



# Slutrapport

## SAF. Optimering af laboratoriemetode til sortering af hangrise

Birgitte Lange Winther Lund

19. december 2019

Projektnr. 2007083

Version 1

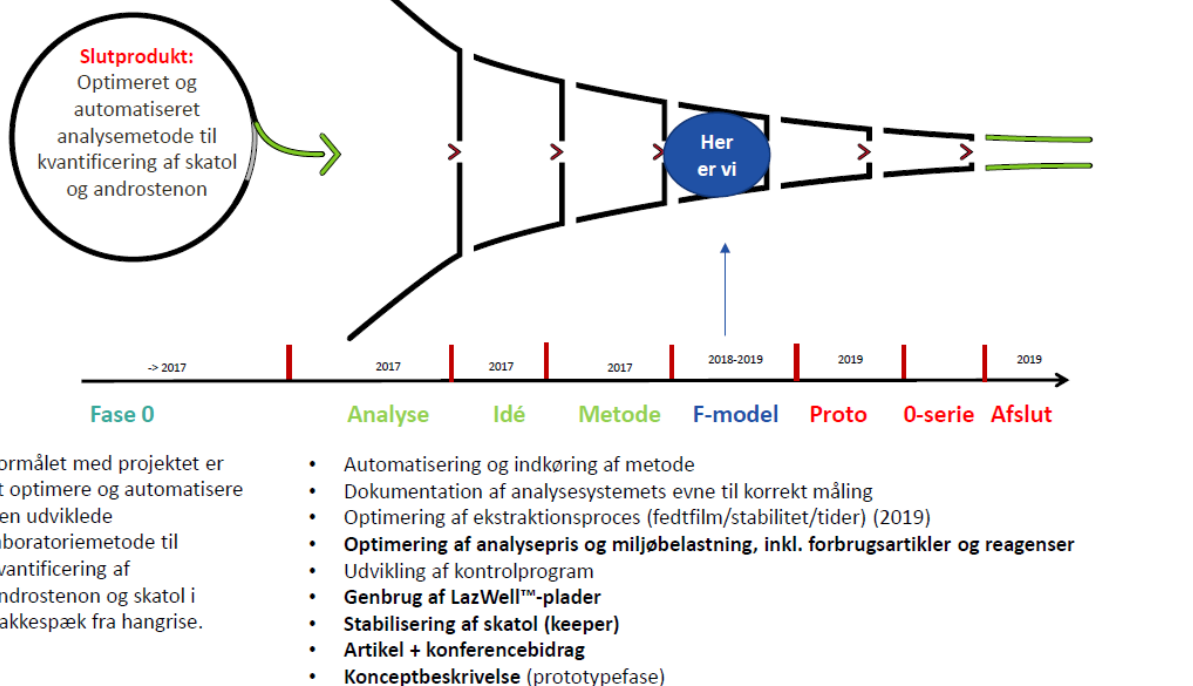
BWGL/OAN/MT/KIJ

### Projektets baggrund

Den danske svinekødsbranche har indgået en frivillig aftale om stop for kastration af hangrise uden bedøvelse efter 2018. For at imødekomme denne aftale kan hangrisene enten produceres som intakte hangrise, lokalbedøves ved kastration eller immunokastreres. En forudsætning for produktion af ukastrerede hangrise er en detektionsmetode til frasortering af hangriseslagtekroppe med ornelugt. Der er i perioden 2014-2017, med finansiering fra SAF og GUDP, udviklet en laboratoriemetode til måling af ornelugtstofferne, androstenon og skatol. Metoden opfylder de krav til hastighed, analysepris og robusthed, som slagterierne har opstillet til en online målemetode. I nærværende projekt optimeres metoden yderligere og automatiseres mhp. efterfølgende implementering på slagterier. Fokus er at reducere prisen, øge analysehastigheden og automatisere selve laboratorieanalysen i overensstemmelse med tidligere udarbejdede forskrifter. Projektet danner grundlag for et effektivt og fuldautomatisk hangrisemålesystem, og afgang af dansk grisekød kan hermed opnå fuld dokumentation for, at hangrise bliver objektivt målt for fravær af ornelugt.

Projektet er afviklet i perioden 1. januar 2018 til 31. december 2019 og følger DMRI's innovationsmodel som vist i Figur 1. Projektet befinder sig i F-modelfasen og går først i Protofasen, når systemet er implementeret på et dansk slagteri.

### Stop for kastration – WP1 Optimering af laboratoriemetode til sortering af hangrise



Figur 1. DMRI's innovationsmodel.

Leverancerne for projektet er:

- 1) Et funktionsdygtigt analyseudstyr til samtidig måling af skatol og androstenon er opstillet i egnet laboratorium.
- 2) Den kemiske ekstraktion af skatol og androstenon er optimeret, så analyse- og svartider samt omkostninger pr. analyse er reduceret.
- 3) En mere miljøvenlig ekstraktionsproces er udviklet.
- 4) En rensemetode til de brugte LazWell™-plader er udviklet, så disse kan genbruges mindst én gang, og kostprisen pr. analyse hermed reduceres med mindst ca. 20%.
- 5) Design af og materialevalg for brugsartikler af plastik er optimeret, så omkostninger til anskaffelse og efterfølgende bortskaffelse reduceres.
- 6) En kemisk forbindelse til stabilisering af skatol på LazWell™-pladen er identificeret.
- 7) En artikel og et konferencebidrag er udarbejdet vedrørende anvendelsen af den udviklede analysemetode i et industrielt miljø.
- 8) Muligheder for optimering af analysemetoden er dokumenteret i en teknisk rapport.
- 9) Konceptbeskrivelse for målesystemet er udarbejdet.

Projektet er tilknyttet porteføljestyregruppen for Sikkerhed & Kvalitet, der ved projektets afslutning havde følgende medlemmer: Søren Tinggaard, Danish Crown, Nicolaj Nørgaard, Danish Crown, Michael Larsen, Tulip Food Company, Gitte Pedersen, Tican Fresh Meat og Lars Hinrichsen, DMRI.

Projektet blev ledet af Susanne Støier, og projektgruppen har primært bestået af Ole Andersen, Tina Frogne, Rune Birkler, Claus Borggaard, Kirsten Jensen og Birgitte Lund.

Projektet har været finansieret af SAF med et samlet budget på 3.500.000 kr.

### Aktiviteter

Den udviklede laboratoriemetode til måling af skatol og androstenon er indkørt på DMRI, men den er optimeret yderligere og automatiseret mhp. efterfølgende implementering på slagterier. Homogeniseringstrinnet i laboratoriemetoden er optimeret for at kunne imødekomme de krav, der er opstået i forbindelse med automatisering og valg af udstyrsleverandører. Effektiviteten af homogeniseringen er afgørende for det endelige analyseresultat. Endvidere var der behov for at optimere analysemetoden mhp. at reducere analyseprisen og øge analysehastigheden yderligere. Endelig er selve laboratorieanalysen automatiseret i overensstemmelse med forskrifterne udarbejdet i det tidligere projekt. Analyseudstyret er i videst muligt omfang baseret på standardkomponenter, og målet er, at udstyret i daglig drift – bortset fra en morgenkontrol, inden dagens slagtinger – skal kunne fungere fuldautomatisk.

