



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Identifikace a kvantitativní stanovení
analytů indol, skatol a androstenon
metodou kapalinové chromatografie
s hmotnostní spektrometrií s vysokým
rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích
tkání vepřového masa**

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

**80
2017**

Uplatněná certifikovaná metodika

č. CM 80/2017

(ISBN 978-80-88233-00-8)

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů indol, skatol a androstenon metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích tkání vepřového masa

Autor:

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu č. QJ1510233 programu Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 "KUS" vyhlášeném MZe ČR.

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: SVS/2017/150808-G

Vydala: Státní veterinární správa, Praha, 13.12.2017

Brno 2017

Uplatněná certifikovaná metodika

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů indol, skatol a androstenon metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích tkání vepřového masa

Obsah:

Předmluva	 3
I. Cíl metodiky	 3
II. Vlastní popis metodiky	 4
III. Srovnání „novosti postupů“	 14
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky	 14
V. Ekonomické aspekty	 15
VI. Seznam použité literatury	 17
VII. Seznam publikací, které předcházejí metodice	 17
Přílohy	 18

Oponentní posudky zpracovali:

1. Mgr. Aleš Cirkva – Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv
2. MVDr. Jiří Drápal, Ph.D. – Státní veterinární správa ČR

Certifikovanou metodu vypracoval: Ing. Kamil Šťastný, Ph.D

.....

Předmluva

Kastrace prasat je častým tématem u odborné i laické veřejnosti. V současné době jsou uplatňovány tři hlavní způsoby prevence kančího pachu u vepřového masa, konkrétně předčasná porážka, odstranění varlat (chirurgická kastrace) či imunokastrace (očkování vedoucí ke snížení kančího pachu). Kastrací samců je dosaženo dvou základních cílů - welfare prasat, která jsou s narůstající pohlavní aktivitou více agresivní vůči ostatním chovaným prasatům i vůči ošetřovatelům, a zabránění vzniku tzv. kančího pachu, který může znehodnotit chuť masa. Kančí pach je senzorická odchylka vepřového masa patrná při tepelné úpravě zejména tukové tkáně některých jedinců samčího pohlaví. Je způsoben vysokou koncentrací dvou látek, a to androstenonu (chemicky: 5-androst-16-en-3-on) a skatolu (3-methyl-indol). Androstenon je látka steroidní povahy, nemá žádnou hormonální funkci. Je produkován v Leydigových buňkách varlat spolu s dalšími steroidy, jako je samčí pohlavní hormon testosteron. U kanců je androstenon transportován do slinných žláz, kde je přítomný s jinými steroidy (3-androstenol, 3 β -androstenol). Kromě androstenonu se na kančím pachu podílí skatol (a také indol), které vznikají v tlustém střevě mikrobiální degradací aminokyseliny L-tryptofanu (Chen, 2007). Tvorba indolu v tlustém střevě probíhá za účasti řady bakterií, produkce skatolu vyžaduje přítomnost vysoce specifických mikroorganismů. Obě látky jsou částečně absorbovány střevní sliznicí a metabolizovány v játrech působením enzymu cytochrom P450. Nemetabolizovaný podíl skatolu se hromadí v tuku a je odpovědný za kančí pach. V tukové tkáni kanců se koncentrace androstenonu pohybují až do 5 $\mu\text{g/g}$, v USA zjistili maximální hodnotu 15 $\mu\text{g/g}$, obsah skatolu dosahuje maximálních hodnot do 1 $\mu\text{g/g}$ (Prusa et al., 2011; Haugen et al., 2012). Nad touto hladinou již konzumenti vnímají obě látky negativně a spotřebitelé, kteří jsou na přítomnost kančího pachu citliví, takovéto maso odmítají. Stejně stanovisko zaujímá také ustanovení o posouzení vhodnosti masa k lidské spotřebě (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní pravidla pro organizaci úředních kontrol produktů živočišného původu určených k lidské spotřebě), které maso se silným kančím pachem považuje za nepoživatelné. Na jatkách je proto nutné detekovat kančí pach a podle intenzity odchylky, maso správně posoudit.

I. Cíl metodiky

V současné době se na jatkách používají pouze orientační senzorické metody na principu tepelné úpravy vzorku, které jsou založeny na subjektivním vyhodnocení hodnotitelem. Pro objektivní zhodnocení především u suspektních kusů je třeba stanovit přesnou metodu. Pro tyto potřeby byla v rámci projektu č. QJ1510233 vyvinuta rychlá, přesná a vysoce citlivá kvantitativní analytická metoda na základě LC-MS/MS(HR), která identifikuje a stanovuje všechny tři složky kančího pachu současně. Certifikovaná metodika byla vyvinuta prioritně jako rozhodčí (konfirmační) a validována dle principů a parametrů Rozhodnutí komise 657/2002/EC (Commission decision 2002/657/EC).

II. Vlastní popis metodiky

1. Část informativní

1.1 Název metody

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů indol, skatol a androstenon metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích tkání vepřového masa

1.2 Princip metody

Princip použité metody je založen na analytické separaci vzorků na chromatografické koloně v kapalně mobilní fázi (kapalinová chromatografie, LC) a následné identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) je fyzikálně-chemickou metodou používanou pro určování hmot molekul a jejich částí, jež je třeba k tomu účelu převést na kladné nebo záporné ionty a následně tyto ionty rozlišit podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a záznamu relativních intenzit těchto iontů. MS je mimořádně citlivá, destruktivní analytická metoda, která při minimální spotřebě vzorku určuje molekulární hmotnost (M_w) a další strukturální informace.

1.3 Analyty

Indol, Skatol (3-Methylindol), Androstenon (5 α -androst-16-en-3-one) a 4-Androsten-3,17-dion (jako IS).

1.4 Rozsah a použitelnost metody

Metoda je použitelná pro stanovení indolu, skatolu a androstenonu ve vzorcích tkání vepřového masa v koncentrační rozsah 0 - 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) pro adrostenon a v koncentrační rozsah 0 - 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) pro skatol a indol.

