



TEKNOLOGISK
INSTITUT
DMRI

Rapport

Samtidig måling af skatol og androstenon

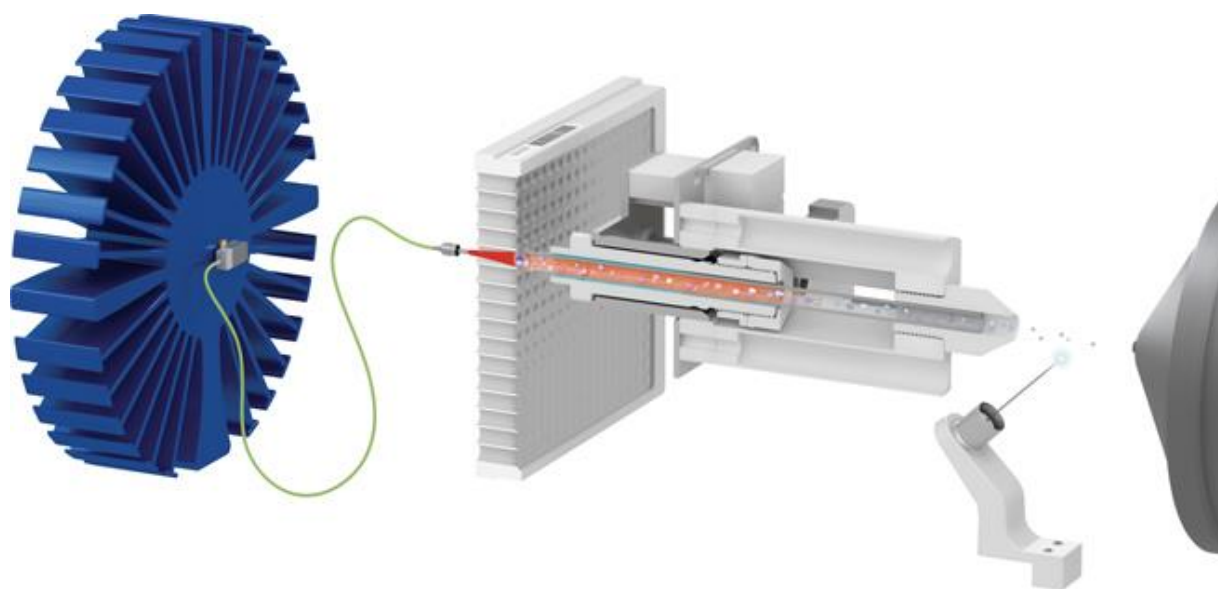
Slutrapport

4. december 2017
Proj.nr. 2002985
Version 1
CBO/RUB/BWGL/MT

Claus Borggaard, Rune Isak Dupont Birkler, Birgitte Lund

Et SAF-/GUDP-støttet projekt

Projektperiode: 2015-2017



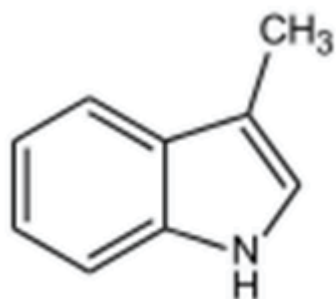
Indholdsfortegnelse

Baggrund for projekt	4
Sammenfatning	5
Kravspecifikationer	7
Valg af metode	8
Kunstige næser	8
SIFT og PTR-TOF-MS	9
Ion Mobility Spectrometry	10
MALDI (Matrix Assisted Laser Diode Ionization)	10
Den valgte metode, LDTD-MS/MS.....	11
Prøveforberedelse	12
Måling i LDTD-MS/MS	13
Specielle problemer med måling af skatol i LDTD	14
Instrument settings for LDTD og MS/MS.....	16
Betydningen af de interne standarder	18
Kalibreringskurver for androstenon og skatol.....	20
Regneeksempel	22
Øvre vægtgrænse for spækprøve.....	22
Metodevalidering	23
Valideringsresultater	24
Konklusioner for langtidstest	26
Implementering på slagteri	28
Prøvetagning på slagtelinje – det gamle skatolanlæg.....	28
Prøvetagning på slagtelinje – en nyudviklet modtagestation	28
Transport af prøve, slagtegang-laboratorium	29
Indretning af laboratorium	31
Automatisering af laboratoriet.....	31
Væskebehandlingsstationen	32
Homogeniseringsstationen.....	33
Centrifugen.....	34
Overførsel til LazWell™-plade.....	35

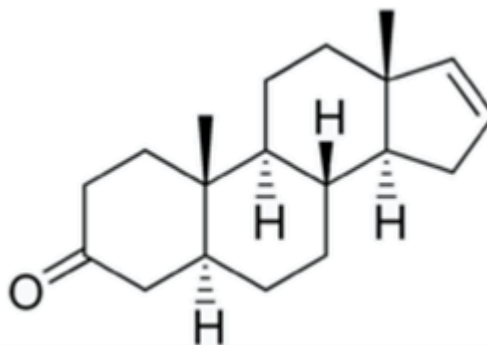
Overførsel til LazWell™-plade fra ikke-fyldte 24 brønds plader	36
ID-håndtering, stregkodelæser	36
Væsketilsætning, centrifugering og pipetteringsstation, alt i én enhed	37
Output fra Luxon-MS/MS-målesystemet	38
Pladebuffer, pladehoteller	38
Robotter til flytning af plade mellem analyseudstyrets delsystemer	39
Kørsel af spækstandarder	40
Kørsel af spækprøver fra andre slagterier eller omprøver	40
Morgenkontrol af systemets tilstand	41
Timing af den automatiske analyse	42
Anslåede omkostninger forbundet med installationen på slagteri	43
Udstyrsinstallation	43
Pris pr. analyse	44
Forbedringsmuligheder	45
Bilag 1. Måleprincip ved afprøvning af PTR-TOF-MS	46
Bilag 2. LDTD-MS/MS	48
Bilag 3. MS-indstillinger	50
Bilag 4. DWP og LazWell™-plade-formater	51
Bilag 5. Robotcentrifuge fra Hettich	52
Bilag 6. Er det lige meget, hvor stor spækormen er?	53

Baggrund for projekt

Det overordnede formål med projektet er at forberede kødindustrien på et evt. ophør med kastration ved at identificere en målemetode til sortering af hangrise og ved at indgå som partner i EU-initiativer vedrørende metoder til måling og sortering af hangrise. Projektets konkrete mål er at forberede udviklingen af et måle-/sorteringssystem, der i tilstrækkeligt omfang opfylder de krav, der fremkommer i forbindelse med slagtning og kvalitetssikring af hangrise. I samarbejde med kødindustrien er der udarbejdet en kravspecifikation for et måleudstyr, der imødekommer slagteriernes behov for sortering af hangrise efter ornelugt. Projektet skal identificere et egnet målesystem og præcisere, hvorledes metoden kan opfylde den udarbejdede kravspecifikation.



Skatol



Androstenon

Sammenfatning

I projektet er der udviklet en objektiv instrumentel laboratoriemetode til måling af androstenon og skatol i rygspæk fra hangrise. Metoden opfylder de stillede krav fra større danske svineslagterier til analysepris, svartider, målehastighed, reproducerbarhed og nøjagtighed. Herudover kan metoden implementeres som fuldautomatisk analyse på slagterier.

Den benyttede metode

Der benyttes en tandem MS-metode med *laser diode termisk desorption* af indtørret ekstrakt og med kemisk ionisation ved atmosfærisk tryk (LDTD-MS-MS). Ved metodevalget blev der set på fem forskellige analysemetoder, som principielt lever op til krav om nøjagtighed og brugbarhed i et industrielt miljø. LDTD-MS-MS-metoden blev udvalgt som den eneste af metoderne, der til fulde lever op til kravspecifikationerne.

Kapacitet

Med et enkelt LDTD-MS-MS-instrument kan der foretages 360 kemiske analyser pr. time, svarende til 2.880 analyser på en 8 timers arbejdsdag.

Det valgte udstyr vil kunne arbejde 16 timer pr. døgn.

Svartider, fra prøveudtag på slagtelinje til resultat foreligger i slagtegangsdatabasen, kan holdes under 45 minutter.

Validering

Metoden har detektionsgrænser for androstenon og skatol på henholdsvis 0,05 mg/kg spæk og 0,02 mg/kg spæk. Mindste kvantificerbare koncentrationer i rygspæk er 0,1 mg/kg og 0,05 mg/kg for henholdsvis androstenon og skatol. Tallene er væsentligt under de grænser, slagterierne fremover ventes at benytte til frasortering af hangrise med uacceptabel lugt.

Automatisering

I nærværende projekt er automatiseringen af arbejdsgangen i laboratoriet beskrevet. Forslag til automatiseringsudstyr til denne del baseres videst muligt på hyldevarer, som altid vil kunne skaffes.

Det er muligt at automatisere hele måleprocessen, fra og med prøveudtag på slagtelinjen til og med analyseresultatet foreligger i slagtegangsdatabasen. Det eksisterende prøveudtagningsudstyr og prøvetransportsystem mellem slagtelinje og laboratorium til det gamle skatolanlæg hos Danish Crown i Ringsted skal erstattes med et nyt.

Bemanding og vedligehold

Med mindre prøveudtagningen på slagtelinjen fuldautomatiseres, vil der i gennemsnit være behov for én mand på fuld tid til at udtage prøver på slagtelinjen. Herudover skal der bruges en halvtidslaborant i laboratoriet til pasning af måleudstyret. I laboratoriet skal der med passende mellemrum køres kontrolprøver, og der skal sørges for ekstraktionsvæsker og engangsartikler til laboratorieroboter. Herudover skal der gennemføres en morgenkontrol af udstyret, som omfatter daglig rengøring og kontrol af målenøjagtighed.

Analyseomkostninger

Analyseomkostninger kan holdes under 7,40 kr. (1€) pr. hangris. Dette beløb dækker kemikalier samt engangsartikler og vil kunne betale for periodisk forebyggende eftersyn og tilkald af specialister ved nedbrud.

Anbefalinger til installation på slagteri

Prøveudtagningsudstyret udviklet til det gamle skatolanlæg skal om-designes og fornyes. Der skal udvikles et nyt biopsiværktøj (prøvetagningspistol) til slagtegangen. Til transport af prøver mellem slagtegang og laboratorium skal der indkøbes og opstilles et standard conveyor-system til prøvekassetter. Datasystemer til håndtering af prøve-ID skal ny-udvikles, og ID-systemet skal kunne håndtere prøver, der ankommer fra andre slagtesteder, typisk mindre slagterier, hvor det ikke betaler sig at indrette det fornødne laboratorium.

I tilfælde af nedbrud på et delelement i systemet skal problemet løses hurtigt. Det anbefales, at enkelte kritiske komponenter indkøbes i dublet, således at det defekte delelement hurtigt kan udskiftes, og analysen kan fortsætte.

Kravspecifikationer

I starten af projektet er der i samarbejde med styregruppemedlemmer fra to slagteriselskaber opstillet kravspecifikationer til et fremtidigt anlæg til samtidig måling af skatol og androstenon. Disse krav er i store træk også blevet anerkendt i europæisk regi gennem DMRI's deltagelse i et fælles europæisk projekt kaldet BoarCheck.

Kravene er:

1. Systemet skal som minimum kunne måle skatol og androstenon samtidig på en udtaget spækprøve.
2. Målingen skal være instrumentel og derfor objektiv.
3. Analyseresultater skal kunne verificeres.
4. Måleresultater skal, som hovedregel, være tilgængelige i slagtegangsdatabase, inden slagtekroppen når frem til udligningsrummet (gælder ikke for prøver, der ankommer fra andre slagtesteder).
5. Et enkelt udstyr skal mindst kunne levere 300 resultatsæt pr. time.
6. Målingen skal være specifik for de målte analytter, hvilket vil sige uden interferenser fra ikke-relevante forbindelser i spækket.
7. Reproducerbarheder, målt som relativ varianskoefficient (CV), skal for både skatol og androstenon være på niveau med eller bedre end det, som opnås ved skatolmålingen med det eksisterende skatolanlæg i Ringsted.
8. Metoden skal være robust, og tiden mellem større serviceeftersyn, der kræver specialistbesøg, skal være mindst 3-6 måneder, afhængigt af belastning.
9. Større serviceeftersyn skal kunne gennemføres af en fagmand i løbet af en weekend.
10. Dagligt vedligehold og eftersyn skal kunne varetages af slagteriets egne laboranter.
11. Omkostninger til selve analysen må ikke overstige 10 kr. pr. hangris.

Valg af metode

Som referencemetode til måling af hangriselugtkomponenter benyttes typisk gas chromatography (GC) eller high performance liquid chromatography (HPLC) – ofte i kombination med massespektroskopi (MS).

DMRI har en metode, der udelukkende baserer sig på HPLC med UV-detektion, som er anvendt som referencemetode.

I princippet kunne sådanne systemer godt bruges som udgangspunkt for et system til online-måling på slagterier.

Grundene til, at GC-MS og HPLC-MS er fravalgt som mulig online-løsning til brug på slagterier, er:

- Metoderne kræver en effektiv oprensning af prøverne, inden ekstrakt kan injiceres i kolonnerne.
- Kolonner bliver let forurenede og skal derfor skiftes med jævne mellemrum.
- Kromatografidelen i analysen tager typisk 30 minutter. En enkelt metode er beskrevet med en gennemløbstid på 6 minutter, men den korte kolonne går voldsomt ud over specificiteten i analysen. Dette betyder, at et GC eller HPLC kolonnebaseret online-system skal have mellem 36 og 180 kolonner arbejdende i parallel for at leve op til krav til hastighed.

Følgende metoder blev fundet interessante:

- Kunstige næser.
- SIFT (Selected-Ion Flow-Tube mass spectroscopy).
- Ion mobility spectrometry.
- PTR-TOF-MS (Proton Transfer Reaction – Time Of Flight – Mass spectroscopy).
- MALDI (Matrix Assisted Laser Diode Ionization).
- LDTD-MS-MS (Laser Diode Thermal Desorption – Tandem Mass spectroscopy).

Kunstige næser

Kunstige næser består typisk af mellem 12 og 40 sensorer, som hver for sig responderer på forskellige molekyler, der sætter sig på deres overflade. Sensorerne kan være belagt med halvledermaterialer eller ledende polymerer, som ændrer karakteristisk, når forskellige lugtforbindelser sætter sig. Adskillige europæiske forskningsinstitutioner har uden held forsøgt at benytte teknikken til at måle graden af hangriselugt i headspace over opvarmede fedtprøver.

Der er flere grunde til, at teknikken ikke egner sig til formålet:

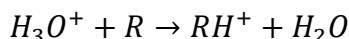
- De enkelte sensorer og kombinationen af dem er ikke selektive nok til at reagere på enkeltkomponenter i dampene fra komplekse objekter som opvarmet fedt.
- Sensorerne bliver mættet med forbindelser og skal renses efter hver prøve.
- Sensorsystemet skal kalibreres, da det er vanskeligt at fremstille 2 sensorsystemer, som reagerer ens.
- Kunstige næser har vanskeligt ved at kvantificere på grund af manglende selektivitet. Responset er i høj grad kvalitativt.
- Androstenon er meget lidt flygtigt og vil ofte forekomme i headspace i mængder, som ikke er detekterbare med denne teknik.

SIFT og PTR-TOF-MS

Instrumenttypen bruges til at måle forureninger i luft. Idéen med at bruge disse systemer til måling af androstenon og skatol i fedtprøver var at opsamle headspace-luft fra opvarmede prøver og analysere denne direkte for tilstedeværelsen af de to komponenter.

Ved SIFT og PTR-TOF-MS ioniseres ren, fugtig luft. I SIFT bruges mikrobølger til at ionisere den fugtige luft, og i PTR-TOF-MS bruges en byge af elektroner. Via et sæt af kemiske reaktioner genereres der et antal ioner med sammensætningen H_3O^+ , NO^+ og O_2^+ . Disse benævnes primære ioner.

Den rene luft med primære ioner bringes nu til at reagere med den luft, som skal analyseres, hvorved analytterne også ioniseres. I SIFT måles mængden af dannede primære ioner i MS-systemet, når der kun tilføres ren, fugtig luft. Herudover måles der på de produktioner, der dannes, når primærionerne reagerer med urenhederne, der er i prøveluften (headspace over fedtprøven).



I ovenstående reaktion har en primær ion (oxonium ion) reageret med en analyt (eksempelvis skatol benævnt R) og overført en proton til denne, hvorved den bliver til (RH^+).

RH^+ -ionen kan måles i massespektrometeret, og analyttens koncentration i det headspace, hvorpå der måles, kan efterfølgende beregnes ud fra kendskabet til hastighedskonstanten i ovenstående reaktion og den tid, hvori reaktionen foregår.

Grunden til, at disse to metoder blev fravalgt, er:

- De er vanskelige at gøre kvantitative, idet metoderne bygger på, at der er opnået en ligevægt mellem fedtprøven og den headspace-luft, der måles på.
- DMRI har afprøvet PTR-TOF-MS-metoden. Her viste det sig, at tiden til opnået ligevægt mellem spæk og headspace var meget forskellig for de to forbindelser – skatol og androstenon. Her blev fedtet opvarmet til 180°C.
- Ved begge systemer benyttes kun et enkelt MS-trin, hvilket bevirker, at der kan være interferenser fra andre forbindelser i spækket.
- PTR-TOF-MS-forsøg viste, at der skulle måles over en længere periode, for at MS-signalerne var tilpas støjsvage til en brugbar kvantificering.

Testopstilling og yderligere dokumentation for fravalget af headspace-metoden er vist i bilag 1.

Ion Mobility Spectrometry

Der foreligger en patentapplikation fra 2002 (EP1233267A1) af Reijer Van Dijk fra TNO, Holland. Ifølge den beskrevne metode opvarmes et område på slagtekroppen, imens den hænger på slagtelinjen, eller der varmes på en udtaget spækprøve, som er fragtet til et laboratorium. Til opvarmningen benyttes en infrarød laser, og opvarmningen skal styres, så overfladetemperaturen ligger i intervallet 40-70°C. De flygtige forbindelser, der blev frigivet ved opvarmningen, heriblandt androstenon og skatol, suges ind i et Ion Mobility Spectrometer, hvor komponenterne ioniseres med en UV-lyskilde og efterfølgende separeres baseret på ionernes vægt, struktur og ladning. Systemet fungerer ved, at ionerne drives frem af et elektrisk felt, alt imens de mødes af en modsatrettet luftstrøm. Detektion sker med en tidsopløst Faraday-detektor.