Aktiviteterne omfattede følgende:

- 1) Hel eller delvis automatisering af selve laboratorieanalysen.
- 2) Laboratieforsøg mhp. test af forskellige udformninger af reagensglas til homogeniseringstrinnet i den automatiserede analysemetode.
- 3) Recirkulering af LazWell™-plader. De mikrotiterplader, som benyttes i laboratoriets måleenhed, har plads til 96 prøver ad gangen. Af hensyn til hastighed og målenøjagtighed kan plader kun fyldes med 32-48 prøver. For at holde prisen pr. analyse på et minimum skal opbrugte plader frasorteres, og ikke opbrugte plader skal recirkuleres, så alle brønde udnyttes.
- 4) Indkøring af det komplette analysesystem. Dokumentation af analysesystemets evne til korrekt måling af skatol- og androstenonindholdet i spækprøver.

- 5) Udvikling af et morgenkontrolprogram, som skal teste udstyrets funktioner og evne til at måle korrekt, inden de første hangrise optræder på slagtelinjen. Herudover udarbejdes procedure for kørsel med spækstandarder med kendte koncentrationer af androstenon og skatol.
- 6) Videreudvikling og optimering af den kemiske analysemetode, så analysepris og miljøbelastning minimeres yderligere. Procestider begrænses for yderligere at afkorte tiden fra prøveudtag, til resultat foreligger.
  - Optimering af procestider og den kemiske ekstraktion af skatol og androstenon med henblik på at mindske analyse- og svartider samt omkostninger pr. analyse.
  - LazWell™-plader udgør den væsentligste udgift ved analysens drift. Det undersøges, om der kan udvikles en simpel renseproces, så pladerne kan genbruges. Det undersøges, om der findes kemiske forbindelser, som kan tilsættes prøven med det formål at stabilisere skatolen på LazWell™-pladen, så skatolen ikke gradvist fordamper.
- 7) Konceptbeskrivelse for det opdaterede målesystem.

Parallelt med nærværende udviklingsprojekt har Danish Crown påbegyndt implementeringen af den udviklede analysemetode i Ringsted. En del af projektets aktiviteter er derfor udført i samarbejde med Danish Crown, mens andre er foretaget i DMRI's laboratorium. Dvs. at metoden er gået fra at være en laboratoriemetode implementeret i DMRI's laboratorium til at være et fuldautomatiseret set-up omfattende prøveudtagning, prøvetransport, prøveforberedelse og analyse, hvilket har medført nye udfordringer og ændringer. Nærværende projekt har – udover at optimere metoden – medvirket til at løse nogle af disse udfordringer.

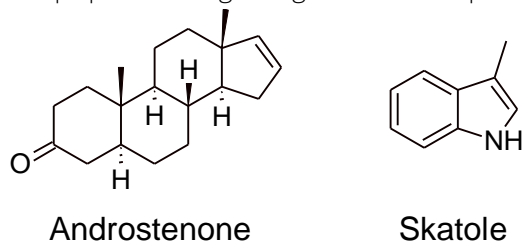
### Sammenfatning

- Et funktionsdygtigt analyseudstyr til samtidig måling af skatol og androstenon er opstillet og indkøbt på DMRI's laboratorium. Det har endnu ikke været muligt for et værtsslagteri at opstille et analyseudstyr, men grundlaget for at kunne gøre det foreligger.
- Den kemiske ekstraktion af skatol og androstenon er optimeret, så analyse- og svartider samt omkostninger pr. analyse er reduceret.
- En mere miljøvenlig ekstraktionsproces er udviklet.
- Stabilitet af ekstrakter: Efter homogenisering og centrifugering er ekstrakterne stabile i op til 26 timer ved stuetemperatur.
- For at optimere homogeniseringsprocessen er der udarbejdet forslag til nyt design af 24-brøndsplade til homogenisering af spækorme.
- Design af DeepWell-plader: For at undgå emulgering og for at optimere homogeniseringstiden er forskellige typer fedtbiopsier og DeepWell-plader testet. Udformning af biopsier og DeepWell-plader er fastlagt, og der er opnået en optimering af analyseprisen mht. reagenser.
- I udviklingsforløbet er laboratoriemetoden optimeret, så derivatisering af skatol er overflødig. Hermed er den samlede analysetid reduceret.
- Tørring af LazWell™-plader: Der er udarbejdet en standardiseret metode for tørring af LZ-plader efter påsætning af ekstrakter.
- Recirkulering af LazWell™-plader: For at overholde den fastlagte tørretid af LZ-pladerne er der arbejdet med to scenarier, hvor pladerne enten fyldes med 24 eller med 48 prøver ad gangen. Ved opstilling af måleudstyr beslutes, hvilket scenarie der implementeres.
- Mængden af interne standarder er reduceret, hvilket bidrager til at sænke analyseomkostningerne og begrænse mængden af kemikalieaffald.
- Kontrol af målesystemet: Der er arbejdet på at udvikle en ny matricestandard, der ikke indeholder et naturligt indhold af skatol og androstenon. Matricestandarden anvendes som kontrol af målesystemet.
- Forslag til morgenkontrollsystem er udarbejdet.

- Laboratoriemetode for måling af androstenon og skatol er akkrediteret.
- Optimeringsarbejdet er dokumenteret.
- Den udviklede og validerede analysemetode er præsenteret ved konferencer og seminarer: ESAC 2018 (Executive Seminar in Analytical Chemistry), Eurolab Danmark 2018, EAAP 2018 (69<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Federation of Animal Science).
- Oplæg til publicering af metoden er udarbejdet.