1.5 Analyticko-statistická charakteristika metody

Identifikace a prokazování měřených analytů ve vzorcích je založeno na měření přesných hmot (mass accuracy) odpovídajících kladných iontů prekurzorů a produktových iontů s využitím kritéria pro Správnost ($\Delta\text{ppm} < 1$). Kvantifikace analytů je založena na základě matricové kalibrační křivky s následujícími vypočtenými kritickými body: LOD a LOQ, CC_α a CC_β (více viz. kapitola – Validace metody).

1.6 Interference metody

Stanovení indolu, skatolu a androstenonu analytickou metodou LC- MS/MS s vysokým rozlišením je za daných podmínek vysoce specifické a nebyly pozorovány žádné interference v oblasti výskytu odezvy analytů pro matrice tkání vepřového masa a rovněž masa s vysokým obsahem tuků.

1.7 Interní kontrola metody

Využívá se přídatku interního standard (IS) – 4-Androsten-3,17-dion (ADD). Každý vzorek je na začátku zpracování fortifikován roztokem interního standardu na výslednou koncentraci 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

1.8 Externí kontrola metody

Účast v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách, spolupráce s laboratoří v Belgii a Nizozemí.

2. Pracovní postup metodiky

2.1 Chemikálie, standardy

Analytické standardy organických látek Indol (CAS n. 120-72-9), Skatol (3-Methylindol, CAS n. 83-34-1), Androstenon (5 α -androst-16-en-3-one, CAS n. 18339-16-7) a 4-Androsten-3,17-dion (CAS n. 897-06-3) byly nakoupeny od firmy Sigma-Aldrich CZ a dodány objednavatelem. Kalibrační roztoky pro mass accuracy – Pierce ESI Positive/Negative Ion Calibration Solution, dodavatel Thermo-Fisher Scientific CZ.

Chemikálie metanol (gradiend grade), acetonitril (gradiend grade), kyselina mravenčí byly nakoupeny u dodavatele Sigma-Aldrich CZ. Deionizovaná (demineralizovaná) voda byla získána na zařízení GORO DEMI ULTRA CZ. Kapalný dusík v kvalitě 5.0 byl dodán firmou Messer CZ.

Zásobní roztok standardů byl připraven o koncentraci 1 mg.ml⁻¹ v acetonitrilu (*Rozpuštěn 1 mg standardu v 1.0 ml acetonitrilu*).

Pracovní roztok standardů byl připraven o koncentraci 100 a 10 μ g.ml⁻¹ odpovídajícím naředěním zásobního roztoku přídatkem acetonitrilu.

Všechny roztoky se skladují při 4°C v lednici. Zásobní roztoky standardů jsou stabilní 1 rok, pracovní roztoky jsou stabilní 1 měsíc.

2.2 Analytické zařízení

Všechny výsledky byly naměřeny na analytickém zařízení UHPLC-(HR)MS, pokud není vysloveně uvedeno jinak. Instrumentální analytické zařízení bylo složeno ze dvou hlavních částí, z části chromatografické separace vybavené zařízením (ultra) kapalinovým chromatografem Accera 1200 a části hmotnostní spektrometrie vybavené hybridním tandemovým hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (High Resolution, HR) na bázi orbitrapu označeném QExactive s H-ESI ionizačním zdrojem. Analytické instrumentální zařízení LC-(HR)MS/MS bylo vyrobené a dodané firmou Thermo Fisher Scientific, USA, jako řídicí software byl použit Excalibur ve verzi 2.21 a jako vyhodnocovací software pro confirmaci (identifikaci a potvrzování) byl použit Mass Frontier v.7.0 (oba Thermo Scientific). Měření bylo provedeno v analytické laboratoři vybavené přesnou klimatizací udržující teplotu v rozmezí 21 $\pm$ 0,5 °C.

2.3 Vzorkování

Vzorky tkání vepřového masa (včetně tuků) musí být po odběru na jatkách neprodleně vakuově zabaleny do polyetylenové folie a zamraženy na -20°C a v krátkém intervalu dodány do laboratoře k vyšetření. Vzorky před zpracováním v laboratoři jsou rozmrazeny při laboratorní teplotě.

2.4 Pracovní postup přípravy vzorků

1. navážit 2 g vzorku (rozmělněného, homogenizovaného) do centrifugační zkumavky,
2. přidat 20 μ l IS (interní standard) + 8 ml metanolu (100%),
3. intenzivně protřepat na vertexu cca 3 minuty každý vzorek,
4. 30 minut třepat na třepačce,
5. zchladit na -20°C a odstředit při 14000 otáčkách/min. 10 minut,
6. odebrat supernatant 6 ml metanolu do Kimber baňky,
7. 6 ml supernatantu odpařit do sucha v termovapu při 50°C v jemném proudu dusíku (v digestoři),
8. k odparku přidat 250 μ l roztoku metanol : voda (50 : 50) a 3 ml hexanu a důkladně protřepat na vertexu,
9. ponechat rozpustit zbytkový tuk v horní organické fázi – hexanu, za občasného protřepání,
10. po viditelném vyčištění zákalu obou fází, opatrně odebrat pipetou spodní fázi (bez zbytkových usazenin),
11. cca 200 μ l odebrané množství dolní fáze přenést do inzertu, vložit do chromatografické vialky a dobře uzavřít.

2.5 Analytická metoda

2.5.1 Chromatografická separace

Vzorky připravené pro cílenou analýzu byly přímo nastříknuty do chromatografického systému Accela 1200 s hmotnostním spektrometrem. Chromatografická separace probíhala na analytické koloně C18 Luna Omega rozměru 100 x 2,1 mm, zrnění 1,6 μ m (Phenomenex) vybavené ochranou předkolonou C18 Luna Omega rozměru 10 x 2,1 mm, zrnění 1,6 μ m. Analytická kolona byla temperovaná na 25°C a průtok kolonou byl konstantně nastaven na 300 μ l.min⁻¹. Nastříkovaný objem vzorku je 5 μ l. Mobilní fáze byla složena z 0,5 % roztoku kyseliny mravenčí ve vodě (mobilní fáze A) a 0,5 % roztoku kyseliny mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B). Použitý gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 1, doba analýza vzorku byla 11 minut.

