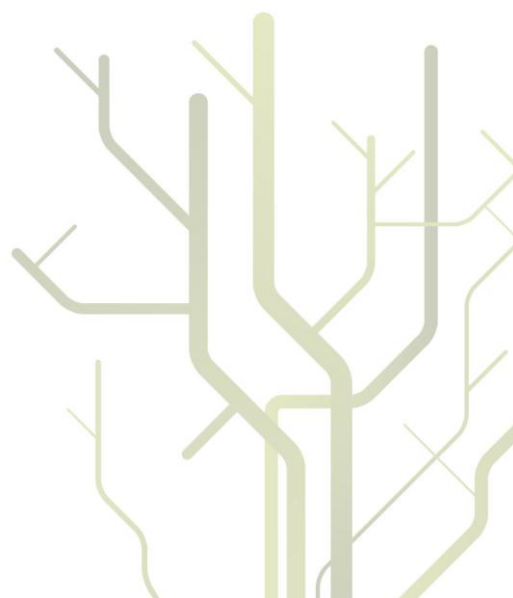


Karakterisering av kommersielle omega-3 produkter og utvikling av en ny metode for separasjon av lipidklasser med fast-fase ekstraksjon.



Marte Stokvik Ovesen

KJE-3900 Masteroppgave i kjemi
Desember 2012



Forord

Denne oppgaven har vært spennende, utfordrende og ikke minst lærerik. Det har vært hele tre professorer involvert i prosessen hvor professor John Sigurd Svendsen, institutt for kjemi, var hovedveileder, professor Einar Jensen, institutt for farmasi, og professor Ragnar Olsen, Norges fiskerihøgskole, var biveiledere. Det var min biveileder Einar Jensen, som først introduserte meg for ideen om å analysere innholdet i kommersielle omega-3 produkter. Etersom jeg ønsket å gjøre en analytisk rettet masteroppgave var denne oppgaven midt i blinken. I tillegg er omega-3 et svært aktuelt tema, ikke bare i den akademiske verden. De største avisene i landet har hatt oppslag med overskrifter som; «Omega-3 – helsefremmende eller bløff», «Mattilsynet skal sjekke om omega-3 er farlig», «Vi vet ikke hvor mye omega-3 som er sunt», «Derfor blir eldre folk smartere av omega-3» og «Slik finner du rett omega-3». I tillegg skal det nevnes at også TV-2 hjelper deg har evaluert noen av omega-3 produktene på markedet. Det er altså ingen tvil om at Norges befolkning er engasjerte i dette temaet. Siden institutt for kjemi ikke tilbyr en retning innenfor analytisk kjemi og heller ikke driver forskning på lipider, ble et samarbeid med professor Ragnar Olsen, avdeling for sjømatvitenskap etablert. Det meste av den praktiske delen av oppgaven ble derfor utført ved avdeling for sjømatvitenskap med god veiledning og hjelp fra avdelingsingeniør Guro Edvinsen og stipendiat Alice Pedersen, tusen takk til dere. Den resterende praktiske delen ble utført på laben til uorganisk kjemi- gruppa ved institutt for kjemi. Tusen takk til dere for lån av avtrekkskap og diverse annet utstyr. Terje Vasskog skal ha takk for hjelp med diverse på lab. Jeg vil også takke Ragnar for super veiledning under skriveprosessen, hjelp til å finne artikler og engasjement rundt oppgaven. Einar og John Sigurd fortjener takk for gode innspill, forklaringer og ideer. Hans-Kristian og Simon har betydd mye for meg under hele studiet og jeg kunne vel neppe hatt flottere mannfolk å dele kontor med. Mange takk for all hjelp, alle diskusjoner, festlige festligheter og fine stunder. Mine nærmeste venninner, Marianne, Mildri og Tiril har alltid sørget for en god latter og avkobling fra studiehverdagen. Sist men ikke minst vil jeg takke familien min, Ronny, Helene, Mamma, Pappa og June. Dere har gitt meg troen på meg selv og den selvtilliten jeg trengte for å gjennomføre dette studiet.

Tromsø 15/11-12

Marte Stokvik Ovesen

Sammendrag

Kliniske studier viser at inntak av omega-3 fettsyrene EPA, DPA og DHA kan bidra til å forebygge hjerte- og karsykdommer, redusere inflammasjon, påvirke sentralnervesystemets funksjon positivt og bidra til en rekke andre helsegevinster. Som en konsekvens har markedet for kommersielle omega-3 produkter økt de siste tiårene. Det ble kjøpt inn 10 produkter til dette studiet. Produktene baserte seg på konsentrert fiskeolje, selolje, krillolje, tran og en blanding av tran og konsentrert fiskeolje. Varedeklarasjonene synes å være mangelfull ettersom det bare opplyses om mengde EPA/DPA/EPA per dose, og ikke hvilke andre fettsyrer produktene inneholder og mengden av disse. Dessuten opplyser de færreste om hvilke lipidklasser fettsyrene er forestret i. Hovedmålet for oppgaven ble derfor å bestemme fettsyresammensetningen i produktene, bestemme prosentandelen av de ulike fettsyrene og å bestemme hvilke lipidklasser de ulike produktene inneholdt. Det skulle også gjøres en klasespesifikk analyse av fettsyresammensetningen. Ettersom teknikkene for separasjon av lipidklasser anses å være utstyrskrevene og tidskrevende ble delmål for oppgaven å lage en ny metode for å separere lipidklasser til videre analyse. Det ble brukt GC-FID til analyse av fettsyresammensetning og bestemmelse av arealprosent. Til separasjon av lipidklasser ble det forsøkt preparativ HPTLC og fast-fase ekstraksjon på silika. Lipidklassene som ble funnet var sammenlagt mono, di- og triacylglyseroler, fosfolipider, frie fettsyrer, etylestere, kolesterylestere og/-eller voksestere og kanskje kolesterol. For fiskeoljene, tran og selolje dominerte triacylglyseroler, for blandingen av tran og konsentrert fiskeolje var innholdet 50/50 etylestere og triacylglyseroler og for krilloljene dominerte fosfolipidene. Fettsyresammensetningen i produktene viste seg å være svært lik. Det var derimot stor variasjon i prosentandelen av de ulike fettsyrene og prosentandelen EPA, DPA og DHA varierte mellom ca. 70 og 15 %. Det var også store variasjoner i prosentandelen mettede og enumettede fettsyrer, mens prosentandelen flerumettede fettsyrer utenom EPA, DPA og DHA ikke varierte i stor grad. Det lyktes ikke å separere lipidklassene med preparativ HPTLC fordi det måtte appliseres for mye olje til at platen var i stand til å gi en god separasjon. Det lyktes heller ikke å lage en god metode for separasjon av lipidklasser med fast-fase ekstraksjon med silika som stasjonærfase, kanskje på grunn av for lav oppløsningsevne. Noen av lipidklassene ble imidlertid høvelig separert med den ene metoden som ble prøvd og fire av fraksjonene ble kjørt på GC-FID for FAME analyse. Resultatene av dette viste at det verken var stor forskjell i fettsyresammensetningen eller prosentandelen av fettsyrer i de ulike fraksjonene.

Forkortelser

LDL	low density lipoprotein
VLDL	very low density lipoprotein
HDL	high density lipoprotein
MAG	monoacylglycerol
DAG	diacylglycerol
TAG	triacylglycerol
FL	fosfolipid
K	kolesterol
KE	kolesterylester
EE	etylester
FF	frie fettsyrer
VE	voksester
DHA	dokosaheksaensyre
EPA	eikosapentaensyre
DPA	dokosapentaensyre
HPTLC	high performance thin layer chromatography/tynnsjiktskromatografi
SPE	solid phase extraction/fast-fase ekstraksjon
GC	gas chromatography/gasskromatografi
FID	flame ionization detector/flammeionisasjonsdetektor
HPLC	high performance liquid chromatography
UPLC	ultra high performance liquid chromatography
ELSD	evaporating light scattering detector
UV	ultra violet/ultrafiolett
MS	massespektrometri
ESI	elektrospray ionisering
EI	electron ionization/elektronionisering
CI	chemical ionization/ kjemisk ionisering
API	atmospheric pressure ionization
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption and ionization- time of flight
NMR	nuclear magnetic resonance/kjernemagnetisk resonans
FT-NIR	fourier transformert/nært infrarødt
FAME	fatty acid methyl ester/fettsyremetylestere

PUFA	polyunsaturated fatty acids /flerumettede fettsyrer
DCM	dichloromethane/diklormetan
R_t	retensjonstid
R_f	retensjonsfaktor

Innholdsfortegnelse

Forord	III
Sammendrag	IV
Forkortelser	V
Innholdsfortegnelse	VII
1. Introduksjon	1
1.1 Innledning.....	1
1.2 Formål med oppgaven.....	3
2. Teori	4
2.1 Lipidkemi.....	4
2.2 Teknikker brukt i analyse av lipider.....	10
2.2.1 High performance thin-layer chromatography (HPTLC).....	10
2.2.2 Fast-fase ekstraksjon (SPE).....	11
2.2.3 High performance liquid chromatography (HPLC).....	12
2.2.4 Gasskromatografi (GC).....	13
2.2.5 Diverse analysemetoder.....	14
3. Materialer og metoder	15
3.1 Materialer.....	15
3.1.1 Helsekostproduktene.....	15
3.1.2 Kjemikalier.....	19
3.2 Tynnsjiktskromatografi.....	20
3.3 Preparativ tynnsjiktskromatografi.....	21
3.4 FAME analyse med GC-FID.....	21
3.4.1 Tillaging av FAME.....	21
3.4.2 GC-FID.....	21
3.5 Fast-fase ekstraksjon.....	23
4. Resultater	27
4.1 Bestemmelse av lipidklasser ved hjelp av tynnsjiktskromatografi.....	27
4.2 Fettsyresammensetning av omega-3 produktene.....	33
4.3 Preparativ tynnsjiktskromatografi-separasjon av lipidklasser.....	41
4.4 Fast-fase ekstraksjon-separasjon av lipidklasser.....	42
4.5 FAME analyse etter separasjon av lipidklasser med fast-fase ekstraksjon.....	48
5. Diskusjon	51
6. Konklusjon	57
7. Referanser	58
8. Appendiks	66

1 Introduksjon

1.1 Innledning

De siste tiårene har det blitt gjort en rekke kliniske studier som mener å påvise flere positive helseeffekter ved inntak av langkjedete omega-3 fettsyrer som DHA og EPA. Historien startet i 1970 årene da Bang *et al.* (1976) besøkte eskimoene på Grønland og fant at dødeligheten av hjerte- og karsykdommer var svært lav. Deres hypotese var at årsaken kunne være eskimoenes høye inntak av langkjedete omega-3 fettsyrer fra fisk og annen sjømat. Neff *et al.* (2011) rapporterte om økning i LDL og HDL, og lavere partikkelstørrelse av VLDL i tillegg til reduksjon av total VLDL og TAG konsentrasjon i blodet når algeolje rik på DHA ble gitt til overvektige og alvorlig overvektige mennesker. Disse endringene er potensielt fordelaktige med tanke på risiko for hjerte- og karsykdommer. I en tidligere studie av Singer *et al.* (1990) med pasienter med svakt forhøyet blodtrykk, ble det konkludert med at fiskeolje hadde tilnærmet lik effekt på blodtrykket som propranolol, et blodtrykksreducerende medikament. Det ble observert lavere systolisk og diastolisk blodtrykk, antakelig som følge av reduksjon i norepinefrin og tromboxan B₂ i plasma, og likeledes økning av plasmareninaktivitet. Videre ble det vist av Din *et al.* (2007) at inntak av fiskeolje reduserte aktiveringen av trombocytter. De anså dette som en av de mulige mekanismene bak hvorfor fiskeolje virker fordelaktig i kampen mot hjerte- og kar sykdommer. Det spekuleres også i om inntak av langkjedet omega-3 kan assosieres med reduserte inflammatoriske parametre (Lankinen *et al.* 2009; Lopez-Garcia *et al.*, 2004). Lauritzen *et al.* (2008) undersøkte effekten av fiskeoljesupplement på 83 friske spedbarn og fant at supplementet påvirket utviklingen av hjernen og funksjonen til sentralnervesystemet positivt. I tillegg til de nevnte er, Metcalf *et al.* (2007); Kew *et al.* (2004); Harrison *et al.* (2004); Harris *et al.* (2007); Milte *et al.* (2007) og Vognild *et al.* (1998) bare et lite utvalg av studier som er gjort på langkjedet omega-3 og dets sammenheng med helsegevinst.

Ulike organisasjoner verden rundt anbefaler inntak av EPA, DHA og fisk (Kris-Etherton *et al.* 2009). Verdens Helseorganisasjon (WHO) anbefaler å spise fisk som tilsvarer 200 -500 mg EPA og DHA per servering, 1-2 ganger i uka for å forebygge hjertesykdom (FAO/WHO, 2003). Australia and New Zealand National Health and Medical Research Council (2006) foreslår et inntak av 610 og 430 mg/dag av DHA/EPA/DPA for hhv. menn og kvinner i alderen 19-70 år. Mens WHO spesifiserer at kilden til EPA og DHA skal være fisk, sier Australske og New Zealandske myndigheter ikke noe om dette. Det kan tolkes som at

kilden er uvesentlig, og at du får samme effekt om du spiser fet fisk eller kosttilskudd for å dekke det anbefalte behovet. Dette er imidlertid omdiskutert og flere påpeker at fisk også gir andre helsegevinster (Larsen *et al.*, 2011).

Som en reaksjon på de antatt positive helseeffektene har markedet for marine omega-3 produkter skutt i været. Den globale fiskeoljeproduksjonen er estimert til å være 1 million tonn i året og ca. 40 % av verdens omega-3 relaterte oljeprodukter for menneskelig konsum blir produsert i Norge. Inntaket av omega-3, i form av kosttilskudd, er høyt i Norge i forhold til resten av Europa, antakelig på grunn av anbefalinger fra helsedirektoratet (VKM, 2011). Bare i Norge finnes det flere produsenter av omega-3 produkter. Produktene baserer seg på fiskeolje, krillolje, tran, selolje, algeolje, konsentrater av disse, og blandinger av vegetabiliske oljer og marine oljer.

