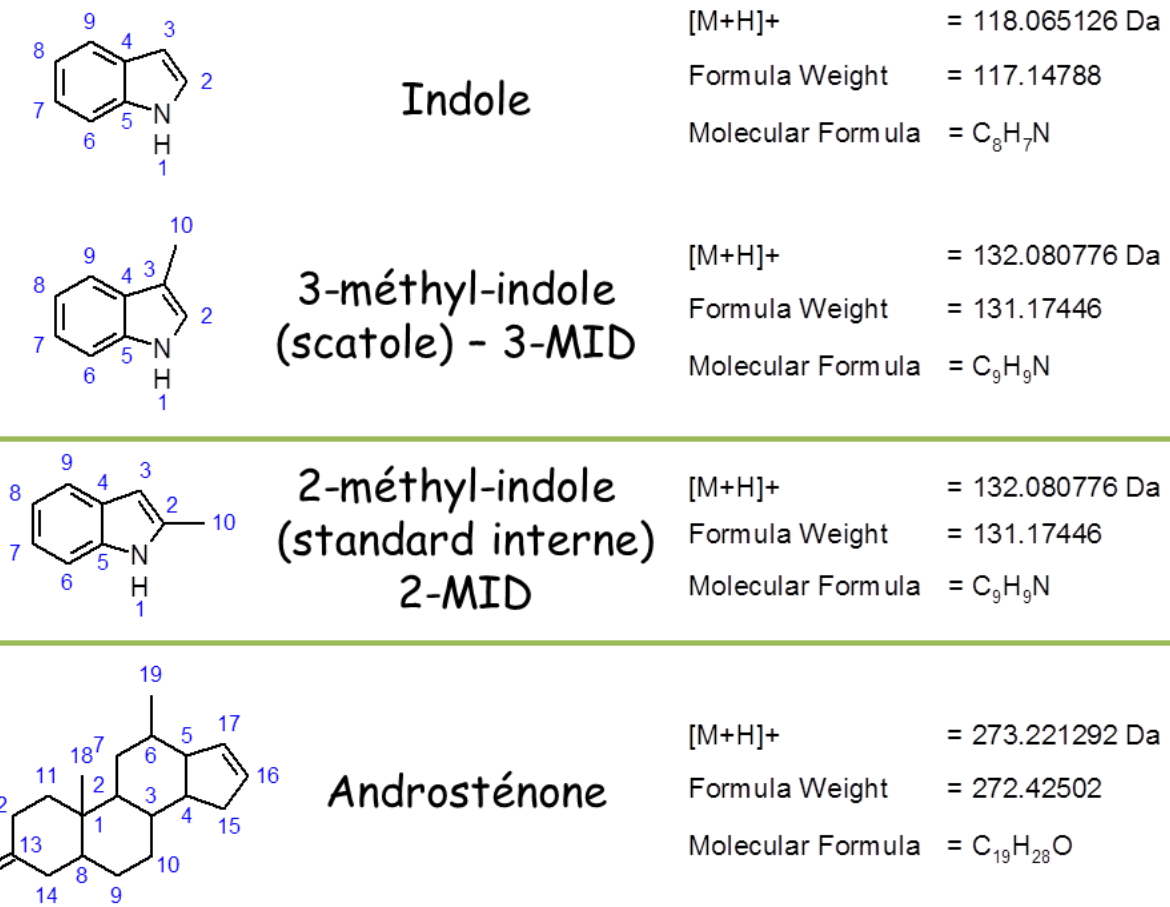


Introduction

Dans le cadre d'un projet destiné à évaluer la vaccination comme alternative à la castration chirurgicale du porcelet contre « l'odeur de verrat », un protocole de dosage du scatole, de l'indole et de l'androsténone, adapté de K. Verheyden *et al.* (2007) a été développé et validé. Ce protocole repose sur une extraction méthanolique et une analyse chromatographique par UPLC[®]-MSMS. L'utilisation de technologie UHPLC permet de réduire d'une part, le temps d'analyse, mais aussi de s'inscrire dans une démarche analytique plus respectueuse de l'environnement en diminuant les volumes de phases mobiles nécessaires à l'analyse.