Tab. 1 - Gradient mobilní fáze:

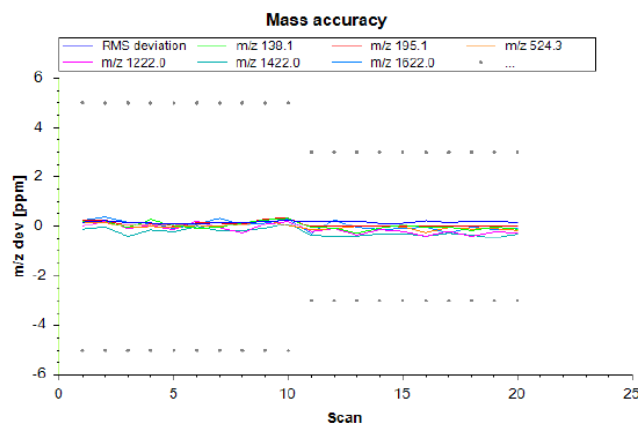
Číslo	Čas (min)	Průtok (μ l/min)	A (%)	B (%)
1	0	300	50	50
2	2.0	300	50	50
3	4.0	300	5	95
4	6.0	300	0	100
5	8.0	300	0	100
6	10.0	300	50	50
7	11.0	300	50	50

2.5.2 Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci

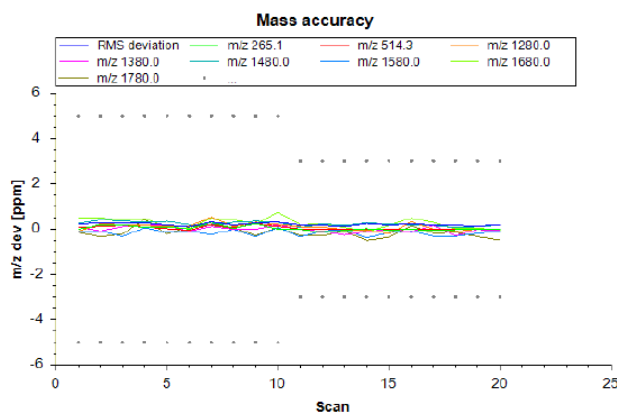
Tandemový hybridní hmotnostní spektrometr typu orbitrap QExactive měří v pozitivním a negativním modu s elektro sprej ionizačním zdrojem (ESI+/-). Pro necílenou analýzu pracuje detektor v nastaveném modu Full Scan s vysokým rozlišením. **Rozlišovací schopnost** (Resolving power, RP) = 140.000 (FWHM). Nastavení hmotnostního spektrometru je následující: Sheath gas flow rate 25 (unit), Aux gas flow rate 4 (unit), Spray voltage 4.50 (kV), Capillary temp. 220 (°C), Heater temp. 50 (°C), S-lens RF level 70, AGC target 6.e⁶ a Maximal inject time 100 (ms). Před začátkem každého měření je hmotnostní spektrometr vždy externě kalibrován na přesnou hmotu pomocí kalibračních roztoků Positive Ion Calibration Solution a Pierce ESI Negative Ion Calibration Solition (Thermo Scientific). Analytický profil (fingerprinting) je měřen v rozsahu 50 až 750 m/z v centroidním modu. Celý LC-(HR)MS systém je řízen a naměřená data jsou ukládána a procesována pomocí softwaru Excaliber 3.1, data jsou vyhodnocována pomocí softwaru Mass Frontier v. 7.0.

2.6 Kalibrace hmotnostního spektrometru na přesnou hmotu (mass accuracy)

Kalibrace MS spektrometru na přesnou hmotu byla prováděna vždy před zahájením měření externě na základě kalibračních roztoků Positive Ion Calibration Solution a Pierce ESI Negative Ion Calibration Solition (dodavatel Thermo Scientific). Výsledek externí kalibrace je uveden na následujících obrázcích (Obr. 1, 2). Povolená chyba měření (správnost) je ≤ 3 ppm pro použitý hmotnostní spektrometr QExactive.



Obrázek 1 – Pozitivní externí kalibrace (Procedure result: rms = 0,20/0,19 ppm)



Obrázek 2 – Negativní externí kalibrace (Procedure result: rms = **0,18/0,25** ppm)

Interní kalibrace byla nastavena na přesnou hmotu aduktů iontu acetonitrilu m/z $[M+Na]^+ = 64,01577$ Da, m/z $[M_2+H]^+ = 83,06037$ Da a probíhala kontinuálně v nastaveném modu mass-lock.

2.7 Standardy analytů pro identifikaci, prokazování a kvantifikaci

U standardů analytů jsou změřeny hmotnostní spektra MS^1 ve vysokém rozlišení ($RP = 140\,000$) a následně charakteristické produktové (fragmentační) spektra MS^2 . Z naměřených dat byly vypočteny velikosti povolených odchylek od teoretické přesné hmoty (Δ ppm) pro odpovídající ionty prekurzorů a fragmentů (produktových iontů) standardů. Výsledky měření jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 2 a 3) a příklady naměřených hmotnostních spekter jsou uvedeny na následujících obrázcích (Obr. 3 a 4). Podmínky nastavení hmotnostního spektrometru pro získání maximálních intenzit odezev pro standardy byly využity pro nastavení MS spektrometru pro následné měření všech vzorků.