Til dette studiet ble det kjøpt inn ti kommersielle omega-3 produkter fra syv ulike produsenter. Produktene var 2 ulike batcher av Ishavskrill fra Superba krill, konsentrert selolje fra Biopharma AS, Triomega høykonsentrert fiskeolje fra Middelfart Sonesson, Lifeline Care fiskeolje til barn fra Wingfirm Pharma AS, Møllers Tran fra Axellus AS, Eskimo-3 fiskeoljekonsentrat fra Cardinova AB, 2 ulike batcher av konsentrert tran og fiskeolje fra Biopharma AS og konsentrert fiskeolje fra Nycomed Pharma AS. Felles for de fleste av produktene er at de på pakningen oppgir potensielle positive helseeffekter; «godt for hud», «immunforsvar», «muskler», «ledd», «syn», «hjerte og blodkar», «styrker kroppens celler», «hjernens funksjon», «læring» og «hukommelse». På pakningen kan en også lese varedeklarasjonen som oppgir hvilken olje produktet baserer seg på og om oljen er et konsentrat. Videre oppgis hvilke langkjedete omega-3 fettsyrer produktet inneholder og i hvilken mengde per dose. De færreste oppgir hvilken form omega-3 fettsyrene foreligger i (etylestere, triglyserider, fosfolipider) og ingen oppgir hvilke andre fettsyrer produktet inneholder.

Metodene som brukes til analyse av lipider er mange og omfatter blant annet HPTLC, SPE, GC, HPLC, UPLC, MS, NMR og FT-NIR. I dette studiet ble det brukt HPTLC, preparativ HPTLC, SPE og GC-FID. HPTLC ble brukt til identifikasjon av lipidklasser i produktene og for å få et visuelt bilde av renheten til fraksjonene etter separasjonen med SPE. Metoden ble valgt fordi den er enkel og tidseffektiv i tillegg til at den gir separasjon av svært komplekse prøver. Preparativ HPTLC ble forsøkt brukt som separasjonsteknikk av

lipidklasser før klassespesifikk FAME analyse med GC-FID. Dessverre oppsto diverse problemer med denne teknikken og den ble byttet ut med SPE. SPE har blitt brukt både til «finseparering» (Giacometti *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2004; Burdge *et al.*, 2000; Dybvik *et al.*, 2008; Vaghela & Kilara, 1995) av lipidklasser og «grovseparering» før finseparering med HPLC (Sommer *et al.* 2006). Selv om Si- aminopropyl ser ut til å være det mest populære valget av stasjonærfase når en skal separere lipidklasser (Giacometti *et al.* 2002; Ruiz *et al.* 2004; Burdge *et al.*, 2000; Dybvik *et al.*, 2008; Vaghela & Kilara, 1995), har også silika blitt brukt til dette formålet (Hamilton & Comai, 1988). Metodene beskrevet med aminopropylkolonner innebærer ofte flere kjøringar på flere kolonner for å separere lipidklassene, og silika ble derfor valgt som stasjonærfase. Til å lage fettsyreprofil av de ulike produktene og bestemmelse av fettsyreinhold i fraksjonene etter SPE ble det brukt GC-FID. GC er enestående til å separere fettsyremetylestere og forfatter har, under litteratursøk, ikke funnet en annen sammenlignbar teknikk til dette formålet. Til deteksjon brukes flammeionisasjonsdetektor og massespektrometre (Araujo *et al.*, 2010; Quehenberger *et al.*, 2011). Flammeionisasjonsdetektorer gir deg såkalt «annenhånds» informasjon fordi prøven må sammenliknes med standarder, noe som medfører en viss usikkerhet i bestemmelsen av fettsyreinholdet. Massespektrometre gir deg «førstehånds» informasjon fordi du direkte bruker et spekter til å bestemme strukturen til fettsyren. Ved bruk av EI massespektrometer må en ta i betraktning at fettsyremetylestere kan gi usikkerhet i lokalisering av dobbeltbindinger (Dubois *et al.*, 2006). En bør derfor vurdere å bruke en annen type derivat som pyridylcarbinolestere (picolinylestere) eller dimethyloxazolinestere. På den annen side er disse derivatene vanskeligere og dyrere å preparere enn metylestere og metylestere med analyse på GC-FID ble derfor valgt i dette studiet.

1.2 Formål med oppgaven

- Å bestemme hvilke lipidklasser og fettsyrer de innkjøpte omega-3 produktene inneholdt.
- En bestemmelse av prosentandelen til de ulike fettsyrene i produktene.
- Lage en metode for å separere de ulike lipidklassene hvor både preparativ TLC og fast-fase ekstraksjon med silika som stasjonærfase skal forsøkes. Og deretter benytte denne metoden for å gjøre en klassespesifikk bestemmelse av fettsyreinholdet.

2 Teori

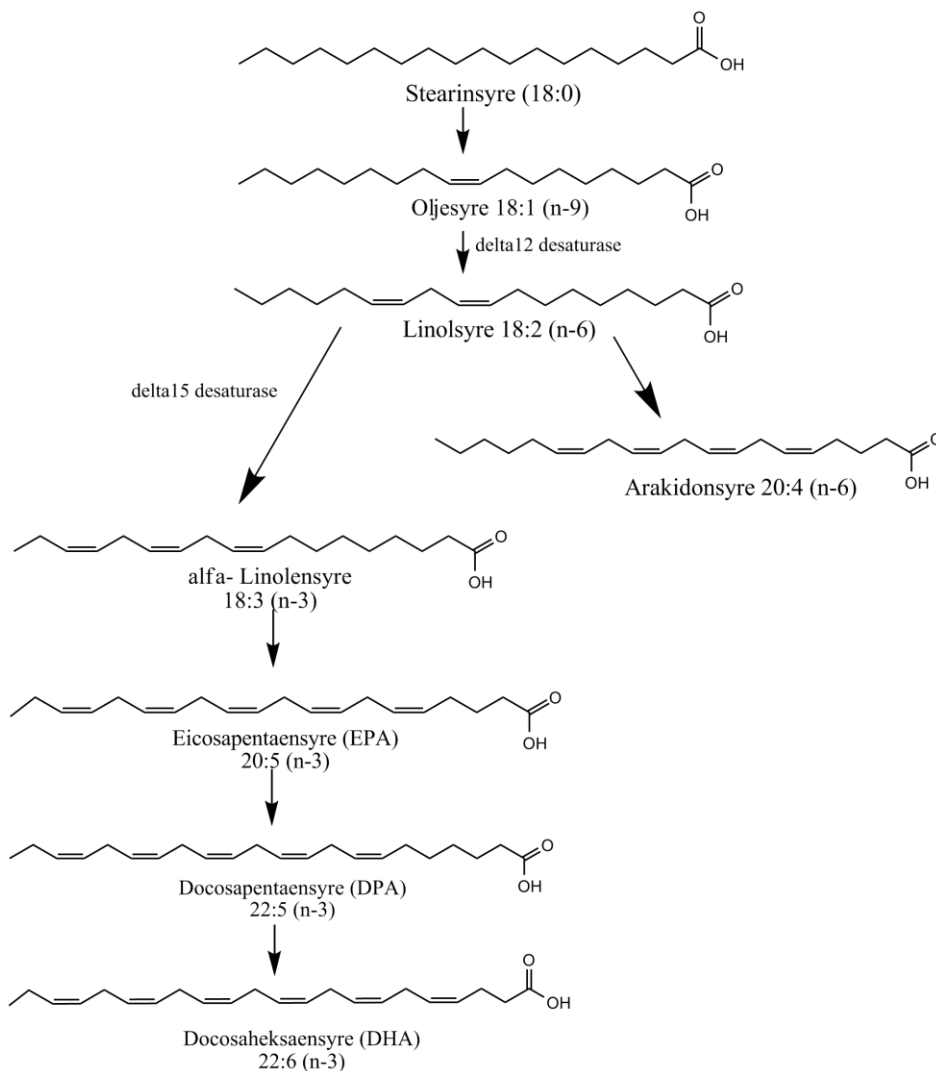
2.1 Lipidkjemi

Den mest brukte definisjonen på lipider er at de er organiske, upolare forbindelser som er uløselig i vann, men løselig i organiske løsemidler som diklormetan og heksan (Fuchs *et al.*, 2011a). William Christie foreslo også en annen definisjon; lipider er fettsyrer og fettsyrederivater, og forbindelser som er relatert til disse enten biosyntetisk eller funksjonelt (Christie, 1987). Lipider er altså en stor gruppe ulike forbindelser med høy diversitet i kjemiske egenskaper og biologiske funksjoner. På grunn av det store mangfoldet innenfor lipider, er det umulig å dekke alt her. Det vil derfor bli fokusert på de gruppene, eller klassene, av lipider som er relevante sett i sammenheng med de innkjøpte omega-3 produktene.

Fettsyrer er karboksylsyrer med en mettet, enumettet eller flerumettet hydrokarbonkjede. I noen tilfeller har kjeden forgreninger, hydroksylgrupper eller ringstrukturer bestående av tre karbon (syklopropylringer). De fleste fettsyrene som opptrer i naturen har partalls-karbonatomer, og dersom de er flerumettet er nesten alltid dobbeltbindingene ukjonjugerte og i *cis* konfigurasjon (Nelson & Cox, 2005). Fettsyrene man finner i vanlige planteoljer som olivenolje, solsikkeolje, rapsolje og soyaolje har karbonkjeder fra 12-18 karbonatomer. I marine oljer som selolje, algeolje, fiskeolje, tran og krillolje har de fleste fettsyrene mellom 14 og 22 karbonatomer. En stor prosentandel av fettsyrene i vegetabiliske og marine oljer er umettede. Noen av de vegetabiliske inneholder flerumettede fettsyrer som 18:2 n-6 og 18:3 n-3, mens langkjedete fettsyrer som 20:5-n-3 (EPA), 22:5 n-3 (DPA) og 22:6 n-3 (DHA) utelukkende finnes i marine oljer (Olsen, 2007). Animalsk fett som derimot er hardt og fast ved romtemperatur inneholder mest av fettsyrer mellom 16 og 18 karbonatomer hvor ca. 50 % av disse er mettede (Nelson & Cox, 2005).

I figur 2.1.1. er det vist struktur og navn til noen kjente fettsyrer. Noen av dem er navngitt trivielt, andre er navngitt systematisk, alt ettersom hvilke navn de er mest kjent under. Palmitinsyre, oljesyre og alfa-linolensyre er trivielle navn og docosaheksaensyre, docosapentaensyre og eicosapentaensyre er systematiske navn. Siden de trivielle navnene ikke sier noe om strukturen til fettsyrene og de systematiske navnene ofte er lange og kompliserte har det blitt utviklet en enklere nomenklatur. Denne nomenklaturen, som i all hovedsak består av tall, beskriver strukturen til fettsyren og har både en systematisk og triviell

skrivemåte. For stearinsyre, en umettet fettsyre, (Figur 2.1.1) er den systematiske og den trivielle det samme; 18:0. For alfa-linolensyre, en flerumettet fettsyre, er den systematiske skrivemåten følgende; 18:3 Δ 9, 12, 15. Det første tallet gir antall karbonatomer, tallet etter kolon (her 3), beskriver antall dobbeltbindinger, mens tallene etter delta (Δ) forteller hvor dobbeltbindingene er lokalisert når man teller fra karboksylsyrekarbonet. Den trivielle skrivemåten for alfa-linolensyre er 18:3 (n-3) og den eneste forskjellen fra den systematiske skrivemåten er at man her starter å telle fra metylenden på fettsyren og bare oppgir lokaliseringen til den første dobbeltbindingen. Som en kan se av figuren er første dobbeltbinding lokalisert på karbon nr. 3 fra metylenden. Det er vanligvis ikke nødvendig å spesifisere lokaliseringen til de andre dobbeltbindingene fordi de som oftest er ukonjugerte og med en metylengruppe mellom hver.



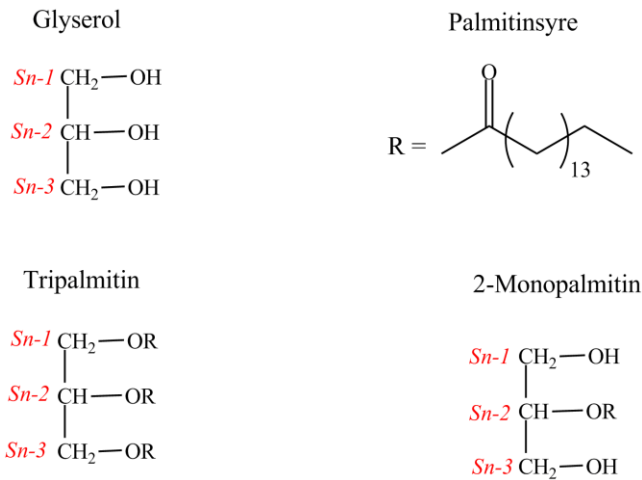
Figur 2.1.1: Navn, struktur og syntesevei for noen utvalgte fettsyrer. Enzymene delta 12 og 15 desaturase er unike for planter.

Det er også vanlig å bytte ut bokstaven n med ω (omega). Omega er den siste bokstaven i det greske alfabetet og er derfor brukt som symbol for det siste karbonet i karbonkjeden. Omega-3 fettsyrer blir dessuten brukt som «fellesnavn» på fettsyrer som EPA, DPA og DHA. Alfa linolensyre er også en omega-3 fettsyre og for å skille mellom C-18 og C-20/22 bruker man ofte betegnelsen langkjedete omega-3 fettsyrer på sistnevnte gruppe. Det er disse som spesielt har de gode helseeffektene (Wang & Harris, 2006).

I kroppen syntetiseres oljesyre fra stearinsyre, mens linolsyre og linolensyre er essensielle og må tilføres gjennom kosten. Fra linolsyre syntetiserer mennesket arakidonsyre som er forløperen for en gruppe eicosanoider. Alfa-linolensyre er forløperen for EPA som videre kan omdannes til DPA og DHA. Synteseveien alfa-linolensyre til DHA opptrer i liten grad i mennesket, men er derimot svært effektiv i marint fyttoplankton. Fra EPA og DHA syntetiseres en annen gruppe eicosanoider som virker mer betennelsesdempende (Olsen, 2007).