Ion Mobility Spectrometer er fravalgt af følgende grunde:

- Det er tydeligt, at metoden ikke giver den fornødne reproducerbarhed eller selektivitet – ellers ville metoden have været implementeret for længe siden.
- Det er tydeligt, at patentet er indsendt baseret på en idé og ikke på faktiske eksperimenter.
- Desuden er Ion Mobility Spectrometry velegnet til luftforureningsmålinger, hvor der er få interfererende forbindelser, og i mindre grad til komplekst sammensatte matricer, så som headspace over en opvarmet fedtprøve.

MALDI (Matrix Assisted Laser Diode Ionization)

Ved denne metode beskydes en prøve i korte pulser med enten en UV- eller en infrarød laser. Prøven kan være tilsat forbindelser, der let ioniseres ved laserbeskydningen, og som overfører ladning til de forbindelser i prøven, der skal analyseres for. Der kan også være forbindelser i selve matricen, som fremmer ioniseringen af analytterne. Som detektor benyttes typisk en TOF (time of flight) MS.

Fordi laserbeskydningen er en stokastisk proces, bruges metoden ikke til kvantificering, men som en effektiv og hurtig screeningsmetode til at identificere forbindelser i en komplekst sammensat prøve. Forskere med baggrund i teknikken påpeger, at metoden kan gøres kvantitativ ved at beskyde prøven et større antal gange med laseren og efterfølgende at tage middelværdien af alle enkeltmålinger.

Metoden blev fravalgt i dette projekt, fordi den ville kræve et omfattende udviklingsarbejde, og fordi der var tvivl om dens evne til at reproducere kvantitative målinger.

Den valgte metode, LDTD-MS/MS

Den i projektet valgte metode, som er udviklet af virksomheden Phytronix, Quebec, Canada, benævnes Laser Diode Thermal Desorption – MS/MS. Det var Phytronix-ambitionen at udvikle en analysemetode med samme selektivitet og reproducerbarhed som standardmetoder baseret på HPLC og GC med MS/MS-detektion, men med meget kortere analysetider og mere enkel forbehandling.

LDTD-MS/MS-systemet lever op til de på forhånd stillede krav til hastighed og selektivitet.

Specifikationer:

1. Ét sæt måleresultater (androstenon og skatol) hver 10. sekund, op til 2.880 hangrise på en 8 timers arbejdsdag.
2. Robusthed (lang tid mellem service, preventive maintenance).
3. Dagligt vedligehold kan varetages af slagteriets egne laboranter.
4. Tilstrækkelig god selektivitet, reproducerbarhed og lav detektionsgrænse.

For en mere udførlig gennemgang af LDTD-MS/MS systemet henvises til bilag 2.

Prøveforberedelse

Følgende hovedkrav stilles til prøveforberedelsen.

- Lavt forbrug af kemikalier.
- Lavt forbrug af engangsartikler.
- Lav pris (helst under 1 € pr. hangris i kemikalier og forbrugsvarer).
- Den skal kunne fuldautomatiseres.
- Prøveforberedelsen skal kunne gennemføres inden for et tidsrum, som er foreneligt med krav til analysehastighed.

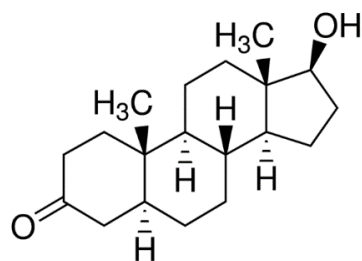
Der anvendes en spækprøve på mellem 0,3 og 0,6 g fra hangrisens nakkespæk. Prøven er udtaget ved hjælp af et hult bor på slagtelinjen eller fra hangrisekroppe i udligningsrummet. Prøven anbringes i et tareret plastcentrifugerør med en arbejdsvolumen på 10 ml, og prøvens vægt bestemmes med 3 betydende cifre.

Der gennemføres en SALLE-ekstraktion (salt assisted liquid-liquid extraction), ved at der tilsættes 1,5 ml acetonitril (CAS no. 75-05-8), som er spiket med interne standarder – 167 ng/ml deutereret skatol (CDN Isotopes, 3-methyl-d₃-indole, CAS no.111399-60-1) og 833 ng/ml androstanon (5 α -androstan-17 β -3-one, Sigma-Aldrich, CAS no. 521-18-6, >97,5% renhed) Herefter tilsættes 1,5 ml mættet saltvand (brine) iblandet 0,08 N natriumhydroxid. Ved udviklingen af analysen i laboratoriet er der benyttet natriumchlorid (CAS no. 7647-14-5) og natriumhydroxid (CAS no. 1310-73-2) med en standardanalysekvalitet.

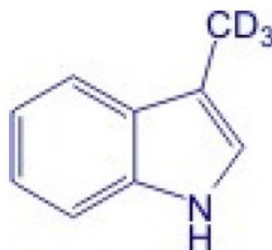
Indholdet af centrifugerøret homogeniseres i 45 sekunder med en Polytron PT3100D homogenisatormotor med en PTG 12/2 standardstav (Ø 12).

Rør med indhold centrifugeres nu ved ca. 5.000 G i 5 minutter. Centrifugeringen resulterer i, at blandingen opdeles i 3 fraktioner, nederst saltvand, i midten et kompakt lag fedt og øverst acetonitril-fraktionen.

Det er på acetonitril-fraktionen, LDTD-MS/MS analysen foretages.

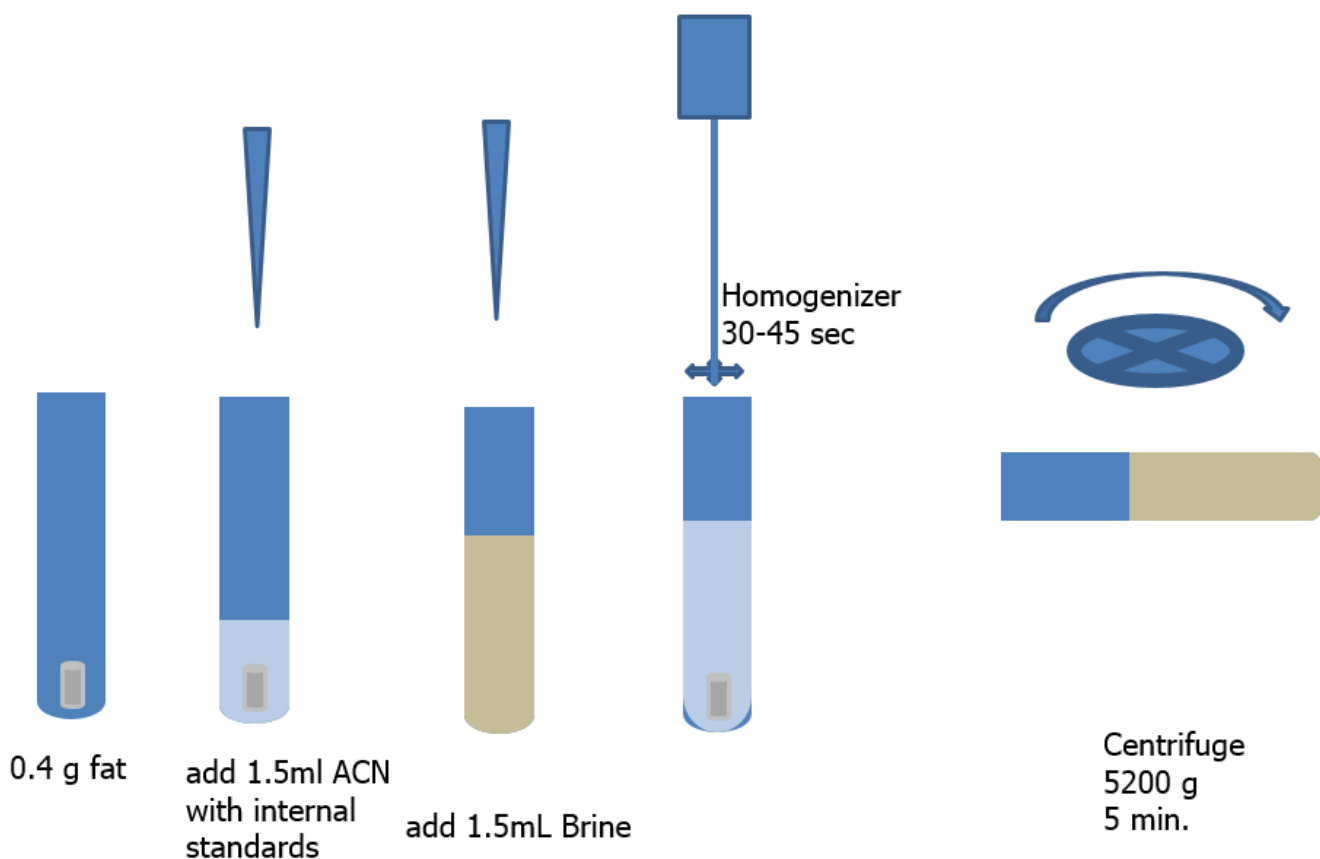


Struktur: 1: 5 α -androstan-17 β -3-one, brugt som intern standard analog for androstenon.



Struktur: 2: 3d-skatol, deutereret skatol som intern standard for skatol

I figur 1 er SALLE-ekstraktionen vist skematisk.

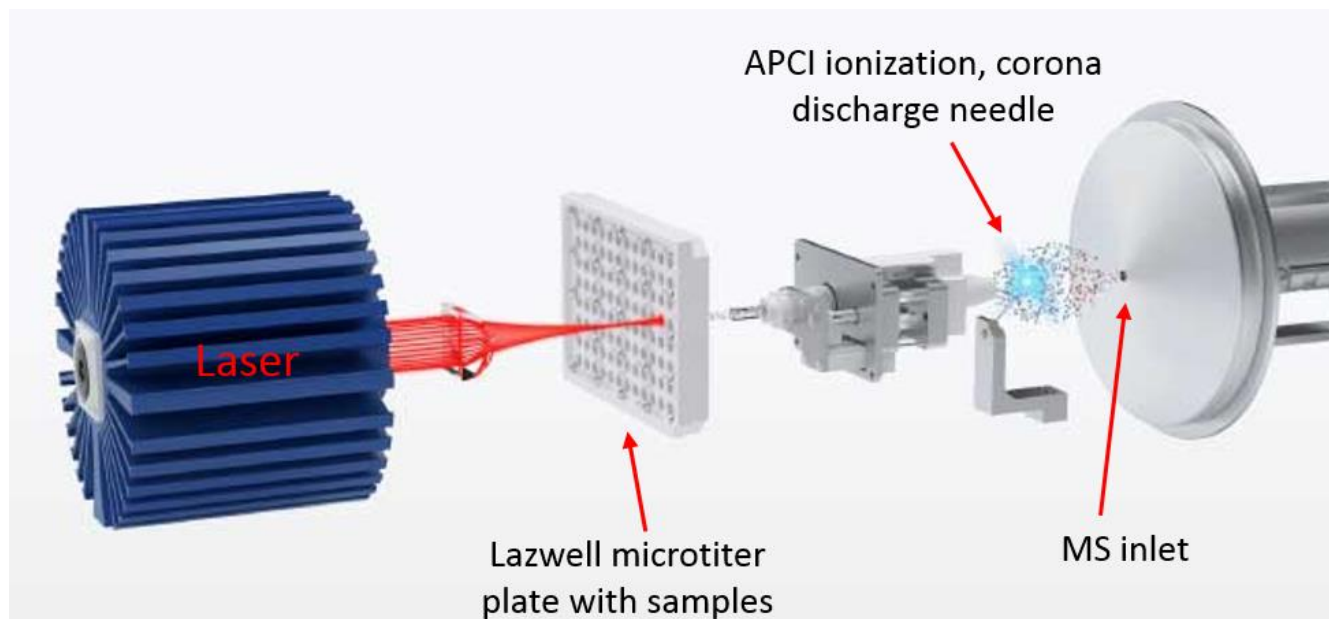


Figur 1. Skematisk visning af ekstraktionsprocessen.

Måling i LDTD-MS/MS

Efter centrifugeringen overføres 2-4 μ l supernatant (acetonitrilfraktionen) til en brønd i en 96 brønds LazWell™-plade. LazWell™-pladen ligner en normal mikrotiterplade i SBS-format, men er særlig ved, at dens bund består af en tyndt metal folie, som kan opvarmes fra undersiden med en laserstråle (se figur 2 og bilag 4).

LazWell™-pladen med den påsatte væskedråbe stilles til tørre i et par minutter, til der kun er tørstof tilbage i hver brønd. Pladen sættes i LDTD-udstyret, hvor målingen foretages.



Figur 2. Måleprincip for LDTD-udstyret. En laser opvarmer metalfoliebunden under en prøve. Prøvematerialet sublimerer (desorberes), og en luftstrøm fører forbindelserne forbi et kraftigt elektrisk felt, hvor de ioniseres. Herfra bevæger luftstrømmen med ioner sig ind i massespektrometeret, hvor deres indbyrdes mængder bestemmes.

Specielle problemer med måling af skatol i LDTD

Skatol er en forholdsvis flygtig forbindelse. Af denne grund sublimerer skatol forholdsvist hurtigt, når den befinder sig som indtørret ekstrakt i brøndene på LazWell™-pladen. Når en vis henstandstid af den fyldte LazWell™-plade overskrides, vil mængden af skatol og 3d-skatol i en brønd være faldet til under instrumentets detektionsgrænser og kan derfor ikke måles.

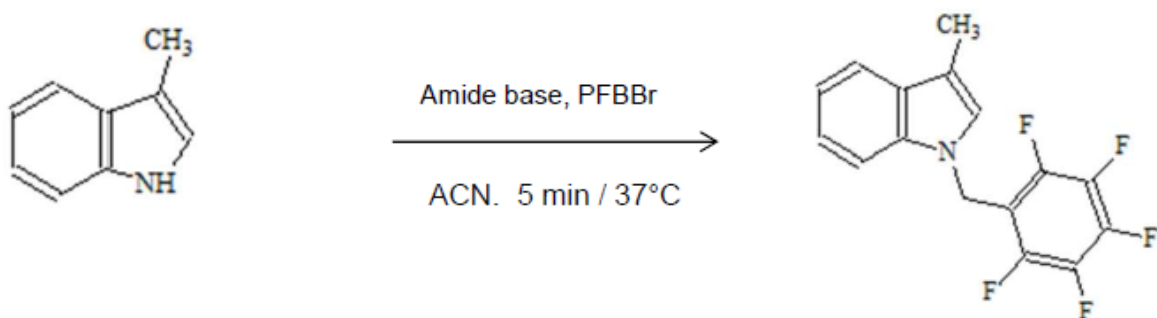
I projektet er der arbejdet med 3 løsningsmodeller:

1. Derivatisering. Skatolen og dens interne standard, 3d-skatol, kobles via en kemisk reaktion til et større molekyle, hvorved den gøres mindre flygtig.
2. Tilsætte en keeper. Finde en ren kemisk forbindelse, som blandes i ekstraktet, og som har en stor affinitet over for skatol, og hvis tilstedeværelse gør, at skatolen ikke så let sublimerer.
3. Begræns henstandstiden i LazWell™-pladen, så der altid er tilstrækkelig skatol tilbage i brøndene, så MS-systemet kan kvantificere mængden.

Derivatisering

Her udnyttes, at kvælstoffet i skatolens pyrrolring, i et stærkt basisk miljø, reagerer med pentafluorobenzylbromid (PFBBBr). Herved dannes et meget tungere molekyle, som er meget lidt flygtigt, og som kan måles i LazWell™-brønden selv efter mange timer.

Skatol derivative:



Derivatiseringen foretages efter centrifugeringstrinet på den allerede klare supernatant.

Ulempen ved denne metode er, at der skal foretages yderligere oprensning efter reaktionen med en hexan- og ethylacetatblanding. Dette sammenholdt med, at reaktionstiden i derivatiseringen tager 5 minutter, gør, at prøveforbehandlingstiden øges med 6-8 minutter. Herudover øges kompleksiteten af processen, således at en automatiseret analyse vanskeligt kan leve op til kravspecifikationerne 4 og 11.

Keeper

I projektet er der gjort forsøg med at tilsætte rene alkaner og alkoholer med mere end 8 kulstofatomer til den klare supernatantfraktion efter centrifugeringen. Forsøgene viste ikke nogen entydig positiv effekt på stabiliteten af skatol i LazWell™-brøndene.

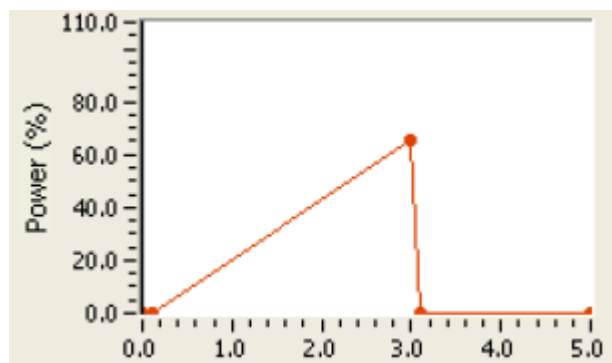
Begrænsning af henstandstiden

Ved at begrænse og styre henstandstiden i LazWell™-pladen fra ekstrakt påsætning til laserbeskydning viste det sig muligt at opnå gode analyseresultater.

Kravene til henstandstid mellem ekstrakt påsætning og LDTD-måling skal holdes under 5,5 minutter. Dette indebærer, at en 96 brønds LazWell™-plade ikke må fyldes mere end en tredjedel, før den sættes i LDTD. Overholdes denne tidsfrist, opnås tilfredsstillende resultater, og prøveforbehandlingen forbliver simpel.