Tabulka 2 – Mass accuracy (správnost) pro prekurzorové ionty standardů (MS^1) v modu Fullscan

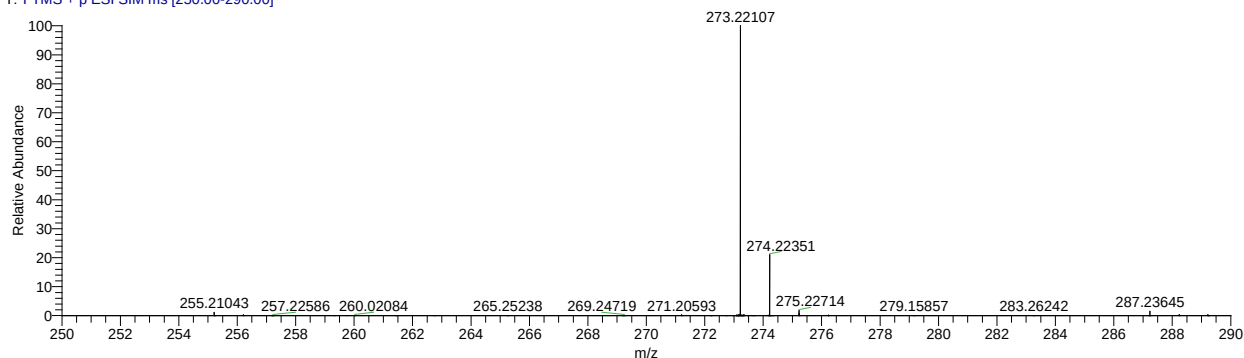
Standard	Elementární formula	Experimentální molekulová hmotnost (m/z)	Teoretická mol.hmotnost (m/z)	Správnost (Δ ppm)
Indol	$[C_8H_7N]^+$	118.06535	118.06513	1,86338
Skatol	$[C_9H_9N]^+$	132.08092	132.08078	1,05996
Androstenon	$[C_{19}H_{28}O]^+$	273.22107	273.22129	-0,80521
4-Androsten-3,17-dion (IS)	$[C_{19}H_{26}O_2]^+$	287.20059	287.20056	0,10446

Poz.: **Správnost (Mass Accuracy)** - relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou m/z a teoreticky vypočtenou m/z iontu vztaženou k teoretické hodnotě m/z ($\cdot 10^6$) vyjádřeno v Δ ppm.

Tabulka 3 – Měřené prekurzorové a produktové (fragmentační) ionty v modu Targeted- MS^2

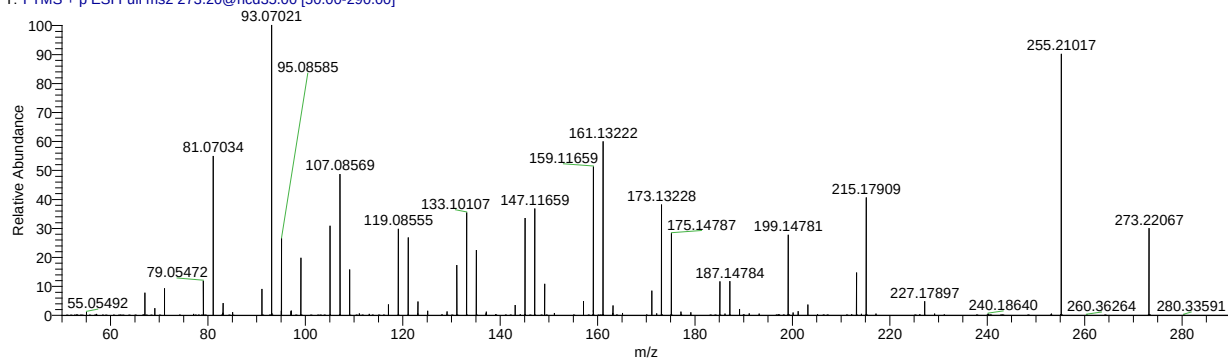
Analyt	Prekurzor iont (m/z)	Produkt iont pro kvantifikaci (m/z)	Další produktové ionty (m/z)	Kolizní energie (eV)
Indol	118.06535	91.05476	95.05448 109.06707	70 70
Skatol	132.08092	117.05719	105.06992	70 70
Androstenon	273.22107	255.21017	215.17909 173.13228 93.07021	35 35 35
4-Androsten-3,17-dion (IS)	287.20059	-	97.06522 109.06473	35 35

AD_FullScan_positive_01_100ug_ml #105 RT: 0.93 AV: 1 NL: 2.76E9
T: FTMS + p ESI SIM ms [250.00-290.00]



Obrázek 3 – Příklad hmotnostního spektra MS¹ Androstenonu
(na hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný iont m/z = 273.22107 odpovídající standardu, včetně jeho izomerů)

AD_MSMS_positive_fragmentace_35eV_02 #62 RT: 0.55 AV: 1 NL: 2.96E8
T: FTMS + p ESI Full ms2 273.20@hcd35.00 [50.00-290.00]



Obrázek 4 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS²) Androstenonu
(v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty m/z = 255.21017, 93.07021, 173.13228 a 215.17909 odpovídající fragmentaci Androstenonu při kolizní energii 35eV)

2.8 Kalibrace a standardizace

Pro kvantifikace je použita metoda „přídavku interního standardu“, každý vzorek je fortifikován roztokem interního standardu IS (4-Androsten-3,17-dion) o koncentraci 100 ng.ml^{-1} tak, aby výsledné množství tohoto interního standardu odpovídalo obsahu ve vzorku $100 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$.

2.9 Management kvality výsledků měření

Na začátek a konec každé sekvence měření jsou zařazeny kontrolní vzorky (QC), připravené z matric, u kterých byla dříve prokázána nepřítomnost sledovaných analytů. QC vzorky jsou fortifikovány roztoky standardů stanovovaných analytů a IS na hladinu koncentrace $100 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$. Odezvy monitorovaných vzorků se porovnávají s odezvami kontrolních vzorků (QC).

