

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL)

Fachgebiet Bioanalytik

Development and application of new methods for the quantitation of boar taint causing compounds

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jochen Fischer

aus

Darmstadt

Bonn, 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. Matthias Wüst
 2. Gutachter: Professor Dr. Michael Gütschow
- Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2013
- Erscheinungsjahr: 2013

Berichte aus der Lebensmittelchemie

Jochen Fischer

**Development and application of
new methods for the quantitation
of boar taint causing compounds**

D 98 (Diss. Universität Bonn)

Shaker Verlag
Aachen 2013

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Bonn, Univ., Diss., 2013

Copyright Shaker Verlag 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-1832-5

ISSN 1868-873X

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Summary

Within Europe the castration of male piglets without anesthesia has been common practice for decades to prevent the occurrence of boar taint - an offensive off-flavor in pork. This practice, however, is increasingly questioned and refused by the majority of the public, since it is evident that piglets suffer pain and serious distress during and after castration. To allow for future animal welfare, all stakeholders along the pork chain have therefore declared to voluntarily ban surgical castration without anesthesia by 2018. Instead, pork industry successively switches to the production of entire male pigs, which appears as the most suitable alternative to surgical castration. This change in production, however, is very likely to result in a remarkable amount of tainting carcasses entering the food chain.

To prevent consumers from tainting pork and to investigate the occurrence of boar taint in detail, the pork industry as well as scientific research demand for reliable boar taint detection methods. Thus, the main objective of this thesis was to develop a candidate reference method for the quantitation of both major and minor boar taint compounds, *i.e.*, androstenone, skatole, indole, 3α -androstenol and 3β -androstenol, in porcine tissue. As the compounds of interest accumulate in fat tissue, back fat samples were selected as the matrix of choice for the intended boar taint analysis. To comply with the general requirements of a potential reference method, a special focus was put on fast and simple sample preparation, precise and simultaneous quantitation of the respective boar taint compounds, and proper validation of the novel method. All requirements are fulfilled by the newly developed GC/MS procedure that is especially characterized by the application of isotopically labeled internal standards in a stable isotope dilution assay (SIDA). Thereby, commonly used internal standards, being only fair structural analogs of the analytes, are replaced by isotopically labeled counterparts of the respective analytes, which exhibit almost identical physicochemical properties such as solubility, polarity or volatility. In consequence, the application of such isotopomers generally guarantees a virtually identical behavior of analyte and internal standard during sample treatment, chromatography and detection, and thereby delivers very reliable results. As suitable isotopically labeled internal standards were commercially not available, synthesis of the required deuterium labeled isotopomers was performed. After successful synthesis, the obtained isotopomers d_3 -androstenone, d_3 -skatole, d_6 -indole and d_3 - 3β -androstenol were characterized in detail by NMR and MS techniques and subsequently applied for SIDA.

Based on the developed SIDA–GC/MS procedure for back fat analysis, a second GC/MS procedure was elaborated, allowing for the selective quantitation of skatole in porcine

Summary

meat juice. Meat juice itself is obtained as drip loss when thawing muscle tissue and is currently explored as an alternative matrix in pork quality assessment, *e.g.*, for *Salmonella* monitoring or haptoglobin measurement. After successful method development, a comparative measurement was performed investigating the correlation of skatole between meat juice and back fat samples in a set of entire male boars. High correlation between both matrices was found, thus confirming that meat juice is a suitable substitute-matrix for skatole analysis. Using this novel skatole analysis, a further quality-related parameter is now detectable in meat juice.

Finally, a small study was performed exploring the back fat concentrations of androstenone, skatole, indole, 3 α - and 3 β -androstenol in a set of entire wild boars. The investigation was focused on wild boars, because no or only negligible complaints about boar taint are usually observed with respect to the meat of entire wild boars. However, wild boars are the genuine form of our domestic pig breeds and hence should be likewise susceptible to boar taint. The performed back fat analysis, though, revealed significant differences in the concentrations of major and minor boar taint compounds between both subspecies with special emphasis on skatole. In this context, possible factors explaining these differences between wild and domestic boars such as their intestinal flora and anatomy, dietary composition, housing or genetic predisposition are discussed.