Instrument settings for LDTD og MS/MS

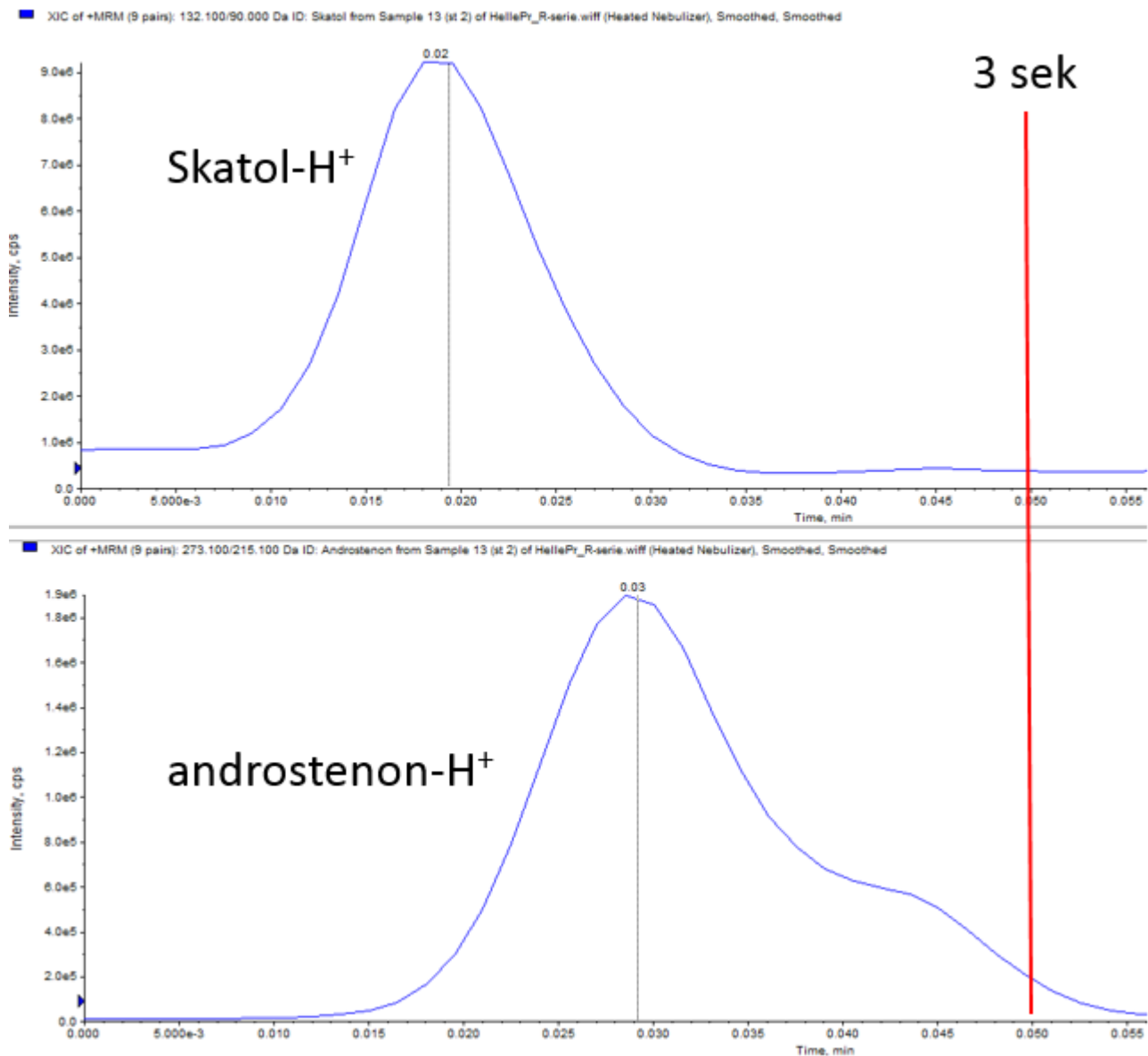
I LDTD beskydes bunden af hver brønd i LazWell™-pladen med en laser. Lasereffekten kan styres af brugeren. I projektet er valgt en laserprofil som vist i figur 3.



Figur 3. Laserenergi afsat på LazWell™-pladen versus tid i sekunder. Effektenheder er specifikke for den benyttede laser.

I figur 3 er vist, at LDTD-laserintensiteten 0,2 sekunder efter, at brønden er positioneret bag laseren, stiger jævnt fra 0 til 65% for derefter at falde til 0 efter 3,1 sekunders beskydning.

Grunden til dette forløb er, at skatol kræver mindre effektoverførelse end androstenon for at sublimeres og vil derfor blive introduceret i MS'en før androstenon. Dette ses i figur 4, hvor MS-systemet er tunet ind på masserne 132,1 u for den protonerede skatol og 273,1 u for den protonerede androstenon.



Figur 4. Counts per second for masserne 132,1 u (skatol-H⁺) og 273,1 u (androstenon-H⁺) versus tid siden laserbeskydning påbegyndes. Det ses, at begge forbindelser er ankommet til detektoren inden for de første 3 sekunder efter påbegyndt laserbeskydning. Skatolionen ankommer gennemsnitligt 0,6 sekunder før androstenonionen.

Figur 4 viser, at den valgte beskydningstid på 3 sekunder med laseren er tilstrækkelig til at sublimerer hovedparten af de to analytter fra LazWell™-brønden.

Carrier gas flow, som er den luftstrøm, der fører de desorberede forbindelser fra LazWell™-pladen forbi corona discharge-nålen og frem til MS-åbningen, sættes til 3 l/min.

Nogle indstillinger af MS/MS (Sciex 6500, 5500 og 4500 QTRAP) kan individualiseres for skatol og androstenon.

Parametrene er:

- Curtain gas flow, som er luft, der blæses på tværs af ionernes bevægelse for at fjerne neutrale molekyler, før de ankommer til kvadrupol 1 (Q1) i massespektrometeret.
- Declustering potential (DP). Dette bruges til at fjerne vandmolekyler, som via Van der Waals kræfter sætter sig i klynger (clusters) omkring de ioner, som skal måles.
- Collision energy (CE). Dette er den energi, hvormed ionerne fragmenteres i kvadrupol 2 (Q2, collision cell).
- Collision cell exit potential (CXP). Dette er den spænding, hvormed ionerne fokuseres og accelereres ud af Q2 på vej mod den sidste kvadrupol (Q3).

Analysen for androstenon og skatol køres i positiv mode som Multiple Reaction Monitoring (MRM). Her filtreres de indkomne ioner efter masse i Q1. I Q2 opsamles ioner med en bestemt masse og fragmenteres ved at lade dem kollideres med neutrale gasmolekyler. Fragmenterne filtreres i Q3, hvor kvadrupolen indstilles til kun at tillade ioner med bestemte masser at passere. De udvalgte fragmenter måles slutteligt i en detektor, som kan være en Faraday-kop eller af en elektron multiplikator-type.

I bilag 3 er en liste over indstillinger for ovennævnte parametre.

Betydningen af de interne standarder

Hensigten med de interne standarder (IS) er, at de tilsættes i kendt mængde til hver prøve før homogeniseringen. Denne kendte mængde bruges som reference ved den egentlige måling i MS-systemet. De interne standarder tager højde for:

1. Tab under homogeniseringen ved at væske hænger på homogenisatorstaven.
2. Fejloverførelser mellem centrifugerør og LazWell™-plade, hvor der påsættes meget små mængder ekstrakt, og hvor den relative fejl på den afsatte volumen er betragtelig.
3. Effektiviteten af laserbeskydningen i LDTD-systemet.
4. Effektiviteten af ioniseringen.

Grunden til, at IS-tilsætning kompenserer for disse forhold, er, at når der sker fejl i de forskellige procestrin, vil forholdet mellem den i MS-systemet målte IS-mængde og mængden af analyt, der rammer detektoren, være uforandret.

Hvis samme fedthomogenat analyseres gentagne gange, og prøverne har samme vægt, vil der gælde:

$$\frac{A_{sk}}{A_{IS}} = \textit{konstant}$$

Hvor A_{sk} er det målte topareal på detektoren efter kvadrupol 3 af analytten (eksempelvis skatol), og A_{IS} er det målte areal på detektoren efter kvadrupol 3 af dens interne standard.

Tilsætning af intern standard tager ikke højde for, hvor stor en del af den naturlige skatol og androstenon, der er i fedtprøven, som udtrækkes under ekstraktionen (overgår til acetonitril-fasen).

Dette problem løses gennem følgende forholdsregler.

- a. Spækprøven har nogenlunde samme form og størrelse.
- b. Homogeniseringens varighed og bevægelser standardiseres.
- c. Tid mellem homogenisering og centrifugering standardiseres.
- d. Temperaturen holdes rimeligt konstant.

Disse fire forholdsregler sikrer, at selv om der ikke er opnået fuldstændig ligevægt mellem fedtpartikler og acetonitrilfasen, inden for de tilladte tidsrammer, kan det antages, at en konstant brøkdelen af det androstenon og skatol, der er i spækket, vil blive overført til ekstraktet. Den brøkdelen af analytterne i fedtet, som under ekstraktionen er kommet over i ekstraktet, kaldes *genfindingen* – hvilket er et mål for ekstraktionsprocessens effektivitet. Genfinding kan være over 100% for en metode, hvis ekstraktionen i den er mere effektiv end i en ellers anerkendt referencemetode. Er genfindingen under 100%, betyder det, at ekstraktionen er ringere end den, der benyttes i referencemetoden. Om genfindingen er over eller under 100%, er af sekundær betydning. Det væsentlige er, om den er stabil/reproducerbar.

Kalibreringskurver for androstenon og skatol

Der er fremstillet kalibreringskurver til LDTD-MS/MS-metoden, baseret på tilsætning af kendte mængder af de rene analytter, skatol og androstenon, til spækprøver, som vides ikke at indeholde hangriselugtkomponenterne. Til formålet er benyttet spæk fra galtgrise, som med sikkerhed ikke indeholder androstenon, og hvor en analyse med en pålidelig referencemetode viser et skatolindhold, der ligger under detektionsgrænsen. En sådan spækblok, fri for androstenon og skatol, benyttes som blank fedtmatrice.

Til kalibreringskurven blev ekstrakter med blank fedt, som er spiket med både androstenon og skatol i 7 niveauer, benyttet. Hvert niveau analyseres i dublet. Fedtprøvernes masse var alle på 0,350 g.

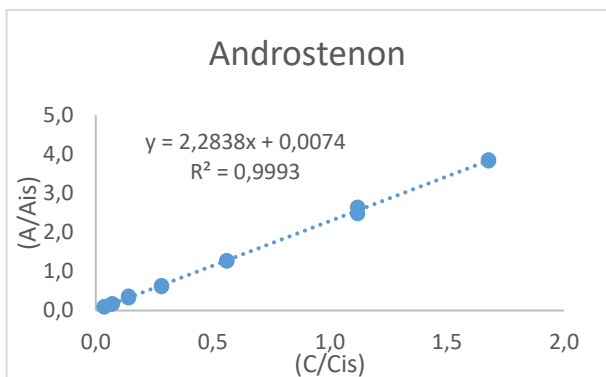
I tabel 1 er vist de spikede mængder androstenon og skatol i hver af de 14 rør omregnet til koncentrationer i spækmængden. De spikede mængder af skatol (3-methylindole, Sigma-Aldrich, CAS 83-34-1, 98% renhed), og androstenon (5 α -Androst-16-en-3-one, Sigma-Aldrich, CAS 18339-16-7) er opløst i de 1,5 ml acetonitril, som først tilsættes spækormen. Indol er medtaget for fuldstændigheden. Dog er indol kun målt på 6 niveauer og som enkeltbestemmelse. Til indol benyttes samme interne standard som til skatol.

Prøver benyttet ved kalibreringen. Koncentrationen af androstenon, skatol og indol samt deres interne standarder omregnet til nanogram pr. gram spæk.

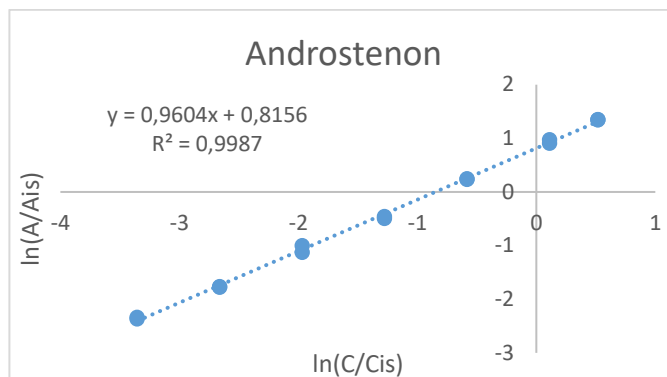
Prøverør	Blank spæk (g)	Androstanon (IS) (ng/g)	3d-skatol (IS) (ng/g)	Skatol (ng/g)	Androstenon (ng/g)	Indol (ng/g)
1-2	0,350	3.580	720	70	125	0,06
3-4	0,350	3.580	720	120	250	0,11
5-6	0,350	3.580	720	220	500	0,21
7-8	0,350	3.580	720	420	1.000	0,41
9-10	0,350	3.580	720	820	2.000	0,81
11-12	0,350	3.580	720	1.620	6.000	1,61
13-14	0,350	3.580	720	2.420	6.000	-

Efterfølgende er der til hvert rør tilsat 1,500 ml mættet saltvand med 0,08 N NaOH.

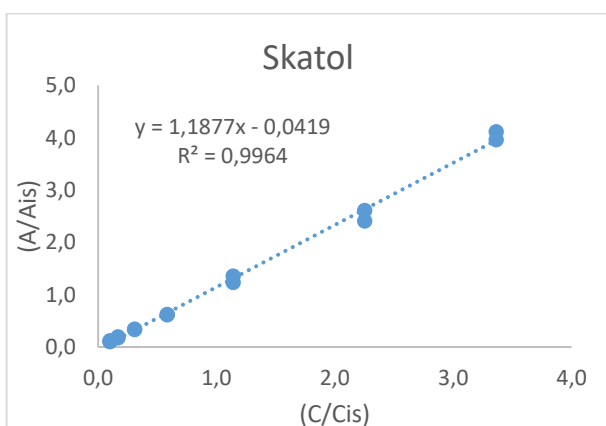
I figurerne 5a-7a er vist de med MS/MS-systemet målte kalibreringskurver for de 3 forbindelser. I disse kurver er forholdet mellem arealerne af de målte toppe for analytten og dens interne standard afsat mod forholdet mellem de spikede koncentrationer af analytten og dens interne standard.



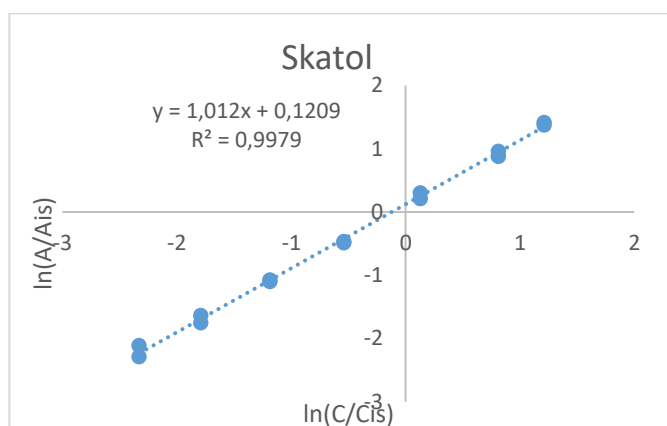
Figur 5a. Area ratio vs conc ratio



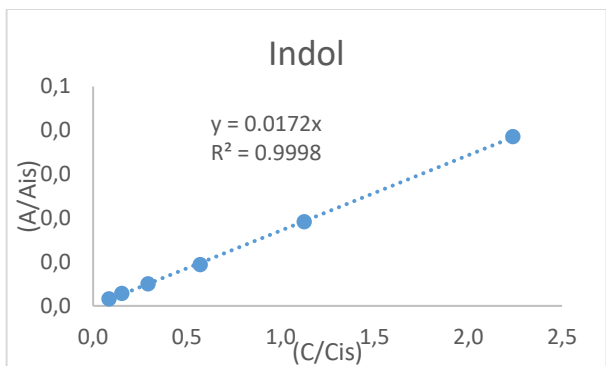
Figur 5b. ln(area ratio) vs ln(conc ratio)



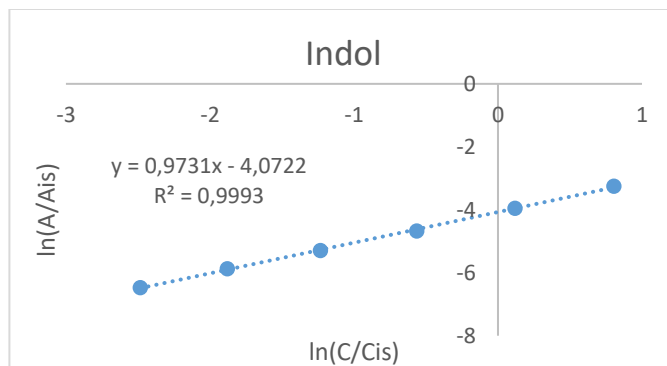
Figur 6a. Area ratio vs conc ratio



Figur 6b. ln(area ratio) vs ln(conc ratio)



Figur 7a. Area ratio vs conc ratio



Figur 7b. ln(area ratio) vs ln(conc ratio)

I figur 5b-7b er kalibreringskurverne også vist som dobbelt logaritmisk plot, idet kalibreringen spænder over tre dekader, og det derfor kan være vanskeligt at vurdere lineariteten for de meget lave koncentrationer i de ordinære plots.

Det ses, at kalibreringskurverne kan beskrives ved ligningen:

$$\frac{A_a}{A_{is}} = \alpha \cdot \frac{C_a}{C_{is}} + \beta$$

Her er A_a og A_{is} arealet af henholdsvis analytfragmenttoppen og fragmentet af dens interne standard målt på detektoren efter Q3. C_a og C_{is} er de spikede koncentrationer. Hældningen α er et mål for metodens sensitivitet, dvs. tilvækst i målt topareal i forhold til tilvækst i koncentration. Konstanten β , som er afskæringen med y-aksen i figurerne 5a-7a, repræsenterer eventuelle små forekomster af analytterne i den spækmatrice, som er brugt til udvikling af kalibreringskurverne. I figurerne 5a-7a ses, at β , for alle tre analytter, kan sættes til nul for den anvendte spækmatrice.

