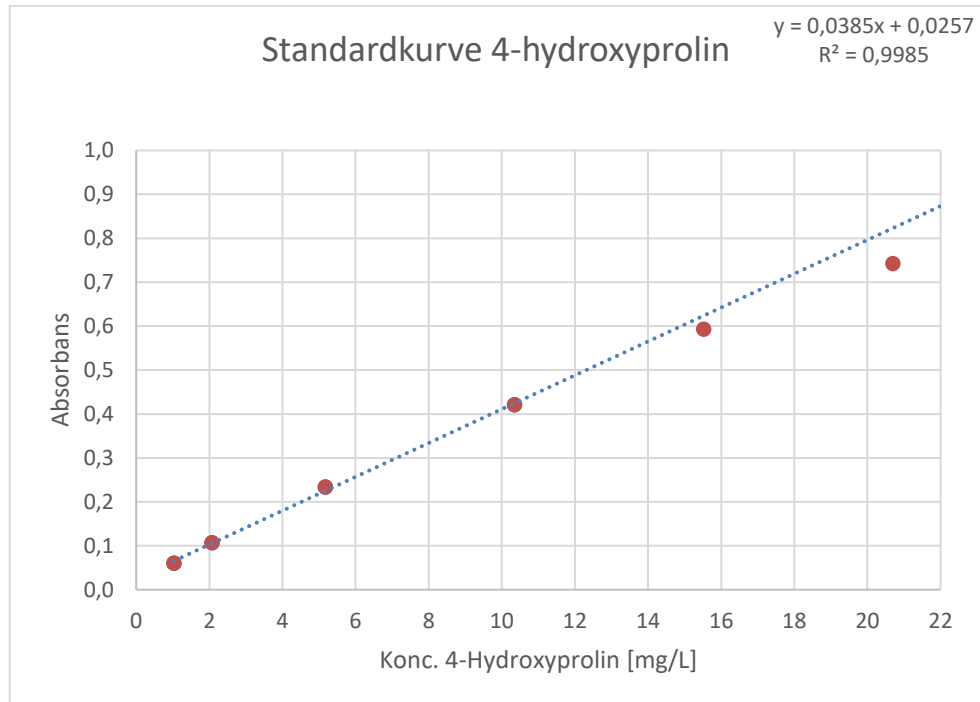
Til sikring af en valid måling skulle følgende afklares/gennemføres:

- Fastlægge, hvilke koncentrationer der skulle benyttes til standardkurven. Krav til korrelation:  $r \geq 0,995$ .
- Identificere en kontrolstandard, der kan behandles på samme måde som prøverne.
- Fastlægge mængder til prøveforberedelse, så prøver og kontrol kan måles på spektrofotometeret uden yderligere fortyndinger.
- Måle kontrollen over tid, så der kan fastsættes kontrolgrænser og gennemføres usikkerhedsberegninger.

#### Standardkurven

Det bemærkes, at der reelt måles på en farvereaktion mellem tilsatte kemikalier og indholdet af 4-hydroxyprolin i den behandlede prøve, og derfor benyttes en kurve med 4-hydroxyprolinstandarder til beregning af kollagenindholdet.

Standarder indeholdende 1 mg/L til 10 mg/L viste sig konsekvent at give den ønskede korrelation på  $r \geq 0,995$ . Det blev observeret, at standardkurven visuelt begyndte at bøje af fra og med kollagenkoncentrationer på 15 mg/L (figur 4).



Figur 4. Standardkurve for 4-hydroxyprolin målt på spektrofotometer.

#### Måleområdet

I tilfælde af prøver med meget lavt kollagenindhold blev der i analysen indbygget en mulighed for at udføre kraftigere farvereaktioner, uden andre parametre i metoden skulle ændres. Herved kan der måles helt ned til 0,05 g/100 g kollagen.

Måleområdet bliver 0,1 g/100 g – 1 g/100 g kollagen (eller 0,1% – 1%), når der afvejes 2 gram prøve. Vides en given prøve på forhånd at indeholde mere eller mindre kollagen, så kan prøvemængden justeres, der kan afpipetteres mere eller mindre til farveudviklingen, og endeligt kan der foretages en fortynding efter farveudvikling. Tabel 1 viser indholdet af kollagen i udvalgte råvarer/produkter fra gris målt tidligere i det kemiske laboratorium.

Tabel 1. Indhold af kollagen.