Triacylglyseroler er bygd opp av en glyserolenhet (figur 2.1.2) med tre fettsyrer bundet via esterbindinger. De tre posisjonene betegnes $sn-1$, $sn-2$ og $sn-3$ hvor sn står for stereospesifikk nummerering. De enkleste triacylglyserolene har tre identiske fettsyrer bundet, men de fleste naturlige triacylglyserolene har en blanding av ulike fettsyrer (Nelson & Cox, 2005). Studier gjort på marine oljer viser at de flerumettede fettsyrene vanligvis foreligger som triacylglyseroler, men at de også kan foreligge som voksesterer og fosfolipider. I studier av fiskeoljer har det også vist seg at de fleste flerumettede fettsyrene er festet til glyserolenheten i $sn-2$ posisjonen, noe som antas å sikre stabilitet mot oksidasjon (Rubio-Rodriguez *et al.*, 2010). Fettet i maten vi spiser består for det meste av triacylglyseroler og i kroppen har triacylglyseroler funksjon som energilager (Nelson & Cox, 2005).

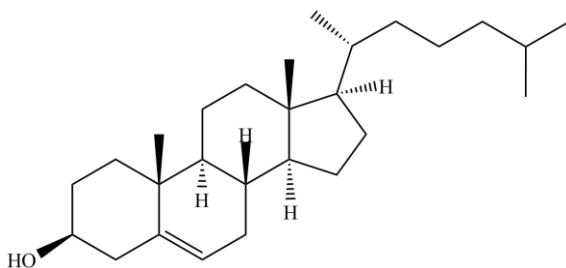
Monoacylglyseroler og diacylglyseroler er acylglyserider med hhv. en og to fettsyre/-r bundet i esterbindinger til glyserolenheten. Diacylglyserolene kan ha fettsyrene festet i $sn-1$ og $sn-3$, $sn-2$ og $sn-3$ posisjon eller i $sn-1$ og $sn-2$ posisjon. Monoacylglyserolene kan ha fettsyren festet i $sn-1$, $sn-3$ (som utgjør det samme) eller $sn-2$ posisjonen.



Figur 2.1.2: Struktur til glyserol, palmitinsyre, triacylglyserolet tripalmitin og monoacylglyserolet 2-monopalmitin, *sn* står for stereospesifikk nummerering.

Monoacylglyseroler og diacylglyseroler er acylglyserider med hhv. en og to fettsyre/-r bundet i esterbindinger til glyserolenheten. Diacylglyserolene kan ha fettsyrene festet i *sn-1* og *sn-3*, *sn-2* og *sn-3* posisjon eller i *sn-1* og *sn-2* posisjon. Monoacylglyserolene kan ha fettsyren festet i *sn-1*, *sn-3* (som utgjør det samme) eller *sn-2* posisjonen.

Kolesterol (figur 2.1.3) består av fire sammenhengende ringer hvor tre av dem har seks karbon- atomer og en av dem har fem. Ringene tillater ikke rotasjon av C-C bindingene så kolesterol er derfor et relativt rigid molekyl. Hydroksylgruppen gjør molekylet amfipatisk, og denne kan forestres med en fettsyre slik at det blir dannet kolesterylestere. (Nelson & Cox, 2005)

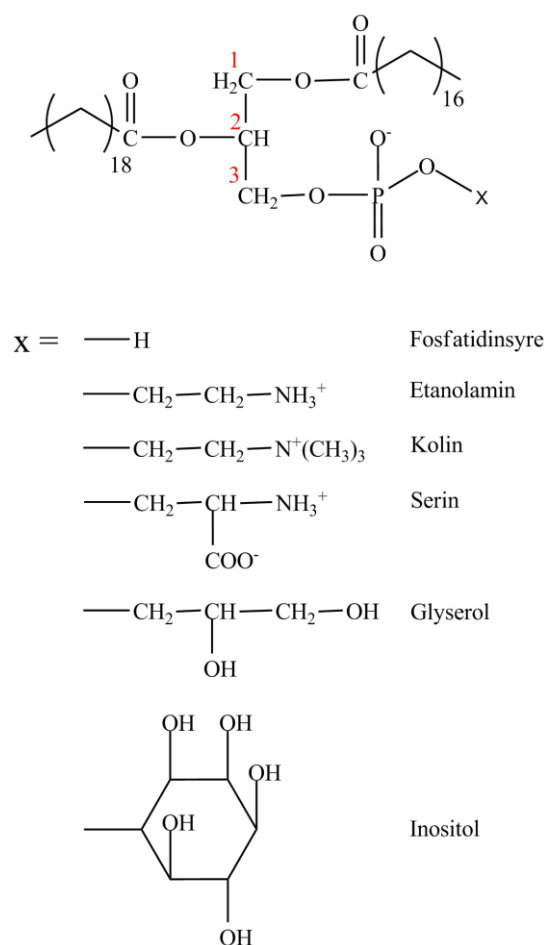


Figur 2.1.3: Strukturen til kolesterol.

Kondensasjon mellom en langkjedet, umettet eller mettet, fettsyre (14-36 karbonatomer) og en langkjedet alkohol (16-30 karbonatomer) gir voksesterer (Nelson & Cox, 2005). Zooplankton, for eks raudåte, bruker voksesterer som hovedlagringsform for energi (Olsen, 2007). Voksesterer brukes også som en av hovedlagringsformene i den antarktiske krillen *Euphausia crystallorophias* (Ellingsen & Mohr, 1981). I nordatlantisk krill ble

voksestere funnet i varierende mengde blant tre arter (Saether *et al.*, 1986). Fisk og mennesket kan ikke syntetisere voksestere og bare fisk kan i stor grad fordøye og utnytte dem (Nelson & Cox, 2005; Olsen, 2007).

Glyserofosfolipider (figur 2.1.4) har, som triacylglycerolene, en glyserolenhet linket til fettsyrer i esterbindinger. Forskjellen er at glyserofosfolipidene har en fosfatgruppe i 3 posisjon, bundet til glyserolenheten gjennom en fosforester binding. Fosfatgruppen kan ha mange ulike substituenten (figur 2.1.4), festet gjennom en fosforester binding, noe som gir opphav til ulike klasser av glyserofosfolipider.



Figur 2.1.4: Generell struktur til et glyserofosfolipid og struktur og navn på de vanligste substituentene. Fettsyrer bundet er bare et eksempel på hvilke fettsyrer et glyserofosfolipid kan inneholde.

Den enkleste substituenten er et hydrogenatom og forbindelsen kalles da fosfatidinsyre. De andre klassene av glyserofosfolipider er derivater av fosfatidinsyre. Naturlige glyserofosfolipider har stor diversitet i fettsyresammensetning, men generelt kan man si at

fettsyren i 1-posisjon ofte er en mettet fettsyre med 16 eller 18 karbonatomer mens fettsyren i 2-posisjon ofte er umettet og 18 eller 20 karbonatomer lang. Glyserofosfolipider er amfipatiske molekyler på grunn av den hydrofile fosfatgruppen og de hydrofobe fettsyrene. Deres hovedfunksjon i pattedyr og fisk er som byggesteiner i cellemembranen hvor de danner et dobbeltlag med de hydrofile delene pekende mot cytosol i den ene enden og den intercellulære væsken i den andre (Nelson & Cox, 2005). Antarktisk krill, for eksempel *Euphausia superba* og *E. crystallophias* bruker derimot glycerofosfolipider som depotfett (Ellingsen & Mohr, 1981).

2.2 Teknikker brukt i analyse av lipider.

2.2.1 High performance thin-layer chromatography (HPTLC)

HPTLC er en enkel og tidseffektiv kvalitativ metode som i lipidanalyse hovedsakelig brukes til å separere lipidklasser (Fuchs *et al.*, 2011a; Touchstone, 1995). Metoden har også blitt brukt preparativt (Gigliotti *et al.*, 2011; Vieler *et al.*, 2007; Sattler *et al.*, 1996), semi-kvantitativt (Vieler *et al.*, 2007) og kvantitativt (Indrasena *et al.*, 2005). Stasjonærfasen er vanligvis silika med 5µm partikkelstørrelse, noe som sikrer god separasjon og lave deteksjonsgrenser. Med nesten ubegrensede muligheter hva sammensetning av mobilfasen angår, kan man separere svært komplekse lipidprøver. Stasjonærfasen kan også impregneres med diverse kjemikalier som borsyre (H_3BO_3) og sølvnitrat ($AgNO_3$). HPTLC plater impregnert med sølvnitrat brukes dersom en ønsker å separere med hensyn på grad av metning i fettsyrene. Desto flere dobbeltbindinger, desto kortere vandrer fettsyren fordi Ag^+ ionene danner komplekser med π elektronene i dobbeltbindingene. Borsyre brukes dersom en vil separere isomerer av diacylglyseroler eller fosfolipider (Fuchs *et al.*, 2011a).

For å detektere og visualisere de separerte lipidklassene på en TLC-plate brukes farge. Det finnes mange ulike reagenser og disse kan deles opp i tre grupper etter spesifisitet og om de er destruktive eller ikke. Destruktiv deteksjon menes med at lipidene blir ødelagte etter visualisering og ikke kan analyseres videre. I teorien skal en kunne analysere lipidene videre om en ikke-destruktiv metode benyttes. En metode som regnes for å være ikke-destruktiv og ikke-spesifikk er å eksponere platen for jod-damp som danner et brunt kompleks med lipidene. Siden jod binder seg til dobbeltbindingene er det vanskelig å farge helt mettede lipider med denne metoden. Av samme grunn er det vanskelig å fjerne alt jodet fra svært umettede lipider og det kan derfor diskuteres om umettede lipider vil være egnet for videre analyse. Innenfor destruktive og ikke spesifikke metoder er en løsning av 50 % svovelsyre i metanol eller vann før oppvarming ved 120 °C i 1 time mye brukt. En annen fargemetode innenfor denne gruppen er en løsning av 3-6 % kopperacetat i 8-10 % fosforsyre. Den siste gruppen er metoder som er selektive og destruktive. Her brukes løsninger som bare farger en enkelt lipidklasse (Fuchs *et al.*, 2011a).

Selv om HPTLC kan brukes preparativt er bruken begrenset blant annet fordi umettede fettsyrer og kolesterol oksideres dersom de eksponeres for oksygen over en lengre periode (Fuchs *et al.*, 2011a). Dessuten må man enten benytte deteksjonsreagenser som ikke

ødelegger prøven, eller en fluorescerende HPTLC plate. Mengden stoff som kan appliseres på en plate er også kritisk, appliseres det for mye blir separasjonen dårligere (Vaghela & Kilara, 1995). Videre analyse er derfor avhengig av instrumenter med lave deteksjonsgrenser. På grunn av disse problemene ser det ut til at SPE favoriseres som teknikk til å separere lipidklasser for videre analyse.

2.2.2 Fast-fase ekstraksjon (SPE)

SPE anses som en av de kraftigste teknikkene tilgjengelig for rask og selektiv prøveopparbeidelse (Giacometti *et al.*, 2002). På tross av denne uttalelsen er det begrenset hvor høy oppløsning man kan oppnå med en SPE kolonne. Og en fullstendig separasjon, av en kompleks prøve, i en operasjon virker å være usannsynlig.

Det er hovedsakelig to stasjonærfase-materialer som brukes i lipidanalyse; silika og aminopropyl. Hamilton & Comai (1988) rapporterte at de hadde funnet en elueringsmetode på SPE-kolonner med silika som fullstendig separerte lipidene kolesterylestere, triglyserider, frie fettsyrer og kolesterol. Fosfolipidklassene ble ikke fullstendig separert, men fosfatidyletanolamin og fosfatidylinositol eluerte i en fraksjon mens fosfatidylkolin, sphingomyelin og lysofosfatidylkolin i en annen fraksjon. Det er imidlertid blitt hevdet at denne metoden ikke lot seg reproducere med like gode resultater (Christie, 1992). SPE kolonner med silika som stasjonærfase blir mest brukt til grovseparasjon av upolare og polare lipider før finseparering med andre teknikker. Silika brukes også til å rense upolare lipidfraksjoner for polare forurensninger. Aminopropyl og silika kolonner har også blitt brukt komplementært i enkelte studier. Både silika, NH_2 , NH_4^+ , C_{18} og diol kolonner har blitt brukt til isolasjon av forbindelser i olje. (Ruiz-Gutierrez & Perez-Camino, 2000).

Kaluzny *et al.* (1985) brukte tre aminopropyl kolonner og åtte eluenter for å separere kolesterylestere, kolesterol, triglyserider, diglyserider, monoglyserider, frie fettsyrer og fosfolipider. Mange har kopiert metoden og noen har publisert modifikasjoner av den (Ruiz-Gutierrez & Perez-Camino, 2000). En fordel ved bruk av aminopropyl framfor silika er at siden aminopropyl er mindre polart enn silika er ikke vanninnholdet i aminopropylkolonner så høyt. Silika tiltrekker seg vann fra luften, noe som påvirker effektiviteten til kolonnen og gjør at adsorpsjonskapasiteten blir mindre. For å forhindre dette kan man tørke kolonnen før bruk, bruke løsemidler med lavt vanninnhold eller også legge tørkemiddel som natriumsulfat (NaSO_4) på kolonnen under bruk.

2.2.3. High performance liquid chromatography (HPLC)

Som med HPTLC og SPE brukes også HPLC til separasjon av lipidklasser. Forskjellen er at med HPLC kan en oppnå separasjoner med høyere oppløsning i tillegg til kvantitativ bestemmelse av lipidklassene (Nordback *et al.*, 1997).

Til deteksjon brukes ELSD (evaporating light scattering detector) og MS (massespektrometri). I enkelte tilfeller brukes også foto-diode array og UV deteksjon (Yao *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2012). Ettersom ikke alle lipider inneholder kromoforer er bruken av disse detektorene begrenset i lipidanalyse (Myher & Kuksis, 1995). ELSD detektorer gir kun respons på massen til analytten og begrenses ikke av gjennomstrømningshastigheten til mobilfasen. Den er kompatibel med alle gradient-elueringer og har god sensitivitet (Rodriguez-Alcala & Fontecha, 2010). I lipidsammenheng er MS med elektroprayionisering (ESI) mest brukt (Fuchs *et al.*, 2010). Elektropray er en mild ioniseringsmetode innenfor klassen av «atmosfærisk trykk ionisering» (API- atmospheric pressure ionization). Elektronionisering (EI) og kjemisk ionisering (CI-chemical ionization) er ikke kompatibel med HPLC fordi forbindelser analysert med HPLC ofte er for polare til å gå over i gassfase. Problemet med MS som detektor for HPLC er gjennomstrømningshastigheten og mengden løsemiddel. Disse faktorene gir utfordringer angående å opprettholde vakuum i massespektrometeret, og å fjerne løsemidlet (Watson & Sparkman, 2007).