2.10 Kvantifikace

Při konfirmačním stanovení se kvantifikace „pozitivních“ vzorků provede výpočtem z matricové kalibrační křivky, která byla naměřena s přídavkem interního standardu. Jako nezávisle proměnná X je zvolena koncentrace analytu a závisle proměnná Y je dána poměrem ploch standardu/internímu standardu.

2.11 Určení nejistoty (chyby) výsledků měření

Nejistota měření byla stanovena dle postupu uvedeného v dokumentu GUM:1995 (Pokyn ISO/IEC 98-3) na základě vyhodnocení dat získaných v průběhu validace metody s využitím standardní směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti ($\text{RSD}_{\text{v-l rep.}}$).

2.12 Uvádění výsledků měření

Výsledek je uváděn ve tvaru: $x \pm U$ ($\text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$)

x naměřená hodnota

U je rozšířená nejistota vypočtená jako $U = 2 * \text{RSD}_{\text{v-l rep.}}$

V případě, že naměřená hodnota je menší než limit rozhodnutí CC_α nebo LOD, pak se výsledek uvede jako **N.D.** („Nedetkováno“ nebo „Not detected“).

Pokud se provádí hodnocení vyhovuje / nevyhovuje („compliant“ / „non compliant“), musí pro hodnocení nevyhovuje („non compliant“) být splněna všechna kritéria požadovaná legislativou.

3. Validace metody

3.1. Popis provedení validace

Validace metody měla za cíl stanovení základních parametrů vypracované analytické metodiky, kterými jsou správnost, přesnost, linearita, kritické meze kalibrace (LOD, LOQ, CC α a CC β), selektivita/specifita a stáblita analytů.

Přesnost metody je definována jako údaj o míře těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek. Přesnost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nevztahuje se ke správné hodnotě. Byla stanovena jako:

Opakovatelnost (Repeatability)

Opakovatelnost je přesnost za podmínek, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmě pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí. Pro stanovení opakovatelnosti se připraví minimálně 6 vzorků téže matrice se stejnou přidanou koncentrací analytu. Z naměřených hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka s (SD Standard Deviation),

Reprodukovatelnost (Reproducibility) jako **Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost** (Within-laboratory reproducibility)

Pro stanovení reprodukovatelnosti se připraví minimálně 6 vzorků dané matrice se stejnou přidanou koncentrací analytu za různých podmínek (např. matrice od různých zvířat, v různých dnech, měření na různých přístrojích). V našem případě byla zvolena veličina provedení v různých časech. Z naměřených hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka s (SD Standard Deviation), a relativní směrodatná odchylka v % (RSD Relative Standard Deviation).

Linearita (Linearity)

Linearita je stanovena měřením kalibrační křivky, která je chápána jako (většinou lineární) závislost mezi dvěma proměnnými, tj. odezvou instrumentace - analytickým signálem (značena jako y) a koncentrací analytu (značenou jako x). Těsnost vzájemné závislosti těchto dvou proměnných charakterizuje korelační koeficient (R). Matematické vyjádření pro lineární regresi – kalibrační přímku je: $y = a + bx$,

kde parametr a je absolutní člen (úsek na ose y), parametr b je směrnice kalibrační přímky. Pro kalibrační přímku validované metody byly stanoveny regresní koeficienty a a b , korelační koeficient R a rozsah kalibrace. Stanovení bylo provedeno na 6 úrovních koncentrace včetně slepého vzorku (nulová koncentrace analytu). Rozsah kalibrace byl 0 - 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a koncentrace interního standardu byla 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Publikované reálně nacházené koncentrace pro jednotlivé analyty u kanečků jsou:

v tukové tkáni kanců se koncentrace androstenonu pohybují až do 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (jako maximální zjištěná koncentrace se uvádí hodnota 15 $\mu\text{g g}^{-1}$), obsah skatolu dosahuje maximálních hodnot do 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Prusa et al., 2011; Haugen et al., 2012).

3.2. Validační parametry

a) Správnost

Správnost není stanovena (např. formou výtěžnosti) z důvodu použití vnitřního standardu (IS) a matricové kalibrační křivky.

b) Přesnost

- **Opakovatelnost** pro vepřové maso (počet měření n=12):

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)
Indol	100	2.10.2016	8,23	4.10.2016	11,0	12.10.2016	4,40
Skatol	100		12,07		8,95		13,70
Androstenon	100		5,60		7,57		5,51