Matériel et méthode

Molécules à rechercher



Préparation des échantillons

Solution d'extraction : solution de 2-MID dans le méthanol à 100 µg·L⁻¹

Échantillon :
Peser 10 g de matière grasse et ajouter 10 mL de solution d'extraction dans un tube à centrifuger

Broyer à l'ultra-turrax pendant 30 sec en maintenant dans un bain de glace

Maintenir le tube 15 min dans le bain de glace

Centrifuger 10 min à 6000 rpm (t°C ambiante)

Filtrer sur 0,22 µm dans une fiole UPLC

Conditions chromatographiques

Colonne : UPLC BEH C18 1.7 µm – 2.1 * 100 mm
Injection : 20 µL
Température de la colonne : 45°C
Durée d'analyse : 12 minutes
Solvants d'élution :

A – Hac 0,5 %
B – Méthanol

Stockage des échantillons : 4°C
Détection : spectrométrie de masse



Gradient :

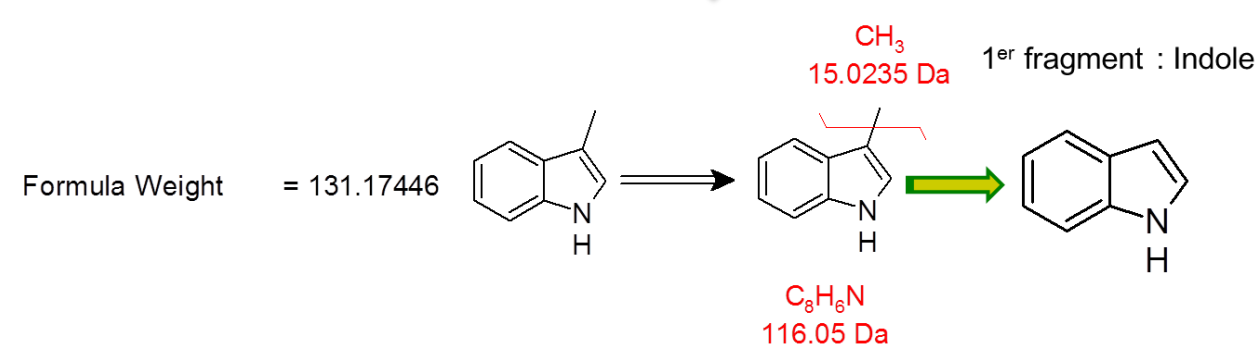
TIME	FLOW	% A	% B	CURVE
Initial	0.5 ml/min	80	20	
3.50 min	0.5 ml/min	0	100	6
3.60 min	0.7 ml/min	80	20	6
5 min	0.5 ml/min	80	20	6

Résultats

Paramètres de spectrométrie de masse

Optimisation des paramètres : infusion directe dans la source

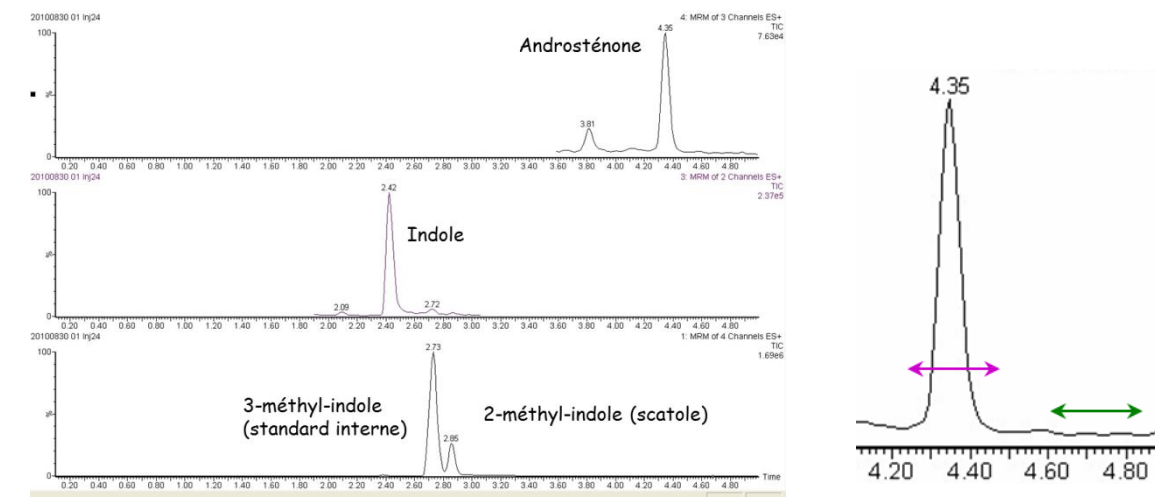
Perte aisée du méthyl pour le 3-MID et 2-MID : obtention de l'indole comme 1^{er} ion fille



Composé	Ionisation	Parent	Énergie de cône	Fille	Énergie de collision
Indole	Esi +	118 (117 + 1)	35	91	20
				65	25
2-méthyl-indole (Standard interne)	Esi +	132 (131 + 1)	32	117	20
				90	40
3-méthyl-indole (Scatole)	Esi +	132 (131 + 1)	30	103	25
				90	35
Androsténone	Esi +	273 (272 + 1)	27	89	45
				255	15
Androsténone	Esi +	273 (272 + 1)	27	161	15
				93	25

Sensibilité

La sensibilité a été calculée en mesurant le rapport « Signal / Bruit ».



$$LOD = [Analyte] \text{ donnant un } \frac{S}{B} = 3$$

$$LOQ = [Analyte] \text{ donnant un } \frac{S}{B} = 10$$

S/N (Valeurs Quantiques)	Droite MeOH						Droite Matrice					
	ID	SK	AEON	ID	SK	AEON	ID	SK	AEON	ID	SK	AEON
25 ppb	1,9	31,4	5,6	15,4	2,4	15,5	51,3	7,9	44,8			
50 ppb	8,6	31,2	12,6	17,4	4,8	11,9	58,0	16,0	39,7			
250 ppb	42,7	211,6	65,8	17,5	3,5	11,4	58,5	11,8	38,0			
500 ppb	135,0	311,6	90,5	11,1	4,8	16,6	37,0	16,0	55,2			
1000 ppb	119,1	464,8	196,1	25,2	6,5	15,3	84,0	21,5	51,0			
1500 ppb	241,9	395,1	260,7	18,6	11,4	17,3	62,0	38,0	57,5			
Moyenne							17,5	5,6	14,3	58,5	18,6	47,7

Limites de détection et de quantification

Dans le solvant

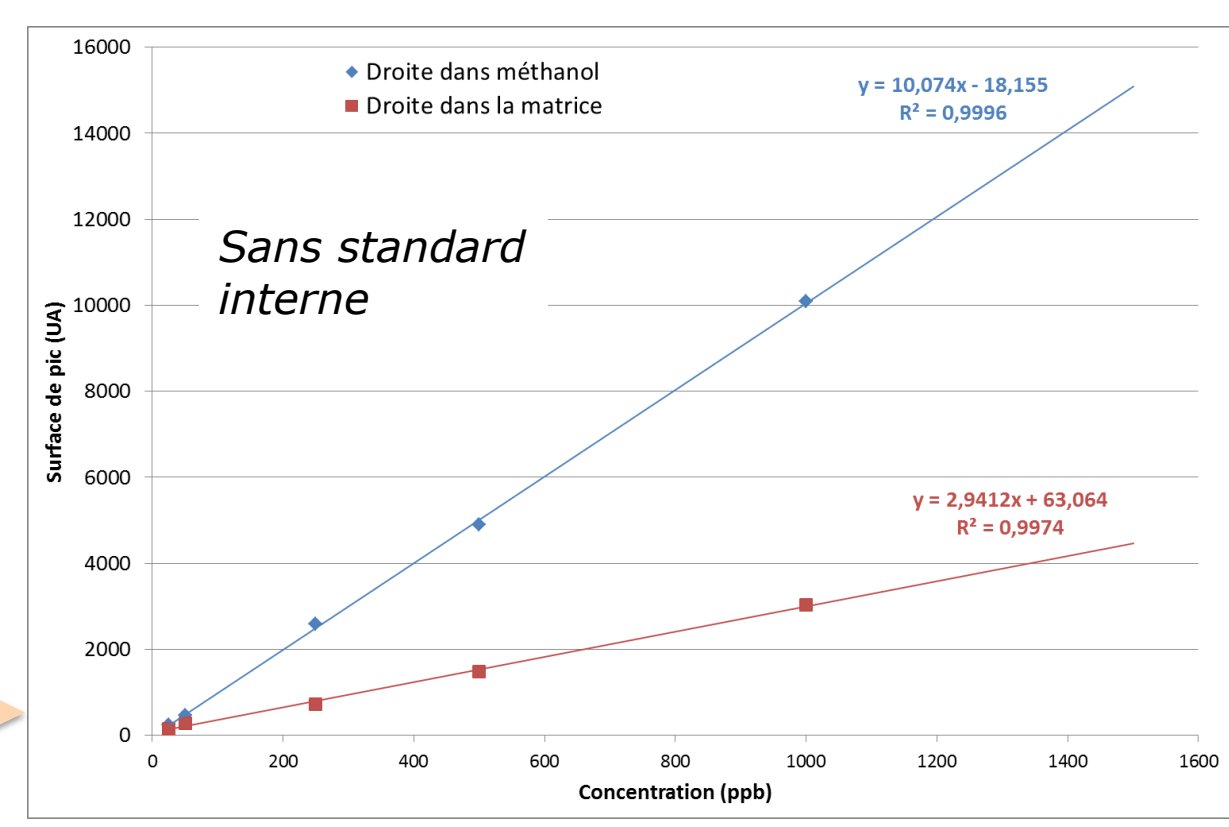
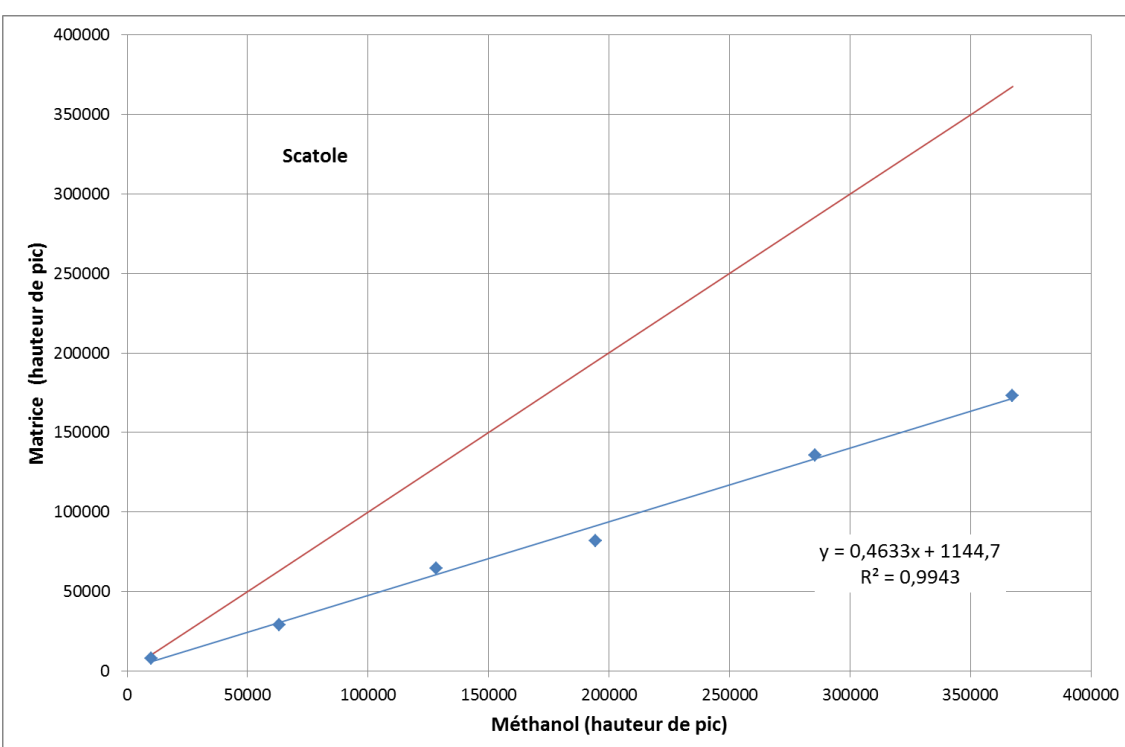
Dans la matrice

	« Extrait matière grasse » dopé			« Extrait « Matière grasse dopée »		
	Indole	Scatole	Androsténone	Indole	Scatole	Androsténone
LOD	10	35	45	40	20	170
LOQ	30	105	135	120	60	500

Les limites sont données en µg·kg⁻¹.

Effet de matrice (extraction)

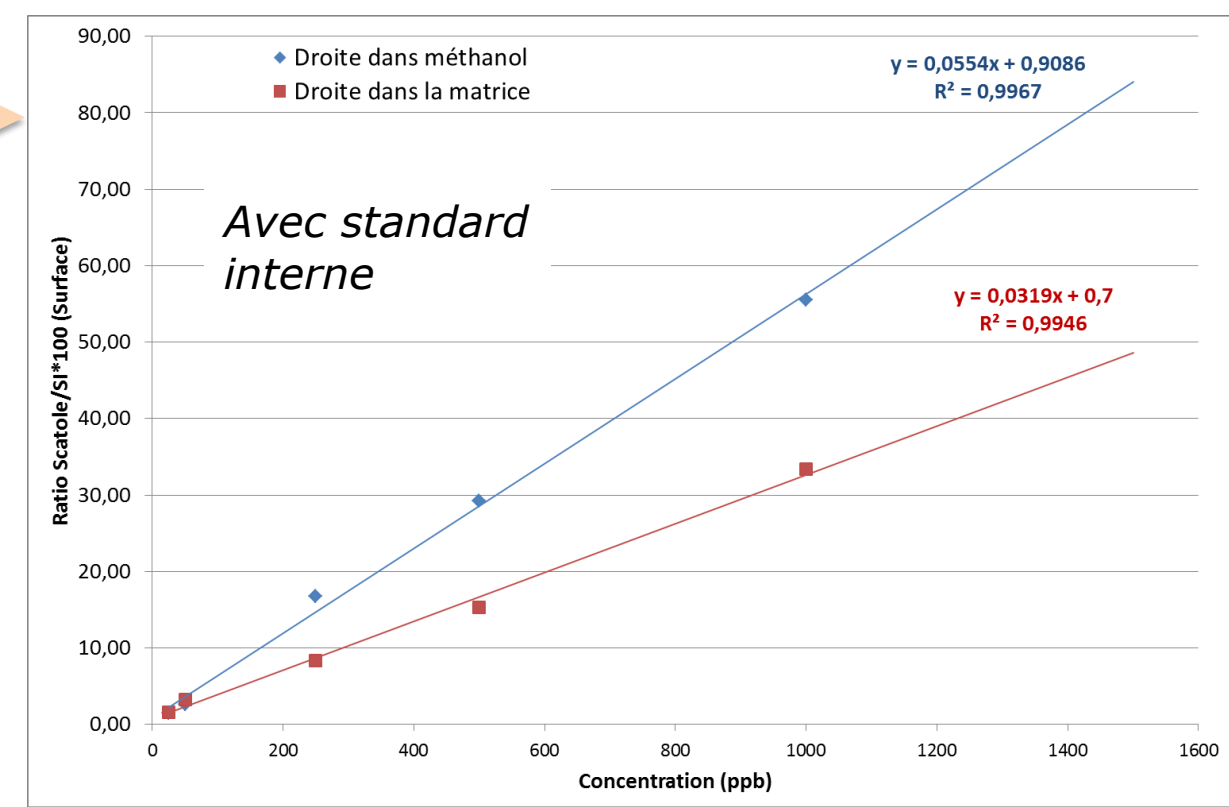
Exemple du scatole



Effet de matrice présent pour les trois molécules recherchées

Améliorations des résultats en utilisant un standard interne (le coefficient angulaire de la droite dans la matrice se rapproche du coefficient angulaire de la droite dans le méthanol)

Nécessité de trouver un autre mode d'extraction pour l'androsténone (effet de matrice trop important et perte de sensibilité)



Taux de récupération

Quatre concentrations : 50 – 500 – 1000 – 1500 µg·kg⁻¹
Cinq extractions pour chaque niveau
Limitation des effets de matrice lors des calculs

	Taux de récupération (en %)											
	Scatole 132>117				Indole 118>91				Androsténone 273>255			
	50 ppb	500 ppb	1000 ppb	1500 ppb	50 ppb	500 ppb	1000 ppb	1500 ppb	50 ppb	500 ppb	1000 ppb	1500 ppb
Moyenne	87.6	98.0	105.6	98.1	109.0	100.1	110.0	94.9	161.4	111.8	132.3	116.2
Écart type	9.7	7.2	7.8	10.0	20.2	5.8	5.9	6.3	69.3	28.8	31.5	20.7
CV %	11.1	7.4	7.4	10.2	18.6	5.8	5.7	6.6	42.94	25.7	23.8	17.8
Moyenne	97.3				103.1				120.1			
Écart type	10.4				11.5				26.9			
CV %	10.7				11.2				22.4			

LOD : 20 ppb
LOQ : 60 ppb

LOD : 40 ppb
LOQ : 120 ppb

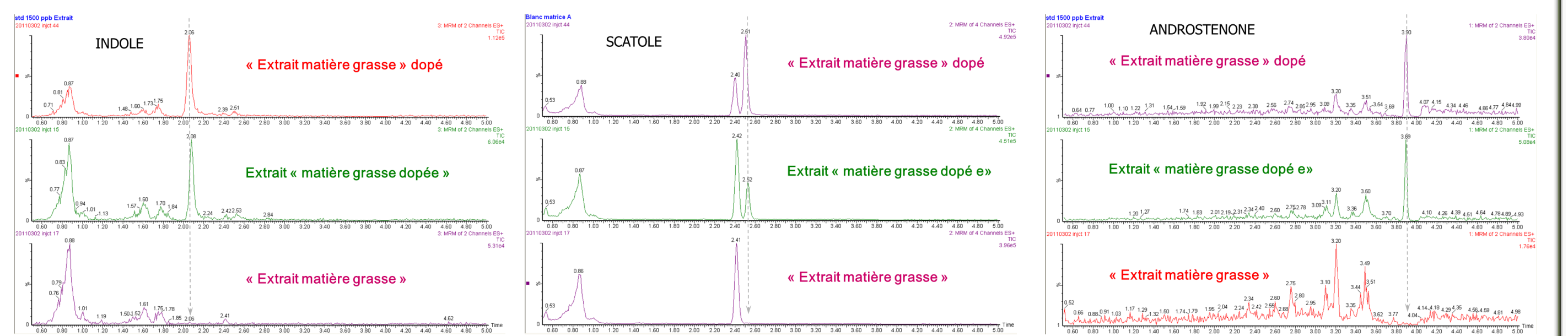
LOD : 170 ppb
LOQ : 500 ppb

Droites de calibrage réalisées dans la matrice
Taux de récupération de l'ordre de 100 %
Variations plus importantes pour l'androsténone aux basses concentrations (< LOD)

Spécificité

Analyse de trois extraits : extrait « matière grasse », extrait « matière grasse dopée », extrait « matière grasse » dopé
Comparaison des chromatogrammes obtenus et vérification de la présence de pics interférents

➔ Méthode spécifique pour les différents analytes



Conclusions et perspectives

Le CRAW a développé une méthode permettant de doser trois molécules impliquées dans « l'odeur de verrat » de la viande de porc : le scatole, l'indole et l'androsténone. Afin de réduire le coût environnemental de l'analyse, le choix de la technique s'est porté sur l'UHPLC, couplée à la spectrométrie de masse, afin de profiter de la spécificité de ce type de détecteur. La méthode est basée sur une extraction méthanolique suivie d'une injection en chromatographie. L'ajout d'un standard interne (2-méthyl-indol) permet de réduire l'effet de matrice mis en évidence. Les limites de détection de la méthode sont de 120 ppb pour l'indole, 60 pour le scatole et 170 pour l'androsténone. Cette dernière molécule présente cependant des difficultés à être correctement extraites de la matrice. L'usage du standard interne permet d'atteindre des taux de récupération, calculés sur quatre niveaux de concentration, de l'ordre de 100 %.

Il faut maintenant confronter cette méthode à d'autres méthodes déjà validées et en cours d'utilisation. La difficulté à ce jour reste de trouver une méthode suffisamment fiable pour évaluer correctement les échantillons de viandes prélevés dans différents pays. Il n'existe pas encore de méthode reconnue par tous.

Remerciements

Cette recherche a pu être menée grâce au soutien financier de la Région Wallonne, dans le cadre du projet AICaPorc « Alternative à la castration chirurgicale du porcelet, évaluation de la vaccination contre l'odeur de verrat de la viande » - Ref 2998