For å kunne separere lipidklasser med stor variasjon i polaritet må en benytte gradientelueling. W. W. Christie (1985) beskrev en metode hvor han benyttet et tertiært gradientsystem og en silikakolonne til å separere kolesterylester, triglyserider, kolesterol, frie fettsyrer, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylkolin og sphingomyelin. Diglyseridene eluerte på skulderen til kolesteroltoppen mens serebrosidene, difosfatidylglyserol og fosfatidylglyserol eluerte samtidig. I nyere tid blir også silika kolonner med gradientelueling brukt til separasjon av lipidklasser (Rocha *et al.*, 2010; Rodriguez-Alcala & Fontecha, 2010). Separasjon av lipidklasser har også blitt gjort på en polyvinylalkohol-bundet stasjonærfase, som har liknende egenskaper som silika og diol-kolonner (Nordback *et al.*, 1997). I et studie gjort av Sommer *et al.* (2006) ble polivinyllalkohol kolonner brukt kombinert med revers-fase C₁₈-kolonner. Lipidklassene separert av normalfase-kolonnen ble samlet og kjørt med revers-fase for videre karakterisering. C₁₈ kolonner har også blitt brukt alene for separasjon av polare lipider og Yao *et al.* (2006) separerte lipider i fotosystem I komplekset med en C₁₈-kolonne. Som i HPTLC

kan stasjonærfasen i HPLC modifieres, og silika med sølvioner kan separere triglyserider med hensyn på graden av metning (Myher & Kuksis, 1995).

De siste årene har en ny type stasjonærfase for lipidklasse-separasjon blitt benyttet, nemlig monolitisk silika. Forskjellen fra de «vanlige» stasjonærfasene er at monolitisk silika har en avlang (stav) struktur i stedet for den klassiske sfæriske, i tillegg til større porøsitet. Den høye graden av porøsitet gjør at mottrykket blir lavere og en kan dermed bruke høyere gjennomstrømningshastighet (Graeve & Janssen, 2009). Disse fordelene benyttet Graeve og Janssen (2009) seg av da de skulle separere lipidklasser fra marint zooplankton.

2.2.4 Gasskromatografi (GC)

GC-analyse av fettsyrer ble for første gang beskrevet i 1952. Etter den tid har analyse av fettsyrer nesten utelukkende blitt gjort med denne metoden (Mitchell *et al.*, 2009). I 1995 hevdet Myhler & Kuksis (1995) at GC fortsetter å være den mest verdifulle og effektive metoden til separasjon og kvantifisering av lipider. I dag virker GC å være standard utstyr på de fleste laboratorier som bedriver analyse av organisk materiale.

Ikke alle forbindelser lar seg analysere med GC fordi det kreves at de er flyktige og termisk stabile. På grunn av dette må mange forbindelser derivatiseres før analyse, fettsyrer inkludert. Fettsyremetylestere virker å være det vanligste derivatet når flammeioniseringsdetektor benyttes i analyse av fettsyrer (Quehenberger *et al.*, 2011), og har blitt brukt i en rekke studier; Saga *et al.* (2011); Kolanowski (2010); Burdge *et al.* (2000); Giacometti *et al.* (2002); Araujo *et al.* (2010), Quehenberger *et al.* (2011). GC-analyse av fettsyremetylestere med en flammeionisasjonsdetektor er avhengig av at man har standarder å sammenlikne den ukjente prøven med. Siden dette bare er annenhånds informasjon kan man ikke med sikkerhet si noe om posisjonene til alle dobbeltbindingene i fettsyrene. For å kunne bestemme posisjonen til dobbeltbindingene i en fettsyre helt nøyaktig må fettsyren først degraderes med for eksempel ozonolyse. Under ozonolyse brytes dobbeltbindingen, og brukes hydrogenperoksid vil det bli dannet to karboksylsyrer fra en dobbeltbinding. På den annen side lar ikke dette seg gjøre dersom man har en blanding av ulike fettsyrer fordi man umulig kan vite hvilke fettsyreprodukt som tilhører hvilke fettsyre. Men man kan derimot bestemme posisjonelle isomerer av dobbeltbindingene som ligger nærmest metylenden. For eksempel vil 22:5 n-6 og 22:5 n-3 separeres som metylestere. For å få høyere oppløsning av

posisjonelle isomerer kan man derivatisere fettsyrene til butyl eller isopropyl estere (Mitchell *et al.*, 2009).

EI-MS er også en ofte brukt deteksjonsmetode for GC i analyse av fettsyrer (Quehenberger *et al.*, 2011). Elektronionisering gir en betydelig fragmentering og en kan på bakgrunn av fragmenteringsmønstret bestemme posisjonen til dobbeltbindingene. På grunn av den omfattende fragmenteringen er ikke metylestere egnet som derivat. Når den alifatiske kjeden fragmenteres vil dobbeltbindingene bli mobile og vandre langs kjeden og den opprinnelige posisjonen blir derfor umulig å bestemme. For å minimalisere migreringen til dobbeltbindingene må en benytte derivater som inneholder et nitrogenatom. Eksempler på slike derivater er pyridylcarbinolestere (picolinylestere) og 4,4-dimetyloxazoliner (DMOX) (Dubois *et al.*, 2006).

EI-MS kan gi mye strukturell informasjon, men er uegnet for kvantitativ bestemmelse av fettsyrene fordi fragmenteringen er så omfattende at den ikke etterlater detektbare molekylioner. Til kvantifisering er derfor mildere ioniseringsmetoder som kjemisk ionisering og elektropray ionisering påkrevd (Quehenberger *et al.*, 2011).

2.2.5 Diverse analysemetoder

MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption and ionization-time of flight) massespektrometri har de siste årene vist seg å være nyttig i lipidanalyse. Blant annet har voksestere, hydrokarboner, plantepigmenter, flavonoider, karotenoider, frie fettsyrer, kolesterol, kolesterolestere, sphingolipider, glyserolipider, og glyserofosfolipider blitt analysert med MALDI-TOF (Fuchs *et al.*, 2010). Fuchs *et al.* (2011b) benyttet MALDI-MS når de studerte oksidativ forandring i lipider. I 2007 brukte Vieler *et al.* (2007) TLC og MALDI-TOF MS til å bestemme lipidinnholdet i alger.

^1H , ^{13}C og ^{31}P NMR (kjernemagnetisk resonans) spektroskopi anvendes også innenfor enkelte felt i lipidanalyse. NMR gir detaljert strukturell informasjon og kan også brukes kvantitativt, men metoden begrenses med at den er lite sensitiv (Fuchs *et al.*, 2011b; Barison *et al.*, 2010) ^1H NMR har for eksempel blitt brukt til å bestemme fettsyresammensetningen i ulike spiselige oljer (Barison *et al.*, 2010).

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

3.1.1 Helsekostproduktene

Produktene ble kjøpt inn på dagligvareforretninger, apoteker og helsekostbutikker og var basert på fiskeolje, tran, krillolje, selolje og en blanding av tran og fiskeolje. Nedenfor er en oversikt over hvilke kommersielle helsekost produkter som ble undersøkt i oppgaven.

Produkt 1

Lifeline Care for barn 0-3 år, fra Wingfirm Pharma AS

Anbefalt dosering: 1 kapsel daglig

1 kapsel inneholder:

Fiskeolje (triglyserider)	790 mg
Omega-3	593 mg
DHA	322 mg
EPA	134 mg
Vitamin D	10 µl
Best før	10/2012
Batch nr.	L0294/2

Produkt 2

Møllers tran fra Axellus AS

Anbefalt dosering barn (over 6 mnd.) og voksne: 5 ml

5 ml tran inneholder:

Omega-3	1,2 g
DHA	0,6 g
EPA	0,4 g
Vitamin D	10 µg
Vitamin A	250 µg
Vitamin E	10 mg
Best før	03/2013
Batch nr.	11030323

Produkt 3**Triomega høykonsentrert omega-3 fra Midelfart Sonesson**

Anbefalt døgndose: 2 kapsler

2 kapsler inneholder:

Konsentrert fiskeolje	1000 mg
Omega-3	600 mg
EPA	300 mg
DHA	200 mg
Øvrige omega-3 fettsyrer	100 mg
Best før	04/12
Batch nr.	80137765922

Produkt 9 ble kjøpt inn for å se på eventuelle forskjeller i fettsyresammensetning og lipidklasser fra produkt 4.

Produkt 4 og 9**Omega-3 Tran fra Biopharma AS**

Anbefalt døgndose: 2 kapsler

2 kapsler inneholder:

Tran og ekstra beriket fiskeolje	1000 mg
Omega-3	412 mg
EPA	188 mg
DHA	145 mg
Vitamin E	10 mg
Vitamin A	250 µg
Vitamin D	10 µg
Best før produkt 4:	12/08-12
Best før produkt 9:	06/04-13
Batch nr. produkt 4:	3602 05
Batch nr. produkt 9:	3819 03

Produkt 5**Selolje fra Biopharma AS**

Anbefalt døgndose: 2-3 kapsler

2 kapsler inneholder:

Selolje	1100 mg
Omega-3	253 mg
EPA	74 mg
DHA	106 mg
DPA	46 mg
Omega-6	24 mg
Best før	26/10-12
Batch nr.	3767 03

Produkt 10 ble kjøpt inn for å se på eventuelle forskjeller i fettsyresammensetning og lipidklasser fra produkt 6.

Produkt 6 og 10**Ishavskrill fra Superba Krill**

Anbefalt døgndose: 1-2 kapsler

1 kapsel inneholder:

100 % krillolje	500 mg
Marine fosfolipider	200 mg
Omega-3	108 mg
DHA	25 mg
EPA	55 mg
Astaxanthiner	50 µg
Best før, produkt 6 og 10:	10/12
Batch nr. for produkt 6 og 10	0101351

Produkt 7**Eskimo- 3**

Anbefalt døgndose for voksne og barn over 12 år: 5ml

5ml fiskeoljekonsentrat inneholder:

Omega-3	1,6 g
EPA	770 mg
DHA	510 mg
Vitamin E	11 mg
Best før	03/13
Batch nr.	21401025E321

Produkt 8**Omega-3 Basic fra Nycomed Pharma AS**

Anbefalt døgndose: 2 kapsler

2 kapsler inneholder:

Konsentrert fiskeolje	1386 mg
Omega-3	866 mg
EPA	437 mg
DHA	291 mg
DPA	34 mg
Vitamin A	250 µg
Vitamin D	10 µg
Vitamin C	90 mg
Vitamin E	30 mg
Best før	05/12
Batch nr.	59314510

3.1.2 Kjemikalier

Det ble brukt heptan, diklormetan, metanol, svovelsyre (95-97 %), eddiksyre, trietylamin, natriumsulfat fra Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland). Etylacetat, dietyleter, natriumklorid, orto-fosforsyre (85 %), kopper(II) sulfat-5-hydrat fra Merck (Darmstadt, Tyskland).

Nitrogen (N₂) 5.0 Ultra og Helium (He) 5.0 Ultra fra Yara Praxair AS (Oslo, Norge).

3.2 Tynnsjiktskromatografi

Fettklassene i produktene ble separert med tynnsjiktskromatografi etter en modifisert metode av Serizawa *et al.* (1992). Oljeprøver fra alle produktene ble løst i diklormetan til en konsentrasjon på ca. 25 mg/ml og applisert på en HPTLC silika gel 60 10 *10 cm plate fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Appliseringsvolumet var ca.1 µl og elueringsmiddelet var heptan: dietyleter: eddiksyre (70:30:1) v/v/v. Etter eluering ble platen satt til tork før den ble sprayet med et uniformt lag av kobberløsning (10 % kobbersulfat, 8 % fosforsyre) Platen ble deretter lufttørket i 10 minutter før den ble satt i kald varmeovn og varmet opp til 160 °C.

Tabell 3.2.1: Oversikt over de ulike standardene brukt i TLC og hvilke lipidklasser de inneholder.

16:0A = S1	18:5A = S2	18:3A = S3	WE 1345 = S4	PL =S5
a1: Monopalmitin	b1: Lecithin	c1: Monolinolenin	d1: Myristyloleat	e1:fosfolipider
a2: Dipalmitin	b2: Kolesterol	c2: Dilinolenin		
a3: Tripalmitin	b3: Oljesyre	c3: Trilinolenin		
a4: Metylpalmitat	b4: Triolein	c4:Metyllinolenate		
	b5:Kolesteryloleat			

Alle standarder kommer fra NuChek Prep, Inc (Elysian, MN, USA).

3.3 Preparativ tynnsjiktskromatografi

Preparativ tynnsjiktskromatografi ble brukt til å separere lipidklassene før klassespesifikk FAME analyse på GC-FID. Det ble veid inn 0,87 g olje av produkt 1 og løst opp i 1 ml diklormetan. Oljen ble applisert som en kontinuerlig strek på en fluoriserende HPTLC Silika gel 60 F₂₅₄ plate (20 x 20 cm) fra Merck. Elueringsmiddelet var heptan: dietyleter: eddiksyre (70:30:1) v/v/v. Etter eluering ble platen betraktet under UV lys og de synlige lipidklassene ble markert med blyant. Lipidklassene ble så skrapet av med skalpell i hvert sitt begerglass og løst opp i et antatt egnet løsemiddel; metanol for monoglycerider, fosfolipider, kolesterol og diglycerider og etylacetat for triglycerider. Etter å ha stått i ro en stund ble løøsningene filtrert med filterpapir. Det ble skyldt etter med de respektive løsemidlene. Løsemidlene ble dampet av under N₂ og prøvene ble resuspendert i diklormetan:metanol (2:1) v/v for metylering. Etter metylering ble prøvene kjørt på GC-FID med program AUT 06.

3.4 FAME analyse med GC-FID

Oljeprøver fra alle produktene ble transesterifisert til metylestere og kjørt på GC-FID for å opprette en fettsyreprofil. Denne metoden ble også brukt til å lage klassespesifikke fettsyreprofiler etter preparativ HPTLC og fast-fase ekstraksjon.