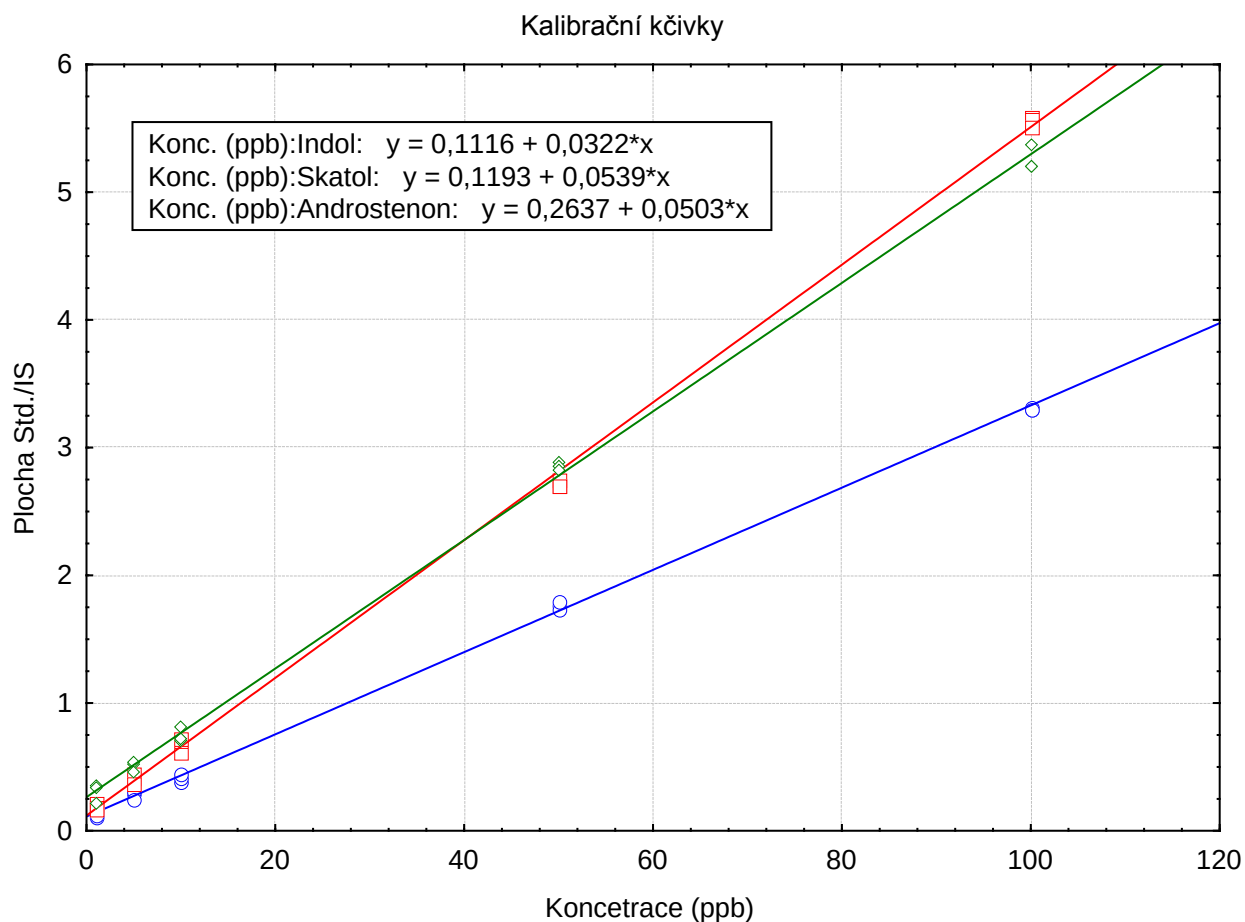
- **Reprodukovatelnost** jako Vnitro-laboratorní reprodukovatelnost (n=36):

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD _{v-l rep.} (%) Maso
Indol	100	14,1
Skatol	100	15,3
Androstenon	100	9,8

c) Linearita

Parametry kalibračních přímek ($Y = a + b \cdot X$):

Analyt	Den kalibrace	a	b	Sa	R
Indol	2.10.2016	0,0567	1,0722	0,0415	0,9699
Skatol		0,0036	0,1049	0,009602	0,9707
Androstenon		0,0249	0,1883	0,01348	0,9866
Indol	4.10.2016	0,0578	1,10122	0,0421	0,9799
Skatol		0,0133	0,1062	0,0091	0,9759
Androstenon		0,0329	0,2183	0,0104	0,9897
Indol	12.10.2016	0,0571	1,0698	0,0378	0,9912
Skatol		0,0052	0,1101	0,0087	0,9789
Androstenon		0,0196	0,1796	0,0129	0,9847



Obr. 5 – Kalibrační křivky pro stanovované analyty (modrá barva odpovídá indolu, červená barva odpovídá skatolu a zelená barva odpovídá androstenonu)

d) Kritické meze dle EC 658/2002 CC α (Decision limit) a CC β (Detection capability)

Anatyt	Maso		Maso s obsahem tuku	
	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Indol	0,09	0,15	0,18	0,31
Skatol	0,21	0,36	0,32	0,54
Androstenon	0,17	0,28	0,18	0,3

Poz: Parametry byly vypočteny dle normy ČSN ISO 11843 a nebo následujících vzorců:

$$\text{CC}\alpha = (2,33 \times S_a) / b$$

$$\text{CC}\beta = \text{CC}\alpha + (1,64 \times S_a) / b$$

d) Robustnost

Nebyla stanovena.

e) Selektivita/specifita

Použitá analytická metoda měření LC-MS/MS s vysokým rozlišením v módu Target-MS² je vysoce selektivní a nevznikají žádné interference mezi analytem a použitou maticí, viz. chromatogramy standardů a čistých matic tkání vepřového masa.

f) Stabilita

Stabilita pro roztoky analytů: - základní roztok: 12 měsíců při -25°C a 4°C.

- pracovní roztok: 4 týdny při 4°C.

Stabilita pro analyty v připraveném vzorku: - **max. 3 dny při 4°C !**

g) Nejistota měření

Postup stanovení rozšířené nejistoty měření byl stanoven dle dokumentu GUM:1995 (Pokyn ISO/IEC 98-3).

h) Kritické hodnoty LOD (Limit detekce) a LOQ (Limit kvantifikace)

Analyt	Maso	
	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Indol	1,14	1,63
Skatol	1,19	1,89
Androstenon	0,68	1,34

Poz.: Hodnoty LOD a LOQ byly stanoveny s využitím naměřených hodnot kalibračních křivek metodou: výpočetem přímou metodou ze signálu – metoda IUPAC.

3.3. Závěr validace

Validace metody Identifikace a kvantitativní stanovení analytů indol, skatol a androstenon metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích tkání vepřového masa potvrdila, že všechny dosažené validační parametry vyhovují publikovaným koncentračním hladinám nálezů v reálných vzorcích masa kanečků.

Tato metodika může být použita pro screeningové nebo konfirmační stanovení indolu, skatolu a androstenonu metodou LC-MS/MS(HR) v analytických laboratořích.