### Resume af laboratoriemetode

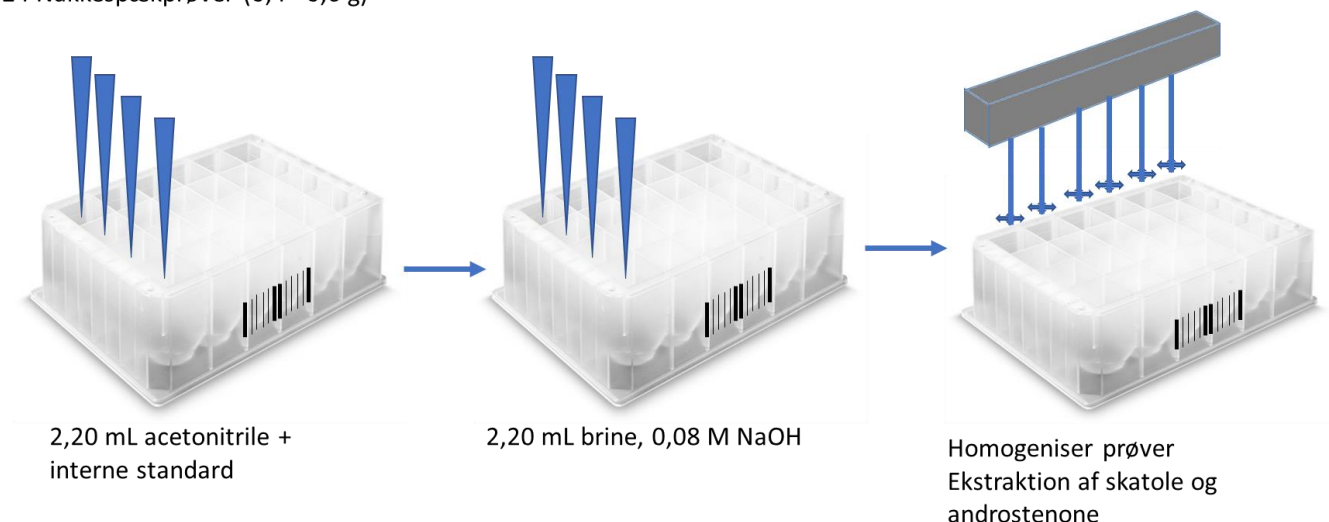
Den udviklede laboratoriemetode til kvantificering af androstenon og skatol består kort fortalt af en ekstraktion af stofferne fra en biopsiprøve udtaget af grisens nakkespæk.



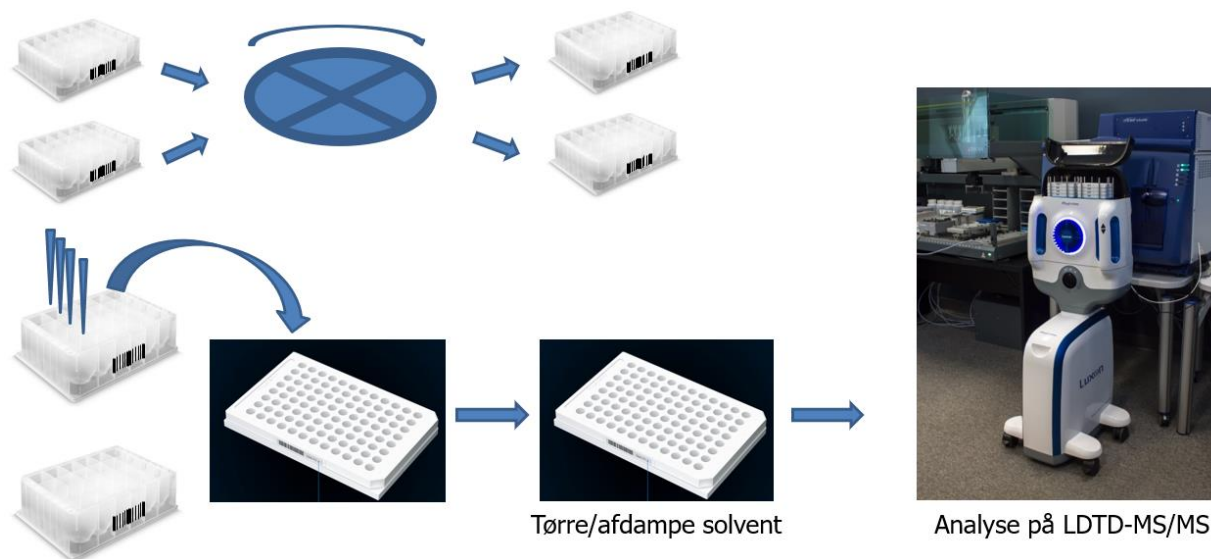
Figur 2. Lugtkomponenter i nakkespæk.

Ekstraktionen er en homogenisering af fedtprøven tilsat acetonitril indeholdende interne standarder, og en basisk opløsning (Figur 3). Homogeniseringen foregår i brøndplader og med en speciel kniv, der forårsager en meget fin blendning af fedtprøverne. Hvis prøverne ikke homogeniseres under de rette betingelser, kan der ske en emulgering, og ekstraktionen af komponenterne bliver utilstrækkelig. Efter ekstraktionen centrifugeres prøverne i brøndpladen, og en lille mængde supernatant overføres til en LazWell™-plade. Prøverne i LazWell™-pladen tørres i ca. fem minutter, hvor solventet afdampes, og pladen loades i målesystemet og analyseres på LDTD-MS/MS (laser diode thermal desorption tandem mass spectroscopy) (Figur 4).

24 Nakkespækprøver (0,4 - 0,6 g)



Figur 3. Laboratoriemetode del 1.



Figur 4. Laboratiemetode del 2.

## Resultater

### *Implementering af laboratiemetode*

Der er i DMRI's laboratorium opstillet udstyr, der kan analysere for androstenon og skatol. Sideløbende med projektet er der i Hangriselaboratoriet, Danish Crown, Ringsted opsat et automatiserbart analyseudstyr. Grundet kompleksiteten af automatiseringen og deraf omfattende forsinkelser har det endnu ikke været muligt at teste den udviklede metode på slagteriets udstyr. I skrivende stund er arbejdet med opførelsen af det automatiserede udstyr i sine afsluttende faser.

### *Optimering af homogeniseringen*

For at få en effektiv ekstraktion er der flere krav til homogeniseringen:

- Homogeniseringen skal foregå i 24 brønds DeepWell-plader
- Fedtprøven må ikke kunne undslippe homogenisatorkniven
- Fedtprøven skal hurtigt indfanges af homogenisatorkniven
- Øgningen af væskestanden skal begrænses under homogeniseringen for at reducere mængden af små fedtpartikler, der ikke er fuldt homogeniseret, og for at væskestanden ikke overstiger højden af brønden
- Højden af brøndpladerne må maksimalt være 5,5 cm, grundet centrifugens specifikationer.

I udviklingsarbejdet er der i DMRI's laboratorium anvendt plastikreagensglas under homogeniseringen, men disse er for høje i forhold til den valgte pipetteringsrobot. Det har ikke været muligt at finde en kommerciel udbyder af 24 brønds DeepWell-plader med en højde på 5,5 cm. Derfor har der – sammenholdt med ovenstående krav – været et behov for at udvikle et nyt brøndpladeforamt. Inspireret af designet af kommercielle brøndplader og homogeniseringsglas/kuvetter, er følgende testet i laboratoriet:

- 1) Forskellige udformninger af kuvettedesign, ved hjælp af 3D-printede prototyper (Figur 5)
- 2) To forskellige homogenisatorstave fra Kinematica er afprøvet (Figur 6)

De forskellige afprøvede udformninger af indsats i brøndplade har vist, at både konsistens og ekstraktionsudbytte kan påvirkes i væsentlig grad sammenlignet med det oprindelige reagensglas, der benyttes i laboratiemetoden.

Efter homogenisering er homogenatet overført til reagensglas for at kunne centrifugere prøven. Konsistensen svinger fra en meget tyk (nærmest mayonnaise) til inhomogen prøve, hvor der er klar solvent adskilt fra det homogeniserede spæk.

Ved det kløverformede design indfanges spækormen uden risiko for, at den undslipper homogenisatorstaven. Væskestanden stiger til lige under kanten. Ved det kløverformede design har homogenatet samme konsistens og ekstraktionsudbytte som ved laboratoriemetoden.

Undervejs blev det observeret, at konsistensen af homogenatet varierer mellem de forskellige udformninger af kuvetter. Faktisk så meget, at ekstraktionseffektiviteten kan reduceres til 1/3 af laboratoriemetoden. Den kløverformede kuvette med flad bund er den bedste af de afprøvede prototyper, sammen med den runde (alm. centrifugeglas/reagensglas).

Der er fremsat to løsningsforslag:

- 1) Kinematica homogenisatorstav, model (PT-DA 1612/2EC)
- 2) Modifieret design af brønde til brøndplade



**Figur 5.** Der er arbejdet med forskellige brønddesign til 24 brønds DeepWell-plader. Disse er fremstillet vha. 3D-printning. Kuvetten længst til højre svarer til formatet på de reagensglas, der anvendes i laboratoriet.



**Figur 6.** To homogeniseringsknive er anvendt under optimeringen af homogeniseringen. Kniven til venstre har vist sig at være mest effektiv.

For at bekræfte ovenstående er der testet 3D-printede versioner af det kløverformede format. Disse har under laborietest vist sig ikke at være tætte under centrifugering, men det har dog været muligt at lave en visuel vurdering af brøndformatet. I mange tilfælde blev der under homogeniseringen dannet en emulsion, som erfaringsmæssigt har vist sig at give et dårligt ekstraktionsudbytte. Yderligere har det vist sig, at de kløverformede DeepWell-plader er komplicerede og dyre at producere. I tillæg er der pga. valget af rørtransportsystem blevet opsat krav til yderligere at reducere højden af brøndpladerne. Derfor blev det besluttet, at en cylinderform, der svarer til reagensglassene, der blev anvendt på DMRI's laboratorie under udviklingen af analysen, men med en reduceret højde, skal anvendes i det automatiserede system. Derved er der sikkerhed for, at homogeniseringen ikke er påvirket af typen af brøndplade. Desuden er denne type brøndplade relativ enkel og billig at producere.

#### *Videreudvikling og optimering af den kemiske analysemetode*

Under udviklingen af laboriemetoden sås en fedthinde, der lå ovenpå supernatanten efter centrifugeringen. Denne hinde blev overført via pipettespidser til LazWell™-pladen og generede derefter målingen på LDTD-MS/MS-udstyret ved kraftig ion-suppression af MS-signalet.

Udover en praksis, hvor supernatanten overføres til en ekstra 96-brøndsplade inden afsætning på LazWell™-pladen, er der arbejdet med flere forskellige løsninger på problemet med fedthinden.

Potentielle løsningsmuligheder:

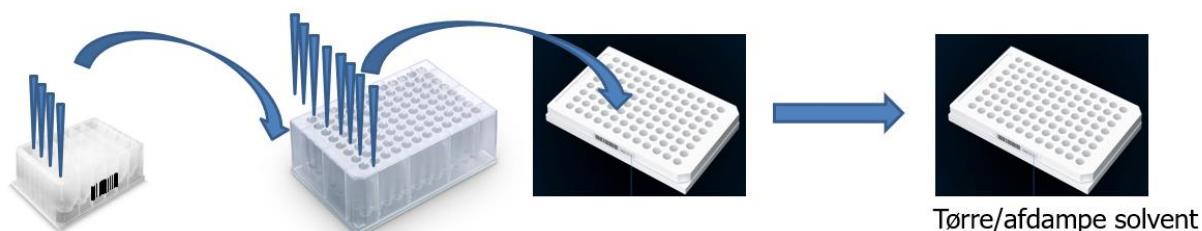
- 1) Mekanisk fjernelse af evt. fedthinde på pipettespidser.
- 2) Tilsætte detergent (4 forskellige typer) både før og efter homogenisering.
- 3) Tilsætte hexan, som vil opløse fedtet.
- 4) Fjerne fedthinden med svagt flow af N<sub>2</sub>.
- 5) Kraftigere centrifugering efter homogenisering af spækormen.

I praksis vil fedthindeproblemet kunne løses ved at:

- 6) overføre 600 µL af den organiske fase til separat 96-brøndsplade.
- 7) fjerne evt. aflejring af fedthinde på pipettespids mekanisk.
- 8) blæse med N<sub>2</sub> for at skubbe fedtlaget til siden.

Eksempel 6 illustreres i Figur 7:

- 1) Overførsel af 600 µL af den organiske fase til separat 96-brøndsplade.
- 2) Mekanisk fjernelse af evt. aflejring af fedthinde på pipettespids.



**Figur 7.** Alternativt løsningsforslag til at fjerne fedthinde

De foreslåede løsningsmuligheder er alle blevet afprøvet uden større succes. Imidlertid er det observeret, at når der arbejdes med friske spækprøver, så er fedthinden visuelt mindre, end når der – som på DMRI-laboratoriet – arbejdes med optøede, frosne spækorme. Problemet ser ud til at være løst ved at anvende tynde, tefloncoatede pipettespidser på væskerobotten. Indledende forsøg på det nyopstillede udstyr med anvendelse af disse pipettespidser ser således fornuftige ud. Dog skal det forventes, at der vil være et stort antal prøver, der kommer fra andre slagterier: Disse prøver vil sandsynligvis først blive analyseret dagen efter. Dette giver fedtet tid til at sætte sig, og der dannes en fedthinde under prøveforberedelsen. Udstyrsleverandøren af pipetteringsrobotten forventer dog ingen problemer med overførsel af fedthinden til LZ-pladerne.

#### *Dokumentation af analysesystemets evne til korrekt måling*

Et vigtigt element i metodetokumentationen er analysesystemets evne til korrekt måling. Der er til udviklingen og optimeringen af laboratoriemetoden anvendt frosne spækstykker, da det ikke har været praktisk muligt at få leveret friske spækstykker eller spækorme fra slagteriet på daglig basis.

Spørgsmålet har været, hvorvidt det har indflydelse på analyseresultatet, om spækormene har været nedfrosset inden analyse.