3.4.1. Tillaging av FAME

Tillaging av fettsyremetylestere ble gjort etter en modifisert metode beskrevet av Fritsche & Johnston (1990). Oljeprøvene ble løst i diklormetan:metanol (2:1) v/v til en konsentrasjon på ca. 10 mg/ml. 100 µl av løsningen ble overført til et glassrør med kork og tilsatt 0,9 ml diklormetan og 2 ml 2 % H₂SO₄ i metanol. Løsningen ble kokt i en time på varmeblokk ved 100 °C. Etter avkjøling ble 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaCl tilsatt. Løsningen ble ristet og satt til faseseparasjon i noen minutter. Den øverste fasen (heptanfasen) ble pipettert av og dampet ned under nitrogen. Prøven ble så resuspendert i 100 µl heptan og overført til GC-rør for GC analyse. Dette ble gjort med alle produktene.

3.4.2 GC-FID

Det ble brukt en Agilent 6890N med en 7683B auto injektor og en flammeionisasjonsdetektor. Bæregassen var helium og kolonnen var en Varian CP 7419 kapillærkolonne (wcot fused silica) (50 m x 250 µm x 0,25 µm nominal) fra Middelburg Nederland. Injektor temperaturen var 240 °C og detektortemperatur 250 °C. Det ble brukt to

programmer; Aut 06 og SPR 10-4. Aut 06 ble brukt på produkt 1, 2, 3, 4 og 6, mens SPR 10-4 ble brukt på produkt 5, 7, 8, 9 og 10. Injeksjonsvolum for alle kjøringene på program AUT-06 og standarder på program SPR 10-4 var 1 µl, mens injeksjonsvolumet ble satt til 2 µl på produkt 5, 7, 8, 9 og 10.

Aut 06:

Tabell 3.4.2.1: Gradienten for program Aut 06.

°C/min	°C	Holdetid (min)	Kjøretid (min)
	50	2	2
10	150	0	12
2	205	0	39,5
15	255	10	52,83

Standardene som ble brukt var

PUFA-1, Marine Source, fra Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA)

PUFA-2, Animal Source, fra Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA)

PUFA-3, Menhaden Oil, fra Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA)

F.A.M.E. mix GLC 40 og GLC 50 fra Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA).

SPR 10-4:

Tabell 3.4.2.2: Gradienten for program SPR 10-4.

°C/min	°C	Holdetid (min)	Kjøretid (min)
	50	2	2
10	150	0	12
1	205	0	67
15	255	10	80,333

Standardene som ble brukt var PUFA-1, 2 og 3 og F.A.M.E. mix GLC 10, GLC 40, GLC 50, GLC 411, GLC 68D og GLC 96 fra Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA).

3.5 Fast-fase ekstraksjon

I elueringsmetode 0-8 ble det brukt 500 mg Sep-Pak Vac 3cc sertifiserte silikakolonner fra Waters (Irland). Alle fraksjoner ble dampet ned under N_2 og resuspendert i 100-1000 μ l diklormetan før tynnsjiktanalyse. Elueringsmetode 0 og 1 ble utført på produkt 1, mens elueringsmetode 2 og 3 ble utført på produkt 1 og 10. Elueringsmetode 4-9 ble utført på produkt 10.

Elueringsmetode 0-3:

Oljeprøvene ble løst i heptan til en konsentrasjon på ca. 25 mg/ml. Kolonnen ble vasket med 3ml heptan før 1 ml av prøven ble applisert.

Elueringsmetode 4:

Oljeprøvene ble løst i heptan til en konsentrasjon på ca. 20 mg/ml. Kolonnen ble vasket med 3ml heptan før 1 ml av prøven ble applisert.

Elueringsmetode 5:

Kolonnen ble vasket med 3ml heptan:eddiksyre (100:1) v/v før applisering av ca. 20 mg olje løst opp 100 μ l av samme løsemiddel.

Elueringsmetode 6-7:

Det ble lagt et tynt lag med Na_2SO_4 på kolonnen før den ble vasket med 3ml diklormetan og 3ml heptan:eddiksyre (100:1) v/v før ca.10mg olje løst opp i 100 μ l heptan:eddiksyre (100:1) v/v ble applisert.

Elueringsmetode 8:

Det ble lagt et tynt lag med Na_2SO_4 på kolonnen før den ble vasket med først 3 ml diklormetan og deretter 3 ml heptan. Ca.10 mg olje løst opp i 100 μ l heptan ble applisert.

Elueringsmetode 9:

Det ble lagt et tynt lag med Na_2SO_4 på kolonnen før den ble vasket med først 3 ml diklormetan og deretter 3 ml heptan. Ca. 5 mg olje løst i 100 μ l heptan ble applisert.

Tabell 3.5.1: Elueringsmetode 0 og 1, produkt 1.

Elueringsmetode 0			Elueringsmetode 1		
Fr.	Volum (ml)	Eluent	Fr.	Volum (ml)	Eluent
1,2,3	3x3	Heptan:DCM (1:1) v/v	1,2	3x2	Heptan: dietyleter: eddiksyre (90:10:1) v/v/v
4,5	2x3	DCM	3	3	Heptan: dietyleter: eddiksyre (70:30:1) v/v/v
6,7	2x3	DCM:etylacetat (1:1) v/v	4	3	Heptan: dietyleter: eddiksyre (50:50:1) v/v/v
8	6	Etylacetat	5	3	Metanol

Tabell 3.5.2: Elueringsmetode 2 og 3, produkt 1 og 10.

Elueringsmetode 2			Elueringsmetode 3		
Fr.	Volum (ml)	Eluent	Fr.	Volum (ml)	Eluent
1	4	Heptan	1	4	Heptan
2	6	Heptan: dietyleter: eddiksyre (90:10:1) v/v/v	2	4	Heptan: DCM (80:20) v/v
3	4	Heptan: dietyleter: eddiksyre (70:30:1) v/v/v	3	4	Heptan: dietyleter: eddiksyre (70:30:1) v/v/v
4	5	Metanol:trietylamin (100:1) v/v	4	4	Metanol:trietylamin (100:1) v/v

Tabell 3.5.3: Eleringsmetode 4 og 5, produkt 10.

Elueringsmetode 4			Elueringsmetode 5		
Fr.	Volum (ml)	Eluent	Fr.	Volum (ml)	Eluent
1,2	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (50:50:1) v/v/v	1,2	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (90:10:1) v/v/v
3,4	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (40:60:1) v/v/v	3,4	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (80:20:1) v/v/v
5,6	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (20:80:1) v/v/v	5,6,7,8	2x4	Heptan:DCM:eddiksyre (70:30:1) v/v/v
7	4	Heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1) v/v/v	9	4	Heptan:DCM (50:50) v/v
8	4	Metanol: trietylamin (100:1) v/v	10	4	Metanol: trietylamin (100:1) v/v

Tabell 3.5.4: Elueringsmetode 6 og 7, produkt 10.

Elueringsmetode 6			Elueringsmetode 7		
Fr.	Volum (ml)	Eluent	Fr.	Volum (ml)	Eluent
1,2	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (95:5:1) v/v/v	1,2	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (90:10:1) v/v/v
3,4	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (90:10:1) v/v/v	3,4	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (70:30:1) v/v/v
5,6	2x2	Heptan:DCM: eddiksyre (80:20:1) v/v/v	5,6	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (50:50:1) v/v/v
7	4	Metanol: trietylamin (100:1) v/v	7	4	Metanol: trietylamin (100:1) v/v

Tabell 3.5.5: Elueringsmetode 8 og 9, produkt 10.

Elueringsmetode 8			Elueringsmetode 9		
Fr.	Volum (ml)	Eluent	Fr.	Volum (ml)	Eluent
1, 2, 3	2x3	Heptan:DCM (95:5) v/v	1	4	Heptan:etylacetat (95:5) v/v
4, 5, 6	2x3	Heptan:DCM (90:10) v/v	2	4	Heptan:DCM (90:10) v/v
7, 8	2x2	Heptan:DCM:eddiksyre (90:10:1) v/v/v	3	4	Heptan:DCM:eddiksyre (90:10:1) v/v/v
9, 10	2x2	Heptan:DCM (70:30) v/v	4	4	Heptan:etylacetat (80:20) v/v
11	4	Metanol	5	4	Heptan:etylacetat (70:30) v/v
			6	4	Metanol

4. Resultater

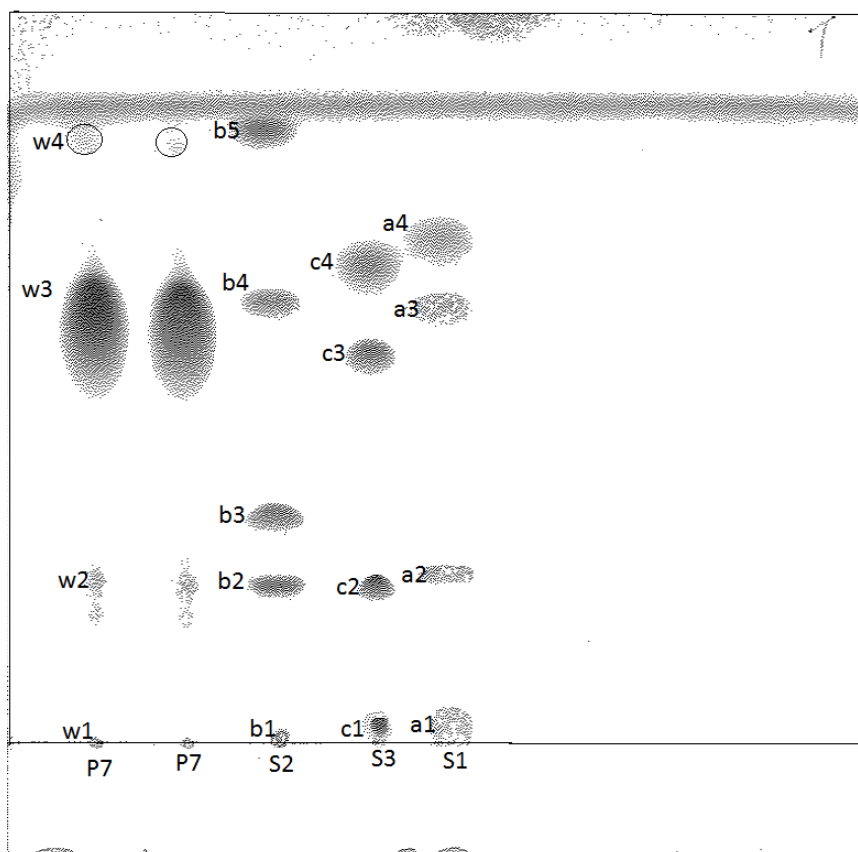
4.1 Bestemmelse av lipidklasser ved hjelp av tynnsjiktskromatografi.

Alle omega-3 produktene ble analysert med tynnsjiktskromatografi for å bestemme hvilke lipidklasser produktene inneholdt. Tabell 4.1.1 gir en oversikt over lipidklassene med tilhørende estimerte retensjonsfaktorer i de ulike produktene. I elueringsmiddelet som er brukt er det noen lipidklasser som separeres svært dårlig. Dette er tilfellet for fosfolipider og monoacylglyseroler, for diacylglyseroler og kolesterol og for voksester og kolesterylester. På grunn av små forskjeller i sammensetningen av elueringsmiddelet fra plate til plate er det enklere å skille fosfolipider og monoacylglyserider i noen kjøringene enn i andre. Jeg vil derfor i enkelte tilfeller skrive at produktene inneholder fosfolipider eller monoacylglyseroler, mens jeg i andre tilfeller skriver at produktene inneholder fosfolipider og/-eller monoacylglyseroler.

Tabell 4.1.1: En oversikt over hvilke lipidklasser produktene inneholder og estimerte R_f -verdier. FL:fosfolipider, MAG:monoacylglyserol, DAG:diacylglyserol, K:kolesterol, FF: frie fettsyrer, TAG:triacylglyserol, EE:etylester, KE:kolesterylester, VE:voksester

Lipidklassene med tilhørende R_f -verdier								
Produkt	FL	MAG	DAG	K	FF	TAG	EE	KE/ VE
1	0	0,02	0,13-0,21	0,20	0,28	0,54-0,70	0,74	0,90
2	-	-	0,05-0,11	0,1	-	0,40-0,55	-	-
3	0	0,02	0,03-0,08	0,06	0,19	0,30-0,40	-	-
4	-	0,02	0,14-0,21	0,18	0,28	0,51-0,64	0,76	-
5	-	-	0,04-0,14	0,13	-	0,36-0,54	-	-
6	0	-	0,04-0,13	0,12	0,24	0,40-0,54	0,75	0,91
7	0	-	0,17-0,27	0,25	-	0,57-0,73	-	0,92
8	0	0,02	0,13-0,21	0,20	0,28	0,54-0,70	0,74	-
9	-	0,02	0,14-0,21	0,18	0,28	0,51-0,64	0,76	-
10	0	-	0,13-0,20	0,19	0,28	0,55-0,70	0,73	0,90

Produkt 4 har en flekk med R_f verdi 0,51 som ikke tilsvarer noen av standardene som ble brukt.

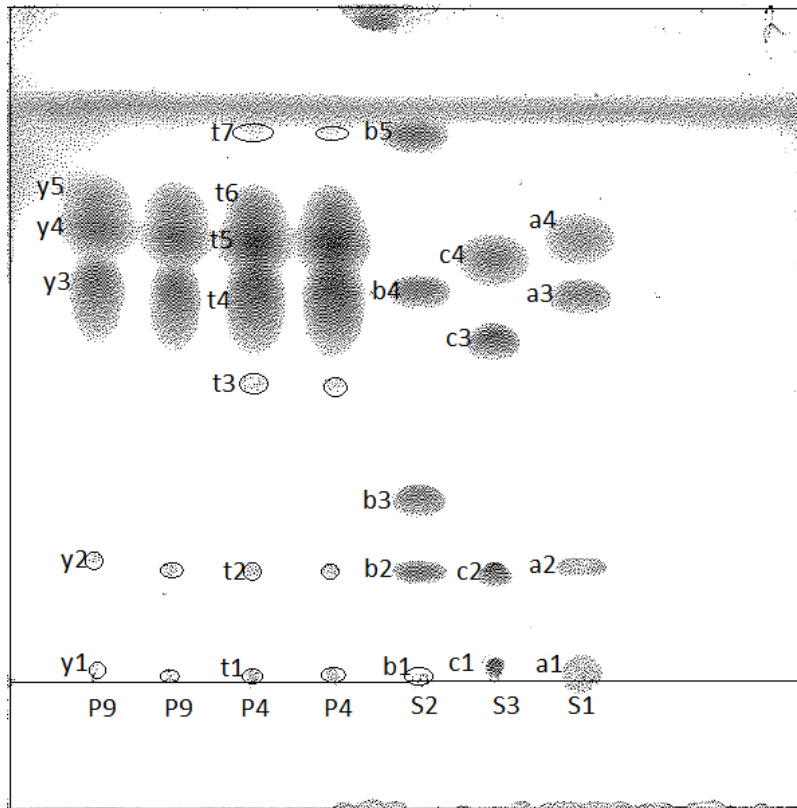


Figur 4.1.1: TLC av produkt 7 (P7), en konsentrert fiskeolje. S1: monopalmitin (a1), dipalmitin (a2), tripalmitin (a3), metylpalmitin (a4). S2: Lechitin (b1), kolesterol (b2), oljesyre (b3), triolein (b4), kolesteryloleat (b5). S3: monolinolenin (c1), dilinolenin (c2), trilinolenin (c3), metyllinolenat (c4).