III. Srovnání „novosti postupů“

Byla vyvinutá nová analytická metoda pro komplexní stanovení analytů způsobujících kančí zápach (indol, skatol a androstenon) na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích svalových a tukových tkáních prasat. Použití tandemového hybridního hmotnostního analyzátoru s vysokým rozlišením pro jednoznačnou identifikaci výše uvedených analytů a konfirmační stanovení s využitím kritéria mass accuracy (MA), je zcela nové řešení a podle znalostí autora nebylo dosud publikováno ve vědecké literatuře. Vyvinutá metodika je dále vysoce citlivá pro kvantitativní stanovení všech tří analytů, jak bylo prokázáno validací a splněním všech parametrů požadovaných rozhodnutím 657/2002/EC pro stanovení reziduí organických sloučenin v potravinách, pro konfirmační metody. Postup přípravy vzorků byl modifikován tak, aby celá procedura zpracování vzorků byla maximálně šetrná k vysoce těkavým analytům, především indolu a skatolu na rozdíl od dřívějších postupů publikovaných v literatuře (J. Wauters, 2015, K. Verplanken, 2016).

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Certifikovaná metodika je určena pro orgány statní správy, zejména SVS ČR, ale i pro soukromé uživatele z řad zemědělců, chovatelů prasat a zpracovatelů vepřového masa na jatkách. Metodika byla vyvinutá dle parametrů požadovaných pro konfirmační metody a díky vysoké citlivosti a jednoznačné identifikaci analyzovaných analytů bude uplatněna prioritně jako rozhodčí metodika (konfirmační) v situacích, kdy bude požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí. Metodika ale může být v případě zájmu využívána i rutině, například soukromými subjekty pro prokazování jakosti výrobků a zvýšení např. prestiže, konkurenční výhody atd.

V. Ekonomické aspekty

1. Náklady na zavedení metodiky do laboratoře

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře je možné rozdělit do dvou kategorií. V první kategorii jsou náklady nezbytné na pořízení spotřebního materiálu, standardů a chemikálií na provedení přípravy vzorků a měření na LC-MS/MS. Další náklady souvisí s nákupem drobného hmotného majetku, který je nutný pro provádění metody (pipety, centrifuga, vortexy, odparky apod.). Náklady na analytické zařízení LC-MS/MS(HR) nejsou uváděny, neboť se předpokládá, že laboratoř využívající metodiku LC-MS je již tímto zařízením vybavena.

Náklady na vyšetření jednoho vzorku a vybavení specializované laboratoře jsou uvedeny v následujících tabulkách. Všechny ceny jsou aktuální k datu vydání metodiky a zahrnují DPH.

Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metodiky.

Položka	Obvyklá cena
Pipety 2 ks	10 000 Kč
Centrifuga	22 000 Kč
Thermovap	65 000 Kč
Vortex	8 000 Kč
Celkem	105 000 Kč

Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku podle uvedené metodiky. Kalkulace zahrnuje i průměrné náklady na pozitivní a negativní kontroly na analytické standardy a IS. Kalkulace nezahrnuje náklady na mzdy odborných pracovníků (středoškolský a vysokoškolský pracovník) a náklady na amortizaci použitého analytického zařízení. Tyto náklady mohou být rozhodující pro celkové stanovení ceny za provedení analýzy jednoho vzorku.

Položka	Obvyklá cena
Homogenizace a extrakce vzorku	100 Kč
Interní standard	120 Kč
Standardy analytů	240 Kč
Spotřební materiál (špičky, zkumavky, rukavice a desinfekce)	50 Kč
Celkem	510 Kč

2. Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomické přínosy pro uživatele lze rovněž rozdělit do dvou kategorií: přínosy pro uživatele vyvinuté metodiky z pohledu laboratoře, která bude tuto metodiku provádět, a pak přínosy z pohledu uživatele, tedy vlastního zákazníka v roli objednavatele (např. SVS, soukromí chovatele prasat, atd.).

Ekonomické přínosy pro laboratoř:

- při běžné ceně 4.000,- až 5.500,- Kč za jednu analýzu biologických vzorků pomocí systémů LC-MS/MS (vysoké náklady na analytické zařízení, odpisy a mzdy vysoce kvalifikovaných pracovníků) se přínosy dají vyčíslit jednoduchým vynásobením počtem vzorků zpracovaných v laboratoři za určité časové období, například za 100 analyzovaných vzorků za rok by to byl přínos 400 tis. Kč,
- obecně ale platí, že ceny se tvoří dohodou a v tomto případě platí, že cena za jednu analýzu se významně sníží, pokud bude objednávka smluvená na více vzorků, například cena pro významného zákazníka může být stanovena na 1.500,- Kč při zakázce 200 vzorků ročně, pak ekonomický přínos bude 300 tisíc za rok.

Budoucí ekonomické přínosy pro objednavatele:

- v tomto případě se nedají ekonomické přínosy přesněji vyčíslit, protože metodika byla vyvinutá především jako rozhodčí (konfirmační) pro situace, kdy bude požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí (ale může být i rutině využívána).
- pouze, hypoteticky se dá dovodit, že může nastat situace, kdy bude *nesprávně* rozhodnuto, například státním orgánem pouze na základě orientační zkoušky (senzorické čichové zkoušky), pak náklady na neuskutečněné prodeje vepřového masa a následné soudní spory mohou dosáhnout řádově až na miliony Kč. A lze dovodit řadu dalších nepříznivých situací, které na základě nesprávného rozhodnutí mohou nastat a mohou mít řadu významných ekonomických dopadů.

