

HPLC STANOVENÍ ANDROSTENONU, SKATOLU A INDOLU VE HŘBETNÍM TUKU U PRASAT

MONIKA OKROUHLÁ^a, ROMAN STUPKA^a,
JAROSLAV ČÍTEK^a, DANIELA URBANOVÁ^a,
KAREL VEHOVSKÝ^a a LENKA KOUŘIMSKÁ^b

^a Katedra speciální zootechniky, ^b Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbátov
okrouhla@af.czu.cz

Došlo 8.12.15, přijato 23.2.16.

Klíčová slova: kanec, androstenon, skatol, indol, kapalinová chromatografie, hřbetní tuk

Úvod

Kančí pach je velmi nepříjemný pach uvolňovaný při zahřívání tuku jatečně opracovaných těl kanců. Hlavní látky odpovědné za kančí pach jsou lipofilní sloučeniny androstenon (5α -androst-16-ene-3-on) a skatol (3-methylindol)¹⁵. Androstenon je steroid páchnoucí po moči a potu¹ a je produkován Leydigovými buňkami varlat. Jeho obsah závisí na mnoha faktorech zahrnujících pohlavní vývoj, věk, živou hmotnost zvířete¹⁹. Skatol vzniká mikrobiálním rozkladem tryptofanu v tlustém střevě. Má hořkou chuť¹¹ a dává fekální a naftalenový zápach vzorkům masa¹⁷. Nej důležitějšími faktory, které ovlivňují hladinu skatolu v mase jsou dieta² a chov^{3,10}. Jen skatol a androstenon nejsou zcela odpovědní za kančí zápach¹⁸. Způsobují ho i další sloučeniny, jako je indol a další androstenonové steroidy^{5,6}.

Podle nových právních předpisů Evropské unie nebude od roku 2018 povolena v chovech prasat kastrace kanců bez anestezie. To je důvod, proč se zabývat novými alternativními možnostmi chovu nekastrovaných kanců. Bude třeba stanovit limit pro koncentraci látek způsobujících kančí zápach v mase, která by byla ještě přijatelná pro spotřebitele. V současné době neexistuje harmonizovaná Evropskou unií schválená metoda pro detekci pohlavního pachu samců prasat. Nicméně existuje mnoho chemických metod pro detekci a kvantifikaci koncentrací androstenonu a skatolu v tukové tkáni. Tyto metody jsou založeny na plynové chromatografii⁸, vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC)⁷, spektrometrii nebo kolorimetrii^{13,14}, imunologii a biosenzorech¹².

Cílem této práce bylo vyvinout novou HPLC metodu založenou na popsání metodách^{7,9}, která by byla snadno použitelná v laboratorní praxi a umožnila by stanovovat koncentrace androstenonu a skatolu v tuku prasat.

Experimentální část

Rozsah a aplikace

Androstenon, skatol a indol jsou lipofilní molekuly, které jsou odpovědné za kančí pach. Metoda popsaná v tomto dokumentu se vztahuje na stanovení těchto analytů v hřbetním tuku prasnic, nekastrovaných a kastrovaných kanců.

Princip stanovení

Androstenon, indol a skatol byly extrahovány z roztaženého hřbetního tuku methanolem, dále derivatizovány dansylhydrazinem (5-dimethylaminonafalen-1-sulfohydrazid) a stanoveny HPLC s fluorescenční detekcí za přítomnosti vnitřních standardů.

Odběr hřbetního tuku

Hřbetní tuk byl odebrán 24 hodin po porážce v oblasti mezi 1. a 3. krčním obratlem. Vzorky byly dále vakuově baleny bez kůže a svalů a skladovány do doby stanovení v mrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chemikálie

Indol, 2-methylindol (2-MID), skatol (3-methylindol), androstenon (5α -androst-16-en-3-on), androstanon (5α -androstan-17 β -ol-3-on), dansylhydrazin, hydrogenfosforečnan draselný, methanol (MeOH), 14% roztok fluoridu boritého (BF₃) v methanolu, acetonitril (MeCN), aceton a tetrahydrofuran (THF) pro HPLC byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Demineralizovaná voda byla vyrobena v systému Aqual® 35 (Aqual, Brno, Česká republika). Všechny ostatní chemikálie byly analyticky čisté.