Produkt 7 (figur 4.1.1) inneholder en liten andel av fosfolipider (w1) og diacylglyseroler (w2). Ettersom diacylglyseroler og kolesterol har tilnærmet lik retensjonsfaktor kan en ikke si om w2 består av bare diacylglyseroler eller begge deler. Av flekkens intensitet og størrelse, kan en si at den største andelen av produkt 7 er triacylglyseroler (w3). Som for kolesterol og diacylglyseroler, har kolesteryllestere og voksesterer tilnærmet lik retensjonsfaktor og en kan derfor ikke si med sikkerhet om produkt 7 inneholder kolesteryllestere og/eller voksesterer (w4).

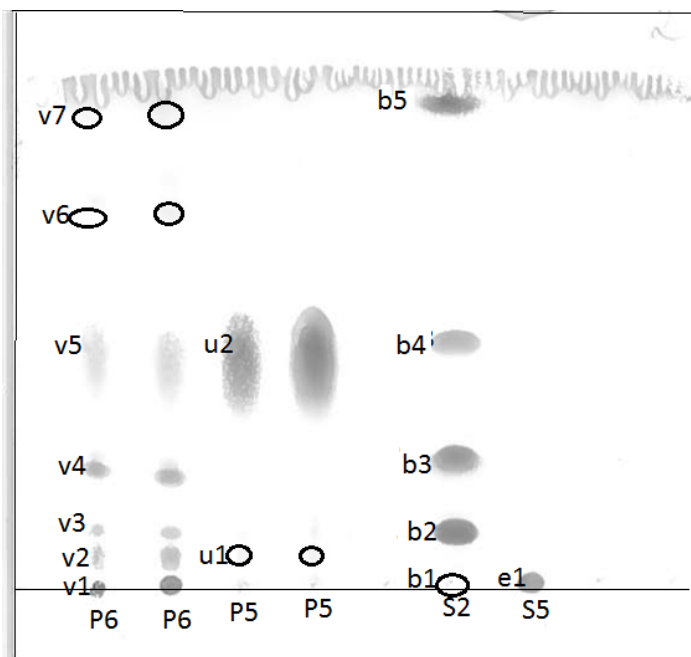
Produkt 4 og 9 (figur 4.1.2) er av samme produsent og merke, men med ulike batch nummer. Både produkt 9 og 4 inneholder en liten andel monoacylglyseroler (y1, t1) og diacylglyseroler og/eller kolesterol (y2, t2). Flekkene y3, y4, y5 i produkt 9 og t4, t5, t6 i produkt 4 er svært dårlig separert, men y3 og t4 antas å være triacylglyseroler. Flekkene y4 og t5 har overlappende retensjonsfaktorer med metylestere i standarden og er mest sannsynlig etylestere. De to flekkene y5 og t6 overlapper ikke med standardene, men kan være etylestere

med lengre fettsyrekjeder og/-eller fettsyreetylestere med færre dobbeltbindinger enn i y4 og t5. Produkt 4 har to flekker (t3 og t7) som ikke er å finne i produkt 9. Flekk t3 vandrer kortere enn triacylglyseridene men lengre enn frie fettsyrer. Flekk t7 er voksesterer og/-eller kolesterylestere. Produktene inneholder ca. 50/50 triacylglyseroler og etylestere.



Figur 4.1.2: TLC av produkt 4 og 9 (P4, P9) som begge er en blanding av tran og konsentrert fiskeolje. Produktene er av samme produsent og merke, men har ulike batch nr. . S1: monopalmitin(a1), dipalmitin(a2), tripalmitin(a3), metylpalmitin(a4). S2: Lechitin(b1), kolesterol(b2), oljesyre(b3), triolein(b4), kolesteryloleat(b5). S3: monolinolenin(c1), dilinolenin(c2), trilinolenin(c3), metyllinolenat(c4).

Produkt 6 (figur 4.1.3) inneholder fosfolipider (v1), frie fettsyrer (v4), triacylglyseroler (v5), etylestere (v6) og kolesterylestere og/-eller voksesterer (v7). Flekk v2 antas å være diacylglyseroler, mens v3 kan være en blanding av diacylglyseroler og kolesterol. Fosfolipider og triacylglyseroler og deretter frie fettsyrer er de dominerende fettklassene i produkt 6, mens produkt 5 (figur 4.1.3) ser ut til å inneholde nesten utelukkende triacylglyseroler (u2). Flekk u1 kan nesten ikke ses men antas å være diacylglyseroler.

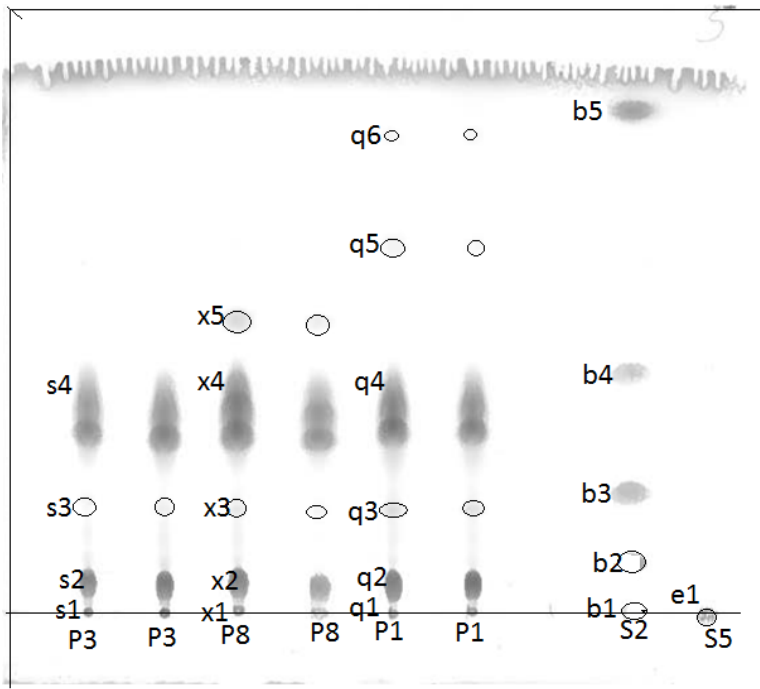


Figur 4.1.3: Tynnsjiktskromatografi av produkt 5 (P5), en konsentrert selolje og produkt 6 (P6), en krillolje. S2: Lechitin(b1), kolesterol(b2), oljesyre(b3), triolein(b4), kolesteryloleat (b5). S5: fosfolipider (e1)

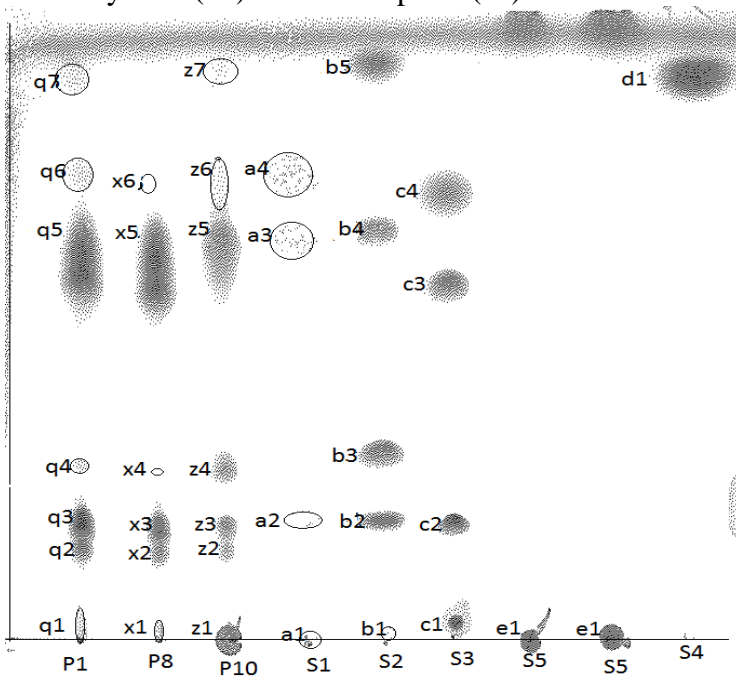
Produkt 3 (figur 4.1.4) inneholder fosfolipider og/-eller monoacylglyseroler (s1), diacylglyseroler og kanskje kolesterol (s2), frie fettsyrer (s3) og triacylglyseroler (s4). De dominerende fettklassene i produktet er triacylglyseroler og diacylglyseroler/kolesterol, hvor det er klart mest av triacylglyserolene.

Produkt 1 og 8 ble kjørt på nytt (figur 4.1.5) fordi det viste seg å være utilstrekkelig med standarder på platen vist i figur 4.1.4. Produkt 6 (figur 4.1.3) og produkt 10 (figur 4.1.5) er av samme produsent og merke og med identisk batchnr. Produkt 1 og 8 (figur 4.1.5) inneholder monoacylglyseroler (q1, x1), mens produkt 10 inneholder fosfolipider (z3). Videre inneholder produktene; diacylglyseroler (q2, x2, z2), diacylglyseroler og/-eller kolesterol (q3, x3, z3), frie fettsyrer (q4, x4, z4) og triacylglyseroler (q5, x5, z5). Det antas at q6, x6 og z6 er etylestere. Produkt 1 og 10 inneholder også kolesterylestere og/-eller voksestere (q7, z7). I produkt 10 er fosfolipidene og triacylglyserolene de dominerende fettklassene. Produkt 1 og 8 inneholder mest av triacylglyseroler og diacylglyseroler.

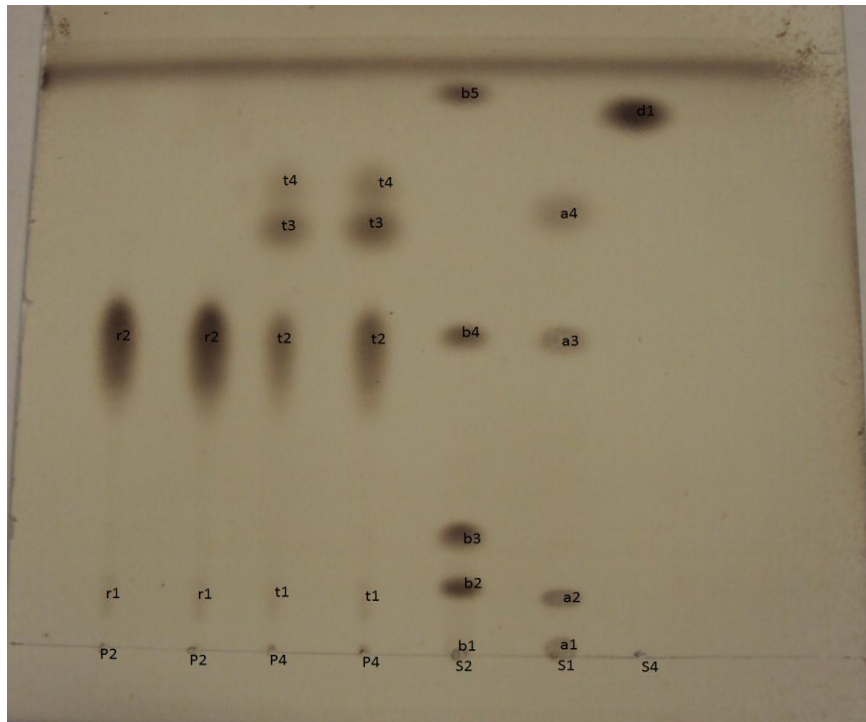
Produkt 2 (figur 4.1.6) inneholder hovedsakelig triacylglyseroler (r2) men også noe diacylglyseroler og kanskje kolesterol (r1).



Figur 4.1.4: Tynnsjikt-kromatografi av produkt 1, en fiskeolje, og produkt 3 og 8 som begge er konsentrerte fiskeoljer. S2: Lechitin(b1), kolesterol(b2), oljesyre(b3), triolein(b4), kolesteryloleat(b5). S5: fosfolipider (e1)



Figur 4.1.5: Resultatet av TLC-analysen til produkt 1(P1), en fiskeolje, produkt 8 (P8), en konsentrert fiskeolje og produkt 10, en krillolje. S1: monopalmitin(a1), dipalmitin(a2), tripalmitin(a3), metylpalmitin(a4). S2: Lechitin(b1), kolesterol(b2), oljesyre(b3), triolein(b4), kolesteryloleat(b5). S3: monolinolenin(c1), dilinolenin(c2), trilinolenin(c3), metyllinolenat(c4). S4: myristyloleat (d1). S5: fosfolipider (e1).



Figur 4.1.6: Tynnsjiktskromatografi av produkt 2 (P2), ren tran, og produkt 4(P4), en konsentrert blanding av tran og fiskeolje. S1: monopalmitin(a1), dipalmitin(a2), tripalmitin(a3), metylpalmitin(a4). S2: Lecitin(b1), kolesterol(b2), oljesyre(b3), triolein(b4), kolesterylloleat(b5). S4: myristylloleat (d1).

4.2 Fettsyresammensetning av omega-3 produktene

Alle produkter ble analysert med GC-FID for å opprette en fettsyreprofil. Produkt 1, 2, 3, 4 og 6 ble kjørt på program AUT 06, mens produkt 5, 7, 8, 9 og 10 ble kjørt på program SPR 10-4. Alle kromatogrammer kan ses i appendiks.