VI. Seznam použité literatury

K. Verplanken, J. Wauters, V. Vercruyssen, M. Aluwé, L. Vanhaecke, (2016), Development and validation of a UHPLC-HR-Orbitrap-MS method for the simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in porcine meat and meat products, Food Chemistry 190, 944–951,

J. Wauters, J. Vanden Bussche, K. Verplanken, K.M. Bekaert, M. Aluwé, A. Van den Broeke, A. Coussé, N. Buys, L. Vanhaecke, (2015), Development of a quantitative method for the simultaneous analysis of the boar taint compounds androstenone, skatole and indole in porcine serum and plasma by means of ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, Food Chemistry 187, 120–129,

K. Verheyden, H. Noppe, M. Aluwé, S. Millet, J. Vanden Bussche, H.F. De Brabander, (2007) Development and validation of a method for simultaneous analysis of the boar taint compounds indole, skatole and androstenone in pig fat using liquid chromatography–multiple mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1174, 132–137,

J.-E. Haugen, C. Brunius, G. Zamaratskaia, (2012) Review of analytical methods to measure boar taint compounds in porcine adipose tissue: The need for harmonised methods, Meat Science 90 (2012) 9–19,

Jensen, B. B., Kudahl, A. B., Thomsen, R., RASMUSSEN M. K., Kongsted, A. G., Gregersen, V. R., Callesen, H., Bendixen, C., Ekstrand, B., Jensen, K. H. (2014): Alternatives to surgical castration in danish pig production - a position review. DCA - Danish Centre for Food and Agriculture, s. 163, ISBN: 978-87-93176-11-9, Dostupné z: www.dca.au.dk

Bernardy, J. (2010): Kastrace prasat jako evropské dilema. Veterinářství, 60, s. 372-374.

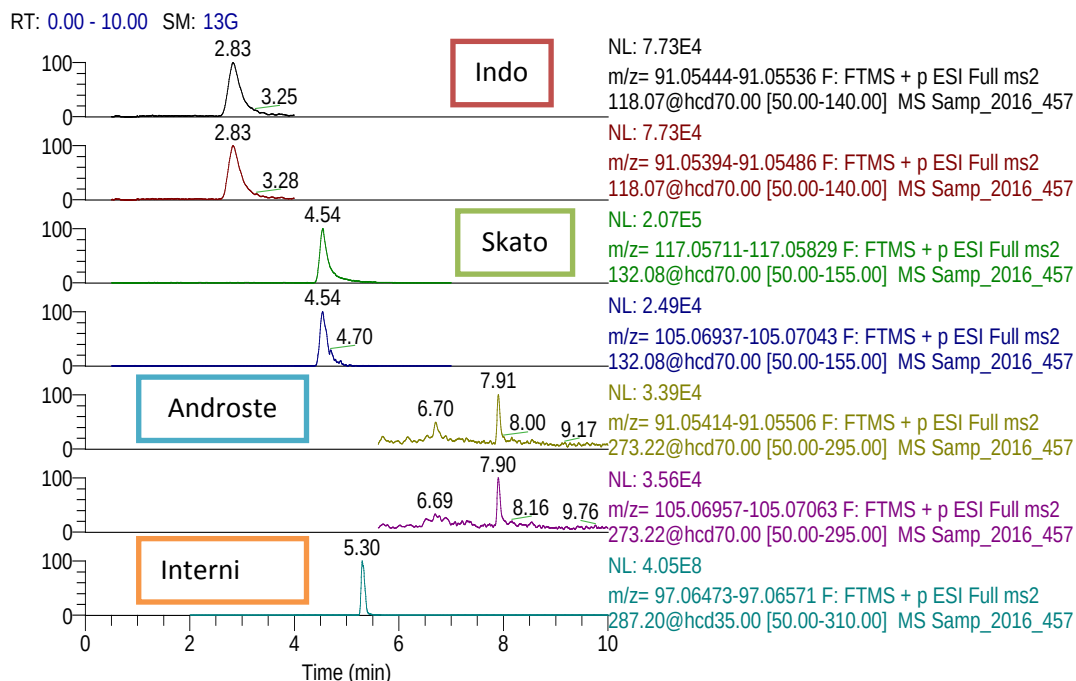
Guide for the expression of uncertainty in measurement. ISO Geneva 1993. (Reprinted 1995: Reissued as ISO Guide 98-3 (2008)). Český překlad: TNI 01 4109-3 Nejistoty měření - Část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995) (Pokyn ISO/IEC 98-3).

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

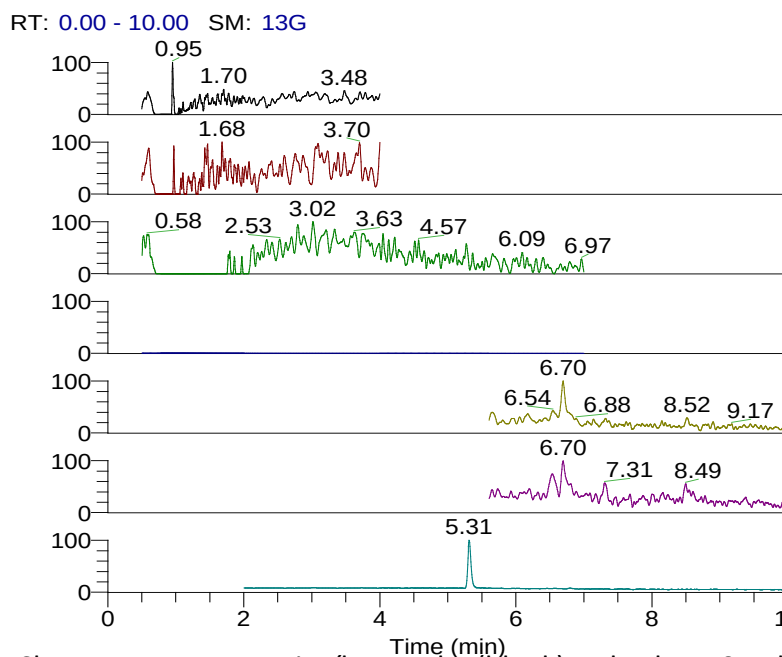
K. Šťastný, Metodologie stanovení metabolitů zodpovědných za kančí pach pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/HR-MS), VÚVeL FEST III. – od výzkumu k praxi, březen 2017.

Celá analytická metodika bude v rámci řešení projektu č. QJ1510233 publikována v impaktovaném časopise v následujícím roce řešení (2018).

Přílohová část



Obrázek 6 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 100 ppb indolu, skatolu a androstenonu



Obrázek 7 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppb indolu, skatolu a androstenonu



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz