



UIT

**NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET**

Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Isolering av etylester og triacylglyserol ved hjelp av fast fase ekstraksjon

Mia Brattli Guldborg

*Masteroppgave i Marin bioteknologi (60 stp)
Mai 2018*



Isolering av etylester og triacylglyserol ved hjelp av fast fase ekstraksjon

Mia Brattli Guldborg

Masteroppgave i Marin bioteknologi (60 stp)

Norges fiskerihøgskole,
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi,
UiT, Norges arktiske universitet



UiT / NORGES ARKTISKE
UNIVERSITET



Tromsø

Mai 2018

Forord

Mesteparten av denne oppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole, UiT, Norges arktiske universitet i samarbeid med bedriften Nordic Pharma Inc AS i Kaldfjord, Tromsø. En liten del av laboratoriearbeidet ble gjort hos bedriften. Jeg vil takke for et fint samarbeid samt veiledning fra mine biveiledere Jørgen Blikra Lødemel og Stig Jansson. Takk til Eirin Glomsaker for hjelp med laboratoriearbeid hos bedriften.

Tusen takk til Lars Dalheim og Guro Kristine Edvinsen for all hjelp med laboratoriearbeid ved Norges fiskerihøgskole og takk til sjømatgruppa for at jeg fikk være en del av forskningsgruppen. Takk til alle medstudenter for en fin mastertid.

Jeg vil til slutt gi en spesiell takk til hovedveileder Ragnar Ludvig Olsen for enestående oppfølging og veiledning fra start til slutt av masterprosessen i tillegg til en dose god humor underveis.

Mia Brattli Guldborg
Tromsø, mai 2018

Sammendrag

I de siste par tiårene har det vært en kraftig økning i humant bruk av kosttilskudd som inneholder langkjedede omega-3 fettsyrer, det vil si eicosapentaensyre (EPA) og docosaheksaensyre (DHA). Årsaken er de antatte positive helseeffekter disse fettsyrene har. I dag er det vanligst at slike kosttilskudd tas i form av kapsler, blant annet fordi mange mennesker synes marine oljer er ubehagelig å drikke direkte. En utfordring med kapsler med marine oljer er at man må ta ganske mange for å oppnå anbefalt dose av EPA og DHA. Produsenter har derfor fremstilt kapsler som har et konsentrert innhold av disse fettsyrene, hovedsakelig i form av enten etylestere (EE) eller triacylglyserol (TAG; triglyserid).

Denne oppgaven har vært gjennomført i samarbeid med bedriften Nordic Pharma Inc AS i Kaldfjord, Tromsø. Bedriften produserer et TAG-produkt med konsentrert innhold av EPA og DHA. Først lages et EE-produkt som så gjennomgår en molekylær destillasjon for å isolere etylestere med høyt innhold av EPA og DHA. Disse transesterifiseres enzymatisk til glyserol for å danne TAG med et høyt nivå av EPA og DHA. Hovedmålet med denne oppgaven var å etablere en fast fase ekstraksjon (SPE) for å separere EE og TAG fra en industriell transesterifiseringsprosess og deretter karakterisere disse to isolerte klassene.

Resultatene viste at det er mulig å separere etylestere og triacylglyserol ved å bruke en spesifikk fast fase ekstraksjon. Det var interessant å oppdage at EE kunne separeres i to fraksjoner der den ene hadde et svært høyt innhold av langkjedede omega-3 fettsyrer mens den andre var fri for disse. Isolering av lipidklassene ved ulike tidspunkt fra den industrielle transesterifiseringen ved hjelp av SPE med påfølgende TLC-analyse og med HPLC, viste at nivåene av TAG, DAG og EE forandret seg som forventet. Etter 55 timers transesterifisering var det fremdeles noe EE igjen. EE eluert fra SPE-kolonna inneholdt svært små nivåer av andre lipidklasser. Eluerte TAG-prøver fra de ulike tidspunktene inneholdt ganske mye DAG, MAG og FFA. Disse kunne i stor grad fjernes fra TAG-prøvene ved å bruke samme type fast fase kolonne, men da med litt andre kondisjonerings- og elueringsbetingelser. Arbeidet med utviklingen av metodene tok såpass mye tid av mastergraden at det dessverre bare ble lite tid igjen å bruke på industrielle prøver.

Forkortelser

ALA	α -Linolensyre
ARA	Arakidonsyre
CE	kolesterylester
DAG	Diacylglyserol
DCM	Diklormetan
DHA	Docosaheksaensyre
DPA	Docosapentaensyre
EE	Etylester
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	Eicosapentaensyre
ER	Endoplasmatisk retikulum
FA	Fettsyrer
FAME	Fettsyremetylester
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FFA	Frie fettsyrer
GC	Gasskromatografi
H ₂ SO ₄	Svovelsyre
HPLC	Høy-ytelses væskekromatografi
HP-TLC	høy-ytelses tynnsjikt-kromatografi
HUFA	høyt flerumettet fettsyre
LA	Linolsyre
LC-PUFA	Langkjedede, flerumettede fettsyrer
MAG	Monoacylglyserol
MUFA	Enumettede fettsyrer
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Lut
NFH	Norges fiskerihøgskole
PL	fosfolipider
PUFA	Flerumettede fettsyrer
-R	Alifatisk hydrokarbonkjede
R _f	Vandrelengde
RI	Refraktiv indeks
rTAG	Reesterifisert TAG
SPE	Fast fase ekstraksjon
SPM	Spesialiserte antiinflammatoriske mediatorer
TAG	Triacylglyserol
THF	Tetrahydrofuran
TLC	tynnsjikt-kromatografi
UV	Ultraviolet
WE	Voksester

Innholdsfortegnelse

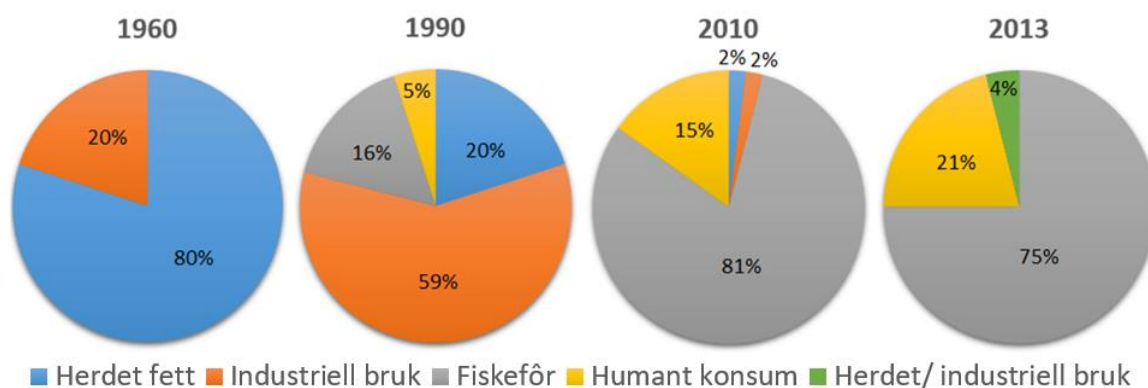
1	Innledning.....	1
2	Bakgrunn	5
2.1	Lipidklasser	5
2.2	Fettsyrer	6
2.3	Fordøyelse av lipider	10
2.4	Kromatografiske metoder	11
2.4.1	Tynnsjikt-kromatografi av fettklasser	11
2.4.2	Fast fase ekstraksjon av fettklasser	12
2.4.3	Gasskromatografi av fettsyremetylestere	13
2.4.4	Høy-ytelses væske-kromatografi av fettklasser.....	14
3	Materialer og metoder	16
3.1	Materialer.....	16
3.2	Metoder.....	18
3.2.1	Fettklasseinnhold med tynnsjikt-kromatografi (TLC).....	18
3.2.2	Separering av fettklasser med fast fase ekstraksjon (SPE)	18
3.2.3	Metylering av fettsyrer	23
3.2.4	Fettsyresammensetning med gasskromatografi (GC)	23
3.2.5	Fettclassesammensetning med høy-ytelses væske-kromatografi (HPLC)	24
4	Resultater.....	25
4.1	Tynnsjikt-kromatografi av lipidklassestandarder.	25
4.2	Tynnsjikt-kromatografi av EE og TAG i ulike mengdeforhold.....	26
4.3	Tynnsjikt-kromatografi av EE og TAG (1:1) i ulike konsentrasjoner.....	27
4.4	Tynnsjikt-kromatografi av EE og TAG (1:1) for deteksjon av FFA.	28
4.5	SPE Metode 1	29
4.6	SPE Metode 2	31

4.7	SPE Metode 3	32
4.8	SPE Metode 4	33
4.9	SPE vaskeforsøk	34
4.10	SPE Metode 5	35
4.11	SPE Metode 6	36
4.12	Fettsyresammensetning i separerte EE-bånd og TAG	37
4.13	EPA- og DHA-innhold i produkter målt ved NFH og ved Nordic Pharma.....	38
4.14	TLC av prøver under transesterifiseringstrinnet	39
4.15	HPLC av prøver under transesterifiseringstrinnet	40
4.16	SPE av prøver under transesterifiseringstrinnet.....	41
4.17	Rensing av TAG fraksjon fra uttak 0 timer	42
4.18	Rensing av TAG fraksjon fra uttak 12 til 55 timer	44
4.19	EPA og DHA i EE og TAG under transesterifiseringstrinnet	46
5	Diskusjon.....	47
6	Konklusjon	51
7	Referanseliste	52

1 Innledning

Totalt har det de siste 40 årene blitt produsert cirka 1 million tonn fiskeolje årlig (FAO, 2006; Tocher, 2015). Tradisjonelt var utgangspunktet pelagiske fiskeslag som ble malt opp og produsert til fiskemel og fiskeolje. Det viktigste råstoffet har vært og er ansjos (*Ansjoveta*; *Engraulis ringens*) fra Sør Amerika (Shepherd & Bachis, 2014). Fra våre farvann blir pelagiske arter som kolmule (*Micromesistius poutassou*) og tobis (*Ammodytes* spp.) nå brukt for å produsere fiskemel og fiskeolje (Shepherd & Jackson, 2013). I dag brukes heller betegnelsen marine oljer fordi oljetypen nå også inkluderer oljer fra blant annet krepsdyr som raudåte (*Calanus finmarchicus*) og antarktisk krill (*Euphausia superba*). Pelagiske fiskeslag som sild (*Clupea harengus*) og lodde (*Mallotus villosus*) ble tidligere mye brukt til fiskemel og fiskeoljeproduksjon, men i dag går disse artene hovedsakelig til humant konsum. Det har imidlertid ikke vært nedgang i volumene fiskemel og fiskeolje produsert og en viktig årsak er at biprodukter fra foredling av fisk nå også blir brukt til slik produksjon (Olsen & Hasan, 2012).

Anvendelsen av marine oljer (fiskeolje) har endret seg dramatisk fra 1960 til i dag (Figur 1). På begynnelsen av 2000-tallet økte etterspørselen av fiskeolje til oppdrettsfôr og humant konsum og prisen steg (Misund *et al.*, 2017). Tidligere ble en betydelig andel av fiskeoljen omdannet til herdet fett ved hydrogenering, men på grunn av de helsemessig ugunstige transfettsyrene som dannes, er det slutt på det (Menaar *et al.*, 2013). Andelen fiskeolje til humant konsum har økt betydelig de siste par tiårene mens en redusert andel har gått til fiskefôr siden 2010. I 2015 ble omtrent 100 000 tonn fiskeolje på verdensbasis brukt som kosttilskudd (Shepherd *et al.*, 2017). Årsaken er de helsefremmende virkningene som omega-3 fettsyrene eicosapentaensyre (EPA; 20:5n-3) og docoheksaensyre (DHA; 22:6n-3) i oljene har.



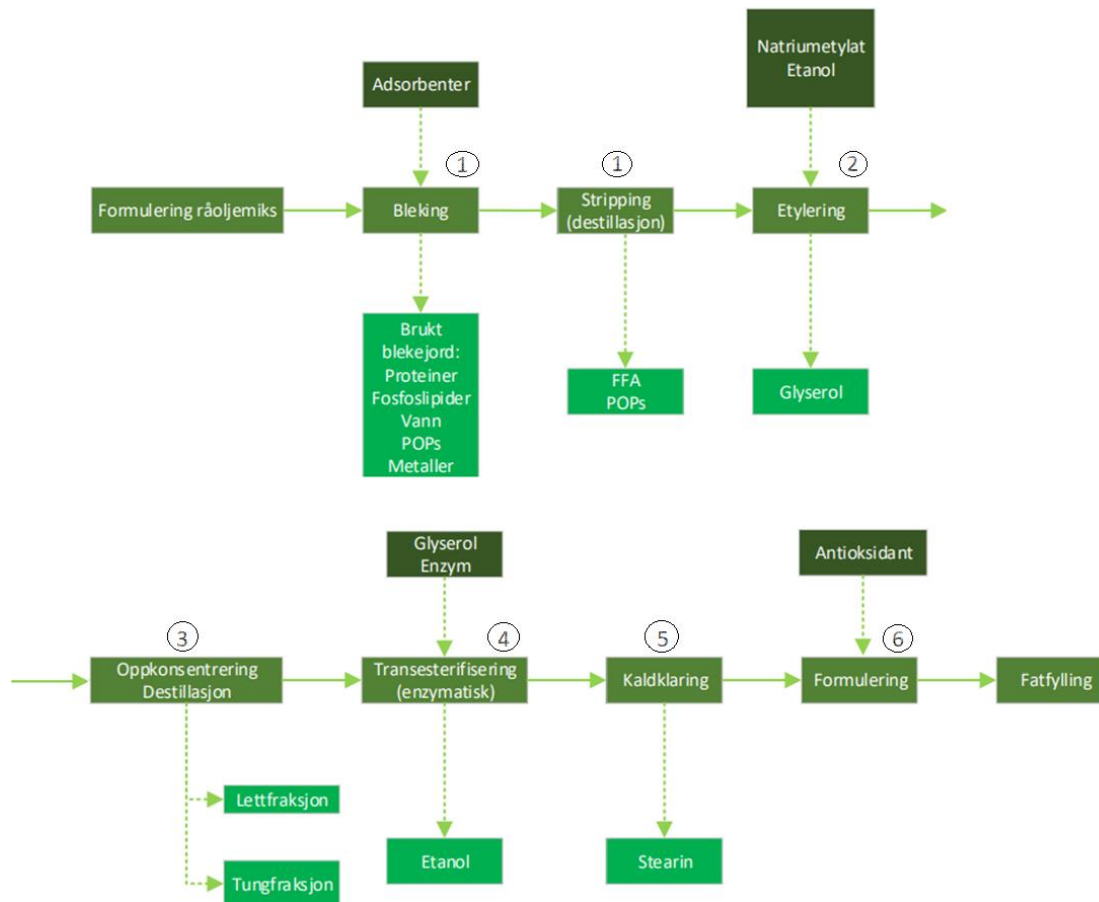
Figur 1. Anvendelse av verdens fiskeoljeproduksjon fra 1960 til 2013 (Shepherd & Jackson, 2013; Shepherd *et al.*, 2017).

Mange helseorganisasjoner anbefaler matvarer som inkluderer EPA og DHA i kosten (Kris-Etherton *et al.*, 2009). European Food Safety Authority (EFSA, 2017) anbefaler 0,25g EPA og DHA per dag, mens Helsedirektoratet i Norge anbefaler å spise fisk til middag to til tre ganger i uken, og samtidig bruke fisk som pålegg (Helsedirektoratet, 2014). EPA og DHA har fordeler i forbindelse med primær og sekundær forebygging av hjerte- og karsykdommer. Det er gjort undersøkelser som tyder på at de blant annet også demper betennelsesreaksjoner, noe som igjen kan hemme utvikling av tilstander som overvekt og type-2 diabetes. Økt inntak av EPA og DHA under graviditet har muligens en positiv effekt på barnets immunsystem og kognitiv utvikling. Det er også foreslått at disse fettsyrene kan hemme utviklingen av noen krefttyper, se oversiktsartikler (Calder, 2018; Siscovick *et al.*, 2017). Nylig er det imidlertid blitt publisert en meta-analyse av 10 studier (til sammen nesten 78 000 personer) hvor effekten av kosttilskudd med EPA og DHA har blitt undersøkt på mennesker. Analysen viste at kosttilskuddene ikke hadde noen effekt på dødelig eller ikke-dødelig hjertesykdom (Aung *et al.*, 2018).

For mennesker som spiser lite fisk kan helsekostprodukter med EPA og DHA være et alternativ. Slike produkter kan konsumeres i form av innkapslet olje, gelekapsler eller i flytende form. Det finnes en rekke ulike produkter på markedet som inneholder EPA og DHA. Noen er raffinerte fiskeoljer, som tran, hvor konsentrasjonen av EPA og DHA er uforandret. Andre marine oljer produseres fra krepsdyr langt nede i næringskjeden. Disse dyrene har samtidig en kort generasjonstid, og dette fører til at miljøgifter ikke akkumuleres og raffinering er derfor ikke nødvendig. Kommersielle eksempler er olje fra raudåte og fra antarktisk krill. Andre kapselprodukter på markedet har et konsentrert innhold av EPA og DHA, for eksempel såkalte 3020-oljer som inneholder 30 % EPA og 20 % DHA. Fettsyrene kan være forestret til etanol (etylestere) eller konsentrert i triacylglyserol (TAG).

Bedriften Nordic Pharma Inc AS i Kaldfjord produserer oljer fra ansjos med konsentrert innhold av EPA og DHA i form av triacylglyserol. Figur 2 viser en skjematisk oversikt over prosessen som brukes i Kaldfjord. I trinn 1 blir råoljen raffinert på en tradisjonell måte. I den første delen av dette trinnet brukes det forskjellige adsorbenter (Fullers earth, bentonite) for å fjerne proteiner, fosfolipider (PL), metaller og noen miljøgifter. I den andre delen av raffineringen brukes molekylær destillasjon for å fjerne de siste restene av organiske miljøgifter fra oljen (Figur 2). Sammen med etanol og katalysatoren natriumetylat (ethoxide) blir fettsyrene esterifisert fra TAG til etylestere (EE) (trinn 2). EE gjennomgår deretter en destillasjonsprosess for å isolere EPA og DHA i EE-form (trinn 3). Så foregår en enzymatisk transesterifisering av

fettsyrene til TAG hvor etanol blir frigjort (trinn 4). Stearinfraksjonen blir så fjernet ved kaldklaring (trinn 5). Til slutt foretar bedriften en sluttformulering av produktet hvor oljene stabiliseres ved tilsats av egnet antioksidant (trinn 6).



Figur 2. Flytskjema med prosesstrinn for prosessering av fiskeolje fra rå fiskeolje til triacylglyserol (TAG) med konsentrert innhold av EPA og DHA. I tillegg viser skjemaet stoffer som tilføres og tas ut i hvert prosesstrinn (■, Prosesstrinn; ■, stoff tilført i prosesstrinnet; ■, stoff tatt ut i prosesstrinnet) (modifisert fra Nordic Pharma Inc AS).

Transesterifiseringen av EPA og DHA i TAG slik det gjøres i dag gir et utbyttetap (trinn 4). Med bakgrunn i at fiskeolje er en begrenset ressurs vil det være fornuftig å optimalisere produksjonsprosesser for å redusere et tap av omega-3 fettsyrer. Utover å være et bærekraftig tiltak vil optimalisering også kunne være økonomisk lønnsomt for bedriften. Innholdet av omega-3 i de forskjellige lipidklassene i restfraksjonene er ukjent. For å undersøke om det er kostnadssvarende å optimalisere prosessen ønsker bedriften å etablere en metode for å beskrive sammensetningen av fettsyrer i etylerings- og transesterifiseringstrinnene (trinn 2 og 4). Dette vil kunne fortelle hvorvidt det er uløste økonomiske potensialer i noen, eller flere, av trinnene i produksjonsprosessen.

Hovedmålet med denne oppgaven var å etablere en fast fase ekstraksjon (SPE) for å separere EE og TAG fra en industriell transesterifiseringsprosess og deretter karakterisere disse to isolerte klassene.

Delmål:

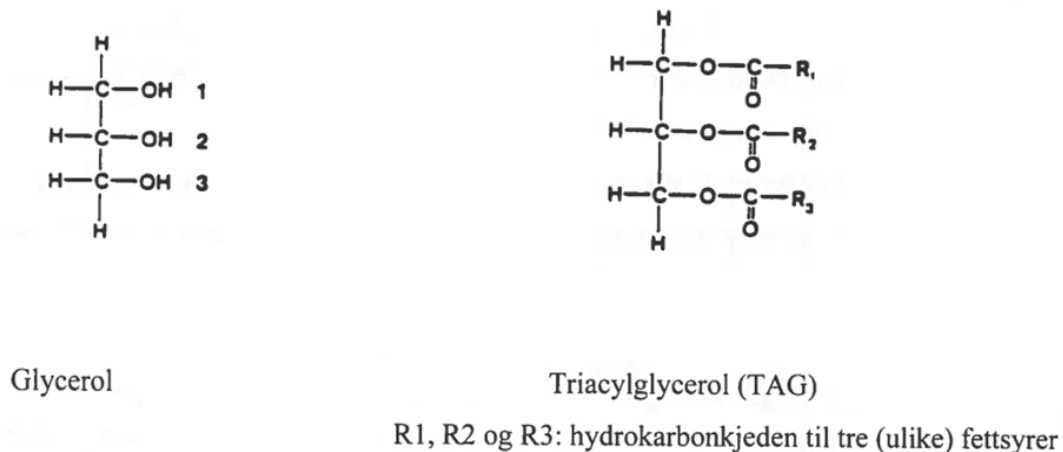
- Etablere tynnsjikt-kromatografi (TLC) som metode for kvalitativ analyse av relevante lipidklasser.
- Undersøke hvilken SPE-metode som er best egnet til å isolere EE og TAG.
- Analysere fettsyresammensetningen i isolert EE og TAG.
- Anvende metodene for å studere innholdet av EE og TAG fra en industriell transesterifiseringsprosess.

2 Bakgrunn

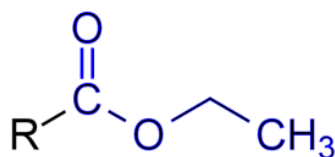
2.1 Lipidklasser

Lipider er en gruppe biologiske forbindelser som er løselig i organiske løsemidler, og tilnærmet uløselig i vann. Gruppen er stor og med varierte egenskaper og strukturer og kan derfor klassifiseres på ulike vis. En klassifisering som ofte brukes er forsåpbare og ikke-forsåpbare lipider. De forsåpbare inkluderer eksempelvis triacylglycerol (TAG), fosfolipider (PL), etylester (EE) og voksester (WE). Disse inneholder fettsyrer og det dannes fettsyresalter når de kokes med lut (NaOH). Ikke-forsåpbare lipider kan eksempelvis være steroidhormoner, gallesalter og vitamin A, D, E og K. Disse inneholder ikke fettsyrer.

I fiskeolje forekommer fettsyrer naturlig i TAG-form bestående av tre fettsyrer forestret til en glyserolstamme (Figur 3). Produkter basert på fiskeoljer kan imidlertid også komme i andre former, slik som EE som inneholder en fettsyre forestret til etanol med to karbonatomer (Figur 4). Lipider har tre hovedfunksjoner i en organisme; energilager (f.eks. TAG), strukturelle komponenter (f.eks. fosfolipider) og biologiske aktive lipider (f.eks. fettløselige vitaminer og steroidhormoner).



Figur 3. Generell struktur for et glyserolmolekyl og et TAG-molekyl med tre fettsyrer forestret til en glyserolstamme (fra Olsen, 2017).



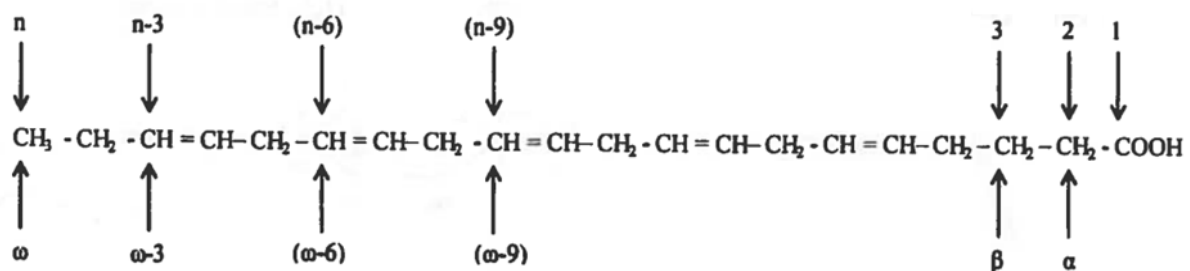
Figur 4. Generell struktur til etylester (EE) der etanol er forestret til en fettsyre. R= fettsyrens hydrokarbonkjede.

2.2 Fettsyrer

Fettsyrer (FA; R-COOH) består av en karboksylsyregruppe (-COOH) og en alifatisk hydrokarbonkjede (-R). Vanligvis er det mellom 12 og 22 karbonatomer i R-kjeden, oftest i partall. Om det er dobbeltbindinger tilstede i karbonkjeden eller ikke, betegnes fettsyrene henholdsvis som umettede eller mettede. Inneholder fettsyren en eller flere dobbeltbindinger kalles den henholdsvis enumettet (MUFA) og flerumettet (PUFA). Når en fettsyre inneholder 3 eller flere dobbeltbindinger kalles den gjerne for en høyt flerumettet fettsyre (HUFA). De kan inneholde opptil seks dobbeltbindinger.

Hydrogenatomene rundt karbonene ved en dobbeltbinding kan ikke rotere fritt slik de kan i en enkeltbinding. De er enten cis- eller trans-konfigurert. Cis-konfigurasjon er den vanligste konfigurasjonen for naturlig forekomst av umettede fettsyrer. I denne konfigurasjonen står hydrogenatomene på karbonatomene tilhørende dobbeltbindingen på samme side, og det dannes en knekk i karbonkjeden. I trans-konfigurasjon står hydrogenatomene på hver sin side, og karbonkjeden er strak.

De ulike delene av en fettsyre kan betegnes med navn. En oversikt over betegnelsene finnes i Figur 5 med eicosapentaensyre (EPA) som eksempel. De to første karbonene i kjeden etter karboksylgruppa kalles alfa (α) og beta (β) (til høyre) mens den siste kalles omega (Ω) eller n (til venstre). I EPA er det første karbonatomet involvert i en dobbeltbinding det tredje karbonet (n-3) i kjeden. Den vanligst brukte strukturformelen på EPA er $20:5n-3$ og viser at karbonkjeden består av 20 karbonatomer, 5 dobbeltbindinger og den første dobbeltbindingen fra Ω -enden er lokalisert på karbon n-3. Alle fettsyrer har en slik betegnelse som beskriver strukturen.

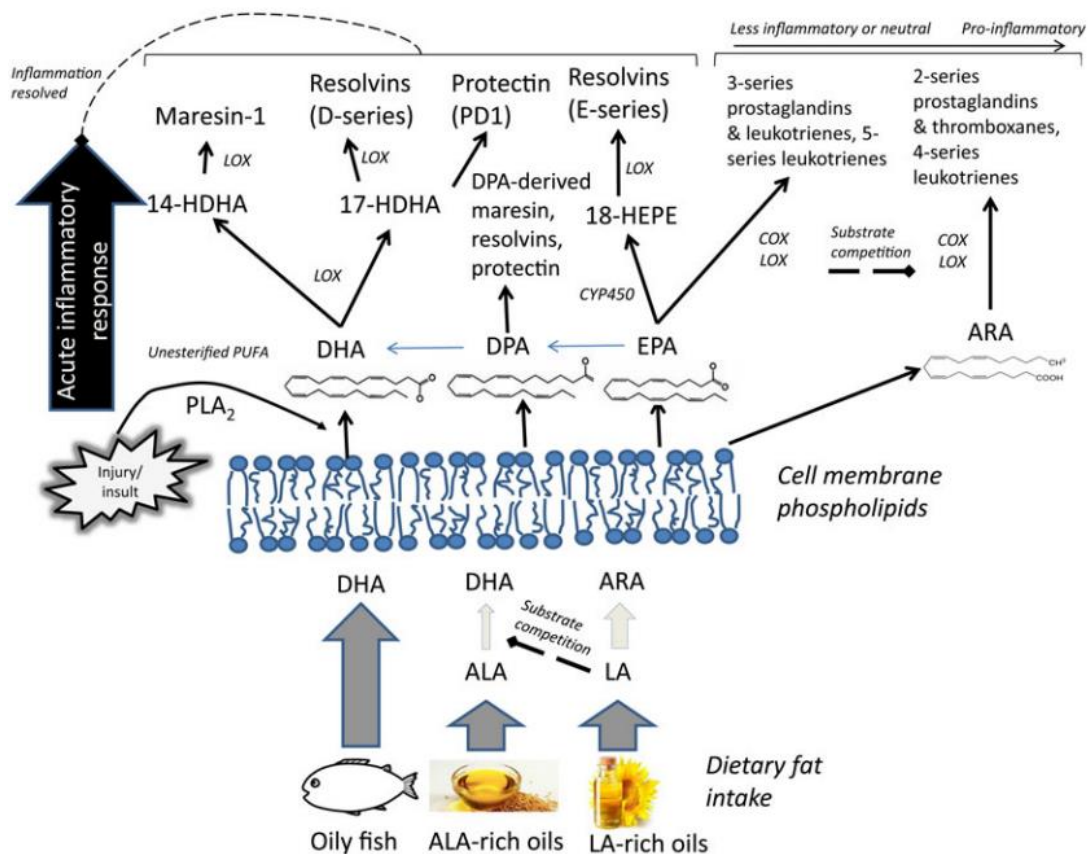


Figur 5. Oversikt over navngivning på de ulike delene av en fettsyre. Her illustrert med strukturen til eicosapentaensyre (EPA) (fra Olsen, 2017).

Ulike fettsyrer har ulike egenskaper. Langkjededede, flerumettede fettsyrer (LC-PUFA) har lave smeltepunkt og inneholder vanligvis 20 eller 22 karbonatomer. Fisk i kalde farvann inneholder

i stor grad slike fettsyrer for å bevare fluiditeten i membranlipider ved lave temperaturer. Dette er viktig for å opprettholde dens normalfunksjon. De langkjedede omega-3-fettsyrene eicosapentaensyre (EPA; 20:5n-3) og docosaheksaensyre (DHA; 22:6n-3) produseres av organismer langt nede i næringskjeden og konsumeres av fisk. De utgjør ofte henholdsvis ~18 % og ~12 % av det totale fettsyreinholdet. Fisk som en del av kostholdet til mennesker har ført til inntak av disse to fettsyrene, og det har blitt vist å bidra til en rekke helsegunstige effekter. En annen viktig langkjedet flerumettet fettsyre er arakidonsyre (ARA; 20:4n-6) som er en omega-6-fettsyre.

Omega-3-fettsyrer spiller ulike roller i kroppen vår, og kan blant annet virke antiinflammatorisk (betennelsesdempende) (Hall, 2017). Figur 6 viser en oversikt over hvordan n-3-fettsyrer kan spille en rolle i å dempe inflammasjonsreaksjoner. Spesialiserte antiinflammatoriske mediatorer (SPM), forbindelser med n-3-fettsyrer som forløpere, hemmer trolig akutte inflammasjoner. SPM inkluderer D- og E-resolviner, Maresin-1 og protectin-D1 (øverst i Figur 6). De virker trolig ved å hemme tilstrømming av nøytrofile granulocytter til inflammasjonsstedet, nedregulere signalmolekyler for inflammatorisk respons og stimulere makrofager til å fjerne produkter fra en inflammasjonsrespons. Nøytrofile granulocytter er hvite blodceller som initierer signalering av en immunrespons. Figur 6 viser også at arakidonsyre kan virke pro-inflammatorisk ved at de er forløpere til en rekke metabolitter som fremmer betennelsesreaksjoner. Dette gjør at det er viktig å balansere forholdet mellom EPA og DHA i kostholdet.



Figur 6. Hypotetisk oversikt over membran-PUFAs roller ved produksjon av inflammasjonsfremmende og -hemmende mediatorer. ALA, α -linolenic acid; COX, cyclooxygenase; CYP450, cytochrome P450; HDHA, hydroxyl-DHA; HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid; LA, linoleic acid; LOX, lipoxygenase; PLA₂, phospholipase A₂ (fra Hall, 2017).

Betennelsesreaksjoner er en del av responsen til immunforsvaret, og er viktig ved å forhindre og bekjempe infeksjoner. Mekanismen er nøye regulert, men ved patologiske inflammasjoner kan reguleringen svekkes eller forsvinne og dermed forårsake sykdom ved å danne skader på vev som ikke er reparerbare (Calder, 2009). De proinflammatoriske eicosanoidene blir generert fra arakidonsyre (ARA). Disse er involvert i stimuli som påvirker varighet og grad av betennelsesreaksjon (Lewis *et al.*, 1990). Det er kjent at betennelsesreaksjoner er assosiert med en rekke sykdommer, noen av dem listet i Figur 7. Velkjente sykdommer som blant annet diabetes, hjerte- og karsykdommer, psoriasis og astma er blant disse.

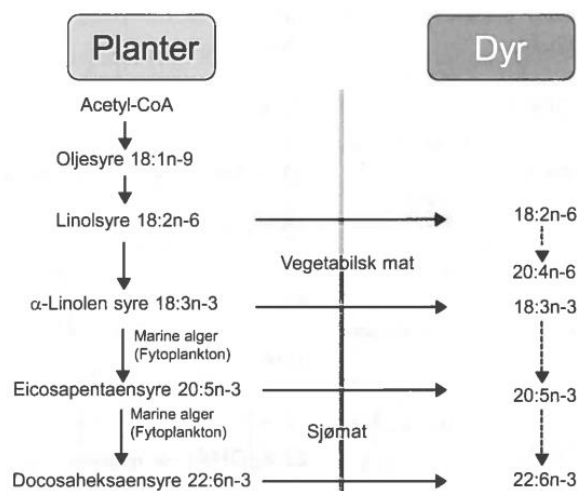
Diseases and conditions with a recognised inflammatory component.

Disease or condition
Rheumatoid arthritis
Crohn's disease
Ulcerative colitis
Lupus
Type-1 diabetes
Type-2 diabetes
Cystic fibrosis
Childhood asthma
Adult asthma
Allergic disease
Chronic obstructive pulmonary disease
Psoriasis
Multiple sclerosis
Neurodegenerative disease of aging
Atherosclerosis
Acute cardiovascular events
Obesity
Response to surgery, injury, trauma and critical illness
Acute respiratory distress syndrome
Cancer cachexia

Note: this list is not exhaustive.

Figur 7. Oversikt over sykdommer og tilstander der betennelseskomponenter er involvert (fra Calder, 2009).

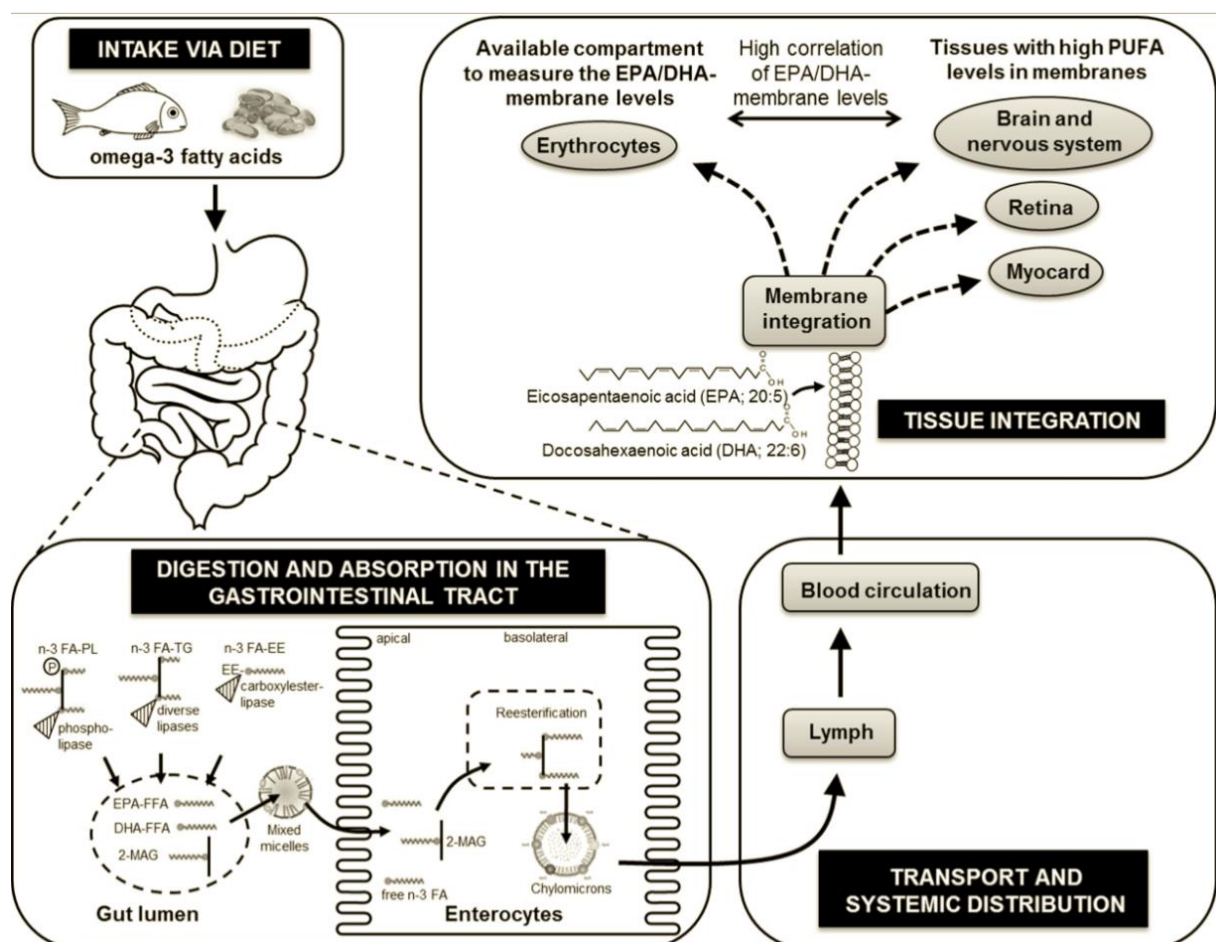
For mennesker er linolsyre (LA; 18:2n-6) og α -linolensyre (ALA; 18:3n-3) de essensielle fettsyrene. Disse produseres bare av planter som vist i Figur 8. Til høyre i figuren beskrives det at vi har litt evne (indikert med stiplet pil) til å omdanne disse til de flerumettede, langkjedede fettsyrene. Marine planteplankton, men ikke landplanter, kan omdanne 18:3n-3 til de langkjedede omega-3-fettsyrene EPA og DHA og disse vil derfor akkumuleres i marin fisk. For å øke inntaket av disse omega-3-fettsyrene anbefales det derfor å spise fisk.



Figur 8. Dyr har en svak evne til å omdanne linolsyre (LA; 18:2n-6) til arakidonsyre (ARA; 20:4n-6) og α -linolensyre (ALA; 18:3n-3) til EPA (20:5n-3) og DHA (22:6n-3) (stiplede linjer). EPA og DHA må tilføres gjennom kosten via marine kilder som sjømat, mens ALA og LA via vegetabilsk mat (fra Olsen, 2017).

2.3 Fordøyelse av lipider

Hovedandelen av fett som mennesker inntar i dietten er i TAG-form. Fordøyelse av fett og opptak av fettsyrene starter ved at TAG fordeler seg i fettdråper i magesekken og ankommer tynntarmen. En oversikt over prosessen er vist i Figur 9. Gallesalter, som produseres i leveren og lagres i galleblæra, finfordeler fett (emulgerer) til små dråper. Totalt overflateområde av lipiddråpene blir da større. Enzymet pankreatisk lipase hydrolyserer esterbindinger i TAG, hovedsakelig i *sn*-1,3 posisjon, og produktene blir monoacylglyserol (MAG) og to fettsyrer (FA). Disse danner miksede miceller og beveger seg inn i enterocytene i tynntarmen. I endoplasmatisk retikulum (ER) blir to FA og MAG reesterifisert til TAG. Chylomikroner, bestående av protein og lipid, legger seg på overflaten av TAG og gjør dem vannløselige. Deretter fraktes de inn i lymfesystemet og videre inn i blodbanen for distribusjon til ulike deler av kroppen.



Figur 9. Fordøyelse og absorpsjon av fett og fettsyrer. I enterocytene (tarmepitelcellene) reesterifiseres de frie fettsyrene til TAG, og eventuelt fosfolipider, før de skilles ut i sirkulasjonen. Omega-3-fettsyrene blir deretter integrert i cellemembraner i ulike vev, særlig nervevev, øye og røde blodceller (fra Schuchardt & Hahn, 2013).

I kommersielle omega-3-produkter kan EPA og DHA være i ulike kjemiske former. I tran foreligger EPA og DHA i naturlig konsentrasjon i TAG. I etylester (EE) er disse fettsyrene i konsentrerte mengder forestret til etanol. Alternativt kan EPA og DHA være i konsentrerte mengder i TAG (reesterifisert TAG; rTAG). I krillolje er vel 40 % i fosfolipidform og resten hovedsakelig i TAG (Yurko-Mauro *et al.*, 2015). Fordøyelighet av disse ulike kjemiske formene med EPA og DHA varierer noe og generelt synes det som om at TAG hydrolyseres raskere enn EE, det vil si at biotilgjengeligheten av EPA og DHA er bedre i TAG enn i EE-form (Dyerberg *et al.*, 2010; Schuchardt & Hahn, 2013). Det har av noen vært rapportert at EPA og DHA har høyere biotilgjengelighet fra krillolje enn i TAG-form (Schuchardt *et al.*, 2011) mens andre har rapportert at biotilgjengeligheten er lik (Yurko-Mauro *et al.*, 2015).

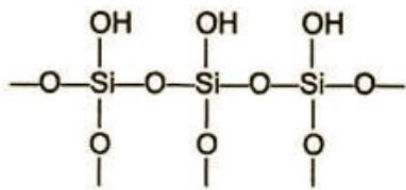
2.4 Kromatografiske metoder

For å separere ulike komponenter i en løsning brukes gjerne kromatografiske metoder. Disse involverer en stasjonær og en mobil fase. Metodene separerer komponenter basert på deres affinitet eller løselighet i den stasjonære eller mobile fasen. Fire metoder som ofte blir benyttet i studiet av lipider er tynnsjikt-kromatografi, fast fase ekstraksjon, gasskromatografi og høy-trykks væske-kromatografi.

2.4.1 Tynnsjikt-kromatografi av fettklasser

Tynnsjikt-kromatografi (TLC) kan betegnes som en kvalitativ kromatografisk metode. Ulike lipidklasser tilstede i en lipidprøve kan raskt, og med få ressurser tilgjengelig, visualiseres med denne metoden. Et tynt lag med silica (Figur 10) på en overflate av en glass- eller aluminiumplate fungerer som en polar, stasjonær fase. Den mobile fasen er som regel en blanding av løsemidler. Den stasjonære fasen, med lipidprøver påsatt nederst på plata, blir satt i et lukket kar med den mobile fasen i bunnen. Grunnen til at karet skal være lukket er at løsemidler lett fordampes i åpne beholdere. Kapillærkraft trekker den mobile fasen sakte oppover den stasjonære og drar med seg lipidene. De ulike lipidklassene vandrer i ulik hastighet basert på affiniteten mellom dem og den mobile eller stasjonære fasen. Affinitet avhenger av polaritet. En polar lipidklasse vil interagere sterkt med den polare, stasjonære fasen og vil dermed vandre sakte og gi en kort distanse oppover plata. En nonpolar lipidklasse vil interagere svakere med stasjonærfasen og sterkere med den mobile og dermed vandre raskere og gi en

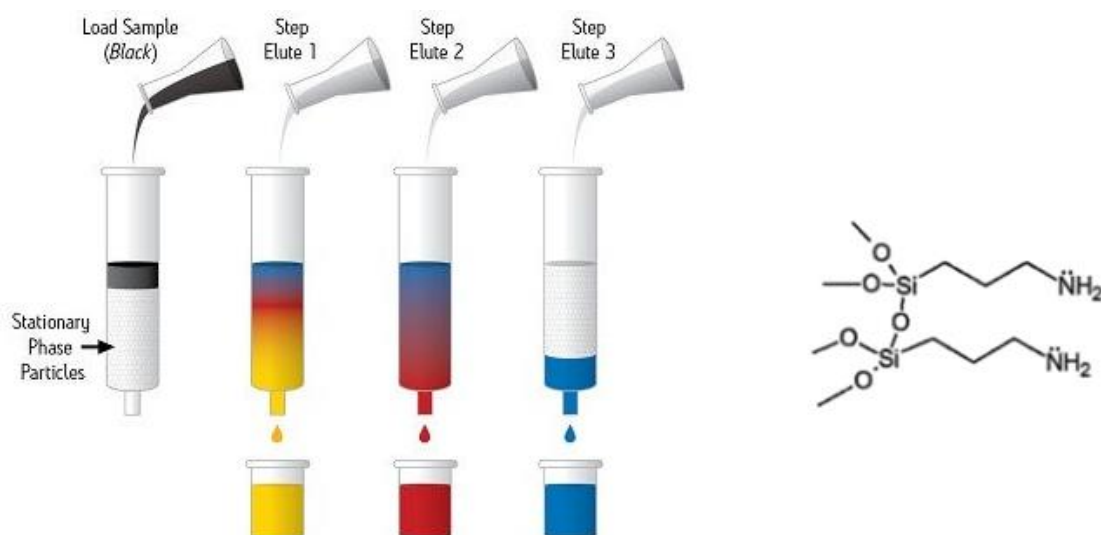
lengre distanse oppover plata. Lipidklasser blir på denne måten separert, og kan visualiseres ved bruk av UV-lys eller høy varme.



Figur 10. Oppbygningen til en Silicastruktur. Silicapartikler er sammenkoblet via oksygenatomer. På overflaten av strukturen er det bundet en hydroksylgruppe (-OH) til hver av de ytterste Silicapartiklene.

2.4.2 Fast fase ekstraksjon av fettklasser

For å separere ulike lipidklasser i egne fraksjoner kan fast fase ekstraksjon (SPE) benyttes. Det er en kvalitativ metode som gjerne utføres for å senere analysere innholdet i fraksjonene. Den stasjonære fasen består av pakkede silicapartikler i en kolonne. Det finnes kolonner med ulike grupper koblet til silicapartiklene, men i denne oppgaven brukes kolonnemateriale med aminopropylgrupper (-C₃H₆NH₂) (Figur 11). Mobilfasene er som oftest løsemidler med ulik polaritet, eller blandinger av ulike løsemidler. Det kan brukes flere mobilfaser i ett og samme forsøk. Prinsippet med ulik vandrethastighet for ulike lipider er det samme som gjelder for TLC. En lipidklasse vandrer enten gjennom kolonnematerialet og elueres ut sammen med den mobile fasen, eller så forblir den i kolonnematerialet. Dette avhenger av dens relative tiltrekning til den stasjonære kontra den mobile fasen. En miks av ulike lipidklasser fra en lipidprøve kan være tilstede i kolonnematerialet samtidig, men de vil interagere ulikt med stasjonær- og mobilfasen slik at det optimalt sett vil være mulig å eluere ut en og en lipidklasse i gangen, kun ved å endre mobil fase mellom hver.



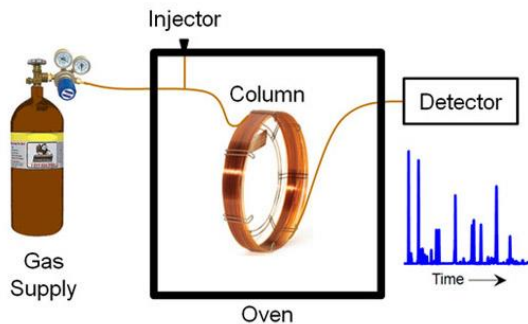
Figur 11. Til venstre er en generell elueringsprosess illustrert. En prøve (svart) tilsettes den stasjonære fasen. Ulike komponenter i løsningen (farget) eluerer ut ved bruk av ulike mobile faser (hvit). Til høyre er en illustrasjon av silicapartikler med påkoblede aminopropylgrupper ($-C_3H_6NH_2$) (modifisert fra Waters, 2018a).

2.4.3 Gasskromatografi av fettsyremetylestere

Gasskromatografi (GC) kan brukes til kvantitativt å analysere komponenter i en prøve. Det forutsettes imidlertid at komponentene er, eller kan gjøres flyktige. For eksempel ulike fettsyremetylestere (FAME), fettsyrer esterifisert til hver sin metylgruppe. Selve separeringen utføres av en gasskromatograf. Dens komponenter er illustrert i Figur 12. FAME-prøven injiseres via injektor og får tilført bæregass, ofte helium, som fungerer som den mobile fasen. Høy temperatur sørger for at FAME blir flyktige og bæregassen kan transportere dem gjennom en lang silicabelagt kolonne kveilet opp i en spiralform.

Kolonna fungerer som den stasjonære fasen. FAME-molekyler med ulike fettsyrer beveger seg med ulik hastighet gjennom kolonna (retensjonstid) basert på antall dobbeltbindinger, lengden til hydrokarbonkjeden og kokepunkt. For FAME-molekyler uten dobbeltbindinger vil de med kortest hydrokarbonkjede være mest flyktige, interagere mest med gassfasen (mobil fase) og dermed vandre i høyere hastighet enn de med lengre kjeder. Har to komponenter omtrent det samme kokepunktet, vil størrelsen på molekylet avgjøre hvilken av dem som vandrer kjappest. små molekyler vil lettere bæres av bæregassens strøm gjennom kolonna og dermed vandre i høyere hastighet enn et større molekyl. Inneholder fettsyrene dobbeltbindinger vil retensjonstiden øke med et økende antall dobbeltbindinger fordi interaksjonen med den stasjonære fasen forsterkes. Jo lengre kolonna er, dess bedre separeres ulike komponenter.

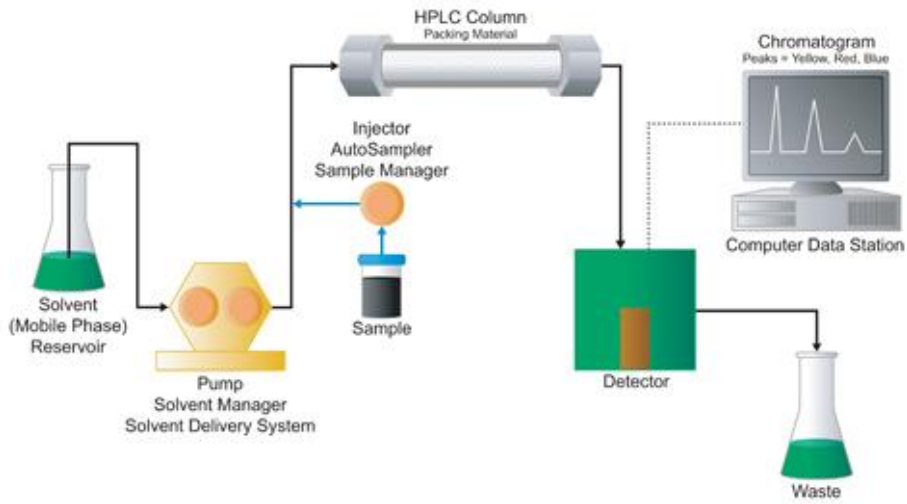
Ved enden av kolonna er en detektor som registrerer antall molekyler av en forbindelse som ankommer og til hvilken tid. Denne sender informasjonen til et dataprogram som danner et kromatogram med topper som indikerer mengde og type FAME som er tilstede i den påsatte prøven. Toppene er direkte proporsjonale til mengden av hver komponent. Kromatogrammet sammenlignes med referansekromatogrammer av kjente prøver for å bestemme hvilke topper som tilhører hvilke FAME.



Figur 12. Oversikt over komponentene i en gass kromatograf (fra Agilent, 2011).

2.4.4 Høy-ytelles væskerkromatografi av fettklasser

For å kvantitativt analysere fettklassesammensetningen i en lipidprøve kan høy-ytelles væskerkromatografi (HPLC) brukes. Denne metoden benytter en eller flere pumper til å skape et høyt trykk som presser en væskeprøve gjennom en eller flere kolonner (Figur 13). Løsemiddel fungerer som mobil fase og blir ført gjennom en høytrykkspumpe for å generere en spesifikk strømmehastighet (flow rate). Via en injektor tilføres lipidprøve til den kontinuerlige mobilfasestrømmen som frakter prøven gjennom en kolonne. Kolonna fungerer, i likhet med i gasskromatografi, som en stasjonær fase og inneholder kolonnemateriale som interagerer med de ulike lipidklassene i en prøve. De ulike lipidklassene danner bånd som vandrer gjennom kolonna i ulik hastighet ved at de enten interagerer mest med den stasjonære fasen og vandrer tregt eller med den mobile fasen og vandrer hurtigere. Detektor registrerer antall molekyler av en forbindelse som ankommer og til hvilken tid.



Figur 13. Oversikt over komponentene i HPLC (fra Waters, 2018b).

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

Fiskeoljer fra produksjon, konsentrater av fiskeolje fra produksjon og kommersielt konsentrat av fiskeolje ble utstedt fra Nordic Pharma Inc AS i Kaldfjord, Tromsø (Tabell 1).

Tabell 1. Oljer og oljekonsentrater benyttet fra Nordic Pharma.

Prøve nr	Materialer	Fra Produksjonstrinn (Figur 2)	Dato for uttak fra produksjon	Batch nr.	Betegnelse i tekst
1	Fiskeoljekonsentrat (TAG 3525)	Ferdigprosessert	02.06.17	291-160-2406	rTAGa
2	Fiskeoljekonsentrat (TAG 3525)	Ferdigprosessert	19.06.17	291-190-2410	rTAGb
3	Fiskeolje (TAG 1812)	Etter trinn 1	16.06.17	E 082-017-2634	TAGc
4	Fiskeoljekonsentrat (EE 3412)	Etter trinn 3	09.08.17	305-210-2536	EEa
5	Fiskeoljekonsentrat (TAG 3525)	Ferdigprosessert	30.01.18	319-130-2840	rTAGd
6	Fiskeolje (TAG 1812)	Etter trinn 1	17.05.17	283-60-2445	TAGe
7	Ukjent prøve 1	Trinn 4	06.02.18 (kl. 13.30)	320-100-2874 Sats 1	Uttak 0 t
8	Ukjent prøve 2	Trinn 4	07.02.18 (kl. 01.30)	320-100-2874 Sats 1	Uttak 12 t
9	Ukjent prøve 3	Trinn 4	07.02.18 (kl. 13.30)	320-100-2874 Sats 1	Uttak 24 t
10	Ukjent prøve 4	Trinn 4	08.02.18 (kl. 01.30)	320-100-2874 Sats 1	Uttak 36 t
11	Ukjent prøve 5	Trinn 4	08.02.18 (kl. 13.30)	320-100-2874 Sats 1	Uttak 48 t
12	Ukjent prøve 6	Trinn 4	08.02.18 (kl. 20.30)	320-100-2874 Sats 1	Uttak 55 t

Til analyse av fettsyresammensetning ble fettsyrestandarder GLC 411 og PUFA-1 fra Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland) benyttet (Tabell 2).

Fettklassestandarder brukt i TLC var 18-5A (Lecithin, Kolesterol, oljesyre, Triolein og kolesterylloleat), MAG (monolein), DAG (1,3 diolein) og TAG (triolein) fra Nu-check Prep, Inc. (Elysian, MN, USA). EE (etyllineolat) og 18:1 (MAG, DAG og TAG) var fra Sigma-Aldrich.

Andre kjemikalier fra Sigma-Aldrich var som følger: Dietyleter p.a $\geq 99,8$ %, Diklormetan (DCM) p.a $\geq 99,9$ %, Eddiksyre p.a $\geq 99,8$ %, Fosforsyre ACS ≥ 85 %, Heksan p.a ≥ 99 %, Isopropanol (2-propanol) p.a $\geq 99,8$ %, Kloroform p.a 99-99,4 %, Kobber (II) sulfat pentahydrat ACS ≥ 98 %, Metanol p.a $\geq 99,8$ %, Svovelsyre p.a 95-97 %, Natriumklorid p.a $\geq 99,5$ %.

Kjemikalier fra andre leverandører var som følger: Heptan p.a $\geq 99\%$ fra Honeywell, Riedel-de Hæn (Seelze, Tyskland) og Tetrahydrofuran (THF) $\geq 99,7$ % fra VWR Prolabo Chemicals, HiPerSolv Chromatograf (Radnor, PA, USA).

Det ble brukt Milli-Q vann (Millipore Corp, Massachusetts, USA)

Tabell 2. Fettsyresammensetning i fettsyremetylesterstandardene (FAME-standardene) PUFA-1 og GLC 411.

Fettsyre	PUFA-1	GLC 411	Fettsyre	PUFA-1	GLC 411
8:0		x	20:1n-12		x
10:0		x	20:1n-9	x	x
12:0		x	20:2n-6		x
12:1		x	20:3n-3		x
14:0	x	x	20:3n-6		x
14:1n-5		x	20:5n-3	x	
16:0	x	x	20:4n-6		x
16:1 n-7	x	x	22:0		x
18:0	x	x	22:1n-9	x	x
18:1 n-7	x	x	22:1n-11	x	
18:1 n-9	x	x	22:2n-6		x
18:1 n-12		x	22:3n-3		x
18:2 n-6	x	x	22:4n-6		x
18:3 n-3	x		22:n-3	x	
18:3n-6		x	22:6n-3	x	x
18:4 n-3	x		24:0		x
20:0		x	24:1n-9	x	x
20:1n-15		x			

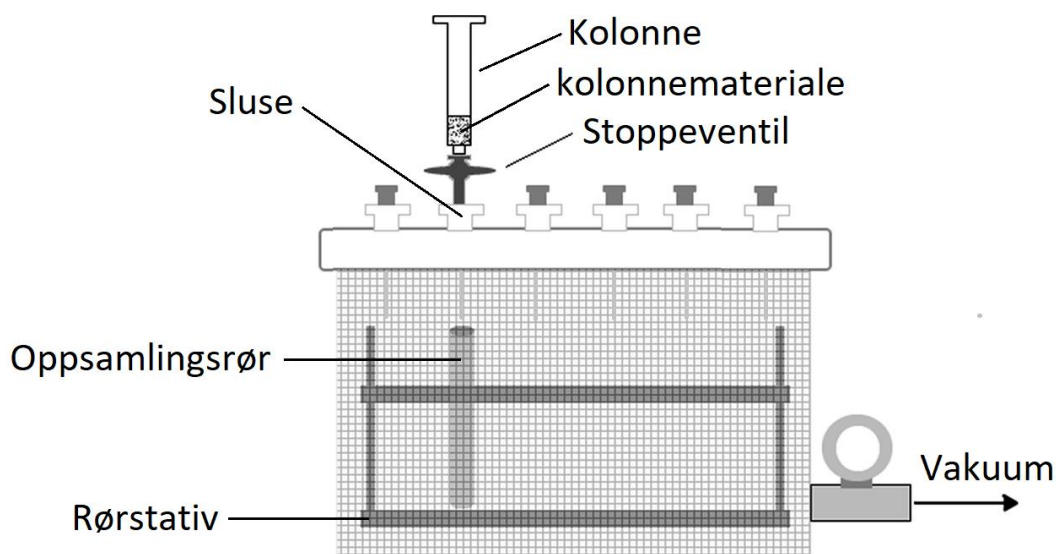
3.2 Metoder

3.2.1 Fettklasseinnhold med tynnsjikt-kromatografi (TLC)

For å detektere ulike lipidklasser i prøvene ble det brukt tynnsjikt-kromatografi (TLC). Lipidprøver ble laget i en konsentrasjon på 10 mg/ml i diklormetan (DCM). Det ble med kapillærrør satt 2 µl lipidprøve med omtrent 1 cm mellomrom langs nedre kant (1 cm unna kanten) på en høy-ytelses tynnsjikt-kromatografi (HP-TLC) Silica gel 60 plate (10 x 10 cm, Merck, USA). Løpemiddelet Heptan:dietyler:eddiksyre (70:30:1) (modifisert fra Kaluzny *et al.*, 1985) ble fylt i et elueringskar slik at bunnen var dekket. TLC-plata ble satt oppreist i elueringskaret med lipidprøvene langs nedre kant. Lokket ble satt på, og løpemiddelet trakk oppover plata til det var omtrent 1 cm igjen til øvre kant. Plata ble da tatt ut av elueringskaret, satt til tørk i 5 min og kobberløsning (10 % kobbersulfat, 8 % fosforsyre) ble sprayet på (Bitman & Wood, 1982). Deretter ble den satt til tørk ved romtemperatur i 10 min og til slutt fremkalt ved å varmes opp fra en starttemperatur på maksimum 100 °C og opp til 180 °C i varmeovn. En plate med analysestandarder ble brukt til sammenligning for å identifisere fettklasser.

3.2.2 Separering av fettklasser med fast fase ekstraksjon (SPE)

Fettklasser ble separert med fast fase ekstraksjon (SPE). Lipidprøver ble løst i et løsemiddel til en konsentrasjon på x mg/ml (spesifikt løsemiddel og konsentrasjonen x mg/ml for de ulike forsøkene er spesifisert i hver metode). En ny Mega BE-NH₂ aminopropylkolonne (1 gram kolonnemateriale og totalt 6 ml kolonnevolum, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ble montert på et vakuumpapparat (Agilent Technologies) og stoppeventilene ble lukket. SPE-systemet er illustrert i Figur 14. Vakuomet ble justert til en hastighet på ~1 ml/min. Kolonna ble kondisjonert med et eller flere løsemidler/cocktailer (spesifisert i hver metode) og lipidprøven ble deretter påsatt. Lipider som ikke festet seg til kolonnematerialet (kalt flow through) ble samlet opp. Videre ble lipidklassene eluert ut i fraksjoner med ulike volumer av ulike løsemidler/løsemiddelblandinger. Det ble tatt hensyn til forsinket eluering. Fraksjonene ble avdampet med nitrogengass (AGA, Oslo) og løst i y µl DCM eller kloroform (y spesifisert i hver metode). Deteksjon av lipidklasser i prøvene ble gjort med tynnsjikt-kromatografi (TLC) som beskrevet i delkapittel 3.2.1. Fraksjonene ble lagret i fryser ved -30 °C frem til videre analyser ble gjort.



Figur 14. Illustrasjon av et SPE-system med betegnelser for de ulike delene (figur modifisert fra Corley & Iacono, 2015).

3.2.2.1 SPE Metode 1

Metoden er modifisert fra Vaghela & Kilara (1995) og beskrevet av Vang *et al.* (2013) for separasjon av nøytrale lipider (trinn IV, V og VII). Trinnene for eluering av kolesterol og MAG i prosedyren til Vang *et al.* (2013) er imidlertid ikke inkludert. Et trinn for eluering med heptan ble lagt til slutt.

Fremgangsmåte (elueringshastighet cirka 1 ml/min):

1. En ubrukt aminopropylkolonne ble kondisjonert med 4 ml heptan.
2. En 0,4 ml lipidprøve (50 mg/ml i kloroform) ble påsatt; EE:TAG (1:1)
3. Kolonna ble eluert i rekkefølge (med 4 ml):
 1. Heptan
 2. Heptan:DCM:dietyleter (89:10:1)
 3. Heptan:etylacetat (85:15)
 4. Heptan
4. Flow through (kondisjonering og påsatt lipidprøve) og de eluerte fraksjonene ble samlet opp og dampet inn med nitrogengass før de ble løst i 200 μ l eller 50 μ l kloroform.
5. Analyse av fraksjonene med TLC.

3.2.2.2 SPE Metode 2

Metode 2 er en kombinasjon av metodene beskrevet av Bernhardt *et al.* (1996) og av Vang *et al.* (2013). Ifølge førstnevnte skal EE elueres med heksan mens Vang *et al.* (2013) bruker heptan:DCM:dietyleter (89:10:1) for å eluere TAG. Heptan er mindre giftig enn heksan og ble av den grunn brukt i stedet.

Fremgangsmåte (elueringshastighet cirka 1 ml/min):

1. En ubrukt aminopropylkolonne ble kondisjonert med 8 ml heptan.
2. En 0,4 ml lipidprøve (10 mg/ml i heptan) ble påsatt; EE:TAG (1:1)
3. Kolonna ble eluert i rekkefølge:
 1. Heptan (2 ml)
 2. Heptan (6 ml)
 3. Heptan:DCM:dietyleter (89:10:1) (6 ml)
 4. Heptan (8 ml)
4. Flow through (kondisjonering og påsatt lipidprøve) og de eluerte fraksjonene ble samlet opp og dampet inn med nitrogengass før de ble løst i 100 µl DCM.
5. Analyse av fraksjonene med TLC.

3.2.2.3 SPE Metode 3

Metoden var som beskrevet av Bernhardt *et al.* (1996), men heptaneluatet ble samlet i 6 fraksjoner.

Fremgangsmåte (elueringshastighet cirka 1 ml/min):

1. En ubrukt aminopropylkolonne ble kondisjonert med 8 ml heptan.
2. En 0,4 ml lipidprøve (10 mg/ml i heptan) ble påsatt; EE:TAG (1:1)
3. Kolonna ble eluert i rekkefølge:
 1. Heptan (8 ml)
 2. Heptan (1,5 ml)
 3. Heptan (1,5 ml)
 4. Heptan (1,5 ml)
 5. Heptan (1,5 ml)
 6. Heptan (1,5 ml)
4. Flow through (kondisjonering og påsatt lipidprøve) og de eluerte fraksjonene ble samlet opp og dampet inn med nitrogengass før de ble løst i 100 µl DCM.
5. Analyse av fraksjonene med TLC.

3.2.2.4 SPE Metode 4

Metoden som ble brukt var en kombinasjon av metodene beskrevet av Bernhardt *et al.* (1996) og Flurkey (2005). Sistnevnte var en modifikasjon av metoden beskrevet av Agren *et al.* (1996) og kun elueringsmidler for eluering av TAG og DAG ble brukt. Elueringstrinn 1 til 5 i punkt 3 nedenfor var fra Bernhardt *et al.* (1996) mens 6 til 8 var fra Flurkey (2005).

Fremgangsmåte (elueringshastighet cirka 1 ml/min):

1. En ubrukt aminopropylkolonne ble kondisjonert med 8 ml heptan.
2. En 0,4 ml lipidprøve (10 mg/ml i heptan) ble påsatt; EE:TAG (1:1)
3. Kolonna ble eluert i rekkefølge:
 1. Heptan (2 ml)
 2. Heptan (2 ml)
 3. Heptan (2 ml)
 4. Heptan (2 ml)
 5. Heptan (4,5 ml)
 6. Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) (6 ml)
 7. Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) (6 ml)
 8. Kloroform:isopropanol (2:1) (10 ml)
4. Flow through (kondisjonering og påsatt lipidprøve) og de eluerte fraksjonene ble samlet opp og dampet inn med nitrogengass før de ble løst i 50 µl DCM.
5. Analyse av fraksjonene med TLC.

3.2.2.5 SPE Vaskeforsøk

Først ble det gjennomført et forsøk som beskrevet i Metode 4 uten lipidprøve og fraksjonene ble visualisert med TLC-analyse. Deretter ble SPE-slusene som kolonnene ble festet til på vakuumparatet (Figur 14), vasket henholdsvis med heptan, aceton, isopropanol og metanol (2 ml av hver) ved bruk av en SPE-kolonne uten kolonnemateriale. Det ble igjen gjort et forsøk som beskrevet i Metode 4 uten lipidprøve som ble visualisert med TLC-analyse. Videre ble det gjort to SPE-analyser, et uten kolonnemateriale og et med, begge uten lipidprøve. I disse forsøkene ble det i hver av slusene eluert med 2 ml Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) etterfulgt av 2 ml kloroform:isopropanol (2:1). Resultatene ble visualisert med TLC.

3.2.2.6 SPE Metode 5

Metoden som ble brukt var som beskrevet i Metode 4, men med ny kondisjoneringsprosedyre.

Fremgangsmåte (elueringshastighet cirka 1 ml/min):

1. En ubrukt aminopropylkolonne ble kondisjonert i rekkefølge:
 1. Heptan (8 ml)
 2. Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) (12 ml)
 3. Kloroform:isopropanol (2:1) (10 ml)
2. En 0,4 ml lipidprøve (10 mg/ml i heptan) ble påsatt; EE:TAG (1:1)
3. Kolonna ble eluert som i Metode 4.
4. Flow through (kondisjonering og påsatt lipidprøve) og de eluerte fraksjonene ble samlet opp og dampet inn med nitrogengass før de ble løst i 50 µl DCM.
5. Analyse av fraksjonene med TLC.

3.2.2.7 SPE Metode 6

Metoden som ble brukt var som beskrevet i Metode 4, men med ny kondisjoneringsprosedyre.

Fremgangsmåte (elueringshastighet cirka 1 ml/min):

1. En ubrukt aminopropylkolonne ble kondisjonert i rekkefølge:
 1. Heptan (6 ml)
 2. Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) (6 ml)
 3. Kloroform:isopropanol (2:1) (6 ml)
 4. Heptan (6 ml)
2. En 0,4 ml lipidprøve (10 mg/ml i heptan) ble påsatt; EE:TAG (1:1)
3. Kolonna ble eluert som i Metode 4.
4. Flow through (kondisjonering og påsatt lipidprøve) og de eluerte fraksjonene ble samlet opp og dampet inn med nitrogengass før de ble løst i 50 µl DCM.
5. Analyse av fraksjonene med TLC.

3.2.3 Metylering av fettsyrer

Lipidfraksjoner ble inndampet med nitrogen-gass og løst i DCM:metanol (2:1) vanligvis til en konsentrasjon på 10 mg/ml (I enkelte tilfeller med lite prøvemateriale ned mot 4 mg/ml). Av denne løsningen ble 100 µl overført til rene Duran GL18 Kimax rør (Fisher Scientific, USA) og det ble tilsatt 0,9 ml DCM og 2 ml 2% H₂SO₄ i metanol. Løkkene ble skrudd på slik at rørene ble tette. Prøvene ble deretter ristet godt og kokt på varmeblokk i 60 min ved 100 °C i avtrekkskap. De kokte prøvene ble tilsatt 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5% NaCl (løst i Milli-Q vann) og ristet. Den øverste fasen (heptan og lipider) ble pipettert over i rene glass med pasteurpipetter og avdampet med nitrogen-gass. Inndampede prøver ble løst i 100 µl heptan.

3.2.4 Fettsyresammensetning med gasskromatografi (GC)

Fettsyrer metylert med metoden beskrevet i delkapittel 3.2.3 ble separert med gass kromatografi (GC). Prøver ble injisert med en 7683B serie autoinjektor (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) i en Agilent 6890N gasskromatograf (Agilent Technologies) med flammeionisasjonsdetektor. Kolonna brukt var en Agilent CP7419 kappilærkolonne (50 m x 0.25 mm, Agilent Technologies). Helium (AGA, Oslo) ble brukt som bæregass. Hydrogen-gass (AGA) ble brukt for å starte flamme i ovnen og teknisk luft (AGA) ble brukt for å opprettholde flammen. Metoden for separasjon var forhåndsprogrammert til en metode kalt H14NY (Tabell 3). Det ble brukt en splitinjektor (med ratio 50:1; 1 del forstøves) og strømmehastigheten ble satt til en konstant strøm på 1,6 ml/min. Prøveinnløpet var 240 °C og detektor 250 °C. Dataprogrammet GC OpenLAB (for GC 6890N, Agilent Technologies) genererte et kromatogram for hver prøve. For å identifisere fettsyrer ble kromatogrammene sammenlignet med kromatogrammene tilhørende kjente analysestandarder (PUFA-1 og GLC 411 (Tabell 2). Senere ble også kjente prøver fra Nordic Pharma brukt som analysestandarder (nr 5; rTAGd og nr 6; TAGe) (Tabell 1).

Tabell 3. Sykluser i den forhåndsinnstilte metoden H14NY.

Perioder med økende temperatur	Grader i ovnen (°C)	Økning i temperatur (°C/min)	Tid holdt ved en gitt temperatur (min)
Start	60	-	1
1	130	30	0
2	195	1,3	0
3	240	30	10

3.2.5 Fettklassesammensetning med høy-ytelses væskekromatografi (HPLC)

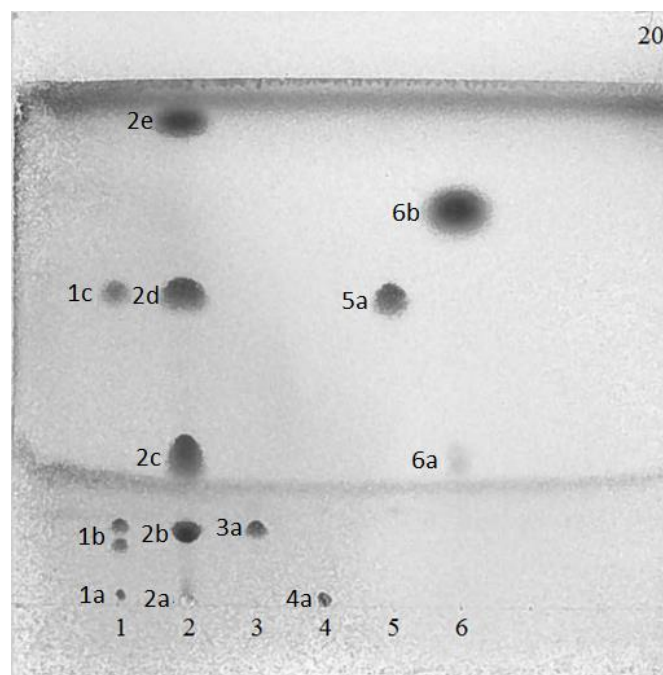
For å detektere fettklasser kvantitativt ble høy-ytelses væskekromatografi (HPLC) brukt. Det ble veid ut 50 mg lipider som ble tilsatt 10 ml tetrahydrofuran (THF) i en kolbe med lokk. Løsningen ble ristet og overført til et HPLC-rør for analyse. Av røret ble 40 µl injisert av en autosampler Model Optimas. Andre deler involvert i HPLC-systemet var HPLC compact pump modell 2250 (Bischoff, Leonberg, Tyskland), refraktiv indeks (RI)-detektor 8120 (Bischoff), Model DG-1410 4-channel degasser (Bischoff), Model 4100 Plus Column oven og tre seriekoblede kolonner. Kolonne 1, 2 og 3 var henholdsvis av typen Styragel® HR 2 THF, Styragel® HR 1 THF og Styragel® HR 0,5 THF (7,8 x 300 mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA). Kolonneovnen var satt til 40 °C, strømmehastighet til 0,80 ml/min og den mobile fasen var ren THF. Software brukt for å fremstille resultater var Compass CDS (Scion Instruments, Livingston, Storbritannia). Analysen ble utført ved Nordic Pharma.

4 Resultater

4.1 Tynnsjikt-kromatografi av lipidklassestandarder.

Formålet med dette forsøket var å lage en TLC analysestandardplate med kjente fettklasser for å se hvor langt de aktuelle klassene vandret med metoden som ble brukt. Dette ble gjort for at den senere kunne brukes som referanse ved å sammenligne prøver med ukjent innhold.

Resultatene i Figur 15 viste god separasjon av lipidklassene og illustrerer vandredistansen til de ulike klassene godt.

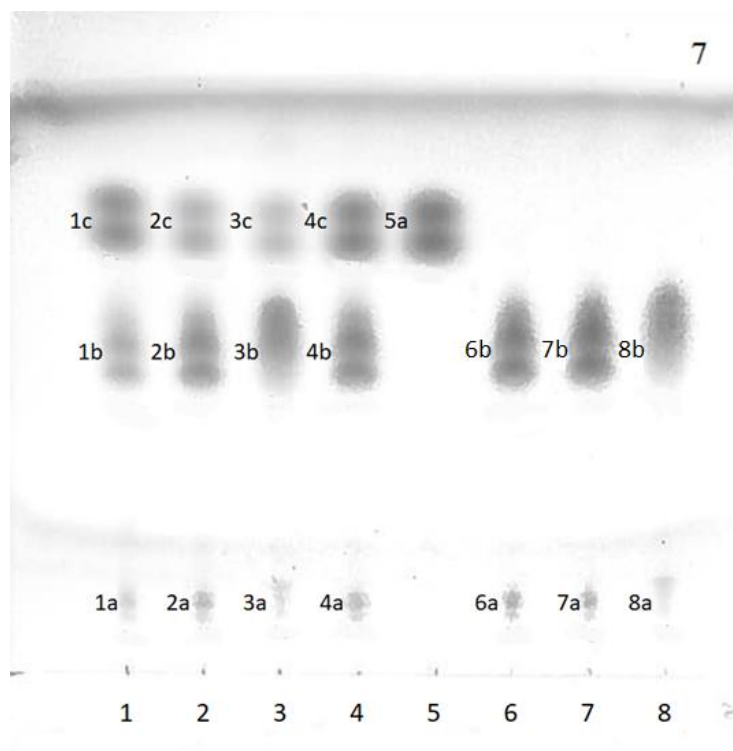


Figur 15. Tynnsjikt-kromatografi (TLC) av lipidklassestandarder. Spor 1: (18:1: mono, di og triacylglyserol); 1a = MAG, 1b = DAG, 1c = TAG. Spor 2: (18-5A); 2a = Lecitin, 2b = kolesterol, 2c = FFA, 2d = TAG, 2e = kolestylester. Spor 3: (1,3 diolein); 3a = DAG. Spor 4: (monolein); 4a = MAG. Spor 5: (triolein); 5a = TAG. Spor 6: (ethyl lineolate); 6a = FFA-forurensing, 6b =EE.

4.2 Tynnsjikt-kromatografi av EE og TAG i ulike mengdeforhold

Formålet med forsøket var å undersøke om vandringslengden (R_f -verdi) til EE og TAG ble påvirket av å være i løsnings med andre lipidklasser sammenlignet med separate løsninger i påsatte prøver. I tillegg skulle homogenitet til EE og TAG-prøvene vurderes.

Resultatene i Figur 16 viste at både EE, TAG og DAG hadde samme R_f -verdi uavhengig om de var alene i løsnings eller sammen med andre lipidklasser. Det kom tydelig frem at både EE og TAG var heterogene. I EE-prøvene var det to tydelige bånd mens i TAG-prøvene var det minst to ulike bånd. I tillegg inneholdt denne prøven spor av DAG.

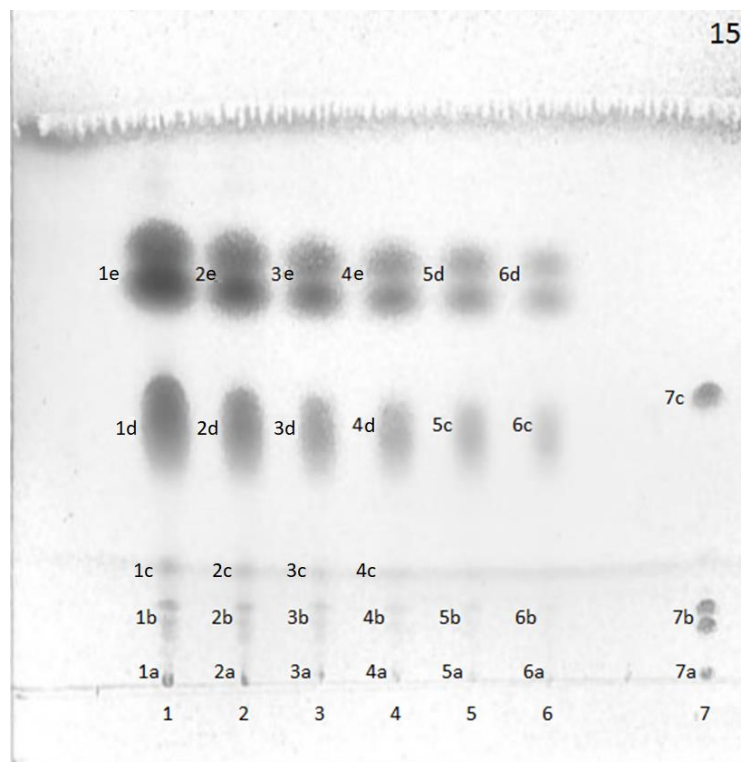


Figur 16. TLC av EE- og TAG-prøver fra Nordic Pharma i ulike mengdeforhold (10 mg/ml). Spor 1: rTAGa:EEa (3:7); 1a = DAG, 1b = TAG, 1c = EE. Spor 2: rTAGb:EEa (7:3); 2a = DAG, 2b = TAG, 2c = EE. Spor 3: TAGc:EEa (8:2); 3a = DAG, 3b = TAG, 3c = EE. Spor 4: rTAGa:EEa (1:1); 4a = DAG, 4b = TAG, 4c = EE. Spor 5: Bare EEa; 5a = EE. Spor 6: Bare rTAGa; 6a = DAG, 6b = TAG. Spor 7: Bare rTAGb; 7a = DAG, 7b = TAG. Spor 8: Bare TAGc; 8a = DAG, 8b = TAG. Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

4.3 Tynnsjikt-kromatografi av EE og TAG (1:1) i ulike konsentrasjoner

Formålet med dette forsøket var å teste om TLC-metoden gav identifiserbare resultater av EE og TAG ved både høye og lave lipidkonsentrasjoner, og om R_f -verdi for lipidklassene forble de samme i ulike konsentrasjoner.

Resultatene i Figur 17 viste at lipidbåndene var visualiserbare ved alle konsentrasjonene 1,25- 40 mg/ml. R_f -verdi var omtrent den samme uavhengig av konsentrasjon.

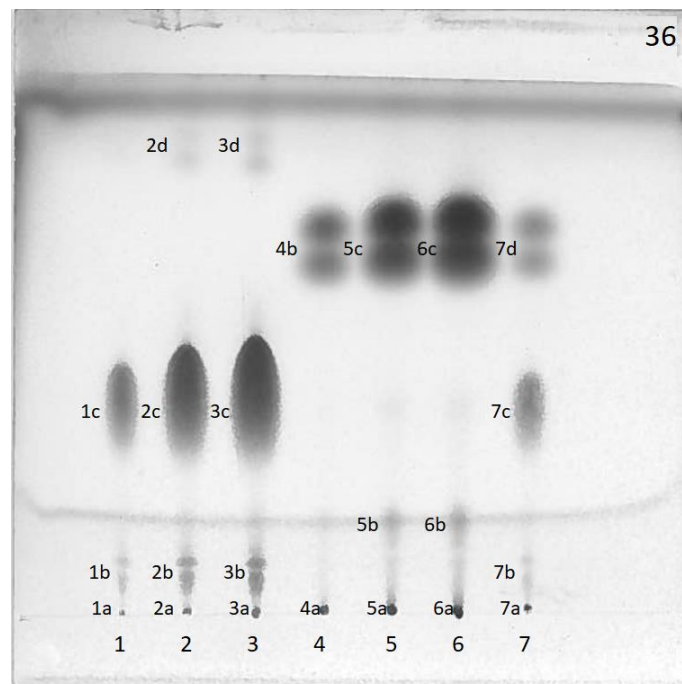


Figur 17. TLC av EE:TAG (1:1) blandet av EEa- og TAGc-prøver fra Nordic Pharma i ulike konsentrasjoner (1,25- 40 mg/ml). Spor 1 (40 mg/ml): 1a = MAG, 1b = DAG, 1c = FFA, 1d = TAG, 1e = EE. Spor 2 (20 mg/ml): 2a = MAG, 2b = DAG, 2c = FFA, 2d = TAG, 2e = EE. Spor 3 (10 mg/ml): 3a = MAG, 3b = DAG, 3c = FFA, 3d = TAG, 3e = EE. Spor 4 (5 mg/ml): 4a = MAG, 4b = DAG, 4c = FFA, 4d = TAG, 4e = EE. Spor 5 (2,5 mg/ml): 5a = MAG, 5b = DAG, 5c = TAG, 5d = EE. Spor 6 (1,25 mg/ml): 6a = MAG, 6b = DAG, 6c = TAG, 6d = EE. Spor 7 (standarder): 7a = MAG, 7b = DAG, 7c = TAG. Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

4.4 Tynnsjikt-kromatografi av EE og TAG (1:1) for deteksjon av FFA.

Formålet med dette forsøket var å identifisere hvilke av prøvene EE og TAG som FFA stammet fra. Dette ble gjort ved å benytte lave og høye konsentrasjoner av de rene prøvene.

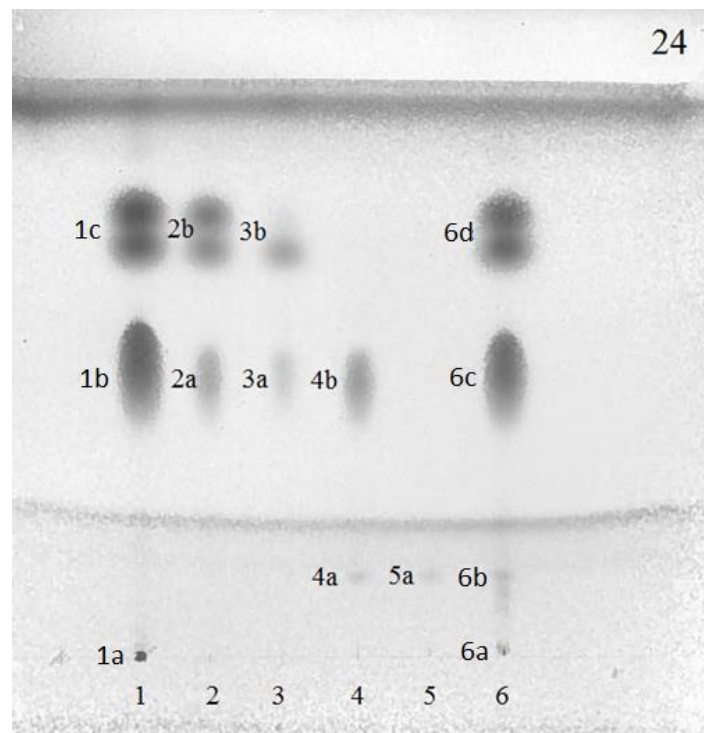
Resultatene i Figur 18 viste at EE-prøven i høye konsentrasjoner inneholdt spor av både FFA og TAG. TAG-prøven i høye konsentrasjoner hadde spor av non-polare forbindelser som kan være kolesterylestere (CE) og i tillegg DAG og MAG.



Figur 18. TLC av EEa:TAGc prøver i ulike konsentrasjoner (10-60 mg/ml). Spor 1 (10 mg/ml): 1a = MAG, 1b = DAG, 1c = TAG. Spor 2 (40 mg/ml): 2a = MAG, 2b = DAG, 2c = TAG, 2d = CE. Spor 3 (60 mg/ml): 3a = MAG, 3b = DAG, 3c = TAG, 3d = CE. Spor 4 (10 mg/ml): 4a = MAG, 4b = EE. Spor 5 (40 mg/ml): 5a = MAG, 5b = FFA, 5c = EE. Spor 6 (60 mg/ml): 6a = MAG, 6b = FFA, 6c = EE. Spor 7 (EEa:TAGc (1:1)): 7a = MAG, 7b = DAG, 7c = TAG, 7d = EE. Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

4.5 SPE Metode 1

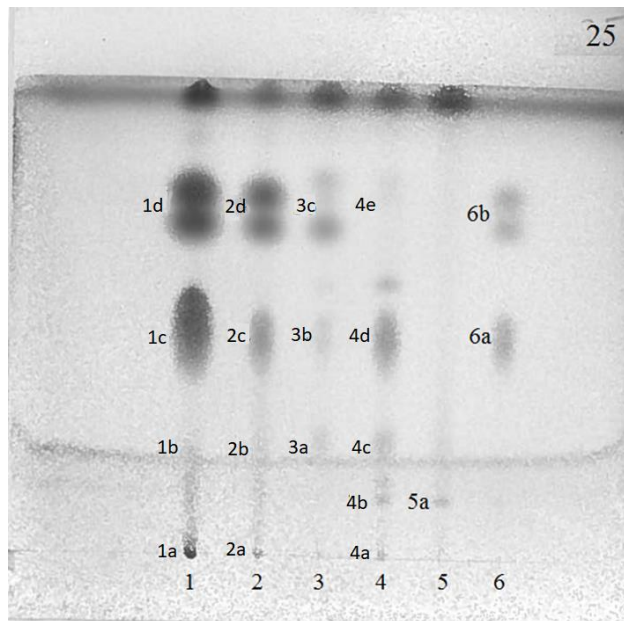
TLC-analyse av fraksjoner samlet opp etter bruk av Metode 1 er vist i Figur 19. Påsatt lipidprøve var EE:TAG (1:1) i konsentrasjon 50 mg/ml. EE og TAG prøvene var nr. 3 (TAGc) og 4 (EEa) fra Nordic Pharma (se Tabell 1). De eluerte fraksjonene var inndampet og løst i 200 µl kloroform.



Figur 19. TLC av fraksjonene fra SPE ved bruk av metode 1. Eluert med: spor 1: Flow through, spor 2: Heptan, spor 3: Heptan:DCM:dietyleter (89:10:1), spor 4: Heptan:etylacetat (85:15), spor 5: Heptan, spor 6: EEa:TAGc prøven påsatt (fortynnet til 10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (1a og 6a), DAG (4a, 5a og 6b), TAG (1b, 2a, 3a, 4b og 6c), og EE (1c, 2b, 3b og 6d). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse i Figur 19 viste at mesteparten av TAG og EE kom ut i flow through. Ved bruk av elueringsmidlene heptan og heptan:DCM:dietyleter så man at mindre mengder EE og TAG ble eluert ut. Ved deretter å bruke heptan:etylacetat ble noe rent TAG med spor av DAG eluert ut. Ved bruk av bare heptan til slutt så man at det kun ble eluert ut spor av DAG.

For å undersøke om påsatt konsentrasjon av TAG:EE overskred kapasiteten til kolonna ble et nytt forsøk gjennomført med å sette på bare 5 mg/ml på kolonna. I dette forsøket ble eluerte fraksjoner inndampet og løst i 50 µl kloroform før TLC-analysen vist i Figur 20.

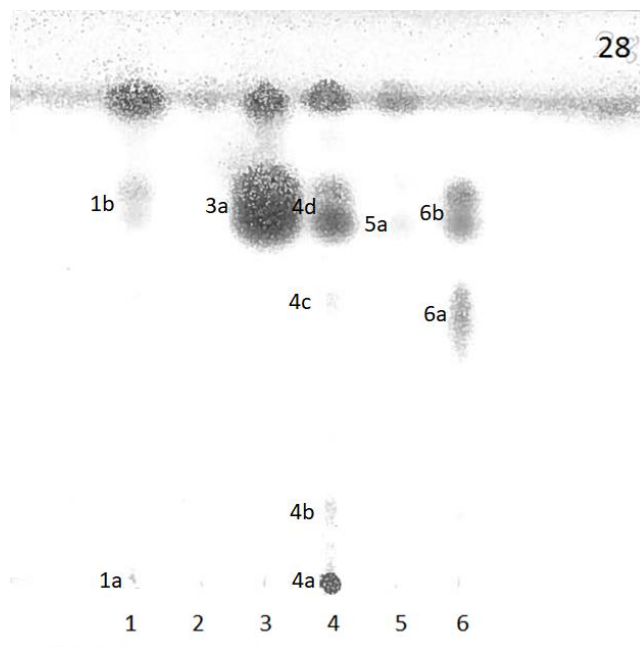


Figur 20. TLC av fraksjonene fra SPE ved bruk av Metode 1 (med 5 mg/ml lipidprøve). Eluert med: spor 1: Flow through, spor 2: Heptan, spor 3: Heptan:DCM:dietyleter (89:10:1), spor 4: Heptan:etylacetat (85:15), spor 5: Heptan, spor 6: EEa:TAGc prøven påsatt (5 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (1a, 2a og 4a), DAG (4b og 5a), FFA (1b, 2b, 3a og 4c), TAG (1c, 2c, 3b, 4d og 6a), og EE (1d, 2d, 3c, 4e og 6b). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15. Umarkerte flekker som ser ut som lipidbånd antas å være forurensinger i prøvene.

Resultatene fra TLC-analyse i Figur 20 viste at også ved lavere konsentrasjon i lipidprøve kom mesteparten av EE og TAG ut i flow through. Ved bruk av elueringsmidlene heptan og heptan:DCM:etylacetat var resultatet tilsynelatende det samme som sett ved bruk av 50 mg/ml lipidløsning. Ved eluering med heptan:etylacetat kom det ut TAG og noe MAG, DAG og FFA. Heptan alene som elueringsmiddel viste at kun spor av DAG kom ut.

4.6 SPE Metode 2

TLC-analyse av fraksjoner samlet opp etter bruk av Metode 2 er vist i Figur 21. Påsatt lipidprøve var EE:TAG (1:1) i konsentrasjon 10 mg/ml. EE og TAG prøvene var nr. 3 (TAGc) og 4 (EEa) fra Nordic Pharma (se Tabell 1).



Figur 21. TLC av fraksjonene fra SPE ved bruk av Metode 2 (med 10 mg/ml lipidprøve). Eluert med: spor 1: Flow through, spor 2: Heptan, spor 3: Heptan, spor 4: Heptan:DCM:dietyler (89:10:1), spor 5: Heptan, spor 6: EEa:TAGc prøven påsatt (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (1a og 4a), DAG (4b), TAG (4c og 6a), og EE (1b, 3a, 4d, 5a og 6b). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

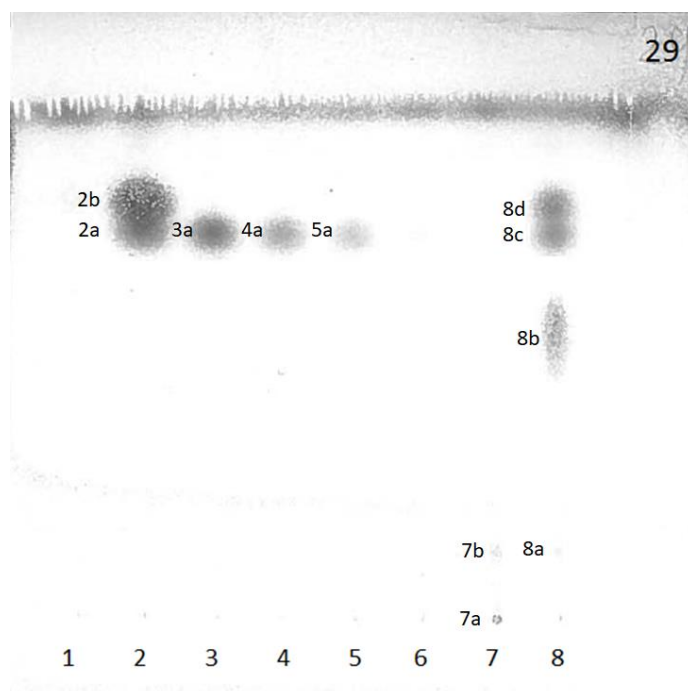
Resultatene fra TLC-analysen viste at litt EE, noe MAG og ingen TAG kom ut i flow through. Ved eluering med heptan så man at ingen lipider kom ut tidlig i elueringen, men videre eluering med heptan eluerte ut mesteparten av EE i en ren prøve. Elueringsmiddelet Heptan:DCM:dietyler eluerte deretter ut tilnærmet den resterende mengde av EE, en høy andel MAG og spor av DAG og TAG. TAG ble imidlertid ikke eluert kvantitativt i dette trinnet. Til slutt ble gjenværende spor av EE eluert ut med heptan. Kontaminering i væskefronten sees i alle spor der materiale eluert fra kolonna er analysert.

For å undersøke hvor mye av elueringsmiddelet heptan som kreves for å eluere ut EE uten å eluere ut MAG og DAG ble det brukt Metode 3 (Bernhardt *et al.*, 1996) som benyttes i neste delkapittel.

4.7 SPE Metode 3

TLC-analyse av fraksjoner samlet opp etter bruk av Metode 3 er vist i Figur 22. Påsatt lipidprøve var EE:TAG (1:1) i konsentrasjon 10 mg/ml. EE og TAG prøvene var nr. 3 (TAGc) og 4 (EEa) fra Nordic Pharma (se Tabell 1).

En total mengde på 15,5 ml heptan (tilnærmet lik mengde heptan brukt til eluering i metode 2) ble underveis i forsøket fraksjonert i små volumer for å detektere hvor høyt volum heptan som førte til eluering av MAG og DAG.



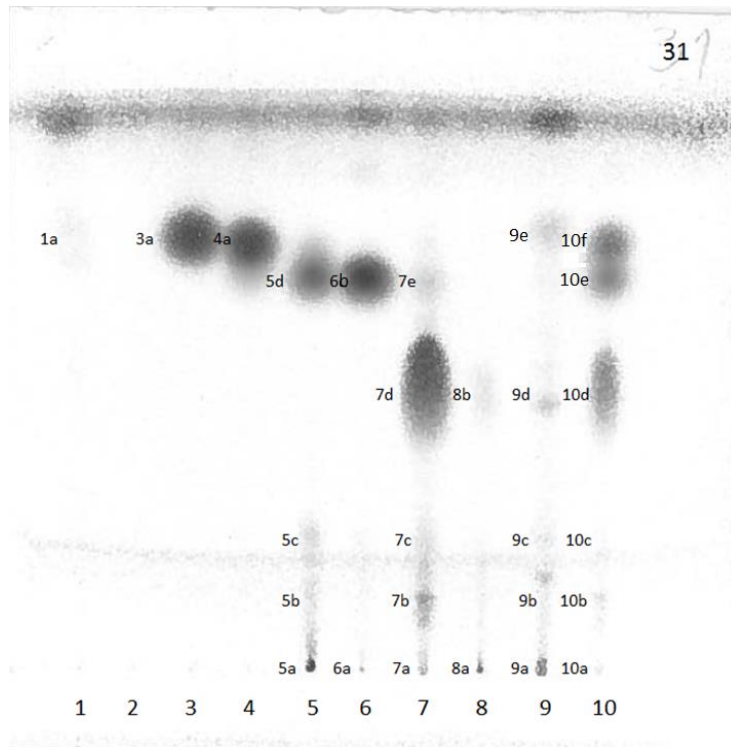
Figur 22. TLC av fraksjonene fra SPE ved bruk av Metode 3 (med 10 mg/ml lipidprøve). Eluert med: spor 1: Flow through, spor 2-7: Heptan, spor 8: EEa:TAGc prøven påsatt (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (7a), DAG (7b og 8a), TAG (8b), EE bånd 1 (2a, 3a, 4a, 5a og 8c) og EE bånd 2 (2b og 8d). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analysen viste at det ikke ble eluert ut lipider i flow through. Alt av EE bånd 2 (EE2) i tillegg til en høy andel EE bånd 1 (EE1) ble eluert ut i de første 8 ml heptan. Med de neste 4,5 ml heptan ble resterende EE1 eluert ut. Spor av MAG og DAG ble eluert ut mellom 14-15,5 ml heptan.

For å undersøke om det var mulig å separere de to heterogene EE-båndene fra hverandre og samtidig eluere ut TAG ble det gjort videre forsøk med Metode 4.

4.8 SPE Metode 4

TLC-analyse av fraksjoner samlet opp etter bruk av Metode 4 er vist i Figur 23. Påsatt lipidprøve var EE:TAG (1:1) i konsentrasjon 10 mg/ml. EE og TAG prøvene var nr. 3 (TAGc) og 4 (EEa) fra Nordic Pharma (se Tabell 1).



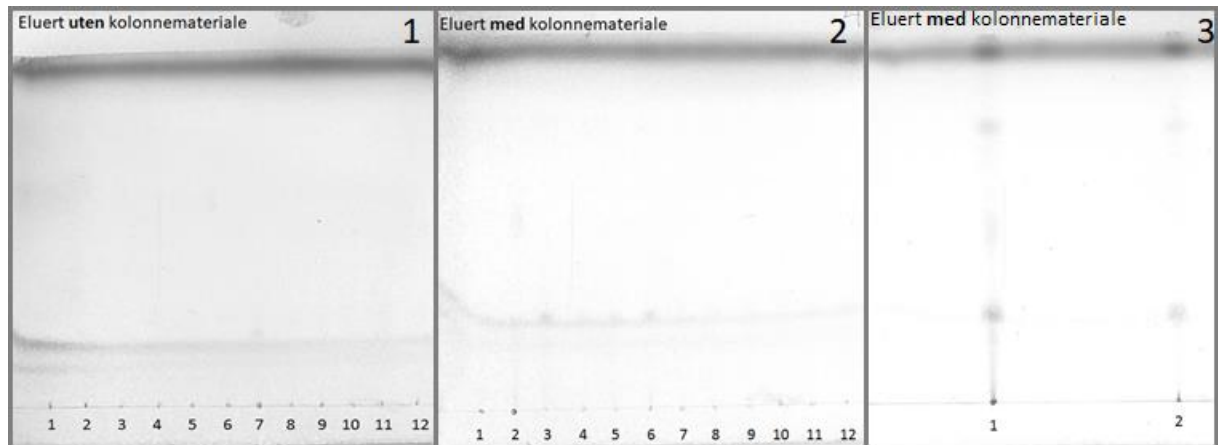
Figur 23. TLC av fraksjonene fra SPE ved bruk av Metode 4 (med 10 mg/ml lipidprøve). Eluert med: spor 1: Flow through, spor 2-6: Heptan, spor 7-8: Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5), spor 9: kloroform:isopropanol (2:1). Spor 10: EEa:TAGc prøven påsatt (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (5a, 6a, 7a, 8a, 9a og 10a), DAG (5b, 7b, 9b og 10b), FFA (5c, 7c, 9c og 10c) TAG (7d, 8b, 9d og 10d), EE bånd 1 (5d, 6b, 7e og 10e) og EE bånd 2 (1a, 3a, 4a, 9e og 10f). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse viste at bare spor av EE2 kom ut i flow through. Ved eluering av de første 6 ml heptan så man at rent EE2 ble eluert ut og med de siste 6,5 ml heptan ble EE1 eluert ut sammen med noe MAG, DAG og FFA. Med de første 6 ml av elueringsmiddelet heptan:kloroform:eddiksyre kom rent TAG med spor av MAG, DAG og FFA. Resultatene viste at de neste 6 ml av dette elueringsmiddelet eluerte ut kun spor av MAG og TAG. Ved bruk av kloroform:isopropanol som elueringsmiddel kom rester av alle fettklassene tilstede i prøven ut.

I et nytt forsøk ble bare en fjerdedel av EE:TAG-konsentrasjonen påsatt kolonna og resultatene viste at utfallet av separeringen ble det samme.

4.9 SPE vaskeforsøk

For å avdekke om det var lipidforurensninger tilstede i SPE-systemet ble det gjort flere vaskeforsøk uten lipidprøve påsatt kolonna. To av forsøkene er illustrert i Figur 24.

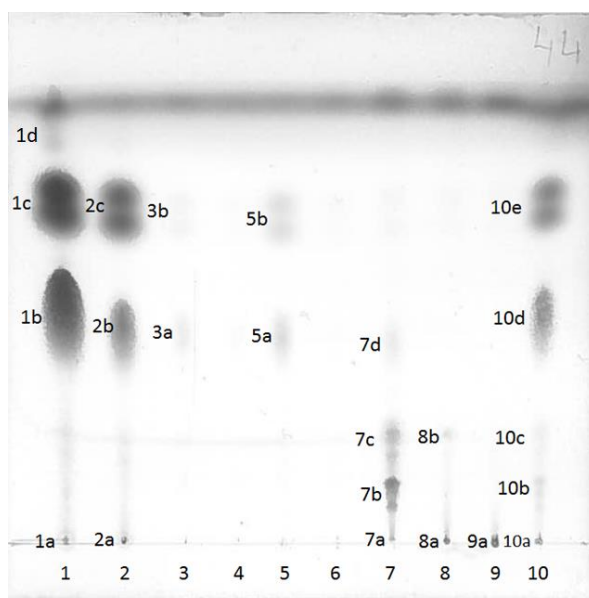


Figur 24. TLC-analyse av fraksjoner fra SPE forsøk eluert uten kolonnemateriale (plate nr. 1) og med kolonnemateriale (plate nr. 2 og 3). Begge forsøk uten lipider påsatt kolonna. De to sistnevnte plater viser forurensningene tilstede i fraksjoner eluert med kolonnemateriale. Plate nr. 1 + 2 ble eluert med: spor 1-6: heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) og spor 7-12: Kloroform:isopropanol (2:1). Plate nr. 3 består av sammenslåtte fraksjoner fra plate nr. 2 som følger: Spor 1: sammenslåtte fraksjoner 1-6, spor 2: sammenslåtte fraksjoner 7-12.

Resultatene i TLC-analyse nr. 2 og 3 viste at det var forurensninger tilstede i fraksjoner eluert med kolonnemateriale, men uten lipidprøve påsatt kolonna. I et identisk gjennomført forsøk, men uten kolonnemateriale (illustrert i TLC-analyse nr 1) viste sporene ingen forurensninger. Det ble videre undersøkt om nye kondisjoneringsmetoder kunne eliminere forurensningene (Metode 5 og 6).

4.10 SPE Metode 5

TLC-analyse av fraksjoner samlet opp etter bruk av Metode 5 er vist i Figur 25. Påsatt lipidprøve var EE:TAG (1:1) i konsentrasjon 10 mg/ml. EE og TAG prøvene var nr. 3 (TAGc) og 4 (EEa) fra Nordic Pharma (se Tabell 1).



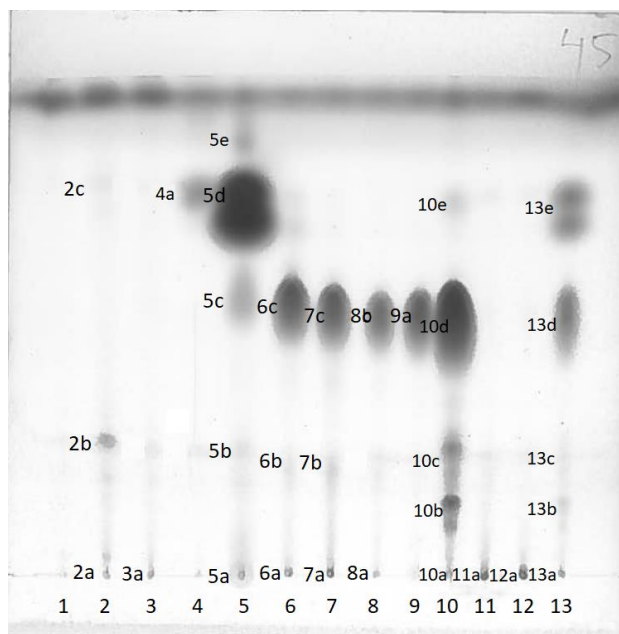
Figur 25. TLC av fraksjonene fra SPE ved bruk av Metode 5 (med 10 mg/ml lipidprøve). Eluert med: spor 1: Flow through, spor 2-6: Heptan, spor 7-8: Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5), spor 9: kloroform:isopropanol (2:1). Spor 10: EEa:TAGc prøven påsatt (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (1a, 2a, 7a, 8a, 9a og 10a), DAG (7b og 10b), FFA (7c, 8b og 10c), TAG (1b, 2b, 3a, 5a, 7d og 10d), EE (1c, 2c, 3b, 5b og 10e) og CE (1d). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse viste at mesteparten av EE og TAG kom ut i flow through og ved eluering av de første 2 ml med heptan. Spor av TAG og EE kom ut i videre eluering med heptan. Ved bruk av elueringsmiddelet heptan:kloroform:eddiksyre ser man at hovedandelen av DAG og FFA kom ut med noe MAG og spor av TAG. Elueringsmiddelet Kloroform:isopropanol eluerte ut resterende andel av MAG.

For å undersøke om et ekstra trinn i kondisjoneringen av kolonnematerialet kunne forbedre separeringen av lipider ytterligere ble det laget en Metode 6.

4.11 SPE Metode 6

TLC-analyse av fraksjoner samlet opp etter bruk av metode 6 er vist i Figur 26. Påsatt lipidprøve var EE:TAG (1:1) i konsentrasjon 10 mg/ml. EE og TAG prøvene var nr. 3 (TAGc) og 4 (EEa) fra Nordic Pharma (se Tabell 1).



Figur 26. TLC av fraksjonene fra SPE ved bruk av metode 6 (med 10 mg/ml lipidprøve). Kondisjonert med: spor 1: heptan, spor 2: Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) og spor 3: kloroform:isopropanol (2:1). Eluert med: spor 4: Flow through, spor 5-9: Heptan, spor 10-11: Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5), spor 12: kloroform:isopropanol (2:1), spor 13: EEa:TAGc prøven påsatt (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (2a, 3a, 5a, 6a, 7a, 8a, 10a, 11a, 12a og 13a), DAG (10b og 13b), FFA (2b, 5b, 6b, 7b, 10c og 13c), TAG (5c, 6c, 7c, 8b, 9a, 10d og 13d), EE (2c, 4a, 5d, 10e og 13e) og CE (5e). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse viste at kondisjoneringen med heptan, heptan:kloroform:eddiksyre og kloroform:isopropanol eluerte ut komponenter fra kolonnematerialet. Man så at bare spor av EE2 kom ut i flow through. Mesteparten av EE ble eluert ut med de første 2 ml heptan i tillegg til spor av TAG. Videre ble det med heptan eluert ut store deler TAG med spor av MAG og FFA. Med heptan:kloroform:eddiksyre som elueringsmiddel så man at en stor andel TAG, FFA og DAG kom ut i tillegg til spor av MAG. Det kom videre ut spor av MAG i Kloroform:isopropanol-eluatene.

Konklusjonen på utprøvingen av SPE-metodene 1-6 ble at Metode 4 var best egnet til å separere EE og TAG fra en blanding. Begge disse klassene, og spesielt TAG, var imidlertid forurenset av spormengder andre lipidklasser som med f.eks MAG og DAG. For å fjerne disse ble Metode 4 kombinert med Metode 5 og 6 ved fraksjonering av TAG under transesterifisering.

4.12 Fettsyresammensetning i separerte EE-bånd og TAG

Fettsyreanalyse av EE- og TAG-fraksjoner samlet opp etter bruk av Metode 4 er vist i Tabell 4. Påsatt lipidprøve var EE:TAG (1:1) i konsentrasjon 10 mg/ml. EE og TAG prøvene var nr. 3 (TAGc) og nr. 4 (EEa) fra Nordic Pharma (se Tabell 1, side 15).

Tabell 4. Identifiserte fettsyrer i separerte EE bånd (EE1; 6b og EE2; 3a) og TAG (7d) med SPE Metode 4 (Se Figur 23). I tillegg er TAG prøve nr 3 (TAGc) og EE prøve nr 4 (EEa) fra Nordic Pharma analysert. n.d = ikke påvist. Hver prøve ble analysert tre ganger og verdiene er et gjennomsnitt.

fettsyre	Arealprosent				
	EE 1- SPE	EE 2-SPE	TAG-SPE	EEa	TAGc
14:0	n.d	n.d	6,3	n.d	7,1
16:0	1,5	24,6	21,7	8,1	19,0
16:1 n-7	n.d	2,7	7,9	2,4	8,5
16:2 n-4	n.d	n.d	1,2	n.d	1,2
16:3 n-4	n.d	n.d	1,2	n.d	1,3
18:0	1,7	26,8	6,2	8,1	4,1
18:1 n-7	n.d	8,2	2,9	5,7	10,9
18:1 n-9	n.d	22,4	10,3	16,5	n.d
18:1 n-12	1,2	n.d	n.d	n.d	n.d
18:2 n-6	n.d	0,8	1,4	2,3	3,1
18:3 n-3	1,0	2,8	0,9	1,6	1,0
18:4 n-3	6,9	n.d	2,4	4,9	2,7
20:1 n-9	n.d	3,6	1,7	n.d	1,8
20:4 n-6	1,4	0,7	1,2	2,0	1,3
20:5 n-3	59,0	n.d	14,9	30,0	16,4
22:1 n-9	1,4	n.d	n.d	1,5	0,9
22:1 n-11	n.d	n.d	2,0	0,8	2,0
22:5 n-3	2,9	n.d	2,0	1,4	2,2
22:6 n-3	20,1	n.d	11,0	9,2	11,7
24:1 n-9	n.d	n.d	n.d	n.d	0,8
Totalt identifisert	97,1	92,6	95,2	94,5	96,0

Resultatene fra GC-analysene viste at EE 1, som eluerte sist av de to EE-variantene fra SPE-kolonna, hadde et svært høyt innhold langkjedede omega-3 fettsyrer (EPA, docosapentaensyre (DPA;22:5n-3) og DHA) på hele 82 %. I tillegg inneholdt det 6,9 % stearidonsyre (18:4n-3). Det EE båndet som elueres først (EE 2) inneholdt ikke langkjedede omega-3 fettsyrer, men mye mettede (51,4 %) og enumettede fettsyrer (36,9 %). Den isolerte TAG prøven (TAG-SPE) inneholdt 14,9 % EPA og 11 % DHA. TAGc hadde 16,4 % EPA og 11,7 % DHA mens de tilsvarende verdiene for EEa prøven var 30 og 9,2 %.

4.13 EPA- og DHA-innhold i produkter målt ved NFH og ved Nordic Pharma

Hensikten med forsøket var å sammenligne analyse av EPA- og DHA-innhold hos de samme prøvene ved Norges fiskerihøgskole (NFH) og ved Nordic Pharma (Tabell 5). Prøvene som ble analysert var metylert prøve nr. 5 (rTAGd) og nr. 6 (TAGe) fra Nordic Pharma (se Tabell 1, side 15).

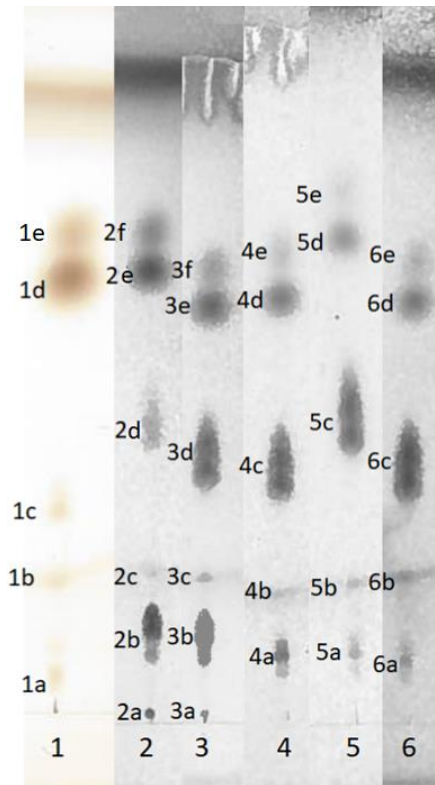
Tabell 5. Oversikt over arealprosenten til EPA og DHA i TAG-prøver analysert på NFH og Nordic Pharma.

fettsyre	Arealprosent NFH (gjennomsnitt av 3 paralleller)		Arealprosent Nordic Pharma	
	rTAGd 3525	TAGe 1812	rTAGd 3525	TAGe 1812
EPA	34,0	19,1	34,1	19,8
DHA	25,7	12,7	25,3	12,6
EPA:DHA	1,32	1,51	1,35	1,68

Resultatene fra GC-analyse viste at EPA- og DHA-verdiene målt ved NFH og ved Nordic Pharma samsvarte godt for begge prøvene TAGe 1812 og rTAGd 3525.

4.14 TLC av prøver under transesterifiseringstrinnet

TLC-analyse av prøver tatt ut fra TAG-reaktor i trinn 4 under transesterifiseringen (se flytskjema i Figur 2, side 3 i Innledningen) er vist i Figur 27. Prøvene 1-6, henholdsvis uttak fra 0, 12, 24, 36, 48 og 55 timer etter start av transesterifiseringen, var fra Nordic Pharma.



Figur 27. TLC av prøver tatt ut etter henholdsvis 0, 12, 24, 36, 48 og 55 t etter start av transesterifisering (trinn 4, Figur 2, side 3). Spor 1 (0 t): 1a = DAG?, 1b = FFA, 1c = TAG, 1d = EE1, 1e = EE2. Spor 2 (12 t): 2a = MAG, 2b = DAG, 2c = FFA, 2d = TAG, 2e = EE1, 2f = EE2. Spor 3 (24 t): 3a = MAG, 3b = DAG, 3c = FFA, 3d = TAG, 3e = EE1, 3f = EE2. Spor 4 (36 t): 4a = DAG, 4b = FFA, 4c = TAG, 4d = EE1, 4e = EE2. Spor 5 (48 t): 5a = DAG, 5b = FFA, 5c = TAG, 5d = EE1, 5e = EE2. Spor 6 (55 t): 6a = DAG, 6b = FFA, 6c = TAG, 6d = EE1, 6e = EE2. Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse viste at prøven fra uttak ved start (0 t) i hovedsak inneholdt EE og bare veldig små mengder av DAG, FFA og TAG (spor 1). I prøven 12 timer etter start så man at det var mye EE og DAG, en del MAG og litt FFA (spor 2). Mengde TAG hadde økt fra forrige prøve. Resultatene fra uttak 24 timer etter start (spor 3) viste at andelen EE og DAG fortsatt var høy, men i denne prøven var det også mye TAG tilstede. I prøven 36 timer etter start var det mye TAG, noe EE og DAG og spor av FFA. Resultater fra uttak av TAG-reaktor 48 og 55 timer etter start viste at hovedandelen av lipider i prøven var TAG med spor av EE, DAG og FFA.

4.15 HPLC av prøver under transesterifiseringstrinnet

HPLC-analyse av prøver tatt ut fra TAG-reaktor i trinn 4 under prosessering av fiskeolje (se flytskjema i Figur 2) er gitt i Tabell 6. Prøvene 1-6 (henholdsvis uttak fra 0 t, 12 t, 24 t, 36 t, 48 t og 55 t etter start) var fra Nordic Pharma.

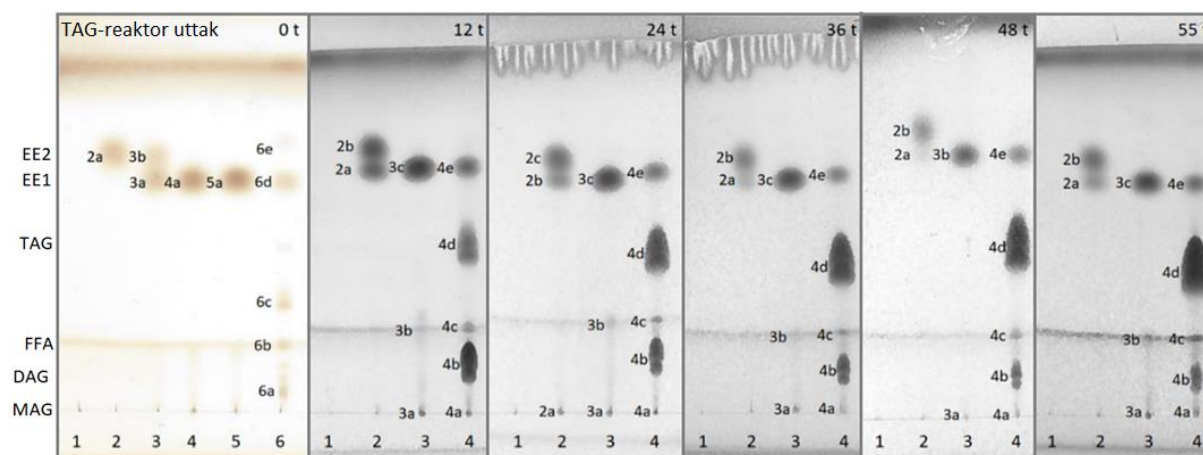
Tabell 6. Fettklassesammensetning (arealprosent) i prøvene 1-6 (0-55 t).

Tid fra start (timer)	0	12	24	36	48	55
TAG (arealprosent)	4,4	12,0	47,8	65,4	73,7	77,1
DAG (arealprosent)	2,8	46,1	25,6	13,8	8,3	6,0
MAG (arealprosent)	0,9	1,7	0,5	0,4	0,0	0,2
EE (arealprosent)	91,8	40,2	26,1	20,4	18,0	16,7

Resultatene fra HPLC-analyse viste at fettklassesammensetningen endret seg over tid gjennom transesterifiseringsprosessen. Ved start så man at 91,8 % av innholdet var EE. Utover i prosessen sank prosentandel EE i avtagende rate til 1,7 % etter 55 timer. TAG-innholdet var ved start 4,4 % og økte til 12 % i løpet av de 12 første timene. Videre viste resultatene at innholdet økte raskt til 47,8 % 24 timer etter start. Ved 55 timer etter start var innholdet av TAG 77,1 %. Man så at DAG-innholdet økte kraftig de 12 første timene fra 2,8 til 46,1 %, men sank videre til 6 % ved 55 timer etter start. Resultatene viste at innholdet av MAG var lavt ved alle prøveuttak med den høyeste målte verdien på 1,7 % 12 timer etter start.

4.16 SPE av prøver under transesterifiseringstrinnet

TLC-analyse av prøver separert med forkortede versjoner av Metode 4 er vist i Figur 28. Lipidprøver påsatt kolonna ble tatt ut fra TAG-reaktor i trinn 4 under prosessering av fiskeolje (se flytskjema i Figur 2, side 3) ved tidspunktene 0 t, 12 t, 24 t, 36 t, 48 t og 55 t etter start. Prøvene var fra Nordic Pharma.



Figur 28. TLC av prøvene 0 til 55 t fraksjonert med SPE Metode 4 (med 10 mg/ml lipidprøve). Uttak 0 t etter start ble eluert med: spor 1: flow through, spor 2: 2 ml heptan, spor 3: 4 ml heptan, spor 4: 2 ml heptan, spor 5: 4,5 ml heptan og spor 6: 12 ml heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5). For uttak 12 til 55 t etter start ble spor 2 + 3 + 4 slått sammen til et nytt spor 2. Spor 5 og 6 ble derfor til nye spor 3 og 4 henholdsvis. Vandrelengden til de ulike lipidklassene MAG, DAG, FFA, TAG og EE (bånd 1: EE1 og bånd 2: EE2) er illustrert til venstre i figuren. Avvik fra normal vandrelengde: ved 0 t: 6c = TAG, ved 48 t: 2a + 3b + 4e = EE1, 2b = EE2. Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

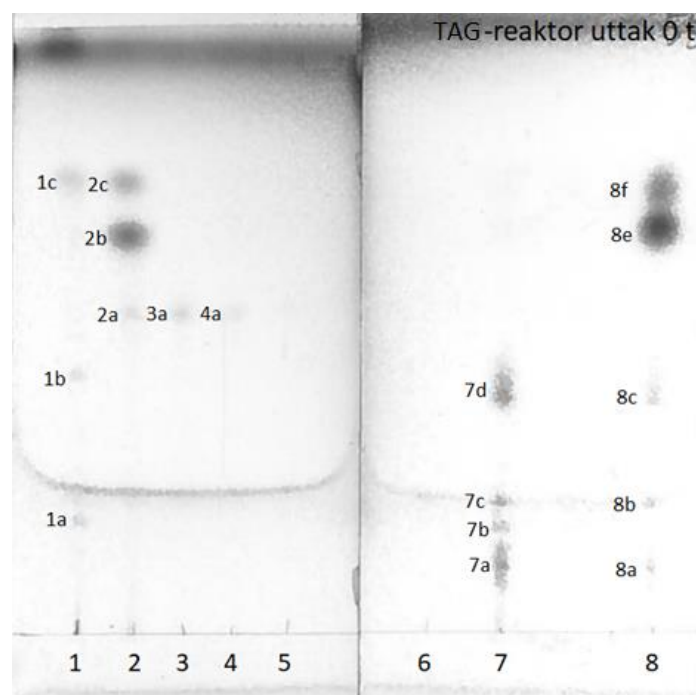
Resultatene fra TLC-analyse viste at store deler av EE kom ut med elueringsmiddelet heptan i tillegg til veldig små mengder av MAG og FFA (uttak 0 t; spor 2-5, uttak 12-55 t; spor 2 + 3). TAG og DAG, i tillegg til litt FFA og MAG, kom ut med elueringsmiddelet heptan:kloroform:eddiksyre (uttak 0 t; spor 6, uttak 12-55 t; spor 4).

EE fraksjoner 2, 3, 4 og 5 fra 0 t og de to EE fraksjonene 2 og 3 i hver prøve fra 12 t til 55 t ble slått sammen og innhold av EPA og DHA ble bestemt (se analyserte prøver i 4.19). TAG fraksjonen (fraksjon 6 fra 0 t og fraksjon 4 fra 12 til 55 t) ble videre isolert på nytt ved å bruke SPE Metode 5 og 6 for å fjerne EE, DAG, MAG og FFA forurensinger.

4.17 Rensing av TAG fraksjon fra uttak 0 timer

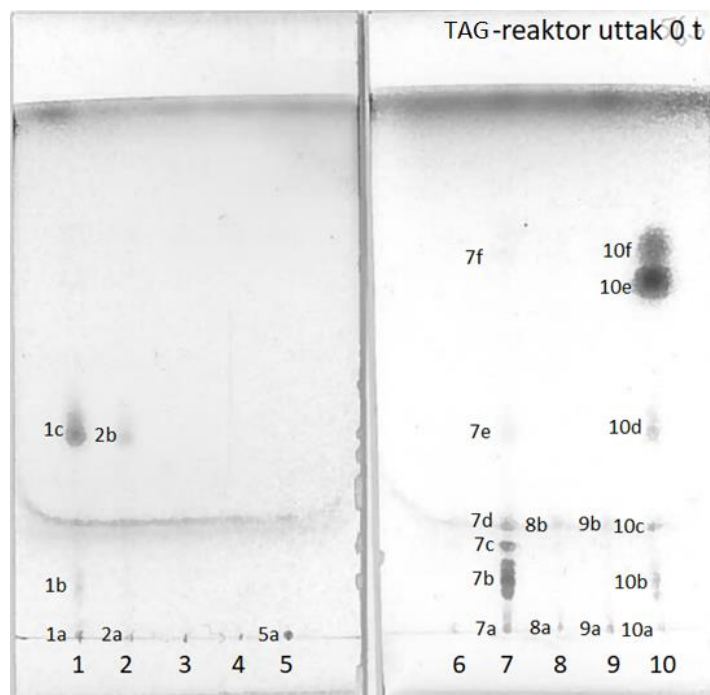
For å rense TAG fraksjonen analysert i spor 6 fra uttak 0 t i Figur 28 ble først Metode 6 (Figur 29) og så Metode 5 (Figur 30) benyttet. Lipidprøve påsatt kolonna ble tatt ut fra TAG-reaktor i trinn 4 under prosessering av fiskeolje 0 timer etter start (se flytskjema i Figur 2, side 3) og deretter fraksjonert med Metode 4.

SPE Metode 6 ble brukt for å fjerne rester av EE i prøven. Resultatene fra TLC-analyse viste at EE ble eluert ut i flow through (spor 1) og den første heptanfraksjonen (spor 2) sammen med små mengder DAG og TAG. Man kan se at majoriteten av TAG og DAG kom ut med elueringsmiddelet heptan:kloroform:eddiksyre i spor 7.



Figur 29. TLC av TAG-fraksjonen fra prøve 0 t (spor 6, Figur 28) løst i 400 μ l heptan, fraksjonert med SPE Metode 6, inndampet og løst i 50 μ l DCM. Kun elueringstrinn 1-6 i metoden ble benyttet. Eluert med: spor 1: flow through, spor 2-5: 2 ml heptan, spor 6: 4,5 ml heptan, spor 7: 6 ml heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5) og spor 8: ufraksjonert prøve 0 t (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som DAG (1a?, 7a, 7b? og 8a), FFA (7c og 8b), TAG (1b, 2a?, 3a?, 4a?, 7d og 8c), EE1 (2b og 8e) og EE2 (1c, 2c og 8f). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

TAG fraksjonen, spor 7 fra 0 t timer ble videre renset ved å bruke SPE Metode 5 for å fjerne DAG, MAG og FFA forurensinger (Figur 30).



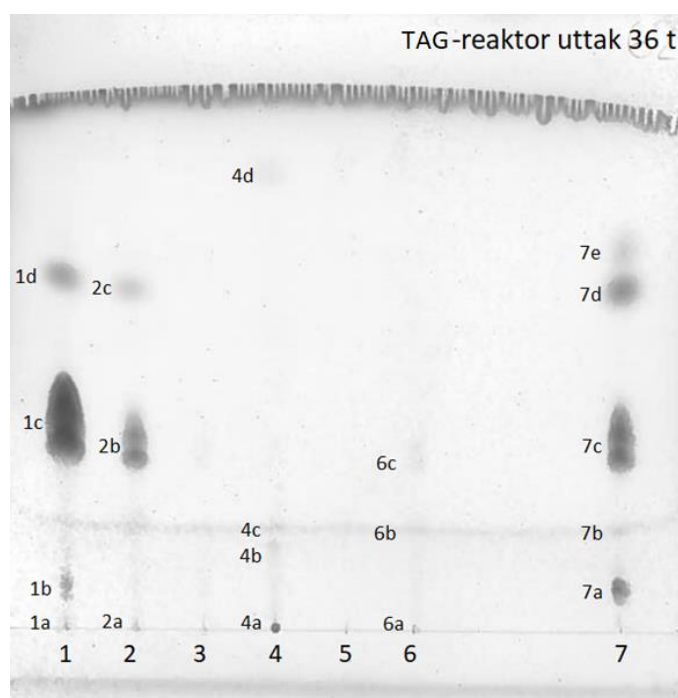
Figur 30. TLC av TAG-fraksjon fra prøve 0 t (Spor 7, Figur 29) løst i 400 μ l heptan, fraksjonert med SPE Metode 5, inndampet og løst i 50 μ l DCM. Fraksjonene ble eluert med: spor 1: Flow through, spor 2-5: 2 ml Heptan, Spor 6: 4,5 ml heptan, spor 7-8: 6 ml Heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5), spor 9: 10 ml kloroform:isopropanol (2:1) og spor 10: ufaksjonert prøve 0 t (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (1a, 2a, 5a, 7a, 8a, 9a og 10a), DAG (1b, 7b, 7c? og 10b), FFA (7d, 8b, 9b og 10c), TAG (1c, 2b, 7e og 10d), EE1 (10e) og EE2 (7f og 10f). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse (Figur 30) viste at TAG, i tillegg til litt MAG og DAG, ble eluert ut i flow through (spor 1) og den første heptanfraksjonen (spor 2). DAG, FFA, små mengder MAG og spor av TAG og EE kom ut med elueringsmiddelet Heptan:kloroform:eddiksyre. (spor 7 og 8). Videre kan man se at rester av MAG og FFA kom ut med elueringsmiddelet kloroform:isopropanol.

TAG-fraksjoner 1 og 2 ble slått sammen og innhold av EPA og DHA ble bestemt (se analyserte prøver i 4.19).

4.18 Rensing av TAG fraksjon fra uttak 12 til 55 timer

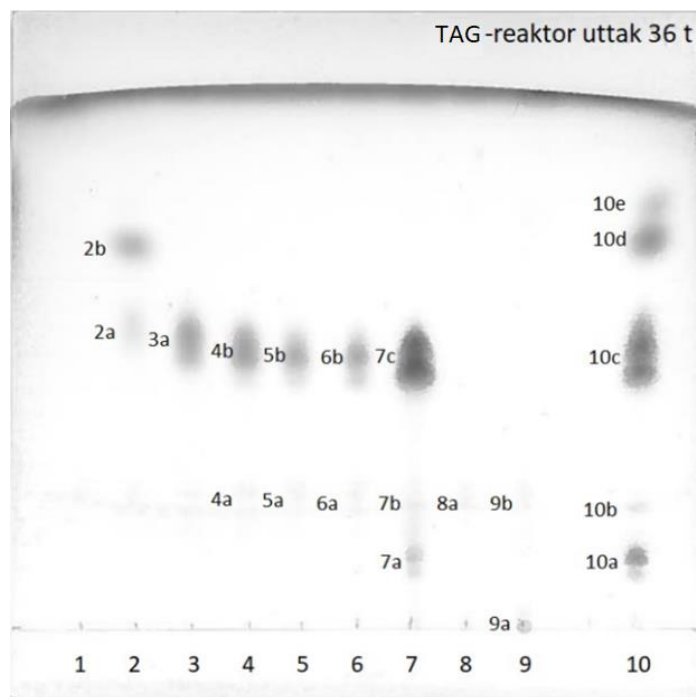
For å rense TAG fraksjon analysert i spor 4 i Figur 28 fra uttak 12 til 55 t ble først Metode 5 (Figur 31) og så Metode 6 (Figur 32) benyttet. Lipidprøve påsatt kolonna ble tatt ut fra TAG-reaktor i trinn 4 under prosessering av fiskeolje ved tidspunktene 12, 24, 36, 48 og 55 timer etter start (se flytskjema i Figur 2, side 3).



Figur 31. TLC av TAG-fraksjonen fra prøvene 12 til 55 t (spor 4, Figur 28) løst i 400 µl heptan, fraksjonert med SPE Metode 5, inndampet og løst i 50 µl DCM. Kun elueringsmidler 1-5 ble benyttet. Fraksjonene ble eluert med: spor 1: Flow through, spor 2-5: 2 ml heptan, spor 6: 4,5 ml heptan, spor 7: ufraksjonert prøve (12, 24, 36, 48 eller 55 t) (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (1a, 2a, 4a og 6a), DAG (1b og 7a), FFA (4c, 4b?, 6b og 7b), TAG (1c, 2b, 6c og 7c), EE1 (1d, 2c og 7d), EE2 (7e) og CE (4d). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse i Figur 31 viste at heptan eluerte ut TAG i de to første fraksjonene sammen med litt DAG og kun små mengder MAG og FFA (spor 1 + 2). Man så at heptan videre eluerte ut små mengder MAG, DAG, FFA og TAG (Spor 4 og 6). Resterende MAG, DAG og FFA ble ikke eluert ut av kolonna grunnet at elueringsmidlene Heptan:kloroform:eddiksyre og kloroform:isopropanol ikke ble benyttet.

TAG fraksjonene, spor 1 og 2 fra 12 til 55 timer ble videre renset ved å bruke SPE Metode 6 for å fjerne EE forurensinger.



Figur 32. TLC av TAG-fraksjon fra prøvene 12 til 55 t (Spor 1 + 2, Figur 31) løst i 400 μ l heptan, fraksjonert med SPE Metode 6, inndampet og løst i 50 μ l DCM. Eluert med: spor 1: flow through, spor 2-5: 2 ml heptan, spor 6: 4,5 ml heptan, spor 7-8: 6 ml heptan:kloroform:eddiksyre (100:5:5), spor 9: 10 ml kloroform:isopropanol (2:1) og spor 10: ufraksjonert prøve (12, 24, 36, 48 eller 55 t) (10 mg/ml). Prøvene på plata er identifiserte som MAG (9a), DAG (7a og 10a), FFA (4a, 5a, 6a, 7b, 8a, 9b og 10b), TAG (2a, 3a, 4b, 5b, 6b, 7c og 10c), EE1 (2b og 10d) og EE2 (10e). Identifisering av prøvene ble gjort på basis av resultatene i Figur 15.

Resultatene fra TLC-analyse i Figur 32 viste at EE, i tillegg til litt TAG, kom ut i første heptanfraksjon (spor 2). Man så videre at TAG og litt DAG og FFA ble eluert med heptan og heptan:kloroform:isopropanol (spor 3-6 og 7 henholdsvis).

TAG-fraksjoner 3-7 i hver prøve fra 12 t til 55 t ble slått sammen og innhold av EPA og DHA ble bestemt (se analyserte prøver i 4.19).

4.19 EPA og DHA i EE og TAG under transesterifiseringstrinnet

Innhold av fettsyrene EPA og DHA i EE og TAG fra prøver separert med Metode 4, 5 og 6 er vist i Tabell 7. Prøvene ble tatt ut fra TAG-reaktor i trinn 4 under prosessering av fiskeolje ved tidspunktene 0 t, 12 t, 24 t, 36 t, 48 t og 55 t etter start av transesterifiseringen hos Nordic Pharma (se flytskjema i Figur 2, side 3).

Tabell 7. Innhold av EPA og DHA i isolert EE og TAG under transesterifisering (0 til 55 t) ved Nordic Pharma.

Tid fra start (timer)	0	12	24	36	48	55
DHA, EE (arealprosent)	21,5	20,2	18,4	22,8	21,4	21,0
EPA, EE (arealprosent)	31,1	30,1	25,3	29,0	30,4	27,9
DHA, TAG (arealprosent)	24,9	10,7	19,6	22,2	22,6	22,7
EPA, TAG (arealprosent)	4,3	16,1	33,4	32,2	31,0	30,7

Resultatene fra GC-analyse viste at EPA-innholdet i TAG økte raskt de 24 første timene av prosessen fra 4,3 % til 33,4 %. Fra dette tidspunktet sank EPA-innholdet til 30,7 % ved 55 timer etter start. Man så at DHA-innholdet i TAG sank fra 24,9 % til 10,7 % de 12 første timene etter start, mens det videre økte til 22,7 % ved 55 timer. EPA-innholdet i EE sank fra 31,1 % til 25,3 % de første 24 timene og økte videre til 27,9 % ved 55 timer. Det fremstår videre at DHA-innholdet i EE sank fra 21,5 % til 18,4 % de 24 første timene, økte til 22,8 % etter 36 timer og sank til en sluttverdi på 21 % ved 55 timer.

5 Diskusjon

For å undersøke lipidklassesammensetningen i lipidprøver kvalitativt ble det brukt en etablert TLC-metode som egner seg for analyse av nøytrale og seminøytrale lipider. TLC-plata med analysestandarder opparbeidet med metoden illustrerer at den mobile fasen (løpemiddelet) brukt under analysen separerer nøytrale lipider godt (Figur 15, side 24). De ulike lipidklassene har betydelig differanse i grad av interaksjon med stasjonær eller mobil fase, og dermed betydelig differanse i vandrethastighet. Dette gjør at avstanden mellom hver av lipidbåndene fra en prøve er stor nok til å gi et tydelig resultat og klassene er lette å identifisere. Det ser imidlertid ut som det er noe FFA tilstede i EE-standardene i spor 6. Den gode separeringen gjenspeiles i analyser utført med ulike mengdeforhold av EE og DAG i lipidprøvene samt analyser med EE og DAG både i lave og høye konsentrasjoner. Det at metoden gir gode resultater både ved høye og lave konsentrasjoner gjør at den er relativt sensitiv. I en sammensatt lipidprøve med høyt innhold av en lipidklasse og lavt innhold av en annen vil begge kunne detekteres. Dette ble vist ved at det eksempelvis ble identifisert små mengder FFA i prøver ved bruk av TLC-analyse.

Lipidklassestandardene som ble benyttet inneholdt en eller flere identiske fettsyrer, oftest oljesyre, og dette gjør at framkalte standardflekker er ganske skarpe. Industrielt produserte EE og TAG fra Nordic Pharma inneholdt imidlertid både mettede og umettede fettsyrer og etter framkalling var flekken derfor ganske langstrakt med to nesten adskilte bånd (Figur 16, side 25). I lipidklassen EE var det to distinkte bånd som kan tyde på at fettsyresammensetning er ganske forskjellig i disse to EE.

De industrielt produserte EE- og TAG-prøvene fra Nordic Pharma inneholdt små mengder andre lipidklasser også. Ved å analysere høye konsentrasjoner kom det frem at TAG-prøvene inneholdt både MAG, DAG og CE, men ikke EE. EE-prøven inneholdt spormengder av MAG, FFA og TAG (Figur 27, side 27).

Separasjon av lipidklasser i fraksjoner ble gjort med 6 ulike SPE-metoder. Den første (Metode 1) bestod av trinnene IV, V og VII i metoden beskrevet av Vang *et al.* (2013), modifisert fra Vaghela & Kilara (1995). Denne var dårlig egnet til å separere EE fra TAG. Dette kan ha med at metoden opprinnelig ble brukt til å separere lipidklasser i olje fra hoppekrepsen *Calanus finmarchicus*, som har et lipidinnhold med mye voksester (Vang *et al.*, 2013). Voksester er, i likhet med EE, et nøytralt lipid og en skulle trodd at separeringen av EE fra TAG og WE fra TAG ville bli noe lik, men det ble den ikke. Årsaken er antakelig lengden på alkoholen. I voks fra *C. finmarchicus* dominerer langkjedede alkoholer med 20 og 22 karbonatomer (Pedersen *et al.*, 2014) som gjør den mer non-polar enn en fettsyreetylster.

Lavere konsentrasjon i lipidprøven gav heller ingen forbedringer av resultatet, men det ble i dette forsøket observert lipidlignende flekker, blant annet langs løsemiddelfronten (Figur 20, side 29), som ikke var identifiserbare med vandrelengder i TLC-analysestandard. Disse ble antatt å være forurensinger i SPE-systemet, og ble etter en rekke elueringsforsøk uten påsatt lipidprøve, identifisert som komponenter fra kolonnematerialet (Figur 24, side 33).

Den andre SPE-metoden (Metode 2) er en kombinasjon av metodene beskrevet av Bernhardt *et al.* (1996) og av Vang *et al.* (2013). Metoden til Bernhardt *et al.* (1996) skal eluere ut EE ved å bruke heksan mens FFA og TAG ikke elueres ut. Dette skjedde i mitt forsøk ved bruk av heptan også, men TAG ble ikke eluert ut med heptan:DCM:dietyler (89:10:1) som beskrevet av Vang *et al.* (2013). Det er vanskelig å forklare hvorfor dette ikke skjer (Figur 21, side 30).

Den tredje SPE-metoden (Metode 3) var basert på Bernhardt *et al.* (1996) der hele 15,5 ml heptan ble brukt og eluatene ble samlet opp i 7 fraksjoner. Resultatene viste at de to EE-båndene tilstede i prøven ble eluert delvis i forskjellige fraksjoner (Figur 22, side 31). Den første fraksjonen som ble samlet opp var på hele 8 ml. Det var derfor naturlig å samle opp mindre fraksjoner i starten av elueringen for å se om de to EE-båndene kunne separeres fullstendig.

Den fjerde SPE-metoden (Metode 4) kombinerte to metoder. Ved eluering med heptan, fra metoden til Bernhardt *et al.* (1996), ble flere små fraksjoner samlet opp i begynnelsen og EE-båndene ble nesten fullstendig fraksjonert. Det mest hydrofobe båndet (EE2) kom først mens EE1 ble eluert i senere heptanfraksjoner (spor 3-6, Figur 23, side 32). TAG ble deretter eluert ved å bruke heptan:kloroform:eddiksyre etter metoden til Flurkey (2005) (spor 7). Det ble senere analysert fettsyresammensetning av EE-prøvene analysert i spor 3a og 6b og TAG-prøven (Tabell 4, side 36). DAG kom ut i TAG-fraksjonen, noe det ikke hadde gjort i resultatene til Flurkey (2005). Det ble brukt en annen kondisjonering enn det som var beskrevet, noe som kan ha innvirkning på fraksjoneringen.

Den femte SPE-metoden (Metode 5) er en variant av Metode 4, men i stedet for bare å kondisjonere med heptan ble to ekstra kondisjoneringstrinn med Heptan:kloroform:eddiksyre og Kloroform:isopropanol brukt i tillegg. Dette gjorde at heptan eluerte ut EE og TAG samtidig (Figur 25, side 34). Mesteparten av DAG og FFA ble separert i en egen fraksjon eluert med Heptan:kloroform:eddiksyre.

Den sjette SPE-metoden (Metode 6) er en variant av Metode 5, men det er lagt til et siste kondisjoneringstrinn med heptan etter de tre øvrige kondisjoneringstrinnene. EE og TAG

ble separert, men noe TAG kom allikevel ut i EE-fraksjonen. MAG, DAG og FFA kom ut i fraksjoner med TAG (Figur 26, side 35).

Fettsyresammensetningen i de to EE-båndene separert med Metode 4 (Tabell 4, side 36) var utpreget forskjellige. Det var en høy andel EPA (59 %) og DHA (20,1 %) tilstede i EE-varianten eluert ut sist (EE 1). I den andre varianten eluert ut først (EE 2) var det en høy andel mettede og enumettede fettsyrer, men det ble verken detektert EPA eller DHA. Det høye innholdet av mettede og enumettede FA betyr at EE2 har en mer hydrofob karakter mens EE1 er mindre hydrofob på grunn av de flerumettede fettsyrene. Sammenlagt samsvarer EPA- og DHA-innholdet i EE 1 og 2 godt med den rene, ufraksjonerte EE-prøven som hadde 14,9 % EPA og 11 % DHA (med antagelsen om at innholdet av de to EE-variantene var omtrent i forhold 1:1 i prøven). Det kan tyde på Metode 4 ikke diskriminerer EPA og DHA under eluering av EE slik som foreslått i en note bakerst i artikkelen til Bernhardt *et al.* (1996). Fettsyresammensetningen i TAG fraksjonert med Metode 4 hadde bare noe lavere prosentandel EPA og DHA enn den rene, ufraksjonerte TAG-prøven. Sammenligning av EPA- og DHA-innhold i EE- og TAG-prøvene målt ved NFH og ved Nordic Pharma bekreftet at fettsyreanalysene ved de to stedene samsvarte (Tabell 5, side 37)

Lipidklassene i prøver fra ulike tidspunkter under en transesterifiseringsprosess hos bedriften ble analysert med tynnsjikt-kromatografi (Figur 27, side 38). Prøven fra tidspunkt 0 t ble først skannet flere dager etter fremkalling og dessverre forandres og svekkes fargen noe sammenlignet med fremkalte TLC-plater som skannes umiddelbart etter analyse (tidspunkt 12 til 55 timer). Årsaken til at de samme lipidklassene har noe forskjellig vandrelengde i de forskjellige sporene er at prøver fra ulike uttak ble kjørt på ulike plater. Sporene 1-6 i figuren er satt sammen fra 6 ulike TLC-plater. I ettertid ser en klart at de 6 burde ha vært analysert sammen på en plate for bedre å kunne sammenligne. Resultatene fra tidsserien er imidlertid ganske tydelig. Mengden EE blir redusert utover i prosessen mens den relative mengden TAG øker. Samtidig så man relativt store mengder DAG og MAG i løpet av det første døgnet. Deretter reduseres innholdet, noe som kanskje kan tyde på at tilgjengeligheten av EE blir lavere utover i prosessen. Det samme mønsteret i forandringene av lipidklassene under transesterifiseringen ble observert ved HPLC-analyse av uttakene fra tidspunkt 0 til 55 timer etter start under transesterifiseringsprosessen (Tabell 6, side 39).

Prøvene tatt ut ved de ulike tidspunktene under transesterifiseringsprosessen ved Nordic Pharma ble også separert med SPE. En forkortet utgave av Metode 4 ble benyttet. Resultatene viste en forventet forandring i fettklasseinnholdet fra tidspunktene 0 til 55 t (Figur 28, side 40).

Det vil si en nedgang i EE, en økning i TAG og forandring i DAG i tidsforløpet. Igjen kan det sees at transesterifiseringen ikke er fullstendig etter 55 timer. Det kan også tyde på at mengden av den mest hydrofobe EE-varianten reduseres raskere enn den andre, men siden TLC bare er en kvalitativ analyse så kan en ikke si dette med sikkerhet.

Som det framgår av Figur 28 (side 40) så inneholder EE-fraksjonene som elueres med heptan ved SPE bare svært små spormengder av andre lipidklasser. Fettsyresammensetningen ble derfor analysert direkte av de sammenslåtte EE-fraksjoner.

Når det gjelder TAG-fraksjon eluert med heptan:klorofom:eddiksyre så inneholder den flere andre lipidklasser som ble separert bort før analyse av fettsyresammensetning i TAG ved de ulike uttakstidspunktene under transesterifiseringen. Ved uttak 0 t ble først EE-rester i TAG fraksjonen fjernet ved å benytte SPE-metode 6 (Figur 29, side 41). TAG-fraksjonen analysert i spor 7 i dette forsøket renses for DAG, MAG og FFA ved å benytte SPE-metode 5 (Figur 30, side 42). Her kommer det frem at nesten ren TAG elueres med heptan først mens DAG, MAG og FFA kommer ut senere (se spor 7). Denne TAG-fraksjonen (spor 1 og 2) analyseres for EPA- og DHA-innhold.

For uttakene etter 12-55 timers transesterifisering ble Metode 5 først benyttet for å utvinne EE og TAG mens hoveddelen av MAG, DAG og FFA kommer senere eller blir ikke eluert ut av kolonna (Figur 31, side 43). Deretter ble TAG og EE separert ved å benytte SPE Metode 6 (Figur 32, side 44). Sammenslåtte TAG-fraksjoner inneholder spor av DAG og FFA, men ble allikevel analysert for fettsyresammensetning. Bare rensing av TAG-fraksjoner ved uttak etter 36 timers transesterifisering er vist, men resultatene for de andre uttakene var tilsvarende.

Resultatene fra analysene av EPA og DHA i EE- og TAG-fraksjoner under transesterifiseringsprosessen er vanskelig å tolke. Nedgangen i EPA i EE fra tid 0 til 24 t faller sammen med økning i EPA i den isolerte TAG-fraksjonene i samme tidsrom. Tilsvarende forandring skjer imidlertid tilsynelatende ikke med DHA. Analyse av DHA og EPA ved 0 tid kan være usikker på grunn av de små mengder TAG som er tilstede. Isolering av EE og TAG i de forskjellige uttakene ble bare gjort en gang og for å være sikker må det reproduseres. En alternativ metode kunne kanskje ha vært å samle opp fettklasser fra fraksjoningene med HPLC og deretter analysere for fettsyrer.

6 Konklusjon

Oppgaven har vist at det er mulig å separere etylestere og triacylglyserol ved å bruke en spesifikk fast fase ekstraksjon. Det var interessant å oppdage at EE kunne separeres i to fraksjoner der den ene hadde et svært høyt innhold av langkjedede omega-3 fettsyrer mens den andre var fri for disse. Isolering av lipidklassene ved ulike tidspunkt fra den industrielle transesterifisering ved hjelp av SPE med påfølgende TLC-analyse og med HPLC, viste at nivåene av TAG, DAG og EE forandret seg som forventet. Etter 55 timers transesterifisering var det fremdeles noe EE igjen. EE eluert fra SPE-kolonna inneholdt svært små nivåer av andre lipidklasser. Eluerte TAG-prøver fra de ulike tidspunktene inneholdt ganske mye DAG, MAG og FFA. Disse kunne i stor grad fjernes fra TAG-prøvene ved å bruke samme type fast fase kolonne, men da med litt andre kondisjonerings- og elueringsbetingelser. Arbeidet med utviklingen av metodene tok såpass mye tid av mastergraden at det dessverre bare ble lite tid igjen å bruke på industrielle prøver.

7 Referanseliste

- Agilent. (2011). Agilent 101: An Introduction to Bio-Analytical Measurement. Lastet ned 23.04.18 fra https://www.agilent.com/labs/features/2011_101_bio.html
- Agren, J. J., Julkunen, A., & Penttila, I. (1992). Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column *Journal of Lipid Research*, **33**, 1871-1876.
- Aung, T., Halsey, J., Kromhout, D., Gerstein, H. C., Marchioli, R., Tavazzi, L., Geleijnse, J. M., Rauch, B., Ness, E., Galan, P., Chew, E. Y., Bosch, J., Collins, R., Lewington, S., Armitage, J., & Clarke, R. (2018). Associations of omega-3 fatty acid supplement use with cardiovascular disease risks: Meta-analysis of 10 trials involving 77 917 individuals. *JAMA Cardiology*, **3**, 225-234.
- Bernhardt, T. G., Cannistraro, P. A., Bird, D. A., Doyle, K. M., & Laposata, M. (1996). Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **675**, 189-196.
- Bitman, J., & Wood, D. L. (1982). An Improved Copper Reagent for Quantitative Densitometric Thin-Layer Chromatography of Lipids. *Journal of Liquid Chromatography*, **5**, 1155-1162.
- Calder, P. C. (2009). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, **91**, 791-795.
- Calder, P. C. (2018). Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proceedings of the Nutrition Society*, **77**, 52-72.
- Corley, C. A., & Iacono, S. T. (2015). A rapid approach to isolating nitro-explosives from imidazolium and pyrrolidinium ionic liquid solutions using solid phase extraction (SPE). *Analytical Methods*, **7**, 6911-6915.
- Dyerberg, J., Madsen, P., Moller, J. M., Aardestrup, I., & Schmidt, E. B. (2010). Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **83**, 137-141.
- EFSA. (2017). Overview on Dietary Reference Values for the EU population as derived by the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Nedlastet 12.04.18 fra https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/DRV_Summary_tables_jan_17.pdf

- FAO. (2006). Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: Trends and policy implications. Nedlastet 17.04.18 fra <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/009/a0604e/a0604e00.pdf>
- Flurkey, W. H. (2005). Use of solid phase extraction in the biochemistry laboratory to separate different lipids. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **33**, 357-360.
- Hall, W. L. (2017). The future for long chain n-3 PUFA in the prevention of coronary heart disease: do we need to target non-fish-eaters? *Proceedings of the Nutrition Society*, **76**, 408-418.
- Helsedirektoratet. (2014). Anbefalinger om kosthold, ernæring og fysisk aktivitet. Nedlastet 17.04.18 fra <https://helsedirektoratet.no/Lists/Publikasjoner/Attachments/806/Anbefalinger-om-kosthold-ertering-og-fysisk-aktivitet-IS-2170.pdf>
- Kaluzny, M. A., Duncan, L. A., Merritt, M. V., & Epps, D. E. (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, **26**, 135-140.
- Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., & Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **81**, 99-104.
- Lewis, R. A., Austen, K. F., & Soberman, R. J. (1990). Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *The New England Journal of Medicine*, **323**, 645-655.
- Mena, F., Mena, A., Mena, B., & Tréton, J. (2013). Trans-fatty acids, dangerous bonds for health? A background review paper of their use, consumption, health implications and regulation in France. *European Journal of Nutrition*, **52**, 1289-1302.
- Misund, B., Oglend, A., & Pincinato, R. B. M. (2017). The rise of fish oil: From feed to human nutritional supplement. *Aquaculture Economics & Management*, **21**, 185-210.
- Olsen, R. L. (2017). Lipidkjemi med vekt på fisk (4. utg). Norges fiskerihøgskole, UiT, Norges arktiske universitet.
- Olsen, R., L., & Hasan, M., R. (2012). A limited supply of fish meal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, **27**, 120-128.
- Pedersen, A. M., Vang, B., & Olsen, R. L. (2014). Oil from *Calanus finmarchicus*—Composition and Possible Use: A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **23**, 633-646.

- Schuchardt, J. P., & Hahn, A. (2013). Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **89**, 1-8.
- Schuchardt, J. P., Schneider, I., Meyer, H., Neubronner, J., Schacky, C. V., & Hahn, A. (2011). Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations - a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids in Health and Disease*, **10**:145.
- Shepherd, C. J., & Jackson, A. J. (2013). Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *Fish Biology*, **83**, 1046-1066.
- Shepherd, J. C., & Bachis, E. (2014). Changing supply and demand for fish oil. *Aquaculture, Economics & Management*, **18**, 395-416.
- Shepherd, J. C., Monroig, O., & Tocher, D. R. (2017). Future availability of raw materials for salmon feeds and supply chain implications: The case of Scottish farmed salmon. *Aquaculture*, **467**, 49-62.
- Siscovick, D. S., Barringer, T. A., Fretts, A. M., Wu, J. H., Lichtenstein, A. H., Costello, R. B., Kris-Etherton, P. M., Jacobson, T. A., Engler, M. B., Alger, H. M., Appel, L. J., & Mozaffarian, D. (2017). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, **135**, e867-e884.
- Tocher, D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, **449**, 94-107.
- Vaghela, M. N., & Kilara, A. (1995). A rapid method for extraction of total lipids from whey protein concentrates and separation of lipid classes with solid phase extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **72**, 1117-1121.
- Vang, B., Pedersen, A. M., & Olsen, R. L. (2013). Oil extraction from the copepod *Calanus finmarchicus* using proteolytic enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **22**, 619-628.
- Waters. (2018a). Beginner's Guide to SPE - Solid-Phase Extraction. Lastet ned 22.04.18 fra http://www.waters.com/waters/en_NO/Solid-Phase-Extraction-SPE-Guide/nav.htm?cid=134721476&locale=en_NO
- Waters. (2018b). How Does High Performance Liquid Chromatography Work? Lastet ned 28.04.18 fra http://www.waters.com/waters/en_NO/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_NO

Yurko-Mauro, K., Kralovec, J., Bailey-Hall, E., Smeberg, V., Stark, J. G., & Salem, N., Jr. (2015). Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study. *Lipids in Health and Disease* **14:99**.