Tabell 4.2.1: Retensjonstider (R_t) for fettsyremetylerne i PUFA-1, 2 og 3 og GLC-40 og 50 kjørt på program AUT 06. Retensjonstiden er oppgitt i minutt.

	PUFA-1	PUFA-2	PUFA-3	GLC-40	GLC-50
Fettsyre	R_t	R_t	R_t	R_t	R_t
14:0	17,338	-	17,365	-	-
16:0	20,879	20,903	20,882	20,931	-
16:1	21,831	-	-	-	21,893
16:1 (<i>n</i> -7)	-	21,827	21,835	-	-
16:2(<i>n</i> -4)	-	-	23,532	-	-
16:3(<i>n</i> -4)	-	-	24,679	-	-
18:0	25,177	25,230	25,161	25,258	-
18:1	-	-	-	-	26,217
18:1(<i>n</i> -9)	26,131	26,175	26,123	-	-
18:1(<i>n</i> -7)	26,299	26,317	26,295	-	-
18:2(<i>n</i> -6)	27,770	27,814	27,765	-	-
18:3(<i>n</i> -6)	-	28,973	-	-	-
18:3(<i>n</i> -4)	-	-	29,839*	-	-
18:3(<i>n</i> -3)	-	29,850	29,839*	-	-
18:4(<i>n</i> -3)	31,019	-	31,001	-	-
20:0	-	-	-	30,129	-
20:1	-	-	-	-	31,167
20:1(<i>n</i> -9)	31,104	-	31,113	-	-
20:4(<i>n</i> -6)	-	34,975	-	-	-
20:4(<i>n</i> -3)	-	-	36,280**	-	-
20:5(<i>n</i> -3)	37,232	37,214	37,268	-	-
22:0	-	-	-	35,214	-
22:1(<i>n</i> -9)	-	-	-	-	36,279**
22:5(<i>n</i> -3)	41,636	-	41,635	-	-
22:4(<i>n</i> -6)	-	40,218	-	-	-
22:6(<i>n</i> -3)	42,053	42,043	42,062	-	-

* I PUFA-3 ser det ikke ut til at 18:3(*n*-3) og 18:3(*n*-4) har blitt tilstrekkelig separert og det er derfor ikke mulig å avgjøre om toppen med retensjonstid 29,839 er den ene eller den andre.

**22:1(*n*-9) og 20:4(*n*-3) co-kromatograferer med retensjonstider på hhv. 36,279 og 36,280.

Fettsyresammensetningen i produktene er relativt lik og alle produkter inneholder de langkjedete omega-3 fettsyrene EPA, DPA og DHA (tabell 4.2.2 og 4.2.6). Fettsyrene 16:0, 16:1(*n*-7), 18:0, 18:2(*n*-6), 20:1(*n*-9), 20:4(*n*-3) og/-eller 22:1(*n*-9) og ulike isomerer av 18:1 er også å finne i alle produkter. Produkt 1 skiller seg ut med og ikke inneholde 14:0, mens 14:1 bare ble funnet i produkt 7 og 10. 16:2(*n*-4) ble funnet i produkt 5, 7 og 10 og 16:3(*n*-4) ble funnet i produkt 7. Produkt 4-10 inneholder 18:3, enten som 18:3(*n*-4), 18:3(*n*-3) eller begge deler.

Tabell 4.2.2: Påviste fettsyrer med retensjonstider (R_t) til produkt 1, 2, 3, 4 og 6, kjørt på program AUT-06. Spørsmålsteget menes med at det ikke ble funnet en tilsvarende retensjonstid i standardene. Retensjonstiden er oppgitt i minutt.

Produkt 1		Produkt 2		Produkt 3		Produkt 4		Produkt 6	
R_t	Fame	R_t	Fame.	R_t	Fame	R_t	Fame	R_t	Fame
20,901	16:0	17,390	14:0	17,425	14:0	17,399	14:0	17,379	14:0
21,855	16:1(<i>n</i> -7)	20,878	16:0	20,904	16:0	20,879	16:0	20,879	16:0
25,162	18:0	21,826	16:1(<i>n</i> -7)	21,854	16:1(<i>n</i> -7)	21,828	16:1(<i>n</i> -7)	21,826	16:1(<i>n</i> -7)
26,093	18:1(<i>n</i> -9)	25,177	18:0	25,169	18:0	25,173	18:0	25,182	18:0
27,771	18:2(<i>n</i> -6)	25,944	18:1(<i>n</i> -12)*	26,095	18:1(<i>n</i> -9)	25,943	18:1(<i>n</i> -12)*	26,094	18:1(<i>n</i> -9)
31,001	18:4(<i>n</i> -3)	26,109	18:1(<i>n</i> -9)	26,299	18:1(<i>n</i> -7)	26,116	18:1(<i>n</i> -9)	26,295	18:1(<i>n</i> -7)
31,109	20:1(<i>n</i> -9)	26,291	18:1(<i>n</i> -7)	27,769	18:2(<i>n</i> -6)	26,294	18:1(<i>n</i> -7)	27,760	18:2(<i>n</i> -6)
34,929	20:4(<i>n</i> -6)	27,761	18:2(<i>n</i> -6)	31,009	18:4(<i>n</i> -3)	27,759	18:2(<i>n</i> -6)	29,833	18:3***
36,280	22:1(<i>n</i> -9)**	31,011	18:4(<i>n</i> -3)	31,112	20:1(<i>n</i> -9)	29,832	18:3***	31,102	20:1(<i>n</i> -9)
37,237	20:5(<i>n</i> -3)	31,106	20:1(<i>n</i> -6)	34,931	20:4(<i>n</i> -6)	31,019	18:4(<i>n</i> -3)	34,927	20:4(<i>n</i> -6)
40,054	?	35,899	?	35,915	?	31,106	20:1(<i>n</i> -9)	36,291	22:1(<i>n</i> -9)**
40,745	?	36,271	22:1(<i>n</i> -9)**	36,288	22:1(<i>n</i> -9)**	34,936	20:4(<i>n</i> -6)	37,245	20:5(<i>n</i> -3)
41,636	22:5(<i>n</i> -3)	37,226	20:5(<i>n</i> -3)	37,280	20:5(<i>n</i> -3)	35,912	?	40,065	?
42,077	22:6(<i>n</i> -3)	40,063	?	40,056	?	36,281	22:1(<i>n</i> -9)**	41,636	22:5(<i>n</i> -3)
		41,633	22:5(<i>n</i> -3)	40,749	?	37,283	20:5(<i>n</i> -3)	42,048	22:6(<i>n</i> -3)
		42,051	22:6(<i>n</i> -3)	41,636	22:5(<i>n</i> -3)	40,059	?		
				42,067	22:6(<i>n</i> -3)	40,750	?		
						41,638	22:5(<i>n</i> -3)		
						42,071	22:6(<i>n</i> -3)		

*18:1(*n*-12) er ikke å finne i standardene, men ettersom 18:1(*n*-12) alltid eluerer litt før 18:1(*n*-9) er det fornuftig å anta at toppene med retensjonstid 25,943 og 25,944 er 18:1(*n*-12). ** 22:1(*n*-9) co- kromatograferer med 20:4(*n*-3) og en kan derfor ikke vite om toppene med retensjonstid 36,288, 36,281 og 36,291 er den ene eller den andre fettsyren. *** Ettersom 18:3(*n*-3) og 18:3(*n*-4) co-kromatograferer oppføres bare 18:3 i tabellen.****Det antas at 18:4(*n*-3) co-kromatograferer med 20:1(*n*-12).

I program SPR 10-4 ble det brukt standarder som inneholdt både 18:4(*n*-3) og 20:1(*n*-12), noe som viste at disse co-kromatograferer. I program AUT 06 ble bare standarder med 18:4(*n*-3) brukt, men det antas likevel at 18:4(*n*-3) co-kromatograferer med 20:1(*n*-12) også i dette programmet. Det ble funnet 18:4(*n*-3) og/-eller 20:1(*n*-12) og 20:4(*n*-6) i alle produkter utenom hhv. produkt 6 og produkt 2. Fettsyrene 20:0 og 20:2 ble bare funnet i produkt 8, mens fettsyrene 22:1(*n*-11) og 24:1 ble funnet i hhv. produkt 5, 8, 9 og produkt 8 og 9.

Tabell 4.2.3:Fettsyresammensetning (areal %) i produkt 1, 2, 3, 4 og 6, kjørt på program AUT-06.

	Produkt 1	Produkt 2	Produkt 3	Produkt 4	Produkt 6
Fettsyre	Areal %	Areal %	Areal %	Areal %	Areal %
14:0	-	4,13	0,65	1,86	12,3
16:0	1,78	11,9	2,04	6,82	21,9
16:1 (<i>n</i> -7)	0,58	8,00	1,25	4,00	8,00
18:0	3,49	2,40	2,86	2,93	1,35
18:1(<i>n</i> -12)	-	2,58*	-	1,27*	-
18:1(<i>n</i> -9)	5,80	15,7	6,21	11,7	11,2
18:1(<i>n</i> -7)	-	4,87	2,50	4,00	7,68
18:2(<i>n</i> -6)	0,67	1,78	0,63	1,09	1,62
18:3	-	-	-	0,61***	0,60***
18:4(<i>n</i> -3)	1,51****	0,34****	1,46****	6,84****	-
20:1(<i>n</i> -9)	0,80	2,15	1,43	2,27	2,81
20:4(<i>n</i> -6)	2,50	-	1,93	1,30	0,50
20:4(<i>n</i> -3)	1,00**	0,68**	1,71**	1,14**	0,26**
22:1(<i>n</i> -9)	1,00**	0,68**	1,71**	1,14**	0,26**
20:5(<i>n</i> -3)	22,0	9,00	39,2	21,9	20,2
22:5(<i>n</i> -3)	5,10	1,45	6,23	3,56	0,42
22:6(<i>n</i> -3)	46,1	12,11	26,9	16,9	7,12
Ukjent(e)	5	8	5	7,6	0,5
Sum total	96,3	88,1	100	95,8	96,5
Sum mettede	5,27	18,4	5,55	11,6	35,6
Sum enumettede	7,18	33,3	11,4	23,2	29,7
Sum flerumettede	3,17	1,78	2,56	1,7	2,72
Sum	73,2	22,6	72,3	42,4	27,7
DHA/EPA/DPA					

,** Disse arealprosentene er bare tatt med en gang i sum total, og er ikke tatt med i sum flerumettede eller sum enumettede. *,**,***, ****: Se tabell 4.3.2 for mer detaljert beskrivelse.

Alle produkter hadde topper med retensjonstider som ikke samsvarte med noen av retensjonstidene i standardene. Retensjonstidene gikk igjen fra produkt til produkt og var også svært like. I produkt 1, 2, 3, 4 og 6 ble det funnet topper med retensjonstider på hhv. 40,054, 40,063, 40,056, 40,059, 40,065.

Tabell 4.2.4: Retensjonstider for fettsyremetylene i PUFA-1,2 og 3 kjørt på program SPR 10-4. Retensjonstiden er oppgitt i minutt.

	PUFA-1	PUFA-2	PUFA-3
Fame	R _t	R _t	R _t
14:0	17,574	17,621	17,570
16:0	21,804	21,810	21,803
16:1	23,001	-	-
16:1 (n-7)	-	22,993	23,000
16:2(n-4)	-	-	25,273
16:3(n-4)	-	-	26,841
18:0	27,764	27,808	27,774
18:1(n-9)	29,099	29,143	29,071
18:1(n-7)	29,364	29,363	29,363
18:2(n-6)	31,552	31,591	31,537
18:3(n-6)	-	33,364	-
18:3(n-4)	-	-	34,304*
18:3(n-3)	-	34,779	34,767
18:4(n-3)	36,649**	-	36,762**
20:1(n-9)	36,924	36,954	36,929
20:4(n-6)	-	43,402	43,335
20:4(n-3)	-	-	45,730***
20:5(n-3)	47,306	47,296	47,323
22:1(n-11)	45,476	-	-
22:1(n-9)	45,731***	-	-
22:5(n-3)	57,278	-	57,285
22:4(n-6)	-	53,233	-
22:6(n-3)	58,696	58,697	58,704
24:1	55,185		

* Det er noe usikkert om 18:3(n-4) eluerte ved denne retensjonstiden eller om den eluerte ved samme retensjonstid som 18:3(n-3).** Retensjonstidene for 18:4(n-3) er svært usikre. I PUFA-1 er det en topp med retensjonstid 34,773, en tid som samsvarer 18:3(n-3) i andre standarder (tabell 4.2.5), men denne fettsyren er ikke oppgitt i sertifikatet til PUFA-1 fra produsenten. I PUFA-3 er det ingen topper mellom tidene 34,767 og 36,762.***22:1(n-9) og 20:4(n-3) co-kromatograferer med retensjonstider på hhv. 45,731 og 45,730.

Tabell 4.2.5:Retensjonstider for fettsyremetylerne i GLC- 411, 68D, 96, 40, 10 og 50 kjørt på program SPR 10-4.

	GLC-411	GLC-68D	GLC-96	GLC-40	GLC-10	GLC-50
Fame	R _t	R _t	R _t	R _t	R _t	R _t
8:0	9,883	-	-	-	-	-
10:0	12,223	-	-	-	-	-
12:0	14,582	-	-	-	-	-
12:1	15,460	-	-	-	-	-
14:0	17,582	17,562	17,618	-	-	-
14:1	18,627	18,595	-	-	-	-
16:0	21,824	21,955	21,818	21,831	21,813	-
16:1	23,022	23,065	22,997	-	-	23,035
17:0	-	-	24,573	-	-	-
18:0	27,769	27,980	27,863	27,835	27,830	-
18:1 (n-12)	28,921	-	-	-	-	-
18:1(n-9)	29,053	29,291	29,185	-	29,127	29,166
18:1(n-7)	29,366	29,509	-	-	-	-
18:2(n-6)	31,560	31,627	31,633	-	31,634	-
18:3(n-6)	33,377	-	-	-	-	-
18:3(n-3)	34,784	34,848	34,804	-	34,849	-
20:0	35,387	35,483	35,406	35,499	-	-
20:1(n-15)	36,248	-	-	-	-	-
20:1(n-12)	36,622**	-	-	-	-	-
20:1(n-9)	36,924	37,192	36,961	-	-	37,077
20:2(n-6)	39,915	39,987	39,946	-	-	-
20:3(n-3)	43,589	43,649	43,550	-	-	-
20:3(n-6)	41,943	-	41,986	-	-	-
20:4 (n-6)	43,398	43,465	-	-	-	-
20:5(n-3)	-	47,519	-	-	-	-
22:0	44,122	44,200	44,131	44,281	-	-
22:1	45,818	46,013	45,842	-	-	46,035
22:2	49,083	-	49,078	-	-	-
22:3	52,973	-	-	-	-	-
22:4	53,248*	-	53,233	-	-	-
24:0	53,248*	53,387	53,453	-	-	-
24:1	55,166	55,214	55,257	-	-	-
22:6(n-3)	58,688	58,965	58,701	-	-	-

*Det antas at 22:4 og 24:0 ikke ble separert i GLC-411. Ut fra kromatogrammet for GLC-411 (figur..)kan en se at toppen med retensjonstid 53,248 har lengre toppbredde enn de andre toppene i kromatogrammet.** 20:1(n-12) co-kromatograferer med 18:4(n-3) (se tabell 4.2.4).