Přístroje a laboratorní vybavení

Mikrovlákná trouba (Eta, Praha, Česká republika), vodní lázeň GFL 1005 (Unimed, Praha, Česká republika), ultrazvuková lázeň RK 255 (Bandelin Sonorex, Hagen, Německo), odstředivka Universal 320 R (Hettich, Tuttlingen, Německo), automatické pipety (Socorex, Ecublens, Švýcarsko) a ostatní laboratorní materiál (Pasteurovy pipety, vialky Robo – 2 a 4 ml včetně ochranných uzávěrů, septa PTFE/silikon, 2ml stříkačky, filtry PFDF – 13 mm, 0,22 μm a mikrozkušky) (Chromservis, Praha, Česká republika).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Jasco sestava (Watex, Praha, Česká republika) HPLC složená ze dvou gradientních čerpadel – 2080 PU Plus, automatického dávkovače AS-2059 Plus, kolonového termostatu CO-2060 Plus, fluorescenčního detektoru FP-2020 Plus, boxu s rozhraním LC-Net II/ADC a softwa-

ru ChromNAV (ver. 1.18.04.). Pro separaci androstenonu byla použita kolona Agilent Eclipse XDB C18 (5 μ m, 150 \times 4,60 mm ID) (Agilent, Santa Clara, USA). Pro skatol a indol bylo využito kolony Kinetex C18 100A (5 μ m, 50 \times 4,60 mm ID) (Phenomenex, Torrance, USA).

Standardní roztoky

Standardní roztoky byly připraveny v následujících koncentracích: androstanon: 5 mg/100 ml methanolu, 2-methyl-indol: 5 mg/100 ml methanolu, androstenon: 6,4 mg/100 ml methanolu, skatol (3-methyl-indol): 0,6 mg/100 ml methanolu.

Roztoky vnitřních standardů (androstanon 5 mg/100 ml a 2-methyl-indol 0,5 mg/100 ml) byly připraveny z 1 ml androstanonu (5 mg/100 ml), 100 μ l 2-methyl-indolu (5 mg/100 ml), 95 ml methanolu a 5 ml destilované vody.

Činidla pro derivatizaci

Dansylhydrazin (DNSH 2 %): 20 mg dansylhydrazinu se odvážílo společně s 1 ml methanolu do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky. Mikrozkumavka se nechala v ultrazvukové lázni předehřáté na 30 až 40 °C temperovat po dobu 15 min. Tento roztok se pro další použití uchovával v chladničce při teplotě 4 °C. Před použitím se opět umístil do ultrazvukové lázně, kde se nechal sediment rozpustit.

BF₃ (14 %): 14% roztok fluoridu boritého (BF₃) v methanolu.

Příprava vzorků

Extrakce tuku z tukové tkáně

Extrakce tuku z tukové tkáně se provedla formou tavení celého vzorku. Hřbetní tuk (10–20 g) byl rozřezán na malé kostičky (0,5 \times 0,5 cm), které se vložily do skleněné láhve s plastovým víkem o objemu 100 ml. Prkénko a skalpel byly po každém vzorku čištěny acetonem. Skleněná láhev byla umístěna do mikrovlnné trouby po dobu dvakrát 1 min při výkonu 350 W. Lahvička s roztaveným tukem byla následně umístěna do vodní lázně předehřáté na 50 °C. Tuk se přenesl pomocí Pasteurovy pipety do 1,5 ml mikrozkumavek a udržoval se ve vodní lázni tak, aby mohl zůstat v kapalném stavu až do odstředění. Mikrozkumavky s roztaveným tukem byly centrifugovány po dobu 20 min při 11 200 g a pokojové teplotě. Vzorky se po odstředění znovu umístily do vodní lázně. Půl gramu (\pm 0,01 g) supernatantu (tuku) se přesně odvážílo do 2 ml mikrozkumavek. Tyto extrahované vzorky byly dále skladovány v chladničce při 4 °C nebo zmrazeny v případě, že vzorek nebyl analyzován ve stejný den, při teplotě –20 °C. Zbytek supernatantu byl umístěn do 2 ml mikrozkumavek a uložen jako rezervní do mrazáku (–20 °C).

