

# Androstenon-indol-skatol-protokol.

## Indholdsfortegnelse:

1. Formål	side 2
2. Teori	side 2
2. Prøvebehandling	side 2
3. Materialer	side 2
3.1 Apparatur	side 2
3.2 Kemikalier	side 3
3.3 Reagenser	side 3
4. Analyseprocedure	side 4
4.1 Flowsheet	side 4
4.2 Prøveforbehandling	side 4
4.3 Ekstraktion	side 4
5. Kørsel på HPLC	side 5
5.1 HPLC indstillinger androstenon metode	side 5
5.2 HPLC indstillinger indolspæk metode	side 6

## Bilag:

1. Stockopløsninger	side 7
2. Stockopløsninger	side 8
3. Brugsopløsninger	side 9
4. HPLC solventer til androstenon metode	side 10
5. HPLC solventer til indolspæk metode	side 11
6. Protokol til spækprøver	side 12
7. Protokol til biopsiprøver	side 13

# **Androstenon-indol-skatol-protokol.**

## **1. Formål:**

Metoden bruges til kvantitativt at bestemme indholdet af Androstenon, Indol samt skatol i spæk prøver.

## **2. Teori:**

### **2. Prøvebehandling:**

Spækprøverne afvejes og fortyndes med 95/5% Metanol/Elgavand indeholdende intern standard henholdsvis androstanon til bestemmelse af androstenon samt 2-methylindol til bestemmelse af indol og skatol.

Herefter bliver de homogeniseret i et 50 ml centrifugerør med en ultraturrax homogenisator. Prøverne bliver centrifugeret for at fjerne fedtet, så de kan køres på HPLC.

## **3. Materialer:**

### **3.1 Apparatur:**

- Whirlmixer
- Ultra-turrax T25, med S25N-18G homogeniseringsstav
- Pipetter: 2-20µl finnpipette®, 20-200µl finnpipette®, 200-1000µl finnpipette®, 1000-5000µl finnpipette®, multipette®pro
- Ika-vibrax-vxr shaker med opsats til 16 mm reagensglas.
- Centrifuge, Sigma 3K12(rotor nr.12154-eppendorfrør)
- Centrifuge, Sigma 3K18(rotor nr. 11180/13190-50 ml centrifugerør)
- Ultralydsbad, Brandson 2200
- Semi-automatisk krympetang til mikrovials-låg, Mikrolab
- HPLC, HP 1200 serie, med fluorocensdetektor(+DAD detektor)
- 2 ml vial ( med 11 mm krave)
- Crimp-caps (11 mm aluminium m. gummi/teflon septum)
- 50 ml centrifugerør
- 1,5 ml eppendorfrør
- 100 ml infusionsflasker
- Div. pipettespidser

### 3.2 Kemikalier:

- Methanol (HPLC kvalitet ) cas.nr.:67-56-1
- Acetonitril (HPLC kvalitet ) cas.nr.:75-05-8
- Kaliumdihydrogenphosphat (merck 1.04873) cas.nr.:7778-77-0
- 1-benzopyrrol (sigma 13408), indol cas.nr.:120-72-9
- 2-methylindol (aldrich m51407) cas.nr.:95-20-5
- 3-methylindol (fluka 85460), skatol cas.nr.:83-34-1
- Androstanon, (Sigma a2650-000-ring og bestil) cas.nr.: 1224-95-9
- Androstenon, (sigma A8008) cas.nr.: 18339-16-7

### 3.3 Reagenser:

- Stockopløsning - se bilag 1+2
- Brugsopløsning - se bilag 3
- HPLC solventer – se bilag 4+5

## **4. Analyseprocedure:**

### **4.1 Flowsheet:**

Se bilag 6

### **4.2 Prøve forbehandling:**

Der skæres en firkant ud fra spækprøven på ca. 5\*7,5 cm (evt. lidt større hvis spæklaget er tyndt). Der skal være friske kanter på prøven og der skæres en ca. 3- 5 mm skive fra den tykkeste ende på firkanten. Fjern hudlaget fra denne skive (så der ikke er flere ”klumper” tilbage i fedtet) og skær indersiden fra, så der fås en ca. ½-1 cm strimmel fra spæklaget. Denne strimmel skæres i små stykker og afvejes herefter med ca. 0,950-1,050 gram i 50 ml plast centrifugerør og til sidst noteres vægten i regnearket. Prøverne kan herefter ekstraheres eller fryses.