Forsøg er sat op, hvor der er hentet friske og tilsvarende frosne spækprøver fra slagteriet i Ringsted for at analysere dem med laboratoriemetoden og sammenligne måleresultaterne med den nuværende analysemetode (skatolækvivalenter). Der er udtaget 4 spækprøver fra hver gris. Fra samme gris er der analyseret 2 spækprøver samme dag, og 2 spækprøver er indfrosset til analyse 2 dage senere. På grund af et meget lille antal hangrise den pågældende morgen var det ikke muligt at udtage spækprøver fra mere end 9 hangrise til analyse.

En oversigt over analyseresultaterne er samlet i Tabel 1.

Der er foretaget en tosidet (parret data) t-test for at evaluere, om der er signifikant forskel mellem måleresultaterne på de 2 dage.

Androstenon: t Stat 1,176; t Critical 2,262 (P 0,27)

Skatol: t Stat -0,094; t Critical 2,262 (P 0,93)

Der er således ikke statistisk signifikant forskel for skatol og androstenon ved forskellig opbevaring.

Det nuværende hangriseudstyr hos Danish Crown i Ringsted måler skatolækvivalenter, dvs. summen af hovedsageligt skatol og indol. Den gennemsnitlige forskel mellem skatolkoncentrationer målt med den udviklede laboratoriemetode på DMRI og skatolækvivalenter målt med hangriseudstyret i Ringsted er 0,03 µg/g, se Tabel 1. Da hangriseudstyret måler summen af indollignende stoffer (dvs. bl.a. skatol og indol), vil der i visse tilfælde opleves en større forskel på skatolækvivalenterne og skatolkoncentrationen fundet ved MS-metoden, da grisens indhold af indol ikke indgår i analysen.



**Tabel 1.** Analyseresultater for skatol og androstenon for friske og frosne spækprøver (6 dage ved -20°C) samt nuværende hangriseudstyret på Danish Crown, Ringsted.

	Androstenon		Skatol		
	Dag 0 C (µg/g)	Dag 6 (-20°C) C (µg/g)	Dag 0 C (µg/g)	Dag 6 (-20°C) C (µg/g)	Skatolanlæg C (µg/g)
Gris 1	0,97	0,95	0,09	0,09	Lugt*
Gris 2	0,51	0,54	0,06	0,06	0,06
Gris 3	2,45	2,49	0,06	0,06	0,08
Gris 4	5,19	5,32	0,21	0,22	0,28
Gris 5	2,18	2,51	0,16	0,18	0,21
Gris 6	0,76	0,74	0,16	0,14	0,19
Gris 7	0,38	0,41	0,13	0,12	0,15
Gris 8	0,00	0,00	0,06	0,06	0,08
Gris 9	0,91	0,85	0,06	0,05	0,07

C = koncentration opgivet i µg/g.

\*Lugt betyder manuel (human nose) detektion af hangriselugt for denne prøve.

#### *Udvikling af matricespækstandard*

Under udviklingen af laboratoriemetoden er der anvendt en homogeniseret matrixstandard som husstandard. På grund af variationen i koncentrationerne af skatol og androstenon i hele spækstykker kan disse ikke benyttes som husstandard. Derfor skal der udvikles en matricespækstandard, der har lang holdbarhed og ikke giver en stor koncentrationsvariation. Analyse (dobbelbestemmelse) af matrixstandard plottes i kontrolkortet og anvendes til at følge, om metoden er i kontrol og til at godkende analyseserier af spækprøver.

Matrixstandarden fremstilles ved at udtage et meget stort stykke nakkespæk. Dette stykke blendes, splittes op og fordeles i daglige/ugentlige portioner og nedfryses ved -40°C. Den ibrugtagne portion kan opbevares ved -20°C i maks. 2 måneder. Niveauer bestemmes for hver produktion af ny batch matrixstandard.

#### *Prøveudtagning på slagteri*

På slagteriet er der i 2019 blevet gjort klart til opsætning af et automatisk biopsiværktøj. Biopsiværktøjet placerer fedtprøverne i 24 brønds DeepWell-plader, som transporteres i en lille cylinderformet kapsel gennem et rørsystem videre til analyselaboratoriet. Biopsiværktøjet arbejder med en anden udformning af spækprøverne end ved det tidligere udstyr, og der fås nu en prøve, der har form som en lille cylinder. Der har været løbende sparring med udstyrsleverandøren, og der er udarbejdet en ny homogeniseringsprotokol tilpasset den nye udformning af spækprøverne/biopsierne.

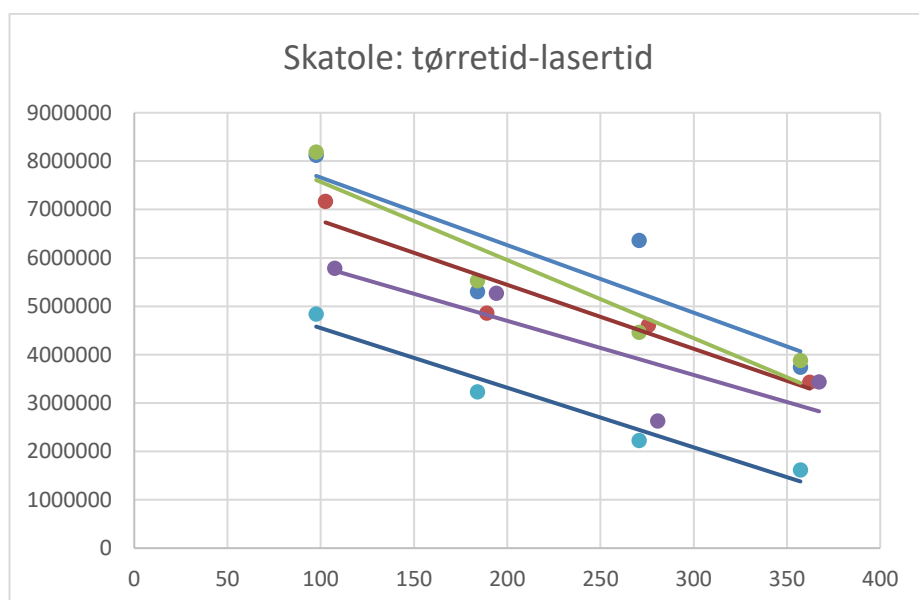
Ved gennemgang af transportsystemet har det vist sig, at der er behov for en yderligere reduktion af højden på DeepWell-pladerne. Disse kan således kun være 53 mm høje.

#### *Automatiseret homogenisering*

Automatisering af analysen kræver et homogeniseringsværktøj, der kan homogenisere seks prøver ad gangen. Dette er nødvendigt, for at homogeniseringen kan holdes under den påkrævede tid på 220 sekunder. Et sådant homogeniseringsværktøj har ikke kunnet findes som hyldevare, og en ekstern fabrikant har derfor udviklet et værktøj. Der har været løbende sparring med udstyrsleverandøren og opfølgning på, om udstyret fungerer som krævet. Analyseudstyret er blevet opsat på slagteriet og indledningsvist blevet indkørt efter protokollen, der anvender den nye type spækprøver. Endelig finjustering af homogeniseringen foretages i 2020. I den forbindelse vil der også blive fulgt op på, om rensningen af udstyret er tilstrækkelig til at undgå *carry-over* mellem prøver. Ved udgangen af 2019 var udstyret ikke leveret med en færdigudviklet vaskeprotokol fra leverandøren.

### Optimering af tørretid af LZ-plader og laser-desorptionen af androstenon og skatol

For at kunne få så mange prøver som muligt analyseret pr. time er det forsøgt at reducere desorptionstiden af androstenon og skatol på LDTD'en. LDTD'en på DMRI er en ældre version end den model, der er anbefalet til det automatiserede analysesystem, og på denne har det ikke været muligt at reducere desorptionstiden uden væsentligt kvalitetstab, dvs. tab af respons og fordobling af %RSD. Der er i den sammenhæng hentet resultater fra Phytronix laboratorium, hvor der er opnået en samlet tid i Luxon på knapt 9 sekunder pr. prøve, inklusiv loading, bevægelse af LZ-pladen mellem brønde og desorption. Herved er Luxon-instrumentet så hurtigt, at det er muligt at påsætte og tørre 48 prøver ad gangen på LZ-pladen og stadig få et pålideligt analyseresultat. Dette giver totalt knap 420 analyser i timen. Hvis det i praksis viser sig, at Hangriselaboratoriets Luxon er langsommere end den, der står i Phytronix laboratorium, kan der være behov for at reducere prøvepåsætningen helt ned til 24 prøver pr. LZ-plade. Herved kan der analyseres 390 prøver i timen. Der er, som tidligere nævnt, behov for at tage LZ-pladens tørretid i betragtning, da skatol er flygtig under *ambiente* betingelser. I nedenstående figur ses, hvordan MS-responset falder ved længere tørretid (inklusive tørring af plade i stinkskab og i laseren). Til trods for responsfaldet er der kun en stigning fra 4% RSD op til 8% RSD af den målte koncentration (Figur 8).



**Figur 8.** MS-respons af skatol påsat på fem forskellige LZ-plader i forhold til den samlede tørretid i stinkskab og i LDTD.

For at teste om tørretiden af LZ-pladerne kunne nedsættes, og om tørringen er afhængig af omgivelserne i laboratoriet, er to forsøg gennemført for at undersøge, om temperaturen og lufthastigheden påvirker tørringen. I det første forsøg er LZ-pladerne efter prøvepåsætning (3  $\mu$ L ekstrakt) placeret på en varmeplade ved to forskellige temperaturer (24,7 og 29°C) og med en lufthastighed på 0,35 m/s, og i det andet forsøg er der benyttet to forskellige temperaturer (20,4 og 24,7°C) og en lufthastighed på 0,5 m/s, samtidig er tørretiden (stinkskab og LDTD) samlet holdt konstant. Prøverne er påsat to gange med 30 sekunders pause. Forsøgsresultaterne viser, at uanset om der er forskellige temperaturer og lufthastigheder i omgivelserne, måler udstyret den samme koncentration af både androstenon og skatol. Der er således ikke behov for at iværksætte foranstaltninger i laboratoriet for sikre konstant temperatur og lufthastighed, hvis ovennævnte parametre holdes. Desuden viser resultaterne, at det er muligt at indregne den tid, det tager LDTD'en af loade og processere prøverne i den samlede tørretid, dog kan pladen først komme på højkant efter 60-90 sek.

Sample Name	Temp. (°C)	Flow (m/s)	Tørretid (s)		Tid i LDTD (s)	Samlet (s)	Androstenon		Skatol	
			1. koll	2. koll			Konc. (mg/kg fedt)	%RSD	Konc. (mg/kg fedt)	%RSD
20c 0,50 m/s	20,4	0,50	240		94	402	1,31	2	0,25	5
2. koll 30's pause				168	177	413	1,37	2	0,27	4
25c 0,35 m/s	24,7	0,35	240		91	381	1,37	2	0,26	8
2. koll 30's pause				158	174	382	1,41	3	0,26	5
25c 0,50 m/s	24,7	0,50	240		101	384	1,34	3	0,26	4
2. koll 30's pause				165	184	392	1,40	2	0,27	4
29c 0,35 m/s	29,0	0,35	210		96	351	1,37	3	0,25	6
2. koll 30's pause				140	179	364	1,43	2	0,27	5

#### *Ekstrakters stabilitet under henstand i PP-rør*

Under drift må det antages, at driftstop kan forekomme. Derfor er det vigtigt at kende ekstrakternes holdbarhed. Disse er testet ved forskellige henstandstider for både androstenon og skatol i polypropylen-ekstraktionsrør med og uden låg. Der ses intet tab af androstenon og skatol ved henstand i 5,5 time før og efter centrifugering. DeepWell-pladen uden låg har et afdampningstab af acetonitril på 8% efter 1 time (Figur 9), hvilket er acceptabelt, da det ikke vil have betydning for koncentrationen af skatol, da der korrigeres med en intern standard. Grundet den lange holdbarhed af ekstrakterne er det aftalt med porteføljestyregruppen ikke at se på udviklingen af en *keeper for skatol*, hvilket ellers indgår i projektbeskrivelsen.

### Stabilitet i PP-reagensrør

### Matrix kontrol

Type	Henstand (t) #	Androstenon		% mg/kg fedt af t0	Skatol		% mg/kg fedt af t0
		mg/kg fedt	%RSD*		mg/kg	%RSD*	
Normalt	0	3,93	1,3	100	0,17	4,4	98
Normalt	0	3,95	2,4	100	0,17	3,3	102
Ej centrifugeret§	2	3,99	3,0	101	0,18	6,1	105
Ej centrifugeret§	5,5	4,07	1,9	103	0,17	4,7	100
Efter centrifugering	2	3,94	1,7	100	0,17	5,4	103
Efter centrifugering	5,5	4,13	2,3	105	0,17	3,6	103

### Standard

Type	Henstand (t) #	Androstenon		% mg/kg fedt af t0	Skatol		% mg/kg fedt af t0
		mg/kg fedt	%RSD*		mg/kg	%RSD*	
Normalt	0	3,18	3,3	101	0,38	3,6	99
Normalt	0	3,14	3,8	99	0,38	5,1	101
Ej centrifugeret	2	3,25	2,6	103	0,37	5,5	96
Ej centrifugeret	5,5	3,14	4,3	99	0,38	5,0	99
Ej centrifugeret	26	3,24	2,2	102	0,37	6,0	97
Efter centrifugering	2	3,15	3,3	100	0,36	6,5	95
Efter centrifugering	5,5	3,14	2,5	99	0,36	5,5	95
Efter centrifugering	26	3,16	2,2	100	0,39	5,1	102

Ej centrifugeret	Uden låg 1 time	3,29	2,8	104	0,38	4,5	99
Efter centrifugering	Uden låg 1 time	3,04	2,2	96	0,37	5,5	96

24 brønds DeepWell (50 mm) med 48 mL acetonitril, placeret i stinkskab ved ca. 0,35 m/s

	Henstand (h) #	% Afdampning tab
0,5 timer	0,5	4
1 timer	1	8
2 timer	2	16
PP reagensrør u låg	1	0,6

# placeret i stinkskab indtil videre analyser (ej mørkt) og overførelse til 1 ml DeepWell

\* 3 påsætninger af en dobbeltbestemmelse = 6 målinger

§ Efter centrifugering var fedtlaget dobbelt så tykt som normalt. Ekstrakter overført manuelt.

**Figur 9.** Stabilitet af ekstrakter i PP-rør.

### Genbrug af LZ-plader

Videreudvikling af vaskeprocessen af LZ-plader er foretaget med henblik på at kunne genbruge LZ-pladerne op til flere gange. Hvis LZ-plader genbruges én gang, reduceres analyseprisen med ca. 20%, og ved to genbrug reduceres analyseprisen med ca. 30%. Der vil dog komme en udgift til etablering af "vaskemaskine" og drift.

Indledningsvist er der lavet forsøg, hvor hver brønd er rensat ved at beskyde brønden en ekstra gang med laseren ved 10 forskellige indstillinger af flow og laser-power. Som udgangspunkt kan pladerne genbruges, hvis der findes de samme koncentrationer som i nye plader, og hvis den relative standardafvigelse ikke stiger mere end nogle få procent. Forsøget viste, at det er muligt at genbruge pladerne, men at der sås en større %RSD end på nye plader. Ved en middel brænding af pladen er det muligt at oprense pladen. For høj eller ingen afbrænding virker ikke, tilsvarende ses med forskellige flowrates.

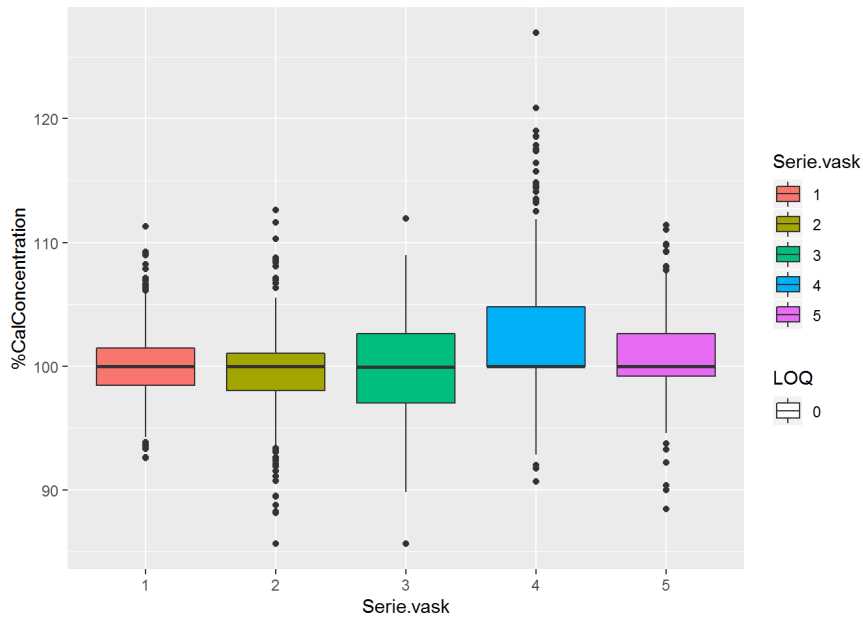
Yderligere forsøg har omfattet vask af brugte LZ-plader i laboratoriets opvaskemaskine med anvendelse af et værktøj, der sikrer grundig vask af alle brønde. Det er undersøgt, om det er muligt at genbruge LZ-plade op til fem gange. Dette er gjort ved, at der – efter påsætning af en analyseserie dvs. dobbelt påsætning på nye plader – er påsat en vasket plade. For at vurdere muligheden af genbrug af pladerne er der lavet et boksplot for androstenon (Figur 10) og skatol (Figur 11) af den opnåede procentvise koncentration i forhold til koncentrationen fundet på en ny plade. Her ses det, at koncentrationen af prøverne ikke ændres ved fem vask, og ligeledes ændrer LOD/LOQ sig ikke væsentligt, se Tabel 2. Ved gennemgang af prøveresultaterne i beregningssoftwaret viser det sig, at kromatograferingen ændrer sig over tid, hvilket medfører, at den automatiske beregning af prøveresultaterne bliver vanskeligere. Dog kan det konkluderes, at det i hvert fald er muligt at genbruge pladerne op til to gange.

**Tabel 2.** LOD/LOQ for androstenon og skatol ved forskellig oprensning og ny LZ-plade.

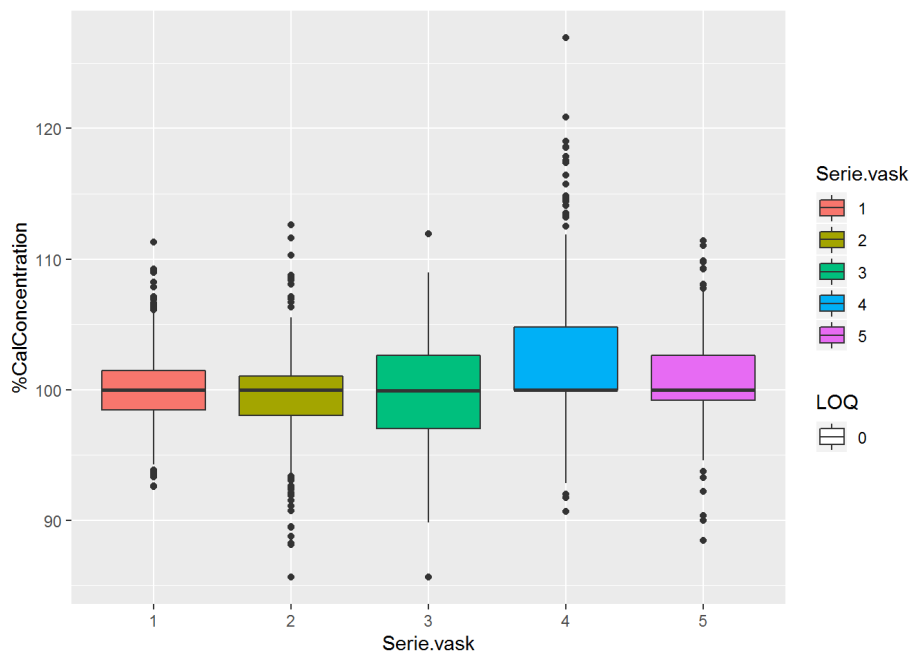
			Androstenon				Skatol				
	n	Exp	%RS				Exp	%RS			
			Middel	D	LOD	LOQ		middel	D	LOD	LOQ
<b>NY LZ-plade</b>	<b>10</b>	<b>0,2</b>	<b>0,208</b>	<b>3,8</b>	<b>0,024</b>	<b>0,071</b>	<b>0,048</b>	<b>0,052</b>	<b>3,3</b>	<b>0,005</b>	<b>0,016</b>
Rens LDTD	10	0,2	0,212	5,3	0,033	0,100	0,048	0,050	3,4	0,005	0,015
vask 1x A	10	0,2	0,214	1,9	0,012	0,036	0,048	0,052	3,8	0,006	0,018
vask 1x B	10	0,2	0,212	1,9	0,012	0,035	0,048	0,053	4,2	0,007	0,020
<b>NY LazWell™</b>	<b>8</b>	<b>ukendt</b>	<b>0,268</b>	<b>2,3</b>	<b>0,022</b>	<b>0,065</b>	<b>ukendt</b>	<b>0,044</b>	<b>4,1</b>	<b>0,006</b>	<b>0,019</b>
vask 4x	8*	ukendt	0,282	2,4*	0,023*	0,070*	ukendt	0,045	9,9*	0,016*	0,047*
<b>NY LazWell™</b>	<b>7</b>	<b>0,2</b>	<b>0,178</b>	<b>1,7</b>	<b>0,011</b>	<b>0,032</b>	<b>0,048</b>	<b>0,050</b>	<b>2,2</b>	<b>0,004</b>	<b>0,011</b>
vask 5x	7	0,2	0,178	3,4	0,021	0,064	0,048	0,050	4,7	0,008	0,024

\*NB! 1 påsætning

Vask 2x og vask 3x ej målt LOD LOQ



Figur 10. Boksplot af % beregnet koncentration af androstenon. X-aksen illustrerer, hvor mange gange en LZ-plade er vasket.



Figur 11. Boksplot af % beregnet koncentration af skatol. X-aksen illustrerer, hvor mange gange en LZ-plade er vasket.

### Opsætning af dagligt kontrolsystem

I et analyselaboratorium er det nødvendigt at udføre kontroller af analyserne for at sikre et validt analyseresultat. Derfor opsættes kontrolsystemer, der kan verificere, at de enkelte processer i analysen fungerer som forventet. Kontrollen omfatter en daglig morgenkalibrering af androstenon og skatol, som samtidig tjekker, at systemet fungerer som forventet, ved at den relative responsfaktor holdes op mod den sidst anvendte. Hvis denne ikke er væsentligt anderledes, må det antages, at der ikke er sket en væsentlig forandring af udstyret. Dette dobbelttjekkes yderligere ved, at der dagligt analyseres en kendt prøve, som ligeledes altid skal give den samme koncentration. Dette plottes i kontrolkort.

Der skal også sættes kontroller op, der tjekker forureningsniveauet af MS og Luxon. Disse kan være blindprøver, men det kan også være clomifen, der vil sige noget om forureningsniveauet af Luxon. Hvor ofte disse skal køres, må vurderes, når systemet er oppe at køre.

Udover morgenkontrollerne må det forventes, at der vil være behov for kontroller i løbet af dagen, som viser, om der er behov for nye kalibreringer og rens af systemet. Løbende vil niveauet af den interne standard vise, om prøven er analyseret korrekt. Det er muligt at forudsige forskellige fejlscaenarier, fx kan der mangle en fedtprøve i DeepWell-pladen, der kan mangle tilsætning af intern standard, eller at homogeniseringsstavene ikke får fat i fedtprøven. Disse problemer kan opdages ved at monitorere den interne standard undervejs. For at få et komplet overblik over systemet er det vigtigt, at alle homogeniseringsstave og pipettespidser anvendes under kontrollerne, dvs. at der bruges 12 brønde. Når det opdages, at der potentielt er behov for en ny kalibrering, skal der være mulighed for at indsatte en prioriteret DeepWell-plade undervejs, som kommer forrest i køen. For endnu bedre at kunne følge analysen har der også været set på, om det vil være muligt at introducere en ekstern standard (fx ved kolesterol, der findes naturligt i fedt, og 2,5-dibromo-indole, der er tilsat brine), men uden succes. Kolesterol ekstraheres i meget lavt udbytte, og indolen giver et meget dårligt respons i MS'en ved den valgte ionisering.

Den udarbejdede procedure til fremstilling af en matricestandard med kendt indhold af skatol og androstenon fungerer rigtig godt som kontrol for systemet. Det kan dog være svært at finde større spækstykker med et passende indhold af androstenon og skatol. Dette kan undgås, hvis det er muligt at bruge en spiket, syntetisk prøve. Indledningsvis er planteolie, C16-C18 frie fedtsyrer, afsmeltet grise-fedt opløst i MTBE og acetonitril testet som substitut for matricen. De indledende resultater viser, at det afsmeltede fedt og grise-fedtet opløst i MTBE kan komme til at fungere med yderligere udvikling. Dog vurderes det, at udviklingen af en anden standard vil kræve uforholdsvist meget udvikling i forhold til det, der potentielt vil kunne vindes ved brug af en homogeniseret matricestandard.

Indledningsvis vil der køre kalibreringer fx hver 2. time eller alternativt: morgen, middag og aften for at vurdere, hvor ofte der under drift er behov for at opdatere kalibreringerne.

#### *Optimering af analyseomkostninger*

I forbindelse med udviklingen af den nye type 24 DeepWell-plade og den automatiserede prøveudtagning har det også været nødvendigt at se på mængden af solventer og prøvemængder. Da pladen skal passe ind i rørtransporten, er der behov for at reducere højden af pladen, hvilket også betyder, at solventmængden skal reduceres. Samtidig er det ønsket, at prøvemængden er så høj som mulig, hvilket vil lette den automatiserede prøveudtagning. Koncentrationen af intern standard er også optimeret, og samlet betyder det, at der er sket en reduktion på 12% på reagenser, hvilket giver en økonomisk besparelse på samlet ca. 4%.

Den største besparelse på analyseomkostninger kommer ved genbrug af LZ-pladerne. Når pladerne bruges to gange, vil det betyde en reduktion på ca. 30%, og hvis pladerne bruges tre gange, vil det betyde en reduktion på ca. 40%.

De beregnede analyseomkostninger tager udgangspunkt i, hvad DMRI har fået oplyst af leverandører, og ikke i, hvad der kan forventes, når der indkøbes til drift.

#### *Valideringsplan*

Der er udarbejdet en valideringsplan, der kan bruges som skabelon, når analysesystemets evne til korrekt måling skal dokumenteres.

#### *Formidling*

Der er lavet en konceptbeskrivelse (prototypefase), og der er skrevet et udkast til en artikel. Det forventes, at der laves et conferencebidrag i 2020.