Zusammenfassung

Die betäubungslose Kastration von männlichen Ferkeln war in Europa über Jahrzehnte hinweg die Methode der Wahl, um das Auftreten von Ebergeruch – ein unangenehmes Fehlroma in Schweinefleisch – zu verhindern. Seitdem jedoch erwiesen ist, dass die Ferkel während und nach der Kastration erhebliche Schmerzen erleiden, wird diese Praxis zunehmend hinterfragt und von der Öffentlichkeit mehrheitlich abgelehnt. Um dem Tierschutz zukünftig Rechnung zu tragen, haben Vertreter der Schweinefleischbranche beschlossen ab 2018 gänzlich auf die betäubungslose Kastration zu verzichten. In Folge dessen stellt die Schweinefleischindustrie schrittweise auf die Produktion unkastrierter Eber um, was sich als praktikabelste Alternative zur chirurgischen Kastration herausgestellt hat. Diese Umstellung der Produktion birgt jedoch die Gefahr, dass ein merklicher Anteil geruchsauffälliger Schlachtkörper in den Handel gelangt.

Um die Konsumenten vor geruchsbelastetem Schweinefleisch zu bewahren und die Entstehung von Ebergeruch im Detail zu erforschen, haben sowohl die Schweinefleischindustrie als auch die Forschung großen Bedarf an einer zuverlässigen Analysenmethode zur Bestimmung von Ebergeruch. Primäres Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines potentiellen Referenzverfahrens zur Quantifizierung der wichtigsten Ebergeruchstoffe Androstenon, Skatol, Indol, 3 α -Androstenol und 3 β -Androstenol in Schweinefleisch. Da sich die gesuchten Substanzen bevorzugt im Fettgewebe der Tiere anreichern, wurde Nackenfett als geeignete Matrix für die beabsichtigte Ebergeruchanalytik ausgewählt. Um den generellen Anforderungen an ein potentielles Referenzverfahren gerecht zu werden, wurde ein besonderes Augenmerk auf eine schnelle und einfache Probenaufarbeitung, eine präzise und simultane Quantifizierung der entsprechenden Ebergeruchstoffe und eine solide Validierung gelegt. Alle Anforderungen konnten durch das neu entwickelte GC/MS Verfahren erfüllt werden, das sich vor allem durch die Verwendung von isotopenmarkierten internen Standards in der sogenannten Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) auszeichnet. Dabei werden die gewöhnlich verwendeten internen Standards, die nur bedingt strukturelle Ähnlichkeit mit dem Analyten haben, durch isotopenmarkierte Pendanten der Analyten ersetzt, die nahezu identische physikochemische Eigenschaften wie Löslichkeit, Polarität oder Flüchtigkeit besitzen. Folglich garantiert die Verwendung solcher Isotopomere im Allgemeinen ein quasi identisches Verhalten von Analyt und internem Standard während der Probenaufarbeitung, der Chromatographie und der Detektion und sorgt somit für ein besonders verlässliches Ergebnis. Da geeignete isotopenmarkierte interne Standards kommerziell nicht erhältlich waren, wurden

Zusammenfassung

die benötigten deuterium-markierten Isotopomere eigens synthetisiert. Die dabei erhaltenen Isotopomere d_3 -Androstenon, d_3 -Skatol, d_6 -Indol und d_3 -3 β -Androstenol wurden mittels NMR- und MS-Techniken im Detail charakterisiert und anschließend in der SIVA eingesetzt.

Auf Basis des neu entwickelten SIVA–GC/MS Verfahrens für Nackenfettproben, wurde ferner ein zweites GC/MS-Verfahren entwickelt, das die Quantifizierung von Skatol in Fleischsaft ermöglicht. Fleischsaft selbst wird als Tropfsaft während des Auftauens von Muskelgewebe gewonnen und aktuell als Alternativ-Matrix zur Beurteilung der Schweinefleischqualität (z.B. Salmonellen-Monitoring oder Haptoglobin-Messung) erschlossen. Nach erfolgreicher Methodenentwicklung wurde anhand von Vergleichsmessungen die Korrelation von Skatol in Fleischsaft und Nackenfettproben einer Gruppe unkastrierter Eber untersucht. Dabei konnte eine hohe Korrelation zwischen beiden Matrices festgestellt und somit die Eignung von Fleischsaft als Substitut-Matrix für die Skatolmessung bestätigt werden. Mit der neu entwickelten Skatolanalytik kann nun ein weiterer qualitätsbeschreibender Parameter in Fleischsaft bestimmt werden.

Abschließend wurden in einer kleinen Studie die Nackenfettkonzentrationen von Androstenon, Skatol, Indol, 3 α - und 3 β -Androstenol in einer Gruppe männlicher unkastrierter Wildschweine ermittelt. Die Untersuchung wurde bewusst mit Wildschweinen durchgeführt, weil im Hinblick auf Wildschweinfleisch keine oder nur geringfügige Beschwerden über das Auftreten von Ebergeruch bekannt sind. Da Wildschweine aber die Urform unserer heutigen Hausschweinrassen darstellen, sollten Wildschweine in gleicher Weise anfällig für Ebergeruch sein. Die durchgeführte Fettanalytik zeigte jedoch, dass es – vor allem bei Skatol – signifikante Konzentrationsunterschiede der Ebergeruchstoffe im Vergleich zu Hausschweinen gibt. Mögliche Faktoren, die die gefundenen Unterschiede erklären könnten, wie etwa die Zusammensetzung der Darmflora, die Anatomie, die Futterzusammensetzung, die Haltungsform oder die genetische Prädisposition, werden abschließend diskutiert.

Table of contents

Abbreviations	i
1 Introduction	1
1.1 Boar taint and boar taint causing compounds.....	1
1.2 Pig husbandry	3
1.3 Castration.....	4
1.4 Immunocastration	5
1.5 Rearing entire male pigs	6
1.6 Boar taint analysis	7
1.7 Objective and outline of the study.....	8
2 Results and discussion	11
2.1 Synthesis of isotopically labeled internal standards	11
2.1.1 Synthesis of d_3 -skatole	13
2.1.2 Synthesis of d_6 -indole.....	14
2.1.3 Synthesis of d_3 -androstenone and d_3 - 3β -androstenol.....	14
2.1.4 Characterization of the isotopically labeled compounds.....	17
Publication: <i>Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals</i> (2011).....	20
2.2 Development of a candidate reference method for boar taint measurements	26
2.2.1 The novel SIDA–HS–SPME–GC/MS procedure	27
2.2.2 Method calibration and validation procedure.....	30
Publication: <i>Analytical Chemistry</i> (2011).....	33
2.3 Meat juice – a new matrix for boar taint measurements	40
2.3.1 Method development, calibration and validation	41
2.3.2 Correlation measurement.....	41
Publication: <i>Meat Science</i> (2012)	44
2.4 Boar taint measurements in wild boars	49
2.4.1 Pheromone levels.....	50
2.4.2 Skatole and indole levels	51
2.4.3 Consumer acceptance of wild boar meat.....	53
Publication: <i>Food Chemistry</i> (2012).....	55
3 Closing remarks and outlook	60
4 References	63

Abbreviations

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GC	gas chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
LC	liquid chromatography
MS	mass spectrometry
m/z	mass-to-charge ratio
UPLC	ultra performance liquid chromatography
CYP2E1	cytochrome P450 subtype 2E1
ppm	parts per million
UK	United Kingdom
EU	European Union
EC	European Commission
PSE	pale, soft, exudative
DFD	dry, firm, dark
SIDA	stable isotope dilution assay
HS-SPME	headspace-solid phase microextraction
DI-SPME	direct immersion-solid phase microextraction
LiAlD ₄	lithium aluminium deuteride
K _{OW}	octanol/water partition coefficient
log P	logarithmic value of the octanol/water partition coefficient
NSP	non-starch polysaccharides
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
LiOH	lithium hydroxide
Et ₂ O	diethyl ether
NMR	nuclear magnetic resonance
Pd	palladium
¹ J	coupling constant (with number of involved bonds indicated)
CI	chemical ionization
EI	electron impact ionization
UV	ultraviolet
Ph D	<i>philosophiae doctor</i>
PDMS/DVB	polydimethylsiloxane/divinylbenzene
FD	fluorescence detector

FID	flame ionization detector
HRMS	high resolution mass spectrometry
SPE	solid phase extraction
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
CV	coefficient of variation
RE	relative error
CO ₂	carbon dioxide
² H/D	deuterium; hydrogen isotope
³ H/T	tritium; hydrogen isotope
D ₂ O	deuterium oxide; heavy water
R ²	coefficient of determination
¹³ C	heavy carbon, carbon isotope
Mg ⁰	magnesium, elemental
Li ⁺	lithium cation
AlH ₂ ⁺	aluminium hydride cation
NaBT ₄	sodium borotritride
T ₂	gaseous tritium
D ₂	gaseous deuterium
ND ₃	deuterated ammonia