### **4.3 Ekstraktion:**

(Denne del af analysen foregår i laboratorium nr.3289+3278)

Prøverne kan påbegyndes med det samme uanset om de har været i fryseren eller ikke. I vores opsætning af metoden er et passende antal prøver til ekstraktion 16 stk.

Prøverne ekstraheres ved at tilsætte 10,00 ml ekstraktionsvæske til centrifugerørene indeholdende intern standard (2-methylindol, til indol samt androstanon til androstenon). Herefter homogeniseres de på en ultra-turrax T25 på trin 5 (22000 rpm/min) i 30 sekunder, hvorefter centrifugerøret lukkes.

Staven på ultra-turrax rengøres ved at skylles/køres med ca. 60 ml 90 °c dem.vand (fra elkedel) i infusionsflaske indeholdende opvaskemiddel, hvorefter staven tørres med papir. Samme skylning/aftørring sker med ca. 60 ml 90 °c dem.vand i infusionsflaske samt 20-25 ml 96% ethanol i 50 ml centrifugerør. Klargør til 4 prøver af gangen med det varme vand. Herefter er homogenisatoren klar til næste prøve.

Nu sættes prøverne i ultralydsbad i 10 minutter.

Herefter sættes de i vandbad ved 60 °c i 5 minutter, hvorefter de tages op og mixes på whirlmixer 5 sekunder pr. prøve.

Nu stilles prøverne i -80 °c fryseren i 5 minutter, hvorefter de kommer i centrifugen og køres ved 3000 g i 10 minutter ved 0 °c.

Prøverne tages op og der udtages 1 ml fra supernatanten til eppendorfrør.

Disse centrifugeres i 10 minutter ved 15000 g ved 0 °c .

Fra eppendorfrørene udtages der 700 µl til 2 ml HPLC-vial og de lukkes med et crimplåg.

Nu kan prøverne stilles på HPLC'en. Der tages en standardmix fra -20°c fryser.

Husk at lave 2 % Dansylhydrasin/bortrifluorid opløsning til derivatiseringen på HPLC på dagen– se side 9

*(Prøverne kan måske stilles i -20°c fryser til senere kørsel.-ikke testet!!!)*

Hæld prøverne + ethanol fra 50 ml centrifuge-rørerne samt prøverne fra eppendorfrørene i spildflasken (C).

Lad centrifugerørerne samt eppendorfrørene stå til afdampning i stinkskab natten over før de smides ud.

## **5. HPLC indstillinger:**

### **HPLC:**

HP 1200 series vacuum degasser

HP 1200 series binary pump

HP 1200 series autosampler

HP 1200 series thermostat

HP 1200 series thermostatted column compartment

HP 1200 series fluorescence detector

(HP 1200 series DAD-detector- bruges ikke)

### **5.1 Androstenon metode:**

Pumpe:

Flow: 1,00 ml/min

Kørselstid: 10 minutter (i alt 19 minutter pga. ca. 9 min. Injektionsprogram + 10 min.)

Solvent :     A1= 30% Acetonitril/70% 25mM kaliumphosphat pH 6,0/ 0,1 % TFA  
                  B1= 100% Metanol

Gradient:	tid	% solvent B1
	0,00	65,0
	2,00	65,0
	7,50	95,0
	9,50	95,0
	9,90	65,0
	10,00	65,0

Autosampler:

Injektionsvolumen: 20 µl

Temperatur i autosampler: 5°C

Injektorprogram:

1. Draw 16,0 µl from sample
2. Draw 0,0 µl from vial 91 (metanol-wash)
3. Draw 4,0 µl from vial 81 (3:1, 2% Dansylhydrazin/20% BF3 opl.)
4. Draw 0,0 µl from vial 91 (methanol-wash)
5. Mix 20,0 µl in air, max speed, 3 times
6. Wait 5,00 min
7. Inject

Koloneovn:                    Temperatur : 40°C

Detektor:                    Fluorescens - excitation:346 nm  
                                  - Emission: 521 nm

C:\Users\metm\AppData\Local\Microsoft\Windows\Temporary Internet Files\Content.Outlook\9FNXND30\Androstenon-indol-skatol forskrift til spæk190612.docx

Side 5 af 13

DAD: Off

Kolonne: Kinetec C18, 2,6µm, 100Å, 4,6\*100mm samt KrudKatcher Ultra forfilter

**5.2 Indolspæk metode:**

Pumpe:

Flow: 1,00 ml/min

Kørselstid: 12 minutter (i alt ca. 14 minutter)

Solvent : A1= 95/5% 50mM kaliumphosphat pH 6,0/ acetonitril  
B1= 90/10% acetonitril/elgavand

Gradient:	tid	% solvent B1
	0,00	5,0
	1,00	5,0
	4,00	40,0
	9,00	52,0
	9,50	100,0
	10,50	100,0
	11,00	5,0
	12,00	5,0

Autosampler:

Injektionsvolum: 20 µl med wash i vial 91

Temperature i autosampler: 5°C

Koloneovn:

Temperatur : 40°C

Detektor:

Fluorescens - excitation: 285 nm

- Emission: 340 nm

DAD: Off

Kolonne: Kinetec C18, 2,6µm, 100Å, 4,6\*100mm samt KrudKatcher Ultra forfilter

## **Bilag 1 : Fremstilling af stockopløsninger:**

### **Androstenon stockopløsning 5000 mg/L :**

(Opbevares i fryserum), Holdbar: 12 mdr.

**Koncentration: 5000 mg/L (5000 ppm)**

*5 mg androstenon(ampul) + 1000 µl Metanol*

### **Androstenon stockopl. 80 mg/L:**

(Opbevares i kølerum)

**Koncentration: 80 mg/L (80 ppm)**

*25 ml: 400 µl (5000mg/L) ⇒ 25 ml 95/5% v/v MeOH/H<sub>2</sub>O*

*Kan også laves med 100ppm (20 ml:400 µl (5000ppm) ⇒ 20 ml 95/5% v/v MeOH/H<sub>2</sub>O)*

### **Androstanon intern standard, stockopløsning 1000 mg/L :**

(Opbevares i kølerum), Holdbar: 12 mdr.

**Koncentration: 1000 mg/L (1000 ppm)**

*0,1000 g androstanon ⇒ 100 ml 95/5% v/v Meoh/H<sub>2</sub>O*

### **Indol(2-methylindol) intern standard, stockopløsning 1000 mg/L :**

Se indolforskrift, er lavet til indol standardmix og opbevares i kølerum.

### **Androstanon/Indol IS stock til ekstraktionsvæske, 100/10 mg/L :**

(Opbevares i kølerum), Holdbar: 12 mdr.

**Koncentration: Androstanon=100 mg/L (100 ppm) + Indol = 10 mg/L (10 ppm)**

*10,00 ml 1000 mg/L Androstanon IS stock+ 1,00 ml 1000 mg/L indol IS stock  
⇒ 100 ml 95/5% v/v Meoh/H<sub>2</sub>O*

### **5,0 M KOH :**

(Opbevares under stinkskaab i rum 3278), Obs! - laves på isbad

**Koncentration: 5,0 M**

*1000 ml: 280,55 g KOH-pellets (Merck 1.05033) ⇒ 1000 ml elgavand*

**Bilag 2 : Fremstilling af stockopløsninger:****Fremstilling af 1000 mg/L stock-opløsning reagens for indoler.:**

Laves enkeltvis og fyldes med methanol(til HPLC) Laves normalt sammen med

forkortelse	navn	mærke	cas. nr	produkt nr.	konc. mg/L	Mw g/mol	renheds. %	antal gram pr. 100 ml
Indol	1-benzopyrrol	sigma	120-72-9	I3408	1000	117.15	99	0.1000
IS2	2-methylindol	aldrich	95-20-5	m51407	1000	131.17	98	0.1000
Skatol	3-methylindol	fluka	83-34-1	85460	1000	131.17	99	0.1000

**Fremstilling af 10,00 mg/L standardmix stock-opløsning for indoler:**

Udtag fra hver 1000 mg/L stockopløsning til en 100 ml målekolbe og fyld op med 95/5 v/v% MeOH/Vand.

forkortelse	navn	Udtag fra 1000 mg/L opl. i ml	konc. Mg/L
Indol	1-benzopyrrol	1,00	10
IS2	2-methylindol	1,00	10
Skatol	3-methylindol	1,00	10



### **Bilag 3 : Fremstilling af brugsopløsninger:**

#### **Fælles standardmix til spækprøver:**

Konc.: 0,10 mg/L indol/skatol+IS(2-methylindol) samt 1 mg/L androstenone+IS(androstanone)  
Holdbar : 12 mdr.

Udtag til 100 ml målekolbe:

1000 µl 10,00 mg/L indol standardmix stockopl.  
1000 µl 100,0 mg/L Androstanon (IS) stockopl.  
1250 µl 80,0 mg/L Androstenon stockopl.

Fyld op med 95/5 v/v% MeOH/Vand.

Udtag 1,0 ml til alm. 2 ml vial og luk med crimplåg og opbevares i -20 graders fryser.

#### **Ekstraktionsvæske til spæk :**

Konc: 1,00 mg/L Androstanon + 0,1 mg/L indol IS(2-methylindol)  
Laves i målekolbe og opbevares i bluecapflaske i kølerum, holdbar: 12 mdr.

**500 ml:**                      *5,00 ml 100/10 mg/L Androstanon IS/indol IS stockopløsning*  
                                         *⇒ 500 ml 95/5 % v/v methanol/vand*

**1000 ml:**                      *10,00 ml 100/10 mg/L Androstanon IS/indol IS stockopløsning*  
                                         *⇒ 1000 ml 95/5 % v/v methanol/vand*

#### **2% Dansylhydrazin opløsning :**

Fremstilles på dagen i engangsplast centrifugerør. Ryst det 5 min på vibrax, og lad det bundfælde.

**Koncentration: 2% w/v**

**1,25ml:**                      *0,0250 gram + 1,25 ml Metanol*

**2,5 ml:**                      *0,0500 gram + 2,5 ml Metanol*

#### **2% Dansylhydrazin/20%Bortrifluorid kompleks i MeOH, blanding 3:1 :**

Fremstilles på dagen i brunt 2 ml hplc-vial med pre-slit septum.

**0,8 ml:**                      *0,6 ml 2% dansylhydrazinopl. + 0,2 ml 20 % BF<sub>3</sub> opl.*

C:\Users\metm\AppData\Local\Microsoft\Windows\Temporary Internet Files\Content.Outlook\9FNXND30\Androstenon-indol-skatol forskrift til spæk190612.docx

**95/5 % v/v methanol/vand :**

(Opbevares under stinkskab i rum 3278)

*1000 ml: 950 ml methanol + 50 ml elgavand***Bilag 4: Blanding af HPLC solventer til Androstenon.****A:**

Acetonitril/25 mM kaliumphosphat buffer/TFA 30/70/0,1 v/v %

	1000 ml	2000 ml	evt. ekstra
Acetonitril	300 ml	600 ml	255 ml
25 mM Buffer, pH 6,0*	700 ml	1400 ml	600 ml
Trifluoreddikesyre, TFA	1,00 ml	2,00 ml	855 µl

Blandingen filtreres gennem 0,45µm nylonfilter inden brug

**B:**

Methanol 100%

**\*25 mM kaliumphosphatbuffer pH 6,0:**

	1000 ml	2000 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (merck 1.04873)	3,402 g	6,805 g
5,0 M KOH	475 µl	950 µl
Elga vand	ad 1000 ml	ad 2000 ml

**Bilag 5: Blanding af HPLC solventer til Indoler.****A:**

Acetonitril/50 mM kaliumphosphat buffer 5/95 v/v %

	1000 ml	2000 ml
Acetonitril	50 ml	100 ml
50 mM Buffer, pH 6,0*	950 ml	1900 ml

Blandingen filtreres gennem 0,45µm nylonfilter inden brug

**B:**

Acetonitril/Elga vand 90/10 v/v %

	1000 ml	2000 ml
Acetonitril	900 ml	1800 ml
Elga vand	100 ml	200 ml

Blandingen filtreres gennem 0,45µm nylonfilter inden brug

**\*50 mM kaliumphosphatbuffer pH 6,0:**

	1000 ml	2000 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (merck 1.04873)	6,805 g	13,609 g
5,0 M KOH	1,25 ml	2,50 ml
Elga vand	ad 1000 ml	ad 2000 ml

## **Bilag 6: Spækprøver, Androstenon/indol/skatol-protokol.**

### **Afvejning:**

1. Afvej ca. 0,950-1,050 gram spæk i 50 ml plastcentrifugerør, noter vægten i Excel-skema sammen med prøvedata. Kan fryses igen.

### **Homogenisering:**

2. Tilsat 10,00 ml ekstraktionsvæske indeholdende IS og luk låg (konc.=2-methylindol 0,1mg/L+Androstanon 1 mg/L)
3. Homogeniser på Ultra-turrax i 30 sekunder ved 22000 rpm (position 5) med s-25-n - 18G stav og luk låg.(se efter at der ikke sidder spækstykker op af siden på røret som ikke er homogeniseret)
4. Skyl homogeniseringstaven en gang i varmt dem.vand med opvaskemiddel – ca. 60 ml i infusionsflaske (varmes på elkedel) og tør med papir.
5. Skyl homogeniseringstaven en gang i varmt dem.vand – ca. 60 ml i infusionsflaske (varmes på elkedel) og tør med papir.
6. Skyl homogeniseringstaven en gang i 20-25 ml 96% ethanol(i 50 ml centrifugerør) og tør med papir(kør evt. lidt i luft).

### **Oprensning:**

7. Prøverne stilles på ultralydsbad i 10 minutter.
8. Prøverne sættes på vandbad i 5 minutter ved 60 grader.
9. Prøverne tages op og mixes 5 sekunder på whirlmixer.
10. Prøverne sættes i -80 grader fryser i 5 minutter.
11. Prøver centrifugeres herefter ved 3000 g ( rotor 11180/13190) i 10 minutter ved 0 grader.
12. Der udtages 1 ml af supernatanten fra 50 ml centrifugerør til eppendorfrør som lukkes.
13. Centrifuger eppendorfrørene ved 15000 g i 5 minutter ved 0 grader.
14. Udtag 700 µl af supernatanten til 2 ml hplc-vial og luk med crimplåg.

Prøverne sættes nu på HPLC og køres først med Androstenon metode og herefter med indolspæk metode. Husk at lave ny 2% Dansyl./BF3 opl.

## **Bilag 7: Biopsiprøver, Androstenon/indol/skatol-protokol.**

### **Afvejning:**

1. Afvej ca. 0,100 gram spæk i 2 ml eppendorfrør fra pistilsæt, noter vægten i Excel-skema sammen med prøvedata. Hvis der bruges biopsinål skal eppendorfrøret være vejet forinden og vægten noteret. Herefter vejes røret igen og prøvevægten kan beregnes. Prøverne kan gemmes i fryseren eller man kan gå videre til homogenisering.

### **Homogenisering:**

2. Tilsat 250 µl ekstraktionsvæske indeholdende IS , luk låg og ryst spækket ned i væsken. (konc.=2-methylindol 0,1mg/L+Androstanon 1 mg/L)
3. Sæt prøven ved 60 grader i minimum 2 minutter.
4. Homogeniser prøven vha. pistillen som er sat på motoren i 30 sekunder (pas på spild).
5. Stil motoren i et stativ og fyld 750 µl ekstraktionsvæske indeholdende IS i eppendorfrøret og dyp pistillen i eppendorfrøret for ekstra skylning af fedt (brug ikke motor!) – luk låg.

### **Oprensning:**

6. Mix en gang på vortexmixer.
7. Prøverne stilles på ultralydsbad i 10 minutter.
8. Prøverne sættes på vandbad i 5 minutter ved 60 grader(evt. varmeblok)
9. Prøverne tages op og mixes 5 sekunder på whirlmixer.
10. Prøverne sættes i -80 grader fryser i 5 minutter.
11. Prøver centrifugeres herefter ved 15000 g i 10 minutter ved 0 grader.
12. Hold eppendorfrørene kolde og udtag forsigtigt 500 µl af supernatanten til 2 ml hplc-vial og luk med crimplåg.

Prøverne sættes nu på HPLC og køres først med Androstenon metode og herefter med indolspæk metode. Husk at lave ny 2% Dansyl./BF3 opl.