Extrakce analytů z čistého tuku

Odvážené vzorky čistého tuku se roztavily ve vodní

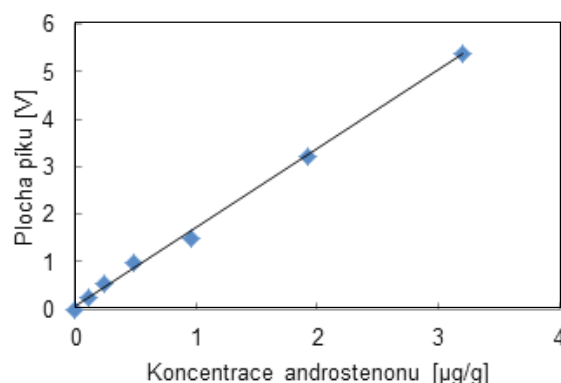
lázni předehřáté na teplotu 50 °C. 1 ml roztoku vnitřního standardu (5 mg/100 ml androstanonu a 0,5 mg/100 ml 2-methyl-indolu) byl přidán do každého vzorku a směs byla 30 s promíchána pomocí Vortexu. Mikrozkumavka se umístila do vodní lázně, aby byl vzorek stále v tekuté formě. Vzorky byly dále vloženy do ultrazvukové lázně předehřáté na 30 °C po dobu 5 min. Následně docházelo k tuhnutí tuku v nádobě s ledem po dobu 20 min. Ochlazené vzorky byly odstředěny po dobu 20 min při 11 200 g při teplotě 4 °C. Supernatant (methanolová fáze) se přefiltroval na nylonovém filtru (13 mm, 22 μ m) za použití 2 ml stříkačky do vialky pro chromatografii. Instrumentální analýza vzorků připravených tímto způsobem začala ihned po extrakci. V případě dalšího uchování byly vzorky skladovány v chladničce při teplotě 4 °C.

Postup derivatizace

Autosampler byl naprogramován na proces derivatizace následovně: 5 μ l 2% dansylhydrazinu v methanolu, 0,1 μ l vzduchu, 2,2 μ l demineralizované vody, 0,1 μ l vzduchu a 5 μ l 14% BF₃ bylo smícháno s 50 μ l extraktu ze vzorku. Po 2 min při teplotě 24 °C bylo 40 μ l směsi (androstenon) nebo 30 μ l směsi (skatol a indol) injektováno do HPLC systému.

Stanovení androstenonu

Pro stanovení androstenonu byla použita kolona Agilent Eclipse XDB C18 (5 μ m, 150 \times 4,60 mm ID) při teplotě 40 °C a mobilní fáze: A – tetrahydrofuran : acetonitril : fosforečnan sodný (25 mM) : kyselina octová (34 : 23,8 : 41,4 : 0,8); B – methanol. Profil gradientu byl následující: 0–3,0 min, 90 % A; 3,0–3,5 min, 90–45 % A; 3,5–15,0 min, 45–5 % A; 15,0–16,1 min, 5 % A; 16,1–17,0 min, 5 až 90 % A; 17,0–19,0 min, 90 % A. Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml min⁻¹ s injekčním objemem 40 μ l. Fluorescenční detekce byla prováděna s excitací při 346 nm a emisí při 521 nm. Pro odečet koncentrace androstenonu



Obr. 1. Kalibrační přímka pro HPLC stanovení androstenonu: $y = 1,6592x + 0,0609$; $R^2 = 0,9979$

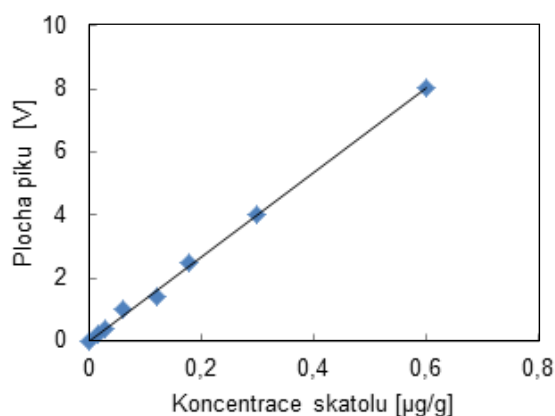
v reálném vzorku byla použita standardní kalibrační křivka (obr. 1).

Stanovení skatolu a indolu

Pro stanovení skatolu a indolu byla použita kolona Kinetex C18 100A (5 μm , 50 \times 4,60 mm ID) při teplotě 40 °C a mobilní fáze: A – fosforečnan sodný (10 mM) a B – methanol. Gradientový profil byl následující: 0–0,2 min, 90 % A; 0,2–6,0 min, 90–55 % A; 6,0–7,0 min, 55–0 % A. Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml min⁻¹ a injekční objem 30 μl . Fluorescenční detekce byla prováděna při excitační vlnové délce 285 nm a emisní vlnové délce 340 nm. Pro odečet koncentrace skatolu a indolu v reálném vzorku byla použita standardní kalibrační křivka (obr. 2).

Standardy pro HPLC

Pro standardizaci androstenonu a skatolu byl použit hřbetní tuk z prasniček poražených do 80 kg živé váhy. Absence androstenonu byla potvrzena HPLC, kde nalezené množství androstenonu a skatolu bylo pod detekčním



Obr. 2. Kalibrační křivka pro HPLC stanovení skatolu: $y = 13,344x + 0,0188$; $R^2 = 0,9983$

Tabulka I

Příprava standardů pro HPLC stanovení androstenonu (A₀–A₆)

Standard	Hřbetní tuk [g]	Zásobní roztok androstenonu [μl] (6,4 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	Koncentrace androstenonu [$\mu\text{g g}^{-1}$]
A ₀	2	0	0
A ₁	2	3,5	0,112
A ₂	2	7,5	0,240
A ₃	2	15	0,480
A ₄	2	30	0,960
A ₅	2	60	1,920
A ₆	2	100	3,200

limitem. Extrakce tuku byla stejná, jako v případě reálných vzorků. Přesně odvážené 2 g tekutého tuku byly umístěny do 4ml lahviček. K čistému tuku bylo ze zásobního roztoku odměřeno požadované množství androstenonu (tab. I). Po 30 s míchání pomocí Vortexu byly lahvičky umístěny do vodní lázně přehřáté na 50 °C. Následně bylo 0,5 g standardů A₀–A₆ rozváženo do 2ml mikrozkušavek. Extrakční postup byl stejný jako v případě reálného vzorku. Lahvičky byly skladovány při –20 °C. Stejný postup jako u androstenonu byl aplikován i pro standardy skatolu. Kalibrační křivka byla připravena ze zásobního roztoku skatolu (tab. II). Standardy byly označeny S₀–S₇.

Výpočet a interpretace výsledků

Výpočet byl založen na kalibračních křivkách vytvořených odděleně pro androstenon, skatol a indol. Jejich identifikace v reálných vzorcích byla provedena za použití vnitřních standardů androstenonu a 2-methylindolu. Výsledky byly vyjádřeny v $\mu\text{g g}^{-1}$ čistého tuku.

Výsledky

Kalibrační křivky standardů

Byly vytvořeny kalibrační křivky standardů pro stanovení androstenonu a skatolu v hřbetním vepřovém sádle. Koncentrace přidaného androstenonu byly na hladině 0; 0,112; 0,24; 0,48; 0,96; 1,92 a 3,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ tuku, standardy skatolu byly v koncentracích 0; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,18; 0,3 a 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ tuku. Kalibrační křivky jsou uvedeny společně s lineárními regresními křivkami a R_2 koeficienty na obr. 1 a 2.

Validační parametry metody

Pět reálných vzorků hřbetního tuku kanců bylo analyzováno pro validaci výše popsané metody HPLC. Opakované stanovení androstenonu a skatolu bylo provedeno za stejných analytických podmínek. Z výsledků uvedených v tab. III je zřejmé, že hodnoty opakovaných měření získané modifikovanou HPLC metodou ukazují na nízký rozptyl.

Tabulka II
Příprava standardů pro HPLC stanovení skatolu (S₀–S₇)

Standard	Hřbetní tuk [g]	Zásobní roztok skatolu [μl] (0,6 μg/100μl)	Koncentrace skatolu [μg g ⁻¹]
S ₀	2	0	0
S ₁	2	5	0,015
S ₂	2	10	0,030
S ₃	2	20	0,060
S ₄	2	40	0,120
S ₅	2	60	0,180
S ₆	2	100	0,300
S ₇	2	200	0,600

Tabulka III
Výsledky validace HPLC stanovení androstenonu a skatolu

Vzorek	n ^a	Koncentrace [μg g ⁻¹] (x ± SD) ^b	
		androstenonu ve hřbetním tuku	skatolu ve hřbetním tuku
1	5	4,57 ± 0,172	0,22 ± 0,005
2	5	2,97 ± 0,195	0,15 ± 0,003
3	5	5,45 ± 0,141	0,20 ± 0,005
4	5	2,51 ± 0,111	0,15 ± 0,002
5	5	3,01 ± 0,042	0,15 ± 0,004

^a n – počet vzorků, ^b x – aritmetický průměr, SD – směrodatná odchylka

Diskuse

Výsledky získané ve studii autorů⁹ ukazují, že HPLC stanovení androstenonu je přesnější než jiné techniky. Autoři⁴ rovněž vyvinuli modifikovanou HPLC metodu pro stanovení skatolu a indolu bez použití acetonitrilu v plazmě prasat. Koncentrace skatolu v tukové tkáni a plazmě obvykle vysoce korelují²⁰, a proto také může být krev vhodným zdrojem pro detekci komponent kančího pachu. Zde prezentovaná nová modifikovaná metoda pro detekci složek kančího pachu používá jako vzorek extrahovaný tuk ze hřbetu prasat, a to umožňuje detekci analytů jak u jatečně opracovaných těl, tak u masa z potravinového řetězce. Pro stanovení androstenonu byla v práci použita modifikovaná metoda, která vycházela z práce⁹ (mobilní fáze) a studie⁷ (gradient). Sestava HPLC, typ kolony, derivatizace, průtokový tlak a injekční objem byly optimalizovány na základě pokusného testování. Použitá metoda stanovení skatolu a indolu částečně vychází ze studie⁹, ale všechny fáze stanovení byly modifikovány pro naše účely.

Závěr

Metoda byla vyvinuta za použití chemických standardů složek kančího pachu. Kalibrační křivky vykázaly lineární závislost v použitém rozsahu koncentrací. Detekční limity pro androstenon a skatol byly 0,24 a 0,03 μg g⁻¹ tuku. Tyto hodnoty nepřekračují práh lidského vnímání, který je 0,5 až 1,0 μg g⁻¹ pro androstenon a 0,2 až 0,5 mg g⁻¹ pro skatol¹⁶. Stanovení indolu lze realizovat za použití analogické metody používané pro skatol za použití indolu jako standardu pro kalibraci a stanovení.

Koncentrace sloučenin kančího pachu, které byly pod prahem lidského vnímání, byly touto metodou úspěšně detegovány a kvantifikovány. Všechny standardy byly také analyzovány odděleně k ověření jejich identifikace. Metoda byla upravena tak, aby píky analytů obsažených ve směsi byly dobře odděleny. Všechny komponenty kančího pachu byly také úspěšně detegovatelné v reálných vzorcích hřbetního tuku kanců.