Når kalibreringskurven benyttes i fremtidige analyser, hvor spækprøvens masse m_s ikke er eksakt 0,350 gram, men antager værdier mellem 0,3 g og 0,6 g, udnytter man, at forholdet mellem arealerne gives af MS/MS-detektoren, og at C_{is} er kendt. Herved kan koncentrationen af analytterne i den nye spækprøve beregnes som:

$$C_a = \frac{A_a}{A_{is}} \cdot \frac{0.350}{m_s} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot C_{is} \quad (1)$$

I bilag 6 er givet en detaljeret udredning om gyldigheden af Ligning 1. For at Ligning 1 skal holde eksakt, skal temperaturen under ekstraktionen holdes konstant, og analyt og dens valgte interne standard skal have ens affinitet over for fedtmatricen og den benyttede solvent (se bilag 6).

Regneeksempel

En spækprøve med masse 0,453 g forbehandles og analyseres i LDTD-MS/MS-systemet.

Arealet af androstenonfragmentet måles til 522342 counts.

Arealet af intern standard-fragmentet måles samtidigt til 1385735 counts.

Det vides, at der er tilsat intern standard til acetonitril svarende til en koncentration i spækket på 3.580 ng/g.

Med α taget fra figur 5a fås resultatet:

$$C_a = \frac{522342}{1385735} \cdot \frac{0.350}{0.435} \cdot \frac{1}{2.2838} \cdot 3580 \text{ ng/g} = 475 \text{ ng/g}$$

Grisen, der har leveret spækprøven til ovenstående eksempel, vil givetvis ikke blive frasorteret.

Øvre vægtgrænse for spækprøve

Spørgsmålet er, om der er en øvre vægtgrænse for spækormens størrelse. Forsøg viser, at arealet, der måles på massespektrometeret af toppen fra den interne standard for androstenon, falder med stigende fedtprøvestørrelse. Dette skyldes, at androstenon og dens interne standard, der ligner den rent kemisk, er meget lipofil. Under ekstraktionen vil en stor del af den interne standard blive tilbageholdt i fedtfraktionen; desto større spækprøve, desto mindre bliver mængden af den interne standard, der måles i massespektrometeret. Såfremt androstenon og

intern standard fordeler sig ens i acetonitril- og fedtfasen under ekstraktionen, betyder dette ikke noget for målingens pålidelighed, da selve den androstenon, hvis koncentration i ekstraktet skal bestemmes, også tilbageholdes i samme forhold.

For at undgå for stort et fald i MS-signalet fra androstenonens interne standard anbefales det at overholde følgende forhold:

$$\frac{M_{\text{spæk}}}{V_{\text{ACN}}} < 0.28 \text{ g/ml}$$

Hvilket svarer til eksempelvis 0,7 g spæk i 2,5 ml ACN.

Hvor $M_{\text{spæk}}$ er massen i gram af den udtagne spækprøve og V_{ACN} er rumfanget i ml af den tilsatte acetonitril med intern standard.

Skatol er ikke i samme omfang et problem, dels fordi den er mindre lipofil end androstenon, dels fordi der her benyttes en deutereret skatol som intern standard. Deutereret skatol og normal skatol er kemisk helt identiske, og fordelingsforholdet mellem fedt og acetonitrilfaserne er ens for de to forbindelser.

For en mere fuldstændig redegørelse henvises til bilag 6.

Metodevalidering

Ved metodevalideringen er følgende forhold undersøgt:

- Matricestandard – homogen matrice til validering foruden spækstykke.
- LOD & LOQ.
- Præcision.
 - Repeterbarhed (RSD%).
 - Reproducerbarhed (RSD%).
- Evaluering af de enkelte trin i analysen.
 - Prøvemængde/ormstørrelse.
 - Ekstraktionstid.
 - Brine-volumen.
 - Basekoncentration.
- Langtidstest.

Detektionsgrænsen (Limit of Detection, LOD) defineres som den laveste koncentration i en prøve, hvorved man, med 99% konfidens, kan sige, at den pågældende forbindelse er til stede i prøven.

Kvantifikationsgrænsen (Limit of Quantification, LOQ) defineres som den laveste koncentration i en prøve, hvor der er statistisk belæg for at sætte et tal på indholdet af analytten i prøven.

For komplette definitioner henvises til "Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program 2nd Edition". 2015. US Department of Health & Human Services.

Valideringsresultater

- Matricestandard

Udfordringen i metodevalideringen har blandt andet været at fremstille en repræsentativ homogen prøve for at minimere bidrag til variation i analyseresultater. Ved anvendelse af matricestandard stammer den observerede variation udelukkende fra selve analysemetoden inklusiv prøveforberedelse. Ud over matricestandard er også anvendt hele spækstykker med forskellige koncentrationsniveauer af skatol og androstenon.

- LOD og LOQ

Metodens samlede LOD og LOQ blev evalueret ved 10 gentagne analyser på samme prøve. Den hakkede og blendede matricestandard blev spiket med androstenon og skatol svarende til en slutkoncentration på henholdsvis 0,125 µg/g og 0,05 µg/g. Standardafvigelsen (SD) blev beregnet for begge komponenter på baggrund af de 10 analyser.

LOD blev beregnet som $3 \times SD$ og LOQ som $10 \times SD$. De opnåede resultater for skatol og androstenon fremgår af tabel 1. (Ref.: NMKL Procedure, No. 4 (2005), Validation of Chemical analytical methods).

Tabel 1. Detektionsgrænse (LOD) og kvantifikationsgrænse (LOQ) for skatol og androstenon

	LOD	LOQ
Skatol	0,02 µg/g	0,05 µg/g
Androstenon	0,05 µg/g	0,1 µg/g

- Præcision

- Repeterbarhed S_r (RSD%)
- Reproducerbarhed S_R (RSD%)

Reproducerbarheden (S_R) og repeterbarheden (S_r) er beregnet ved variansanalyse (ANOVA) fra dobbeltbestemmelser på fem forskellige dage. Der er til bestemmelse af præcision anvendt flere forskellige stykker spæk med varierende niveauer af skatol og androstenon. Præcisionsresultater for 6 matricer er samlet i tabel 2. Matricer 1-3 er hele spækprøver (udborede orme), og matricer 4-6 er matricer fremstillet ved at hakke og blende spækstykker for at sikre homogenitet i matricen. Ved alle 6 matricer er der udtaget orme jævnt fordelt analyseforskriften. Til fastlæggelse af præcisionen er hver af de 6 matricer analyseret 10 gange fordelt over 5 dage. I denne metodevalidering refererer reproducerbarhed til variationen mellem dage, og repeterbarheden til variationen inden for dagen.

Tabel 2. Tabel over præcisionsresultater for skatol og androstenon

	Skatol			Androstenon		
	Koncentration ($\mu\text{g/g}$)	S_R	S_r	Koncentration ($\mu\text{g/g}$)	S_R (%)	S_r (%)
Hak+blend matrice 4	0,43	6,54	5,39	9,04	3,85	3,85
Hak+blend matrice 5	0,21	5,50	3,08	3,91	3,08	2,63
Hak+blend matrice 6	0,90	5,30	5,30	1,59	2,65	2,65
Orm matrice 1	0,44	7,58	4,87	8,86	9,59	9,39
Orm matrice 2	0,96	6,21	6,21	1,48	7,76	6,65
Orm matrice 3	0,18	10,03	6,05	1,75	13,35	7,83

S_R = reproducerbarhed (%), S_r = repeterbarhed (%), Hak+blend = hakket og blendet, orm = orm fra hele spækstykker

Analysemetodens robusthed er evalueret ved at variere parametre, der indgår i prøveforberedelsen.

- Prøvemængde/ormstørrelse

Der anvendes i laboriemetoden en prøvemængde på 0,35 g sammen med 1,5 mL acetonitril og 1,5 mL brine-opløsning. Der blev analyseret 5 forskellige prøvemængder: 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g og 0,5 g for at undersøge indvirkningen på analyseresultatet.

Den relative standardafvigelse (RSD%) for androstenon og skatol er henholdsvis 4,6% og 3,3%.

Konklusion: Det kan konkluderes ud fra evaluering af analyseret prøvemængde, at de anvendte 0,35 g kan variere fra 0,25 g til 0,5 g, uden at det har væsentlig indflydelse på koncentrationsbestemmelsen. Vigtigt at bemærke ved dette eksperiment er et observeret fald i areal for den interne standard for androstenon ved øget prøvemængde, hvilket kan have betydning for korrekt kvantificering (se bilag 6).

- Ekstraktionstid

Ekstraktionstiden er fastsat til 45 sekunder (s).

Der er under dette punkt i valideringen undersøgt ekstraktionstiderne 25 s, 35 s, 45 s, 55 s og 105 s for at evaluere, om der er forskel på analyseresultaterne ved de forskellige tider.

Variierende tid kan potentielt påvirke indstilling af ligevægt, ekstraktionseffektivitet og evt. påvirkning af komponenter fra temperaturændring. Den relative standardafvigelse (RSD%) for androstenon og skatol ved 5 forskellige ekstraktionstider er henholdsvis 3,1% og 1,9%.

Konklusion: Ud fra dette punkt i valideringen kan det konkluderes, at de anvendte 45 s kan variere fra 25 s til 105 s uden at have væsentlig indflydelse på analyseresultatet.

Den samlede mixetid er ekstraktionstiden plus de 20 sekunder, det kan tage, før spækormen fanges af staven.

- Brine-volumen

Effekten på analyseresultatet ved forskellige voluminer af tilsat brine er evalueret. RSD% for både androstenon og skatol er mindre end 5%. Det kan altså konkluderes, at varierende brine-volumen (1,3 ml-1,7 ml) ikke har indflydelse på analyseresultatet.

- Basekoncentration

Forskellige basekoncentrationer er undersøgt på 4 forskellige matricer med varierende indhold af androstenon og skatol. RSD% er beregnet for både androstenon og skatol til at være mindre end 5% for niveauer over LOQ. Det kan konkluderes, at varierende basekoncentration (0,04 M-0,20 M) ikke har indflydelse på analyseresultatet.

- Langtidstest

En simuleret langtidstest er udført over et tidsrum på 5 arbejdsdage. Under testen er der analyseret på 10.000 LazWell™-brønde for at evaluere, i hvor stort omfang LDTD-MS/MS-instrumentet bliver påvirket mht. respons og tilsvining.

Til de 10.000 analyser blev der benyttet 10 nye LazWell™-plader svarende til 960 analyser ligeligt fordelt over de 5 testdage. Til de resterende analyser blev der benyttet genbrugsplader. De brugte LazWell™-plader var blevet genbrugt efter rengøring i opvasker ved lav vandtemperatur (40°C) eller rensed med acetone. Formålet med at bruge genbrugsplader var at stresse MS/MS-systemet maksimalt med mulig kontaminering og dermed simulere en meget mere langstrakt testperiode.

MS/MS-systemet havde inden testen kørt ca. 1½ år uden vedligeholdelseeftersyn. I denne periode var der i laboratoriet sammenlagt blevet kørt ca. 15.000 analyser med LDTD, plus at MS/MS-systemet også havde været anvendt som detektionsudstyr ved laboratoriets øvrige projekter, hvor HPLC-udstyr blev anvendt i stedet for LDTD. Efter langtidstesten med yderligere 10.000 analyser blev der udført et vedligeholdelseeftersyn af MS/MS-systemet og af LDTD udført af serviceteknikere fra leverandørerne.

Konklusioner for langtidstest

Ved eftersynet af MS/MS-systemet vurderede leverandørens servicetekniker, at systemet viste en lav grad af forurening efter sammenlagt 25.000 analyser med LDTD samt kørsel med HPLC som indgang til MS-MS-systemet i laboratoriets øvrige projekter.

Forsøgene under langtidstesten viste et faldende respons på MS/MS-systemet for de interne standarder. Årsagen til dette viste sig at stamme fra LDTD-laseren, hvis effekt faldt med skønsmæssigt 50% fra de første nye plader blev analyseret på testdag 1 til de sidste målinger på dag 5. Ifølge leverandøren af LDTD-systemet er dette ikke set tidligere, og det vurderes, at der er opstået en fejl i de elektroniske kredsløb, eller at laseren skal skiftes. På trods af faldende respons på signalhøjder var reproducerbarhed og sensitivitet på målingerne målt over de 5 dage yderst acceptable.

Ved forsøget blev der benyttet en kalibrering for androstenon og for skatol som ved starten af langtidstesten var 1½ måned gammel. Kalibreringen virkede upåklageligt under hele forløbet, og det kan konkluderes, at der i et fremtidig online-udstyr ikke er behov for jævnlig recalibrering af metoden. Nedenstående er vist hældninger og R^2 for standardkurver for androstenon og skatol målt på dag 1, 3 og 5 under langtidstesten.

Tabel 3. Hældninger og korrelationer for standardkurver for androstenon og skatol. Arealforhold versus faktuelle koncentrationer.

Day	Slope of standard curve (Sensitivity)			Day	R^2		
	1	3	5		1	3	5
Androst	1.249	1.217	1.243	Androst	0.999	0.998	0.997
Skatole	0.671	0.611	0.655	Skatole	0.990	0.997	0.989

Implementering på slagteri

Projektets formål var at finde en laboratoriemetode, som lever op til krav til måle-hastighed, pris pr. analyse og robusthed, og som fuldt ud kan automatiseres som brugbar at-line målemetode i et industrielt miljø.

Udformningen og udviklingen af den automatiske analyse blev ikke fastlagt i dette projekt. Men der blev arbejdet med at finde løsningsmuligheder, således at det sandsynliggøres, at der i et efterfølgende projekt kan opbygges et komplet system, som lever op til industriens behov. Der blev fokuseret på, at de benyttede udstyr i et automatisk hangriseanalyseudstyr i videst mulig omfang skulle være baseret på instrumenter/robotter, som er standardudstyr.

I det følgende beskrives mulige udstyrskonfigurationer, som kan benyttes.

Prøvetagning på slagtelinje – det gamle skatolanlæg

På det danskudviklede skatolanlæg fra 1991 var der på hver slagtelinje opstillet en prøveudtagningsstation, også benævnt modtagestationen. Dennes funktion var manuelt at udtage en prøve på mellem 0,4 g og 1,0 g fra hver hangris, som kunne analyseres i et nærliggende hangriselaboratorium. Prøven blev manuelt anbragt i et tareret prøvebæger, som efterfølgende blev vejret med indhold, så spækprøvens masse kunne beregnes. Prøvebægeret var forsynet med en strekkode, som automatisk blev linket til nummeret på hængejernet.

Bægeret blev forsynet med låg og kunne afsendes til hangriselaboratoriet.

Til udboring af en prøve fra spækket i nakkeregionen på den midt-flækkede hangris blev der brugt en håndholdt "pistol" med et roterende, skarptslebte, hult bor. Borets indhold kunne tømmes i prøvebægeret ved at trykke på et stempel, som pressede spækprøven ud. Modtagestationen var forsynet med to pistoler, således at en pistol kunne stå til rensning, imens den anden blev brugt til udboring.

Prøvetagning på slagtelinje – en nyudviklet modtagestation

Det foreslås at benytte en manuel prøvetagningspistol, som i det væsentlige ligner den, der blev benyttet i det tidligere skatolanlæg. Vægten af den udtagne orm skal dog reduceres til mellem 0,3 g og 0,6 g. Kravet om mindre prøvevægt hænger sammen med ønsket om at benytte så små mængder solventer som muligt i det videre forløb.

De store prøvebægere fra skatolanlægget passer ikke sammen med måden, hvorpå prøvehåndteringen gennemføres på LDTD-MS/MS-metoden. Her vil der blive arbejdet i et 24 brønds DWP-format (deep well plate) som vist i figur 8 og bilag 4.



Figur 8. Eksempel på en 24 brønds SBS-plade (128 x 86 mm)

Pladen er et standardformat (SBS/SLAS mikrotiter fodaftryk, se bilag 4), som passer med det øvrige laboratorieudstyr, der anvendes til den nye analysemetode. Pladen skal være forsynet med en strekkode. Hver spækprøve, der anbringes i pladen, er entydigt genkendelig ved pladens strekkode sammenholdt med dens placering i pladen med betegnelser – rækkenummer A til D og kolonnennummer 1 til 6. Da pladen har dybe brønde, benævnes den deep well plate (DWP).

Arbejdsgangen

1. En DWP-plade placeres på en vægt indbygget i modtagestationen og tareres.
2. Over DWP-pladen er der en plade, som styres af et xy-bord. Pladen er forsynet med et enkelt hul, som er lidt mindre end brøndenes åbning. Hullet over DWP-pladen styres til at befinde sig over position A1 i DWP-pladen.
3. Operatøren tømmer prøven fra pistolen ned i hullet.
4. Vægtforøgelsen registreres i et datasystem sammen med slagte-ID fra hængejersaflæseren og positionen A1 fra xy-bordet.
5. Xy-bordet flytter åbningen over DWP-pladen til positionen A2.
6. Punkterne 1-5 gentages nu for de følgende 23 hangrise, hvorfra prøver udtages.

Transport af prøve, slagtegang-laboratorium

Når DWP-pladen er fyldt, skubbes den væk fra vægten og over på et transportsystem, der fører pladen frem til hangriselaboratoriet. Transportsystemet kan bestå af transportbånd, kabeltransport, (skilift), drone, AGV eller manuel transport.

En AGV (automatic guided vehicle) kan være en lille eldreven transporter på hjul, som i sin simpleste version følger en rute, der er optegnet med streger på gulvet.

Standard conveyer-systemer kan være af samme typer som systemer, der benyttes i medicinalindustrien, hospitalslaboratorier og på mejerilaboratorier. Et eksempel er vist i figur 9.



Figur 9. Qlip N.V. mælk, prøvningslaboratorium i Zutphen, Netherlands. Laboratoriet håndterer 55.000 mælkeafregninger dagligt (kilde Foss). Bånd af denne type kan anvendes til transport af microtiter-plader.

Kravet til systemet er, at det skal kunne fragte en plade fra udtagestedet på slagtelinjen til laboratoriet inden for 2 minutter. Fra første prøve anbringes i en plade, til den fyldte plade afleveres til laboratorierobotterne, vil der gå mellem 6 og 9 minutter, afhængigt af frekvensen af hangrise på slagtelinjen.

Dette vil i værste fald efterlade kun 36 minutter til prøveforberedelse og analyse i laboratoriet, hvis en svartid skal holdes inden for 45 minutter.

Ved ankomsten til laboratoriet kan conveyoren fra slagtelinjen aflevere pladen med prøver til en sliske, som pladerne glider ned ad, indtil de bliver stoppet af en klods (se skitse i figur 10). Herfra kan en SCARA-robot sørge for, at pladen videreføres til behandlingenhederne.

Slisken kan endvidere udgøre en buffer for plader, der kommer fra slagtelinjen, såfremt der i laboratoriet sker nedbrud.

Indretning af laboratorium

I laboratoriet skal der være et ledigt gulvareal på 4 x 2,5 m, og plads til at en laboratoriearbejder kan bevæge sig frit omkring dette areal.

Området skal være forsynet med:

- Ren, oliefri trykluft 8 bar (zero air med mindre end 0,1 ppm kulbrinter).
- Der skal anskaffes en kvælstofgenerator, som drives af trykluft. En sådan kan evt. være en del af massespektrometeranskaffelsen og placeres under den bænk, hvorpå massespektrometeret anbringes.
- Der skal være rent vand til vask af genbrugspipetter og homogenisatorstave.
- Der skal være rigeligt med strømudtag (230 V) til robotter og måleudstyr.
- Netforbindelse til kommunikation med pc og slagteriets databaser.
- Nærliggende kontor til pc og øvrigt overvågningsudstyr.

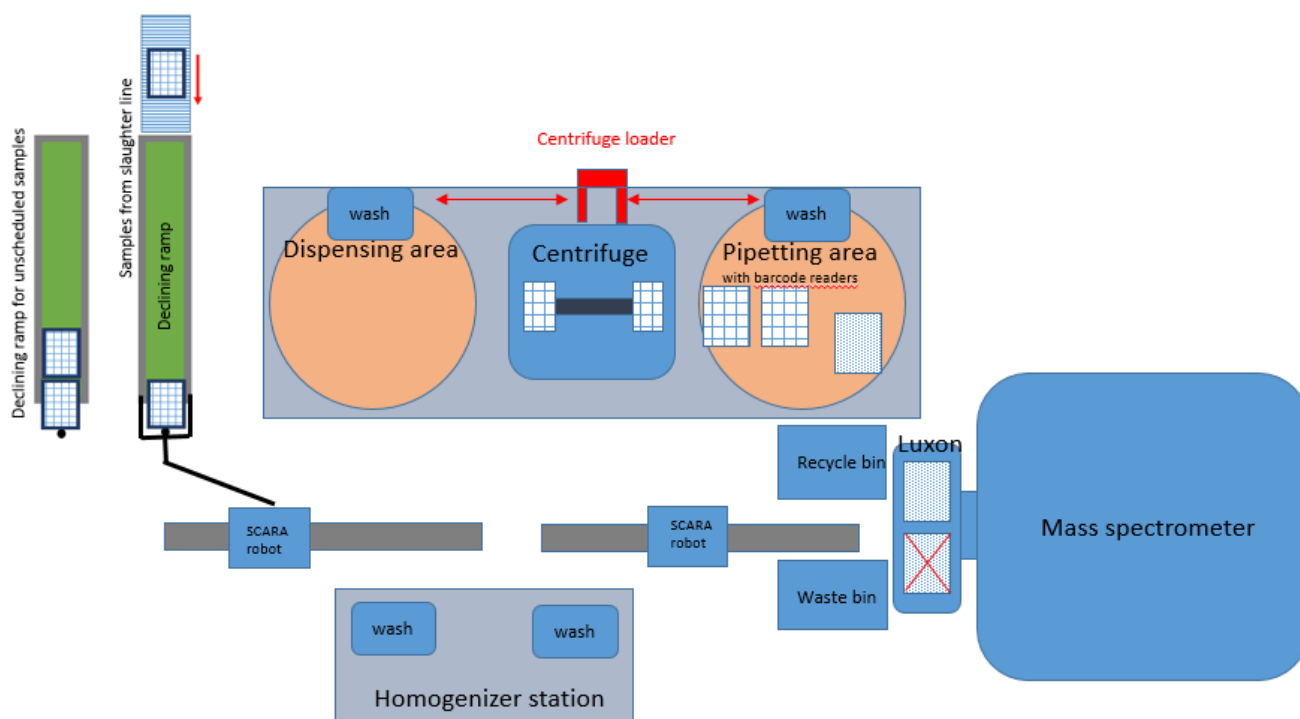
Der henvises i øvrigt til Site Planning Guide fra leverandøren af MS/MS-systemet og LDTD-ionkilden.

Automatisering af laboratoriet

I laboratoriet foretages ekstraktionen af androstenon og skatol fra fedtet, oprensning af ekstraktet og slutteligt en måling på ekstraktet i LDTD-MS/MS.

Følgende laboratorietrin automatiseres:

1. Transportsystemet mellem slagtelinje og laboratorium placerer 24 brønds DWP-brøndplader på slisken ved væsketilsætningsstationen.
2. Væsketilsætningsstationen tilsætter 1,5 ml acetonitril og 1,5 ml brine til hver brønd.
3. Indholdet af de enkelte brønde i DWP-pladen skal nu homogeniseres. Dette gøres i en separat homogenisatorstation.
4. Pladen med de homogeniserede prøver skal nu centrifugeres ved 5.000 G.
5. Der overføres 4 µl fra hver af de 24 brønde til nye brønde på en LazWell™-plade i en pipetteringsstation.
6. LazWell™-plader overføres til LDTD-MS/MS, hvor der måles på hver påsat prøve.



Figur 10. Et tænkt layout for laboratorieanalyseudstyret. To SCARA-robotter, hver placeret på en lineær akseskinne for øget rækkevidde, flytter plader mellem behandlingsstationer.

Væskebehandlingsstationen

Når prøverne ankommer til laboratoriet, skal de to ekstraktionsvæsker tilsættes. Dette kan gøres ved hjælp af 2 stk. stand-alone dispenserhoveder, eller dispenserens kan være en del af en væskebehandlingsstation, som samler flere operationer i samme væskebehandlingsstation.

Stand-alone dispenserstation

Stand-alone dispensere kan være af fabrikatet Fritz Geyger AG, hvorfra der kan købes ventiler som OEM-komponenter. Det medfølgende SDK-software bruges til at kalibrere ventilerne og til at styre den tilsatte væskemængde. Ventiler fra Fritz Geiger AG, fx SMLD 300G micro-valve er udstyret med Safir ventilhoveder, som er yderst slidstærke og modstandsdygtige over for kemikalier. Ved tilsætning af 1,5 ml er usikkerheden på $\pm 0,2\%$.

Den tilsatte væskemængde styres med åbningstiden for ventilen, idet der er proportionalitet mellem tid og dispenseret mængde.

Der skal indkøbes to pumper, som kan levere et konstant overtryk på væsken, der tilføres ventilen (typisk 1 bar for brine og noget mindre for acetonitril).

Dispenserhovederne monteres på et xy-bord, som flytter dyserne rundt over DWP-pladen. Styringen af xy-bordet skal integreres sammen med software til styring af dispenseringen. Alternativt anbringes DWP-pladen på et styrbart xy-bord, og dispenserhovederne holdes i en fast position.

Arbejdsgang:

1. DWP-brøndpladen anbringes på en plade under dispenserhovederne.
2. Den udviklede software styrer dispenserhovederne i xy-retningen, således at de enkelte brønde i DWP-pladen fyldes med den ønskede væskemængde. Fyldning af væsker på 24 brønds DWP-pladen kan gøres på 38-42 sekunder pr. væske.
3. DWP-pladen kan nu flyttes til homogenisering vha. en SCARA-robot med griber til SBS-pladeformatet.

Væskebehandlingsstationsløsning

Såfremt dispenseringen udføres i en væskebehandlingsstation, vil der blive benyttet standardpipetteringsværktøjer. Pipettespidser kan være genbrugspipetter, idet der ikke er risiko for afsmitning mellem prøver.

Homogeniseringsstationen

Homogeniseringsstationen har i værste fald kun 240 sekunder til at processere en hel 24 brønds DWP-plade. Dette inkluderer tid til at modtage og fiksere DWP-pladen med SCARA-robotten, og at pladen igen kan fjernes fra homogeniseringsstationen.

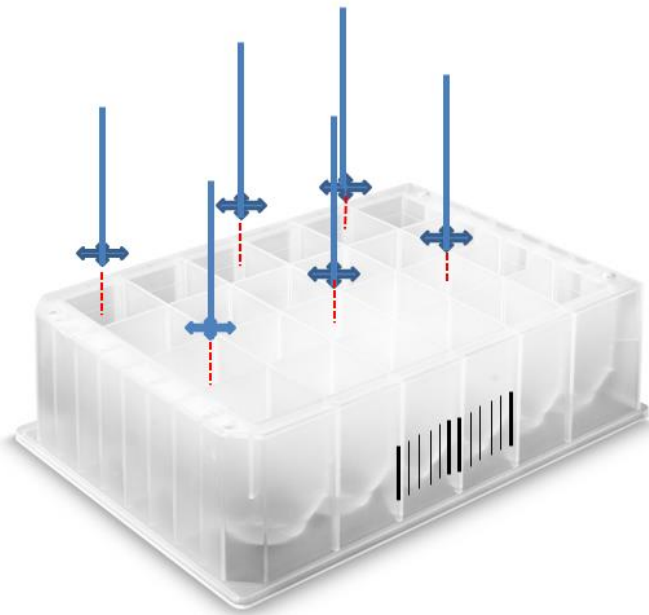
Hvis der bruges mindre end 240 sekunder ved dispenseringen af acetonitril og saltvand, kan den sparede tid lægges til den tilladelige homogeniseringstid.

Forsøg i laboratoriet viser, at der skal bruges 30 sekunder til en homogenisering, såfremt der benyttes en standard stålstav med en diameter på 10-11 mm og en omløbshastighed svarende til 30.000 rpm.

For tiden findes der ikke kommercielt tilgængelige homogenisatorer, som kan klare at homogenisere 24 prøver på 240 sekunder på tilfredsstillende måde. OMNI INC. (Cobb Place Blvd. NW Kennesaw, GA 30144, United States) har et system kaldet en OMNI-Prep 96, som kan ombygges til at arbejde med 6 stave i parallel og således kan tage én række i DWP-pladen ad gangen. Problemet er, at stavene og motorerne er meget små (stav diameter 7 mm). Motorerne kan givetvis ikke drive kraftigere stave.

Det er således nødvendigt at udvikle en homogenisator, som opfylder kravene.

I figur 11 er vist, hvordan et system kan se ud.



Figur 11. Layout for en homogenisatorarm med 6 stave, som tager hver anden brønd pr. gennemløb.

Homogenisatoren kan opbygges med 2 arme, som hver har 6 homogenisatorstave. DWP-pladen stilles midt mellem de to arme. På hver side af DWP-blokken er der et vaskekar med lunkent vand til vask af stave.

Homogeniseringstrin er:

1. Venstre arm homogeniserer brønde A1, C1, A3, C3, A5, C5. Højre arm er i vaskebad.
2. Højre arm homogeniserer brønde A2, C2, A4, C4, A6, C6. Venstre arm vaskes.
3. Venstre arm homogeniserer brønde B1, D1, B3, D3, B5, D5. Højre arm er i vaskebad.
4. Højre arm homogeniserer brønde B2, D2, B4, D4, B6, D6. Venstre arm vaskes.

Samlet procestid 4 x 30 sek. + 4 x 5 sek. til bevægelse = 140 sekunder.

Med det i figur 11 skitserede homogenisator-layout kan homogeniseringstiden udvides til 45 sekunder, hvis dette er fordelagtigt.

Problemet er, at denne løsning skal specialudvikles. Konceptet kan realiseres med 1 stort tandhjul, som driver de 4 stave, og et tilsvarende tandhjul, som driver de sidste 2. Venstre og højre arm skal kunne bevæge sig i retningen op/ned og i én længderetning. De to arme kan arbejde synkront. Ved at placere stavene med 2 brøndes afstand, kan der benyttes stave med en diameter på 11 mm, som sikrer en effektiv homogenisering.

Centrifugen

Efter homogeniseringen skal pladerne centrifugeres i 300 sekunder ved 5.000 G. Ud over dette skal der regnes med tid til at isætte DWP-plader i centrifugegondolen og efterfølgende at fjerne dem igen. Dette er klart det langsomste trin i processen. Da der ankommer en DWP-plade til centrifugen hver 240 sekunder, skal centrifugen køre med 2 DWP-plader ad gangen.

Det vil tage 2 x 240 sekunder (= 8 minutter) at få to plader leveret til centrifugen fra homogenisatorstationen. Så det er den tid, som er til rådighed for hele forløbet: ladning med DWP-plader, accelerering af centrifugerotor, 5 min ved 5.000 G, deceleration af rotor og fjernelse af de to DWP-plader.

En mulig leverandør af centrifugeenheden er Tecan Group Schweiz. Tecan fremstiller en væskebehandlingsstation med indbygget centrifuge af fabrikatet Hettich (se bilag 5). Væskebehandlingsstationen er forsynet med gribearm, som henter DWP-plader placeret på dækket, nedsænker dem i centrifugen, og som slutteligt henter pladerne tilbage på væskebehandlingsstations dæk.

Overførsel til LazWell™-plade

Det sidste trin i prøveforbehandlingen er, at supernatanten efter centrifugeringen overføres fra 24 brønds DWP-pladeformat til 96 brønds LazWell™-pladeformat. Til dette skal der bruges pipetter.

Ved processen skal der med pipette udtages 3-4 µl fra den øverste fraktion i hver af de 24 brønde, som overføres til LazWell™-plade.

Da plast engangspipetter er en stærkt fordyrende forbrugsartikel, foreslås det, at der i stedet benyttes genbrugelige stålpipettespidser. Med genbrugspipetter skal der være mulighed for vask af spidserne efter hver væskeoverførelse.

Opgaven kan i teorien løses med enkeltpipette, som tager en brønd ad gangen. Herved bliver tidsforbruget for stort, og processen vil blive en flaskehals i hele analysen.

De to pladeformater, 24 brønds og 96 brønds pladeformat, er kendetegnet ved, at deres grundplan har samme ydre dimensioner, og at afstanden mellem brøndcentre er nøjagtigt dobbelt så stort, målt på begge leder, i 24 brønds formatet som i 96 brønds formatet.

Dette gør, at processen muligvis kan udføres i et enkelt trin, hvis der benyttes et multihoved pipetteringsværktøj. Multihoved pipetteværktøjer er standard til 96 brønds SBS-plader (figur 12).



Figur 12. Et eksempel på et multihoved pipetteværktøj til 96 brønds SBS-plader (Tecan)

Hvis hver anden pipette i multihovedværktøjet fjernes, og ubrugte åbninger forsegles, vil det kunne bruges til både 24 brønds formatet og 96 brønds formatet.

Indholdet af et 24 brønds format kan nu overføres til samme LazWell™-plade i én arbejdsgang.

Overføringsmønsteret fra 24 brønds DWP-pladen, som er ankommet fra centrifugen, til LazWell™-pladen bliver så:

24 brønd plade 1

A1	A2	A3	A4	A5	A6
B1	B2	B3	B4	B5	B6
C1	C2	C3	C4	C5	C6
D1	D2	D3	D4	D5	D6



Lazwell plade 1

A1	A3	A5	A7	A9	A11
C1	C3	C5	C7	C9	C11
E1	E3	E5	E7	E9	E11
G1	G3	G5	G7	G9	G11

Næste gang lazwell pladen skal bruges fyldes den efter mønstret

24 brønd plade 2

A1	A2	A3	A4	A5	A6
B1	B2	B3	B4	B5	B6
C1	C2	C3	C4	C5	C6
D1	D2	D3	D4	D5	D6



Lazwell plade 1

A2	A4	A6	A8	A10	A12
C2	C4	C6	C8	C10	C12
E2	E4	E6	E8	E10	E12
G2	G4	G6	G8	G10	G12

Efter hver påfyldning med 24 prøver tørres pladen et antal sekunder og kan overføres til Luxon ionkilden til måling. Overførslen sker med en laboratorie SCARA-robot med SBS gribeværktøj.

Tredje og fjerde gang den ufuldstændigt benyttet LazWell™-plade bruges, vil rækkerne B, D, F og H blive fyldt.

Overførsel til LazWell™-plade fra ikke-fyldte 24 brønds plader

Såfremt der ankommer 24 brønds DWP-plader, der ikke er helt fyldte, til pipetteringsstationen, skal denne foruden en multihoved pipette også være forsynet med et enkelt pipettehoved, som kan bruges til at ekspedere enkelte prøver. I sådanne situationer vil det være passende at reservere nogle LazWell™-plader, som allerede har udnyttet hver anden række via påfyldning med multihoved pipetteværktøjet.

De fleste pipetteringsstationer er forsynet med værktøjsholdere, således at multihovedværktøjet kan parkeres, imens enkelt pipetteværktøjet er i brug og omvendt.

ID-håndtering, stregkodelæser

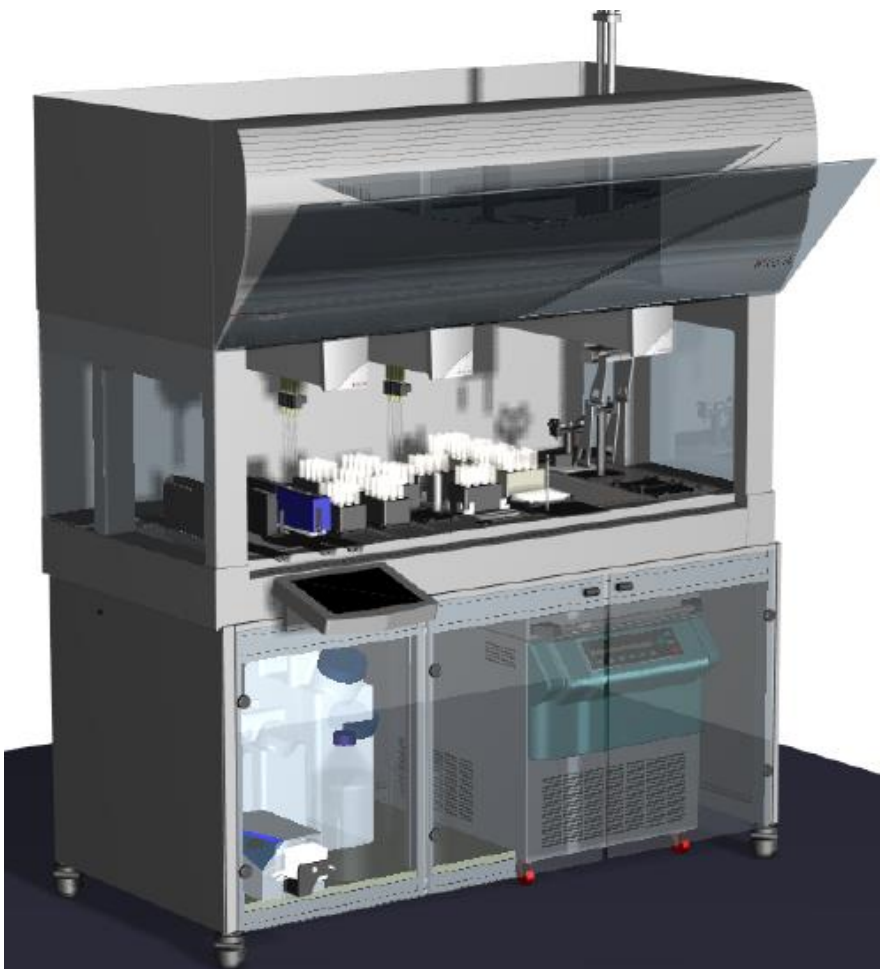
Det forudsættes, at slagte-ID, allerede fra påfyldningen af spækprøver i 24 brønds DWP-pladen, er koblet til stregkoden på 24 brønds pladen og til en givet position i denne (A1-D6).

Når en 24 brønds plade er færdig efter centrifugen, skal dens stregkode aflæses. Ligeledes aflæses stregkoden på den LazWell™-plade, som skal påfyldes ekstrakter. Datasystemet skal nu fortælle pipetteringsrobotten, hvilke rækker på LazWell™-pladen der er ledige (ubrugte). Ved overførslen af ekstrakter til LazWell™-plade skal datasystemet koble brøndposition i 24 brønds formatet til brøndposition i 96 brønds formatet. Brøndpositioner i de to pladeformater gemmes af slagtegangsdata-basen sammen med stregkoder på de to plader under det tilhørende slagte-ID. Spækprøvens vægt ligger allerede i databasen linket til slagte-ID, stregkode på 24 brønds pladen og positionen i denne.

Når Luxon Ionkilden og MS/MS-systemet afleverer det færdige analyseresultat, gøres dette i form af et strekkodenummer på LazWell™-pladens brøndposition og et sæt analyseresultater for henholdsvis skatol og androstenon. Telegrammet fra målesystemet kan eksempelvis se således ud: "stregkode#, B6, 0.14, 0.37", hvilket af datasystemet skal tolkes som, at spækprøven i LazWell™-plade nr. xxxxxxxx, brønd nr. B6 er målt til at indeholde 0,14 µg/g skatol og 0,37 µg/g androstenon.

Væsketilsætning, centrifugering og pipetteringsstation, alt i én enhed

Tecan, som er leverandør af laboratorievæskebehandlingsstationer, har standardudstyr, som i et og samme væskebehandlingsudstyr udfører tilsætning af væsker, centrifugering og slutpipettering til LazWell™-plader (figur 13).



Figur 13. Fluent 780 platform fra Tecan med 2 stk. 8-kanals liquid handling-arme til pipetteringer af henholdsvis små og større volumener og 1 stk. gribearm til flytning af plader til og fra centrifuge. Der medfølger Hettich centrifuge til 4 stk. DWP.

Arbejdsgangen med Tecans Fluent 780 væskebehandlingsstation er som følger:

1. 24 brønds DWP-pladen, med spækorme til analyse, placeres i væskebehandlingsstationen af en SCARA-robot.
2. Væskebehandlingsstationen påfylder acetonitril og saltvand til hver af de 24 brønde (~ 4 minutter pr. DWP).
3. SCARA-robotten flytter DWP-pladen fra væskebehandlingsstationsdæk til en ekstern homogenisatorstation.
4. Efter homogenisering flyttes DWP-pladen tilbage til væskebehandlingsstationen.
5. Væskebehandlingsstationen er udstyret med gribearme, som kan nedsænke DWP-pladen i centrifugen, som er placeret under væskebehandlingsstationen (figur 13), (< 8 min for 2 stk. DWP).
6. Efter centrifugering benyttes de samme gribeværktøjer til at hæve DWP-pladen og anbringe den ved pipetteringsstationen.
7. Sluttelig pipetteres fra 24 brønds DWP til 96 brøndpladen (~ 2 min. pr. DWP-plade)

Output fra Luxon-MS/MS-målesystemet

Af hensyn til sporbarheden og kvalitetssikringen af analysen skal målesystemet levere følgende informationer til slagtegangsdatabase:

- LazWell™-plade stregkodennummer.
- Position i LazWell™-pladen, hvorfra et givet resultat stammer.
- Det målte skatolindhold.
- Det målte androstenonindhold.
- Rådata fra kvadrupol 3 (Q3) massesensoren i et passende masseinterval omkring fragment-ioner og interne standardfragmenter, der benyttes til målingerne.

Pladestregkode og -position kobler direkte til slagte-ID.

Massespektrene kan bruges til fejlfinding på systemet og til vurdering af massespektrometerets tilstand.

Pladebuffer, pladehoteller

Når DWP-plader med 24 prøver ankommer til laboratoriet fra slagtegangen, vil de under normale forhold umiddelbart efter blive overført til prøveforberedelsesudstyret og målt i LDTD-MS-systemet. Afvigelser fra dette kan forekomme, når:

1. der på slagtelinjen kommer hangrise med en frekvens, der overstiger systemets kapacitet på 360 prøver pr. time. I sådanne situationer vil der ske en ophobning af plader før dispenseringsenheden. Her vil man fortfarende benytte first-in-first-out-tilgang til analysen. Dog kan det forekomme, at resultater afleveres til en tid, som overskrider punkt 4 i kravspecifikationen.
2. der opstår systemnedbrud i prøveforbehandlingsudstyret eller ved LDTD-MS. Her kan det også forekomme, at punkt 4-kravet overskrides.

3. der indskydes prøver fra andre slagterier eller prøver, som skal reanalyseres. Her vil det være nødvendigt at prioritere de prøver, som kommer direkte fra slagtelinjen, og at ekstra prøver afvikles, når der er ledig kapacitet i laboratoriet.

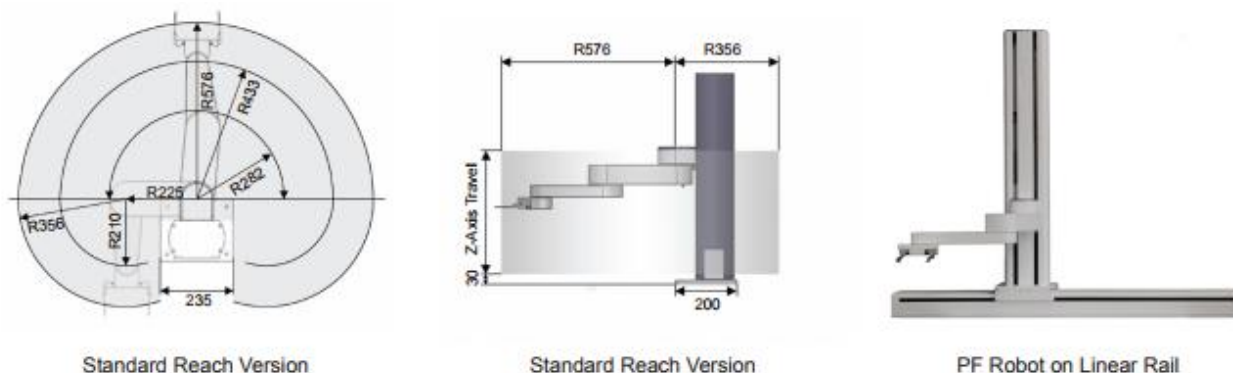
Ved større ophobning af brøndplader, eller når der indskydes plader med prøver fra andre slagterier, skal der være et buffersystem, hvor plader kan stilles i venteposition. Et sådant system kan være udformet med 2 sliske, som vist i figur 10 under afsnittet "Automatisering i laboratoriet". Den styrende computerenhed skal have adgang til at prioritere, om SCARA-robotten skal hente pladerne fra den sliske, som fodres af conveyor-systemet fra slagtelinjen, eller om der er ledig kapacitet i laboratoriet, til at en plade fra den manuelt fyldte sliske kan behandles.

Robotter til flytning af plade mellem analyseudstyrets delsystemer

Såfremt alle funktioner i analysen udføres af stand-alone-udstyr, skal der foretages en del flytteoperationer mellem delprocesser i den automatiserede analysemetode.

1. Ved ankomst til laboratoriet via transportbånd fra slagtelinjen flyttes DWP-pladen over på væsketilsætningsstationen.
2. Mellem væsketilsætningsstationen og homogenisatoren.
3. Mellem homogenisator og dækket ved centrifugen.
4. Centrifugen lades automatisk med 2 stk. DWP.
5. Efter centrifugering hentes de to DWP op ad centrifugen.
6. Fra centrifuge til pipetteringsenheden, hvor der overføres supernatant fra DWP til LazWell™-plade.
7. LazWell™-pladen hentes fra pipetteringsenheden og overføres til Luxon ionkilden.
8. Den færdigmålte LazWell™-plade fjernes fra Luxon ionkilden. LazWell™-pladen kommer i affaldsspand, hvis alle 96 brønde er opbrugt eller kommer i en genbrugskasse, hvis den indeholder ubrugte brønde.

De fleste af ovennævnte 8 operationer udføres med SCARA-robotter. I figur 14 er vist en robot fra firmaet Precise Automation, PF 400, som er en sikkerhedsgodkendt co-worker-robot til laboratoriebrug.



Figur 14. SCARA-robot PF 400 fra Precise Automation, udstyret med plate handler tool.

Den viste robot kan monteres på en lineær skinne, så dens rækkevidde i x-retningen kan øges. Ydermere kan den fås med udvidet arm, så den kan nå ud i 750 mm. Positioneringsnøjagtigheden for værktøjet i x, y og z-retninger er $\pm 0,1$ mm.

En SCARA-robot kan udføre alle trin i ovenstående liste over flytteoperationer bortset fra trin 4 og 5, hvor der skal bruges specialværktøj, som typisk leveres af centrifugeleverandøren eller af væskerobotleverandøren, hvis der er tale om en væskebehandlingsstationsløsning som i figur 13.

Kørsel af spækstandarder

Det foreslås, at 24 brønds pladen på slagtegangen ved modtagestationen kun fyldes med 23 prøver. Herved vil der altid være én ledig brønd, som kan bruges til:

1. Indskydning af kontrolprøver for jævnlig kontrol af udstyrets evne til at måle korrekt.
2. Kørsel med rene væskestandarder.
3. Indskydning af enkelte omprøver.

Hypigheden, hvormed kontrolprøver skal køres, vil skulle forhandles med klassificeringskontrollen. Til formålet skal datasystemet kunne håndtere specielle prøve-ID-numre, som kun anvendes til kontrolprøver.

Kørslen med rene væskestandarder vil udgøre en løbende kontrol af MS-systemets tilstand. Her skal der kun være målbare massetoppe for de to interne standarder d3-skatol og androstanon (5 α -androstan-17 β -3-one). Målbare mængder af de rene analytter må ikke kunne iagttages i massespektrene for de rene væskestandarder.

Ved omprøver skal der ligeledes være mulighed for, at en laborant kan tilsætte en spækprøve til den ledige brønd og indtaste/indscanne et slagte-ID, som linkes til denne brønd i slagtegangsdatabase.

At der benyttes 23 ud af 24 brønde vil naturligvis indebære, at kapaciteten af systemet sænkes fra 360 til 345 hangrise pr. time.

Kørsel af spækprøver fra andre slagterier eller omprøver

Når et anlæg får tilført hangriseprøver fra andre slagterier, kan resultaterne ikke foreligge, før slagtekroppen ankommer til udligningsrummet (krav 4 i kravspecifikation).

Ydermere kan der opstå fejl ved en analyse, som gør, at der må udtages en ny prøve fra en slagtekrop, og at denne analyseres, efter at slagtekroppen er ankommet til udligningsrummet.

Her skal der være mulighed for manuelt at indskyde fyldte 24 brønds DWP med spækprøver i området umiddelbart før væskedispenseringen. Et skitseforslag til pladehåndteringen er vist i figur 10, hvor der ved siden af rampen til indkomne prøver direkte fra slagtelinjen er afsat en ekstra rampe med plads til plader, som kan indsættes manuelt. Begge ramper er placeret, således at SCARA-robotten kan nå pladerne, der er i dem. Den pc, som styrer logistikken i prøveforbehandlingen og Luxon-MS/MS-målingen, skal, når der er ledig kapacitet på laboratorieudstyret, give besked til SCARA-robotten, om at en plade med fremmede prøver kan afvikles.

Morgenkontrol af systemets tilstand

Hver morgen, inden de første hangriseprøver ankommer til laboratoriet, skal prøveforbehandlingsudstyr og måleudstyret rengøres, og der skal køres et mindre antal kontrolprøver på spæk med kendt indhold af skatol og androstenon for at sikre, at udstyret måler korrekt.

LDTD-MS/MS-systemet kan udføre mellem 10.000 og 30.000 analyser, før der er behov for mindre rengøring af udsatte dele.

Efter behov udføres følgende:

1. På prøveforbehandlingsudstyret og SCARA-robotter fjernes synligt snavs og pletter med en fugtig fnugfri klud.
2. Det sikres, at der er fyldt op med LazWell™-plader i pipetteringsstationen, og at der er mættet saltvand og acetonitril-opløsninger på reservoir-beholdere.
3. Efter behov afmonteres LDTD/Luxon fra massespektrometeret.
4. Efter behov. For rengøring af massespektrometerets forende henvises til leverandørens "Instrument Front-End Cleaning Procedure For Customers". Rengøringen af dette område kan for det meste begrænses til aftørring af forpladen med lidt methanol.
5. Efter behov. På LDTD/Luxon ionkilden skal corona udladningsnålen ligeledes aftørres med en methanolvædet klud, og der køres en metanolvædet vatpind gennem røret, der forbinder LazWell™-brønde med corona udladningsnålen. Der henvises til rengøringsvejledningen fra leverandøren (Phytronix).

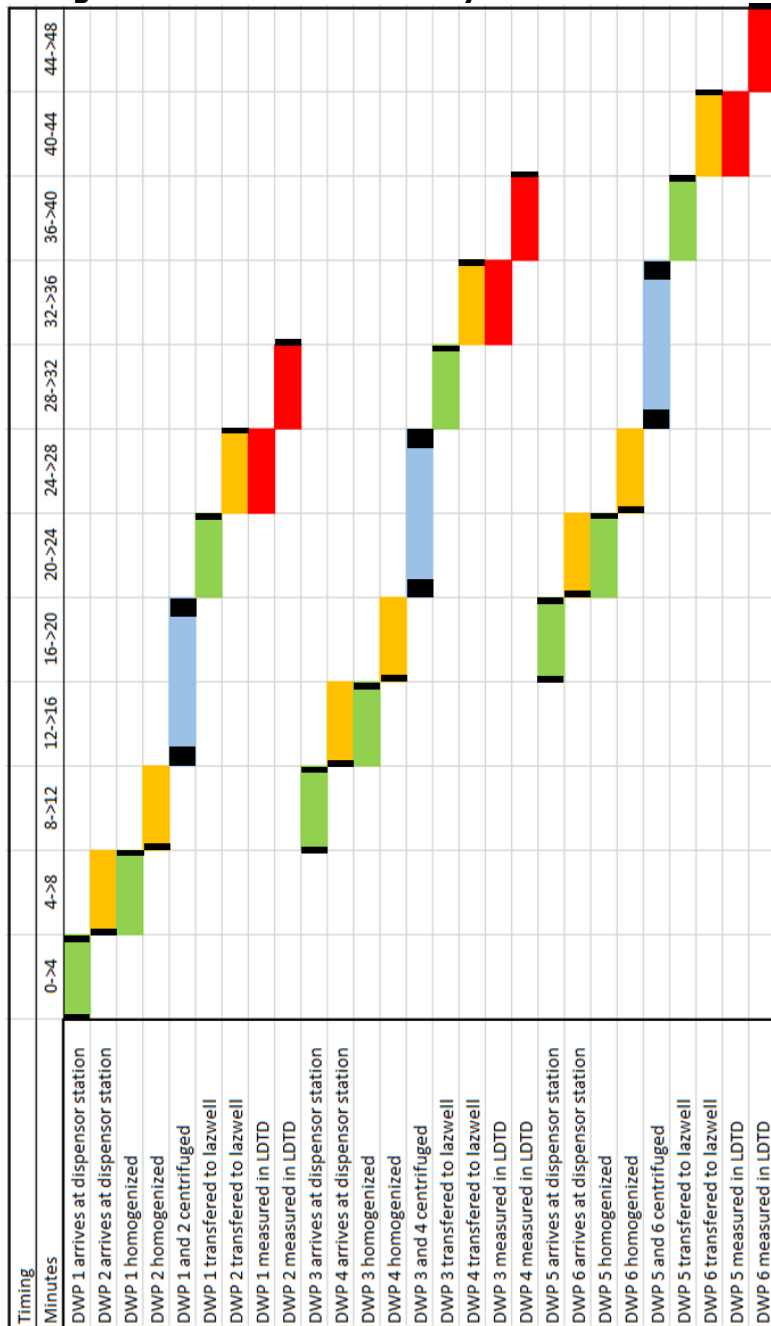
Der skal udføres en kontrol af, om systemet måler korrekt. Til dette bruges homogeniseret spæk fra hangrise med kendt indhold af skatol og androstenon. De nominelle værdier for koncentrationer i de benyttede spækprøver bestemmes af et akkrediteret referencelaboratorium.

6. Ved dispenseringsenheden indsættes en DWP med et mindre antal referencespækprøver, som hver er afvejnet. Masse og position af hvert spækstykke i 24 brønds pladen indtastes i computersystemet. Nogle brønde efterlades tomme. Prøveforbehandling og måling igangsættes.

Der er nu to sæt resultater, som skal vurderes. Den endelige udformning af metoden afstemmes med slagterikontrollen.

- a. Det målte skatol- og androstenonindhold i referencespækken skal ligge inden for $\pm xx\%$ af de nominelle koncentrationer for de to forbindelser i spækken. De endelige grænser for accepteret måleevne mangler fastsættelse.
- b. De blanke prøvebrønde, som kun har indeholdt interne standarder fra acetonitril-tilsætningen, kan bruges til en vurdering af, om der er urenheder i systemet, som giver uventede toppe på et fuldt skan med massespektrometeret. Det foreslås, at dette fulde skan afleveres til slagteriets database, hvorfra det automatisk analyseres for, om systemet nærmer sig tidspunktet for et fuldt forebyggende vedligeholdseftersyn.

Timing af den automatiske analyse



Figur 15. Timingen i laboratorietrinene.

Det foreslås at benytte 2 stk. SCARA-robotter hver placeret på standard lineære skinner for at forlænge deres rækkevidde. Den ene SCARA-robot kan nå arbejdsstationerne: modtagelse fra transportbånd, dispensering og homogenisering. SCARA-robot 2 kan nå områderne: homogenisator, centrifuge, pipetteringsstation, LDTD samt affaldskurve for brugte LazWell™-plader.

I figur 15 er vist håndteringen af de første 6 DWP-plader, som ankommer fra slagtelinjen. Sorte markeringer viser transporttid med SCARA-robot eller med centrifugegribearm.

Luxon/LDTD tager selv en nyankommen plade og udskyder den målte plade. SCARA-robot kan placere ny plade på Luxon og fjerne den færdige plade.

Anslåede omkostninger forbundet med installationen på slagteri

Udstyrsinstallation

I figur 16 er vist prisestimerer baseret på, at prøveforbehandlingen udføres med en Tecan Fluent 780 væskebehandlingsstation med Hettich centrifuge med automatisk ladning af plader. Det antages, at en homogenisatorenhed med fornøden kapacitet specialudvikles. Da der ved analysen arbejdes med acetonitril, er det nødvendigt, at hele måleudstyret indbygges i et stort stinkskaab med udsugning.

Ny modtage station på slagtelinjen	tkr	
Standard mettler vægt	50	Tilbud fra Mettler
Modificering af gl prøvetagnings pistol	100	skøn
xy bord med styring	200	skøn
Transportsystem slagtegang-laboratorium	500	skøn
Diverse omkostninger	200	skøn
Laboratorium		
pladebuffer	50	to stk slsker der passer til SBS format
SCARA robotter på lineær skinne (2 stk)	500	Rå robot koster 180 tkr
Tecan Fluent 780 med Hettich centrifuge	2100	baseret på tilbud fra Tecan
Homogenisator	1500	inkl. Udvikling
12 stk standard homogenisator stålstave	100	Pris baseret på DMRI laboratorieindkøb
Tilslutning af varmt vand til vask	50	skøn
Luxon ionkilde	950	Baseret på tilbud fra Phytronix
MS-MS system	1800	Baseret på tilbud fra Sciex 4500 Qtrap
Affaldshåndtering/genbrug af Lazwell plader	100	skøn
Nitrogen generator	120	Pris baseret på tilbud fra Peak Scientific
Plexiglas stinkskaab med udsug og adgangsforhold	300	AltiTech alu. Profiler
UPS strøm backup til beskyttelse af MS turbopumpe	80	Maks pris
Total	8700	

Figur 16. Estimerede priser for anskaffelse af nødvendigt udstyr til automatisering af analysemetoden på et slagteri. Det bemærkes, at en del af udgifterne er tillagt udviklingsomkostninger.

Følgende udgifter er ikke medtaget i ovenstående estimerer for omkostninger forbundet med metodeimplementeringen:

1. Indretning af plads til modtagestation på slagtelinjen.
2. Software til ID-håndtering på slagtelinje.
3. Føring af transportbånd mellem slagtelinje og laboratorium.
4. Integration/kommunikation mellem udstyr i laboratoriet.
5. Software til ID-håndtering i laboratoriet og lagring af data i slagteriets databasesystem.

Angående integration/kommunikation mellem laboratorieudstyr er det kutyme, at der i leverancen på væskebehandlingsstationen, Luxon ionkilde og MS-udstyrene medfølger det fornødne software til styring og håndtering af eksempelvis prøve-ID.

Pris pr. analyse

I figur 17 er vist de beregnede priser pr. analyse for kemikalier og andre forbrugsvarer ved metoden.

Analyse pris i kr pr prøve	
Mættet saltvand 1.5ml	0.01
acetonitril 2.5 ml pr prøve	1.80
Intern standard androstenon	0.05
Intern standard skatol	0.05
Lazwell brønd	2.91
DWP brønd	0.25
PM hver tredje måned	0.50
Sum	5.57

Figur 17. Estimeret analysepris i kroner pr. analyseret hangris.

Tallene i figur 17 dækker over det direkte kemikalieforbrug samt DWP-plader og LazWell™-plader. Herudover er medtaget faste omkostninger, til at der hver 3. måned kan udføres en PM (preventive maintenance) eftersyn på Luxon ionkilden og MS-systemet. En fuld PM koster typisk 80.000 kr. pr. besøg. Der er regnet med et besøg af servicetekniker hver 3. måned, og at der analyseres 2.800 hangrise/dag.

Priser på forbrugsvarer og PM er endvidere baseret på de indkøbspriser, som DMRI's laboratorium kan opnå hos leverandørerne.

I omkostningsoverslaget regnes der med, at DWP-pladerne (24 brønde) kan anskaffes for 6 kr. pr. plade. De billigste DWP, som opfylder kravspecifikationerne, ligger på 85 kr. pr. plade svarende til 3,45 kr. pr. prøve. En færdig plade vejer typisk 90 gram og består af polypropylen, som koster mindre end 1 kr. Den høje pris på standardplader skyldes, at pladerne bruges på hospitaler og i medicinalindustrien, hvor pris pr. analyse ikke er kritisk.

Det foreslås derfor, at slagterierne får produceret en støbeform i rustfrit stål, som de lader en plastproducent bruge til produktion af DWP, der opfylder kravene. En støbeform koster mellem 180.000 og 300.000 kr. at fremstille.

Forbedringsmuligheder

Der er gode muligheder for at nedbringe omkostningerne pr. analyse fra de estimerede 5,57 kr. til et noget lavere niveau.

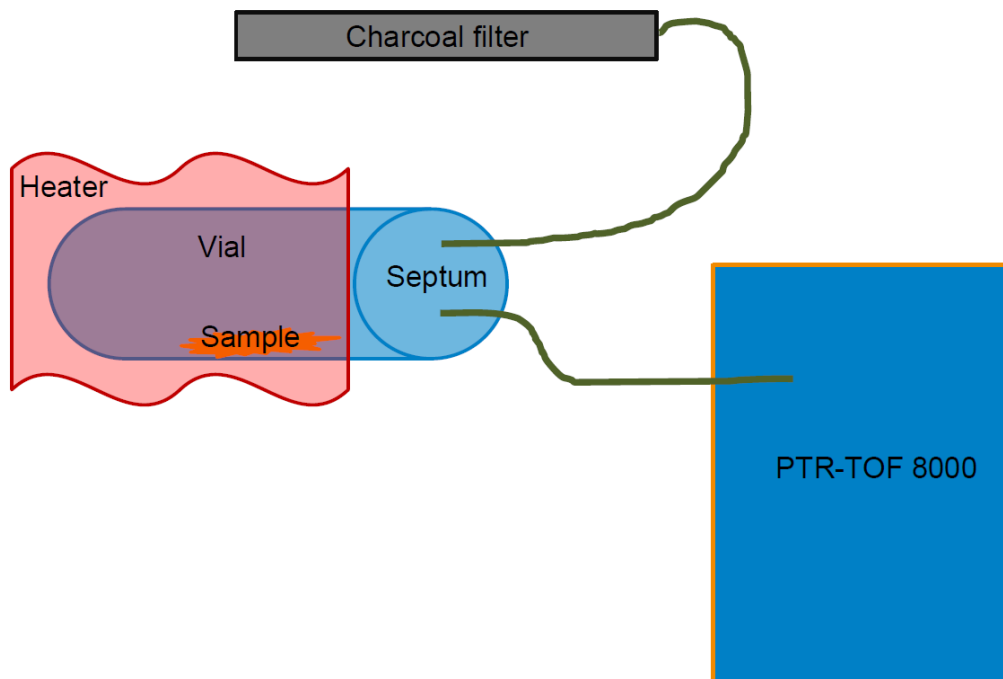
På LazWell™-pladerne er der store penge at spare. En plade indkøbt af DMRI koster 41 USD pr. stk. Meget foreløbige resultater i laboratoriet har vist, at pladerne, i modsætning til leverandørens anbefalinger, kan genbruges. Hvis yderligere undersøgelser viser, at pladerne kan genbruges bare 1 enkelt gang, vil prisen pr. analyse kunne sænkes til 4,10 kr.

Om nødvendigt kan der udvikles en vaske-/rensemethode for LazWell™-pladerne. En mulighed kunne være at komme brugte plader i et vakuumkammer. Vakuummet vil bevirke, at evt. rester af androstenon og skatol hurtigt damper bort.

Ekstraktionen med saltvand og acetonitril af androstenon og skatol i fedtprøverne kan muligvis forbedres ved at benytte andre solventer eller en kombination af solventer. Fordelen kunne være, at kvantificeringsgrænsen (LOQ) sænkes, samtidigt med at reproducerbarheden forbedres.

Bilag 1. Måleprincip ved afprøvning af PTR-TOF-MS

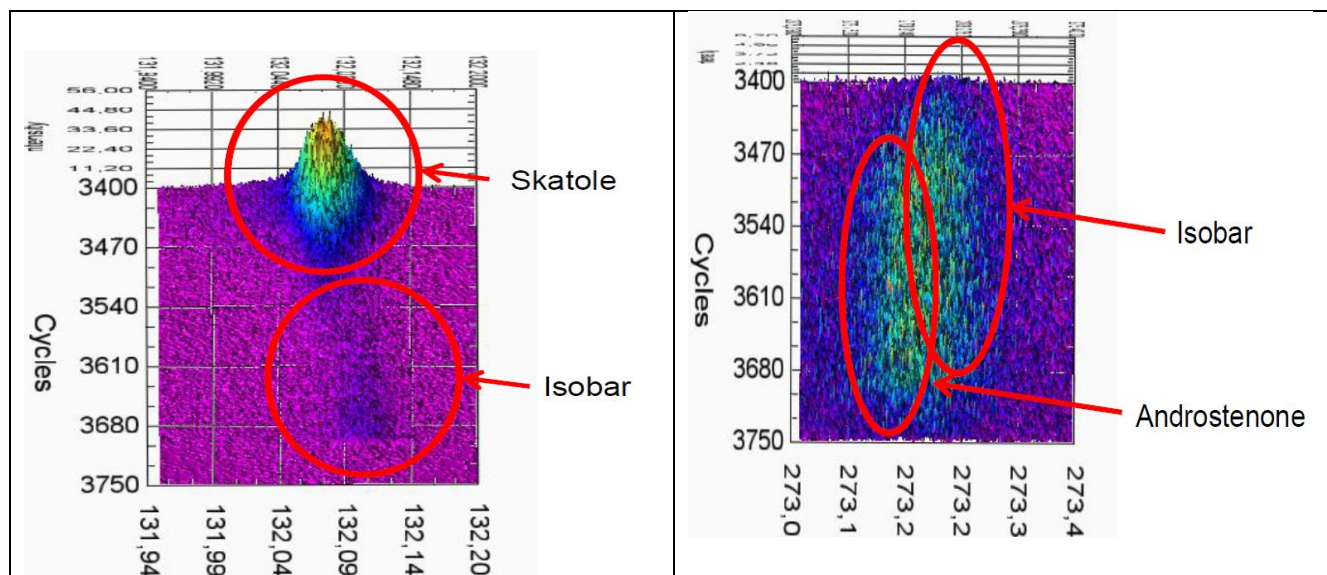
Ved afprøvningen af PTR-TOF-MS-udstyret blev der anvendt en opstilling som vist i figur a.



Figur a. Principskitse af testopstilling til afprøvning af PTR-TOF-MS.

Under afprøvningen blev signalhøjden for skatol- og androstenonmasserne målt i headspace, efter prøven var opvarmet til 180°C.

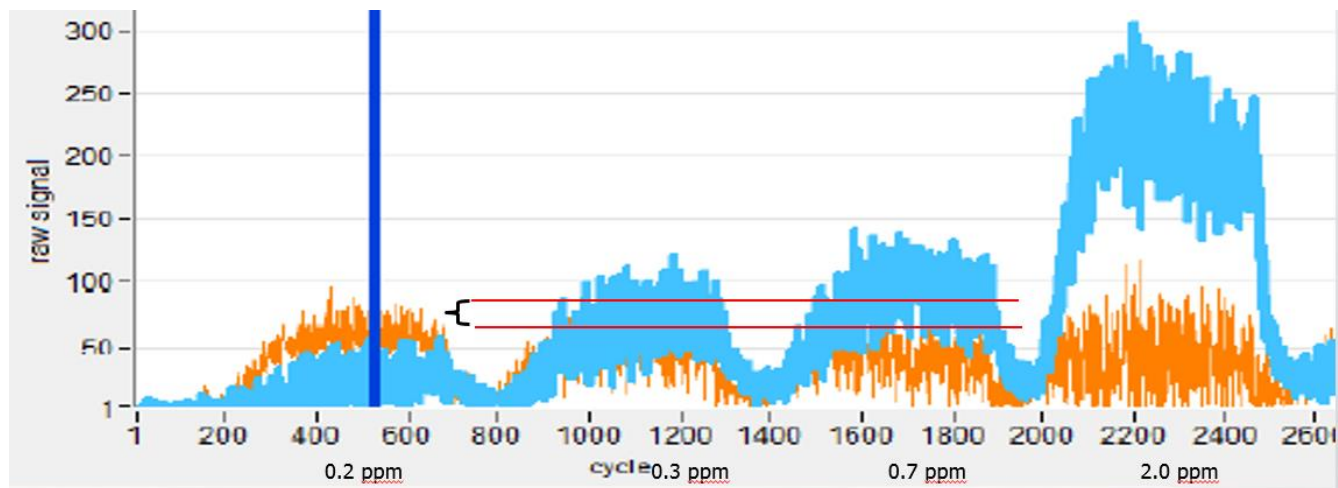
I figur b er signalhøjden vist ved masser tæt på den protonerede skatol og den protonerede androstenon. Her ses, at to ukendte isobarer ligger meget tæt på skatol og androstenon, både hvad angår masser og den tidlige opløsning (cycles, som angiver, hvornår stofferne afdamper fra spækprøven og registreres på instrumentets detektor).



Figur b. Måleresultater med PTR-TOF-MS. Både for skatol og specielt for androstenon er der interfererende isobarforbindelser.

I figur c er massefiltret tunet ind på androstenon, og signalerne fra headspace over 4 spikede blanke fedtprøver, som er opvarmet til 180°C, er målt.

I figuren påbegyndes samplingen ved tider svarende til cycle nummer 200, 800, 1400 og 2000. Den blå kurve angiver responset for androstenon, og den røde kurve angiver responset fra den interfererende isobar. 1 cycle svarer til 1,5 sekunder. Konklusionen er, at man godt kan se forskel på de fire androstenonniveauer, hvis der midles over 100 cycles. Vi har kun 3 cycles til rådighed, og så kan man ikke skelne 0,3 ppm fra 0,7 ppm.



Figur c. Måleresultater med PTR-TOF-MS. Her ses den tidlige variation i signalhøjde for androstenon og dens interfererende isobar. De fire toppe svarer til prøver med 0,2 ppm, 0,3 ppm, 0,7 ppm og 2,0 ppm androstenon (spiket blank fedtprøve).

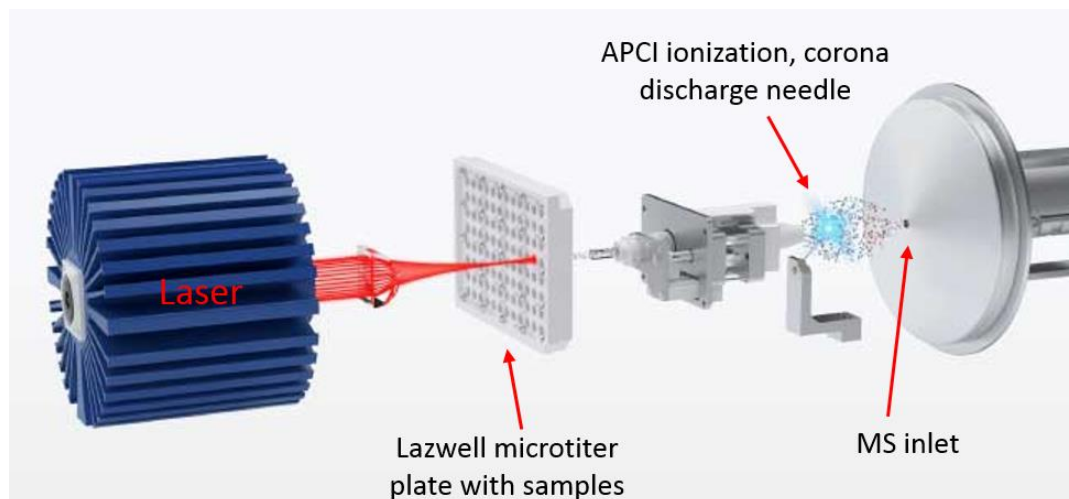
Bilag 2. LDTD-MS/MS

I en LDTD udføres to grundfunktioner:

1. En laseropvarmning af det udtørrede prøveekstrakt, hvorved analytterne bringes på luftform.
2. En luftstrøm fører analytterne forbi en metalnål med et kraftigt elektrisk felt omkring spidsen (corona discharge needle). Det kraftige elektriske felt ioniserer vandmolekylerne i luften, som så overfører deres ladning til analytterne.

Ioniseringen i LDTD er en såkaldt Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI). Denne ioniseringsmetode er kendetegnet ved, at den ikke forårsager fragmentering af analytterne, og at den typisk kun overfører en enkelt ladning til hvert molekyle.

De ioniserede analytter føres nu med luften ind i et MS/MS-system til detektion og kvantificering. I figur 1 er vist en principskitse af LDTD-udstyret.



Figur 1. Principskitse af LDTD laseropvarmning og APCI-ionisering.

Prøverne introduceres i LDTD-udstyret, ved at få mikroliter prøveekstrakt placeres i brønde på en specialtilpasset microtiter-plade kaldet en LazWell™-plade. Denne plade er speciel, ved at bundmaterialet udgøres af en varmeledende metalplade. Efter få minutter er ekstraktet udtørret, og pladen kan sættes i LDTD-enheden.

Pladen bevæges foran laseren, som beskytter én brønd i LazWell™-pladen ad gangen. På den modsatte side af laseren føres de afdampede forbindelser via et tyndt rør forbi udladningsnålen, hvor ioniseringen finder sted.

Selve detektionen foregår i et MS/MS-system, ofte benævnt et tandem massespektrometer. Fordelen ved dobbelt MS er, at de indkomne ioner først sorteres efter forholdet mellem deres masser og deres ladning. Dette første trin, som foregår i en elektrisk kvadrupol (Q1), er ikke specifik for en bestemt analyt, idet der i en kompleks matrice som fedt er en overvejende

sandsynlighed for, at der ved ioniseringen er flere forskellige ioner, som opnår samme masse-ladningsforhold som dem, man er interesseret i at måle.

For at undgå at medregne uinteressante interfererende (isobarer) ioner ved bestemmelsen af analytterne, fragmenteres ionerne efter første kvadrupol (Q1). Fragmenteringen foretages eksempelvis ved at lade ionerne støde ind i en neutral sværm af kvælstofmolekyler, hvorved de går i stykker til mindre ioner. Det heldige er, at forskellige ioner med samme masse-ladningsforhold typisk vil fragmentere til datter-ioner med forskellige masse-ladningsforhold. Disse fragmenter kan nu sendes igennem en efterfølgende kvadrupol (Q3), som kan indstilles til kun at måle på et bestemt fragment.

Dette krydstjeks-system, der udgøres af måling før og efter fragmentering, sikrer, at problemer med interfererende forbindelser minimeres, og at metoden er yderst selektiv for den analyt, man ønsker at måle.

Bilag 3. MS-indstillinger

Massespektrometerindstillinger for MRM-bestemmelsen af androstenon, skatol og indol.

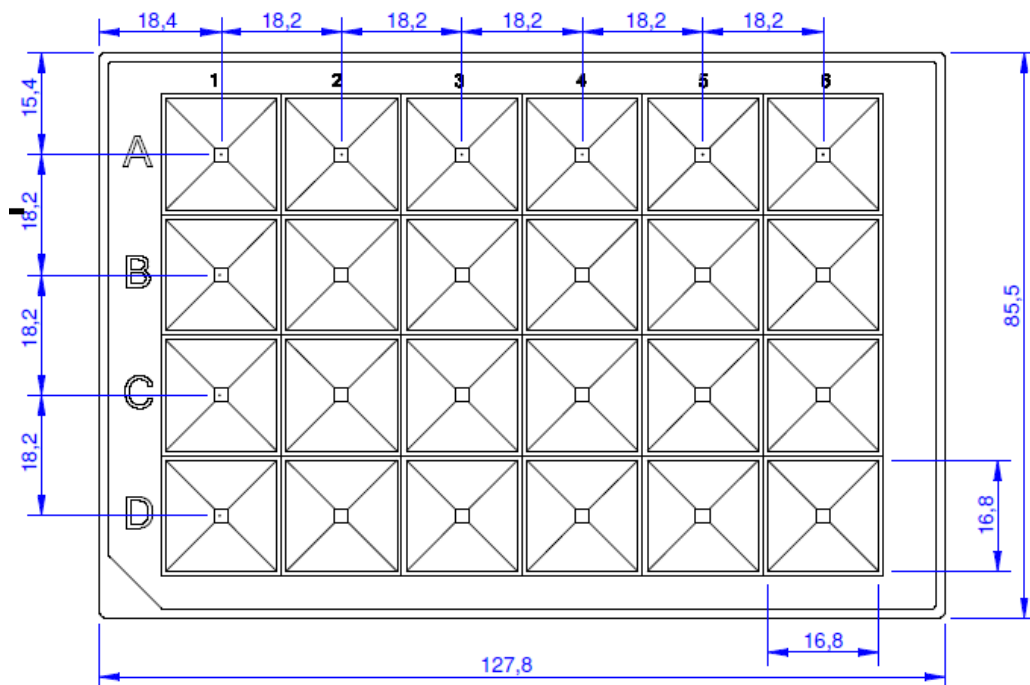
	Precursor ion (Da, [M+H] ⁺)	Product ion (Da)	DP	CE	CXP
Androstenone	273,1	215,1	80,00	25,00	13,00
5 α -androstan-17 β -3-one			80,00	25,00	13,00
Skatole	132,1	90,00	40,00	40,00	10,00
Skatole-d3	135,1	117,0	40,00	28,00	12,00
Indole	118,1	65,01	20,00	19,00	10,00
Indole	118,2	91,00	20,00	12,00	12,00

DP: Declustering Potential (volts), CE: Collision Energy (volts), CXP: Collision Exit Cell Potential (volts)

Bilag 4. DWP og LazWell™-plade-formater

Ekstraktionsproces

24 well deep well plate (DWP). V og U-shaped bottom, height 50 – 55mm.



LDTD LazWell™-plate, 96 well microtiter plate

Length 127,8 mm, Width 85,5 mm. Distance between wells (center-center): 9,1 mm. Plate height 14,5 mm, well depth 9,5 mm



Bilag 5. Robotcentrifuge fra Hettich



ROTANTA 460 ROBOTIC



- Automated loading and unloading of the centrifuge without interruption
- The centrifuge has a maximum speed of 6,200 rpm / RCF of 6,446
- It has a maximum capacity of 4 x 250 ml tubes, 24 microtitre plates or four deep wall plates or comparable vessels
- The centrifuge can be set to any temperature in the range -20°C to +40°C
- Positioning accuracy < 0.6 mm
- 89 programmable memories

Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Föhrenstr. 12
D - 78532 Tuttlingen
Germany

Bilag 6. Er det lige meget, hvor stor spækormen er?

Det undersøges, om Ligning 1 i afsnittet "Kalibreringskurver for androstenon og skatol" holder, uanset spækprøvens masse.

$$C_a = \frac{A_a}{A_{is}} \cdot \frac{0.350}{m_s} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot C_{is} \quad \text{Ligning 1.}$$

Hvor A_a og A_{is} er det målte areal af fragmenttoppene på MS/MS for henholdsvis analytten og dens interne standard. C_{is} er den spikede koncentration af intern standard i den tilsatte acetonitril, α hældningen på kalibreringskurven for forsøg, hvor spækmassen er holdt konstant på 0,350 g. C_a er den søgte koncentration af analytten i den rene spækprøve. Når metoden benyttes på et slagteri, vil der ved prøveudtagningen være en vis spredning i massen på de udtagne spækprøver. En prøvetagningspistol, som er indstillet til at udtage 0,45 g fedtvæv fra grise, vil typisk levere prøver, som varierer mellem 0,3 g og 0,6 g.

Spørgsmålet er, om denne variation i prøvemasse kan forventes at indvirke på resultatet.

Beregning

Intern standard (eksempelvis for androstanon) tilsættes i fast mængde via acetonitrilfasen. Analytten (eksempelvis androstenon) er naturligt forekommende i fedtprøven.

Formålet med homogeniseringstrinet er at findele spækket så godt, at ligevægt mellem fedtpartikler og acetonitrilfasen indtræder hurtigt. Frem til ligevægt sker der en udveksling af kemiske forbindelser mellem fedtpartikler og acetonitril. Noget af den tilsatte interne standard vil forlade acetonitrilfasen og diffundere ind i fedtpartiklerne, og noget af analytten i fedtpartiklerne vil bevæge sig ud i acetonitrilfasen.

Fra start ved tilsætning af acetonitril og frem til ligevægt mellem fedtfase og acetonitril er forholdene:

Tidspunkt	Tilsatte masser		Androstenon		Intern standard	
	ACN (g)	Fedt (g)	Konc. i fedt (ng/g)	Konc. i ACN (ng/g)	Konc. i fedt (ng/g)	Konc. i ACN (ng/g)
Tid = 0	M_{ACN}	M_{Fat}	C_a	0	0	C_{IS}^0
Ligevægt	M_{ACN}	M_{Fat}	X_{fat}^L	X_{ACN}^L	C_{fat}^L	C_{ACN}^L

Tidspunkt	Androstenon		Intern standard	
	Mængde i fedt (ng)	Mængde i ACN (ng)	Mængde i fedt (ng)	Mængde i ACN (ng)
Tid = 0	$M_{fat} \cdot C_a$	0	0	$M_{ACN} \cdot C_{IS}^0$
Ligevægt	$M_{fat} \cdot X_{fat}^L$	$M_{ACN} \cdot X_{ACN}^L$	$M_{fat} \cdot C_{fat}^L$	$M_{ACN} \cdot C_{ACN}^L$

I ovenstående tabeller kender vi ikke forholdene ved ligevægt; altså hvor meget intern standard der er vandret over i fedtfasen, og hvor meget androstenon som forbliver i fedtfasen.

Vi antager, at vi måler på en kendt fedtmatrice, hvor vi kender androstenonkoncentrationen X_{fat}^0 , før ekstraktionen igangsættes.

Vi kender også koncentrationen C_{IS}^0 af intern standard i den acetonitril, vi tilsætter.

Opgaven er nu at finde koncentrationerne af intern standard og androstenon i acetonitrilfasen efter ligevægt.

Til dette bruger vi to hovedprincipper i den fysiske kemi:

1. Massevirkningsloven anvendt på en fordeling mellem faser, som er i ligevægt:

$\frac{X_{ACN}^L}{X_{fat}^L} = K_a$ og $\frac{C_{ACN}^L}{C_{fat}^L} = K_{is}$, som siger, at forholdet mellem koncentrationer i de to faser er konstant for konstant temperatur. Konstanten K kaldes for fordelingskonstanten.

2. Loven om massebevarelse (summen af mængder efter ligevægt skal være lig med mængden før ligevægt):

$$M_{fat} \cdot X_{fat}^L + M_{ACN} \cdot X_{ACN}^L = M_{fat} \cdot C_a$$

og

$$M_{fat} \cdot C_{fat}^L + M_{fat} \cdot C_{ACN}^L = M_{ACN} \cdot C_{IS}^0$$

Løses disse ligningssystemer for koncentrationerne af intern standard og androstenon i acetonitrilfasen efter ligevægt, fås udtryk for koncentrationer af intern standard og androstenon i acetonitrilfasen, efter ligevægt er indtrådt:

$$\text{Intern standard: } C_{ACN}^L = \frac{K_a \cdot C_a}{1 + K_a \cdot \frac{M_{ACN}}{M_{fat}}} \quad \text{og androstenon: } X_{ACN}^L = \frac{K_{is} \cdot C_{IS}^0 \cdot \frac{M_{ACN}}{M_{fat}}}{1 + K_{is} \cdot \frac{M_{ACN}}{M_{fat}}}$$

Regneeksempel 1

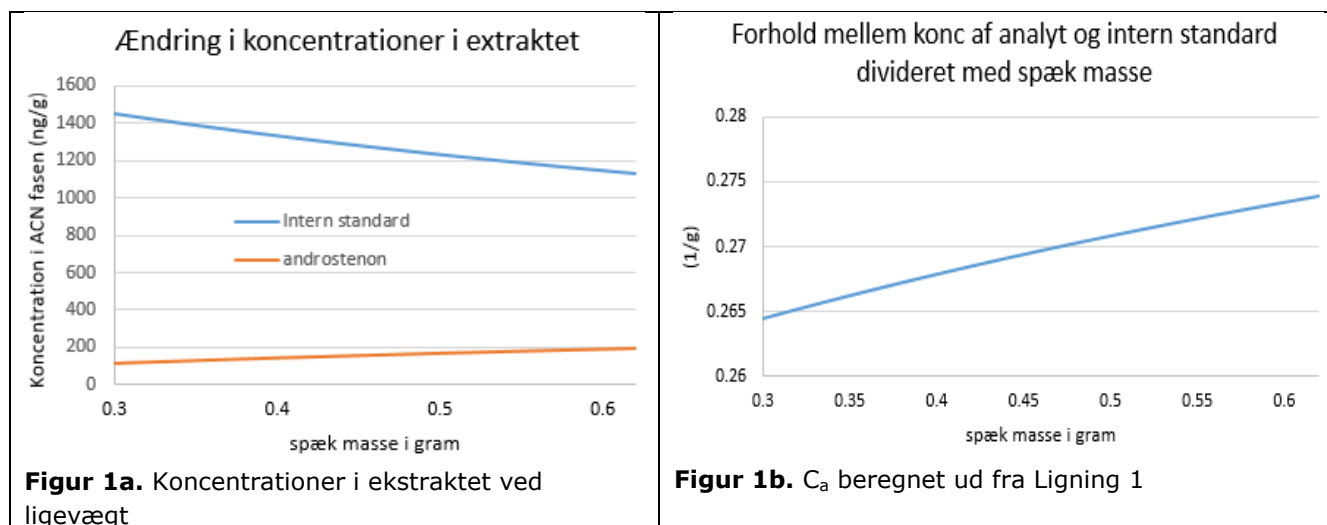
Vi regner først på en situation, hvor fordelingskonstanterne mellem de to faser er forskellige.

Sæt $K_{is} = 0,4$ og $K_a = 0,5$ (altså at fordelingskonstanterne mellem fedt og acetonitrilfaserne er forskellige for henholdsvis den valgte interne standard for androstenon og selve androstenonen).

Sæt startkoncentrationen af androstenon i fedtprøven til 1,000 ng/g og startkoncentrationen af intern standard i acetonitril til 2,000 ng/g.

Sæt endvidere massen af tilsat acetonitril til 2 g (2,5 ml).

Vi lader nu fedtprøvens masse variere mellem 0,3 g og 0,62 g, og i figur 1a ser vi konsekvensen:



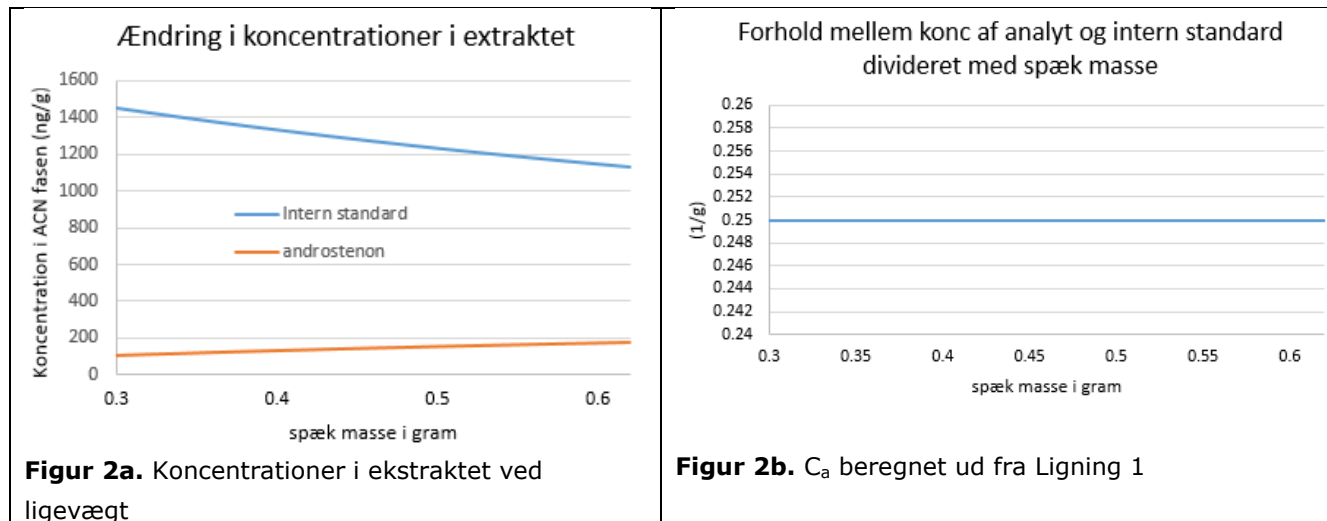
Af figur 1a ses, at koncentrationen af androstenon i acetonitrilfasen stiger med spækmassen, og at koncentrationen af intern standard falder med ormehmassen.

I figur 1b er Ligning 1 fra afsnittet om kalibreringskurver anvendt ved at tage forholdet mellem de to kurver i figur 1a og dividere dette med spækprøvens masse. Vi ser, at dette ikke giver et koncentrationsforhold, som er helt konstant og uafhængigt af spækprøvens masse.

Regneeksempel 2

Nu regnes på en situation, hvor fordelingskonstanterne er ens for androstenon og intern standard.

$K_{is} = 0,4$ og $K_a = 0,4$. Alle andre parametre er uforandrede i forhold til regneeksempel 1.



Det ses i figur 2a, at koncentrationen af intern standard falder, mens koncentrationen af androstenon stiger i acetonitrilfasen for stigende spækmasse. I figur 2b ses, at forholdet mellem androstenonkoncentrationen og intern standard-koncentrationen divideret med spækmassen er konstant, og at Ligning 1 dermed er gyldig for alle ormemasser.

Konklusioner

Ligning 1 i afsnittet om kalibreringskurver, hvor der blot divideres med spækprøvens masse, holder kun, hvis fordelingsforholdene mellem fast fase og solvent for analytten og dens interne standard er ens. Hvis dette ikke er tilfældet, skal spækprøvens masse altid være den samme.

Det kan umiddelbart antages, at deutereret skatol og selve skatolen fordeler sig ens mellem fedtfase og acetonitril, da de kemisk opfører sig helt ens.

Som intern standard for androstenon er valgt forbindelsen **5 α -androstan-17 β -3-one**, som ligner androstenon så meget, at fordelingsforholdet mellem fedtfase og acetonitrilfase for de to forbindelser kan sættes lig med hinanden. Altså gælder Ligning 1, hvilket også er eftervist eksperimentelt og beskrevet i valideringsafsnittet.

Man skal være opmærksom på, at det målte areal af den interne standard falder betragteligt med stigende prøvestørrelse. Dette bevirker, at signal-støj-forholdet på bestemmelsen af arealet af den interne standard forringes.

Modsat virker, at en større spækprøve er mere repræsentativ for slagtekroppen end en lille prøve, så målingen bliver overordnet set ikke mindre pålidelig af større spækprøve.