Kollagenindhold	n	g/100 g
Bovsnitte	10	4,48
Svær	10	22,56
Svinebryst	10	1,6
Kam	10	0,42
Spæk	10	2,37
Kødpølse	10	1,52

#### Kontrolstandard

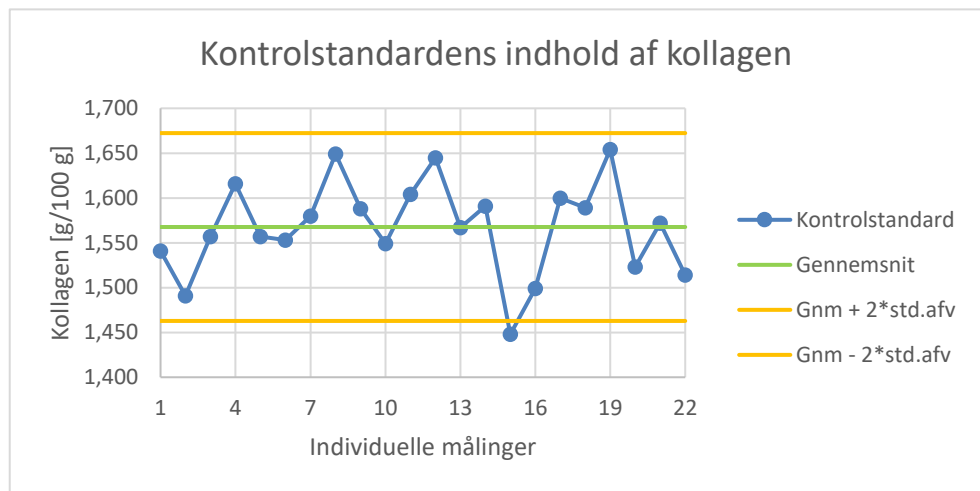
Laboratoriet anvender i flere analyser en kontrolstandard baseret på et kødprodukt på dåse (Spam), der blendes. Kontrollen indeholder bl.a. protein, fedt, vand og kollagen.

#### Måling af kontrolstandard

Indholdet af kollagen i kontrolstandard er blevet målt over et år, og værdierne er benyttet til beregning af kontrolgrænser til kontrolkort for metoden. Der blev gennemført 22 målinger i alt (11 destruktionsdage), se tabel 2.

**Tabel 2.** Målt koncentration af kollagen i 22 målinger af kontrolstandard udført over et år

Kollagen i kontrolstandard	
Gennemsnit [g/100 g]	1,568
Spredning [g/100 g]	0,052
Variationskoefficient	3,3%
Minimum [g/100 g]	1,448
Maximum [g/100 g]	1,654
Prøveantal (n)	22



**Figur 5.** Kontrolstandardens indhold af kollagen målt 22 gange over en periode på et år.

Det ses af figur 5, at målingerne på kontrolstandarden ligger pænt fordelt på begge sider af gennemsnittet uden trends i den ene eller den anden retning. De orange linjer markerer 2 standardafvigelser fra gennemsnittet. Der er et enkelt målepunkt udenfor svarende til < 5% af målepunkterne, hvilket vurderes acceptabelt, da vi forventer, at 95% af målingerne vil ligge inden for 2 standardafvigelser fra gennemsnittet.

### Reduktion af kemikalier

Der blev opnået en markant reduktion i kemikalieforbruget alene ved at skifte fra QuikChem til spektrofotometer. Dertil blev voluminet af reagenser og buffere, der fremstilles til analysen, også reduceret, så mængden passer bedre til antallet af prøver. Den samlede kemikaliereduktion ses i tabel 3.

**Tabel 3.** Kemikalieforbrug pr. analyse ved hhv. QuikChem og spektrofotometer.

Reagens	QuikChem mL/analyse	Spektrofotometer mL/analyse
Citronsyre/acetatbuffer	1000	100
Iltningsreagens	300	50
Farvereagens	283	47
Carriervæske	5000	-
1 N HCl-opløsning	500	-
5% Deconex-opløsning	500	-
50% Ethanol	Variabelt	-
7,5N Svovlsyre	40 mL/prøve	40 mL/prøve

Der bruges fortsat 40 mL 7,5N svovlsyre til enkeltbestemmelse af kollagenindholdet i en prøve, og det er ikke blevet testet, hvorvidt en reduktion i svovlsyre er mulig. Det er der to årsager til:

1. Hvis koncentrationen af svovlsyre bliver for lav, kan kollagen ikke hydrolyseres (nedbrydes) og 4-hydroxyprolin frigøres.
2. Hvis voluminet af svovlsyre bliver for lavt, er hele prøven ikke dækket, og en mangelfuld frigørelse af 4-hydroxyprolin kan blive en konsekvens.

### Konklusion

Analysemetoden for kollagenindholdet i animalske råvarer og produkter er blevet optimeret. Der var i metodeoptimeringen fokus på at bibeholde analyseprincippet og mest muligt af prøveforberedelsen, dog med et samtidigt sigte på at reducere forbruget af kemikalier. Dette blev indfriet ved at flytte analysen fra QuikChem-apparatet til et spektrofotometer.

Der blev indkøbt en kontrolstandard, som indeholdt 1,57 g/100 g kollagen, med en variationskoefficient på 3,3%. Dette er flot, idet usikkerhedsbudgettet på QuikChem til sammenligning er cirka 10%. Målingerne for kontrolstandarden på spektrofotometer ligger desuden indenfor godkendelsesgrænserne for analyse på QuikChem.