Tato práce byla podpořena S grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a projektem č. MSM 6046070901.

LITERATURA

1. Aldal I., Andresen O., Egeli A. K., Haugen J. E., Grodum A., Fjetland O., Eikaas J. L. H.: *Livest. Prod. Sci.* 95, 121 (2005).
2. Aluwé M., Millet S., Nijs G., Tuytens F. A. M., Verheyden K., De Brabander H. F., De Brabander D. L., Van Oeckel M. J.: *Meat Sci.* 82, 346 (2009).
3. Bonneau M.: *Meat Sci.* 49, 257 (1998).
4. Brunius C., Zamaratskaia G.: *Acta Vet. Brno* 81, 153 (2012).
5. European Food Safety Authority (EFSA): *The EFSA Journal* 91, 1 (2004).
6. Garcia-Regueiro J. A., Diaz I.: *Meat Sci.* 25, 307 (1989).
7. Hansen-Møller J.: *J. Chromatogr. B* 661, 219 (1994).
8. Haugen J. E., Brunius C., Zamaratskaia G.: *Meat Sci.* 90, 9 (2012).
9. Chen G., Zamaratskaia G., Andersson H. K., Lundström K.: *Food Chem.* 101, 439 (2007).
10. Jensen M.T., Cox R.P., Jensen B.B.: *Animal Sci.* 61, 293 (1995).
11. Lundström K., Malmfors B., Malmfors G., Stern S., Petersson H., Mortensen A. B., Sorensen S. E.: *Livestock Prod. Sci.* 18, 55 (1988).
12. Lundström K., Matthews K. R., Haugen J. E.: *Animal* 3, 1497 (2009).
13. Mortensen A. B.: *Unites States Patent* 4,563,428 (1983).
14. Mortensen A. B., Sørensen S. E.: *In Proceedings of the 30th European Meeting of Meat Research Workers*, Bristol, UK, Sept. 9–14, 1984, str. 394.
15. Patterson R. L. S., Elks P. K., Lowe D. B., Kempster A. J.: *Anim Prod.*, 50, 551 (1990).
16. Øystein A.: *Acta Vet. Scand.* 2006, 48.
17. Rius M. A., Garcia-Regueiro J. A.: *Meat Sci.* 59, 285 (2001).
18. Rius M. A., Hortos M., Garcia-Regueiro J. A.: *Meat Sci.* 71, 595 (2005).
19. Walstra P., Claudi-Magnussen C., Chevillon P., von Seth G., Diestre A., Matthews K. R., Homer D. B., Bonneau M.: *Livest. Prod. Sci.* 62, 15 (1999).
20. Zamaratskaia G., Babol J., Madej A., Squires E. J., Lundström K.: *Reprod. Domest. Anim.* 39, 168 (2004).

M. Okrouhlá^a, R. Stupka^a, J. Čítek^a, D. Urbanová^a, K. Vehovský^a, and L. Kouřimská^b (^a *Department of Animal Husbandry*, ^b *Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiological Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic*): **Method for Determination of Androstenone, Skatole and Indole in Dorsal Fat of Pigs**

The aim of the study was to improve a high performance liquid chromatography method for determination of substances responsible for boar taint in pig fat in order to achieve an easily applicable procedure in laboratory practice. Androstenone and skatole were extracted by methanol from melted fat, derivatized with dansylhydrazine and detected using a high performance liquid chromatography method with a fluorescence detection in the presence of internal standards. The calibration curves showed a linear dependence in the concentration ranges used ($R^2 = 0.9979$ for androstenone and 0.9983 for skatole). The limits of detection were $0.24 \mu\text{g g}^{-1}$ of fat for androstenone and $0.03 \mu\text{g g}^{-1}$ of fat for skatole. Five real samples of boar dorsal fat were analysed to validate this modified method. Androstenone and skatole were well detectable in real samples. Values obtained in repeated measurements showed only low variance. The method allowed us to detect and quantify the concentrations of boar taint compounds below the threshold of human perception.