Tabell 4.2.6: Påviste fettsyrer med retensjonstider (R_t) til produkt 5, 7, 8, 9 og 10, kjørt på program SPR 10-4. Spørsmålsteget menes med at det ikke ble funnet tilsvarende retensjonstid i standardene. Retensjonstiden er oppgitt i minutt.

Produkt 5		Produkt 7		Produkt 8		Produkt 9		Produkt 10	
R_t	Fame	R_t	Fame.	R_t	Fame	R_t	Fame	R_t	Fame
17,573	14:0	17,565	14:0	17,608	14:0	17,580	14:0	17,547	14:0
18,625	14:1	18,573	14:1	21,814	16:0	19,525	?	18,579	14:1
19,527	?	19,521	?	23,017	16:1(n-7)	21,783	16:0	19,521	?
21,800	16:0	21,792	16:0	27,725	18:0	22,983	16:1(n-7)	21,816	16:0
22,998	16:1(n-7)	22,988	16:1(n-7)	29,032	18:1(n-9)	27,736	18:0	22,353	?
25,265	16:2(n-4)	25,266	16:2(n-4)	29,347	18:1(n-7)	28,804	18:1(n-12)	22,986	16:1(n-7)
27,781	18:0	26,835	16:3(n-4)	31,521	18:2(n-6)	29,079	18:1(n-9)	24,414	?
28,823	18:1(n-12)	27,743	18:0	34,752	18:3***	29,333	18:1(n-7)	25,260	16:2(n-4)
29,083	18:1(n-9)	29,048	18:1(n-9)	35,331	20:0	31,521	18:2(n-6)	27,740	18:0
29,350	18:1(n-7)	29,348	18:1(n-7)	36,752	20:1(n-12)*	34,744	18:3***	29,040	18:1(n-9)
31,525	18:2(n-6)	31,519	18:2(n-6)	36,890	20:1(n-9)	36,745	20:1(n-12)*	29,347	18:1(n-7)
34,756	18:3***	34,755	18:3***	39,857	20:2	36,887	20:1(n-9)	31,514	18:2(n-6)
36,619	20:1(n-12)*	36,750	20:1(n-12)*	43,317	20:4(n-6)	39,846	20:2	34,743	18:3***
36,899	20:1(n-9)	36,902	20:1(n-9)	45,452	22:1(n-11)	43,312	20:4(n-6)	36,742	20:1(n-12)*
43,360	20:4(n-6)	43,321	20:4(n-6)	45,707	22:1(n-9)**	45,435	22:1(n-11)	36,892	20:1(n-9)
45,446	22:1(n-11)	45,723	22:1(n-9)**	47,381	20:5(n-3)	45,705	22:1(n-9)**	43,309	20:4(n-6)
45,709	22:1(n-9)**	47,300	20:5(n-3)	52,646	?	47,331	20:5(n-3)	45,747	22:1(n-9)**
47,289	20:5(n-3)	52,644	?	54,473	?	52,636	?	47,311	20:5(n-3)
57,267	22:5(n-3)	57,263	22:5(n-3)	55,111	24:1	54,468	?	52,631	?
58,674	22:6(n-3)	58,670	22:6(n-3)	57,260	22:5(n-3)	55,108	24:1	57,255	22:5(n-3)
				58,746	22:6(n-3)	57,255	22:5(n-3)	58,653	22:6(n-3)
						58,706	22:6(n-3)		

.* 20:1(n-12) co-kromatograferer med 18:4(n-3) og en kan derfor ikke vite om produktene inneholder begge eller bare en av fettsyrene. ** 22:1(n-9) og 20:4(n-3) co-kromatograferer og en kan derfor ikke vite om produktene inneholder begge eller bare en av fettsyrene. *** Ettersom det er usikkerhet rundt retensjonstiden til 18:3(n-3) og 18:3(n-4) oppføres bare 18:3 i tabellen.

I produkt 2, 3 og 4 ble det også funnet topper med retensjonstidene 35,899, 35,915, 35,912 og i produkt 1, 3, og 4 ble det funnet topper med retensjonstidene 40,745, 40,747 og 40,750. Produkt 5, 7, 9 og 10 hadde topper med retensjonstider på hhv. 19,527, 19,521, 19,525, 19,521 og produkt 7, 8, 9 og 10 topper med retensjonstider 52,644, 52,646, 52,636, 52,631. Videre har produkt 8 og 9 topper med retensjonstidene 54,473 og 54,468. Produkt 10 har i tillegg to topper med retensjonstidene 22,353 og 24,414.

Tabell 4.2.7: Fettsyresammensetning (areal %) i produkt 5, 7, 8, 9 og 10, kjørt på program SPR 10-4. Spørsmålstegn menes med at arealet til disse fettsyrene var så lite relativt til de andre at de ikke ble regnet med i det totale arealet og derfor heller ikke i arealprosent.

	Produkt 5	Produkt 7	Produkt 8	Produkt 9	Produkt 10
Fame	Areal %	Areal %	Areal %	Areal %	Areal %
14:0	5,42	8,56	0,81	2,58	13,0
14:1	-	?	-	-	?
16:0	10,2	23,1	2,65	10,3	27,8
16:1(n-7)	17,2	9,32	0,91	4,15	7,19
16:2(n-4)	?	1,33	-	-	0,63
16:3(n-4)	-	1,65	-	-	-
18:0	1,42	4,33	5,18	4,49	1,59
18:1 (n-12)	4,86	-	-	1,00	-
18:1(n-9)	18,8	12,6	5,86	15,8	10,7
18:1(n-7)	5,04	3,52	2,39	4,14	6,63
18:2(n-6)	1,83	1,61	0,90	2,90	1,62
18:3	?***	0,76***	0,66***	1,25***	0,59***
18:4(n-3)	2,43*	3,01*	1,41*	2,17*	1,78*
20:0	-	-	1,98	-	-
20:1(n-12)	2,43*	3,01*	1,41*	2,17*	1,78*
20:1(n-9)	10,2	?	5,02	1,72	0,88
20:2	-	-	0,89	-	-
20:4 (n-6)	?	0,99	2,22	1,05	?
20:4(n-3)	1,76**	0,91**	2,75**	1,72**	1,33**
22:1(n-11)	?	-	2,43	3,74	-
22:1(n-9)	1,76**	0,91**	2,75**	1,72**	1,33**
24:1	-	-	?	0,62	-
20:5(n-3)	5,50	15,6	34,1	18,6	17,0
22:5(n-3)	3,33	1,68	2,62	3,12	?
22:6(n-3)	6,91	9,05	23,2	14,0	6,09
Ukjent(e)	?	1,27	1,74	1,91	2,6
Sum total	94,9	99,3	97,7	95,26	99,4
Sum mettede	17,0	36,0	10,6	17,4	42,4
Sum enumettede	56,1	25,4	16,6	31,2	25,4
Sum flerumettede	1,83	6,34	4,67	5,20	2,84
Sum	15,7	26,3	59,9	35,7	23,1
EPA/DPA/DHA					

* og **: Arealprosenten er summert i sum total en gang, men er ikke summert i sum enumettede eller sum flerumettede. *, **, ***: Se tabell 4.2.6. for mer detaljert forklaring.

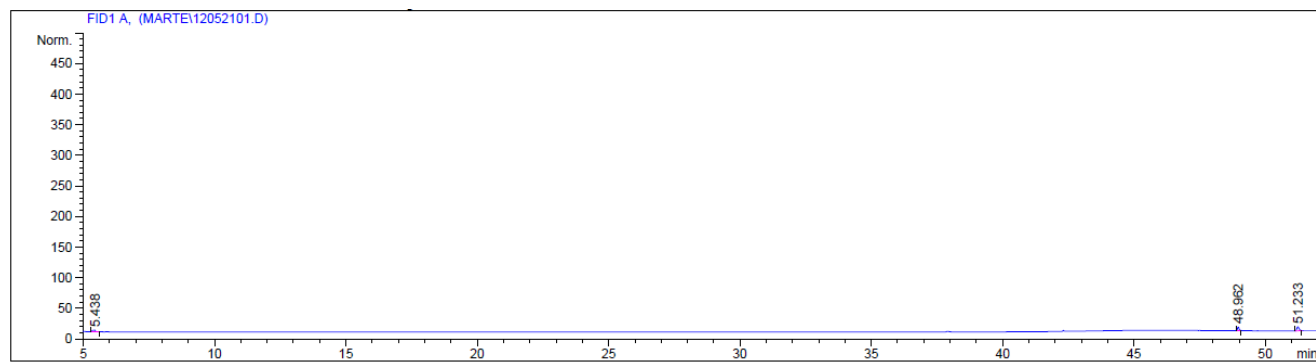
Fettsyresammensetningen i produktene er altså svært lik, men prosentandelen av de ulike fettsyrene varierer i stor grad fra produkt til produkt (tabell 4.2.3 og 4.2.7). Den høyeste prosentandelen av de langkjedete omega-3 fettsyrene ble funnet i produkt 1 hvor EPA, DPA og DHA står for ca. 73 % av det totale fettsyreinholdet. Produkt 3 er en god nr. 2 med ca. 72 % EPA, DPA og DHA. Produkt 2, 5, 6, 7 og 10 hadde de laveste prosentandelene EPA, DPA og DHA med hhv. 22,6, 15,7, 27,7, 26,3, 23,1 %. Produkt 4, 8 og 9 lander midt i mellom med hhv. ca. 42,4, 59,9 og 35,7 %.

Mengden av mettede fettsyrer varierer også mye blant produktene og hele 35,6 % av produkt 6, 36 % av produkt 7 og 42,4 % av produkt 10 består av 14:0, 16:0 og 18:0. I produkt 1 og 3 er prosentandelen mettede fettsyrer bare ca. 5 % mens produkt 2, 4, 5, 8 og 9 inneholder hhv. ca. 18,4, 11,6, 17,0, 10,6 og 17,4 % mettede fettsyrer. Den høyeste prosentandelen enumettede fettsyrer ble funnet i produkt 5 med 56,1 % mens de laveste ble funnet i produkt 1 og 3 med hhv. 7,18 og 11,4 %. Produkt 2, 4, 7, 8, 9 og 10 ligger midt mellom med hhv. ca. 33,3, 23,2, 29,7, 25,4, 16,6, 31,2 og 25,4 % enumettede fettsyrer.

Mengden flerumettede fettsyrer utenom EPA, DPA og DHA, varierer ikke mye blant produktene og for produkt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 og 10 er prosentandelen hhv. ca. 3,17, 1,78, 2,56, 1,70, 1,83, 2,72, 6,34, 4,67, 5,20 og 2,84 %. Prosentandelen av de ukjente fettsyrene (tabell 4.2.2 og 4.2.6) varierer fra 0,5 % i produkt 6 til 8 % i produkt 2. Produkt 1 og 3 har ca. 5 % ukjente fettsyrer, mens produkt 4, 7, 8, 9 og 10 har hhv. ca. 7,6, 1,27, 1,74, 1,91 og 2,60 %. I produkt 5 er prosentandelen ukjente fettsyrer ikke kjent. Den beregnede totale summen for produkt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 og 10 er hhv. 96,3, 88,1, 100, 95,8, 94,9, 96,5, 99,3, 97,7 95,26 og 99,4.

4.3 Preparativ tynnsjikt-kromatografi- separasjon av lipidklasser

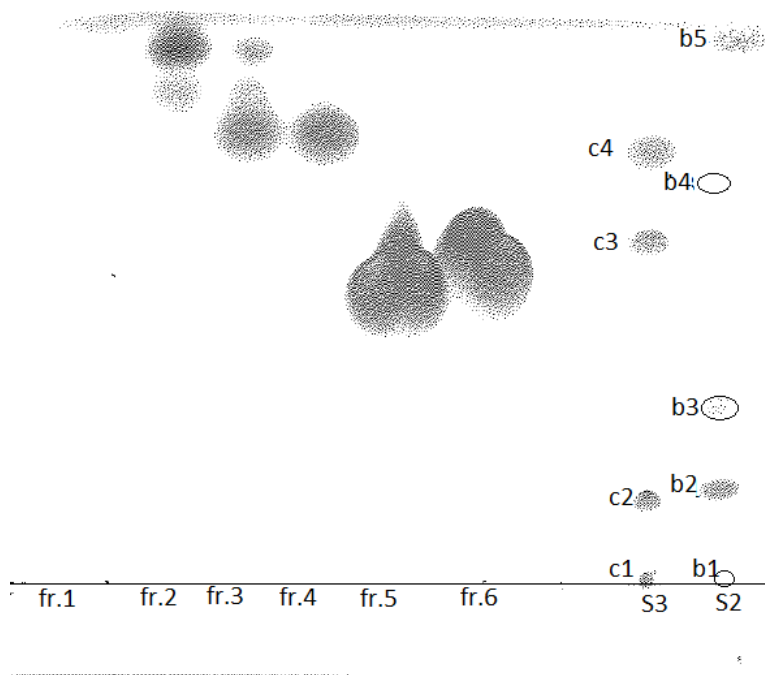
Det var tre «bånd» som var synlig på TLC platen under UV-lys; Et med fosfolipider og/eller monoglycerider (1MET), et med kolesterol og/eller diglycerider (2MET) og et med triglycerider (3MET). Kromatogrammene for alle tre prøvene var tomme. I figuren under vises kromatogrammet for 1MET. Kromatogrammet for 2MET og 3MET kan ses i appendiks.



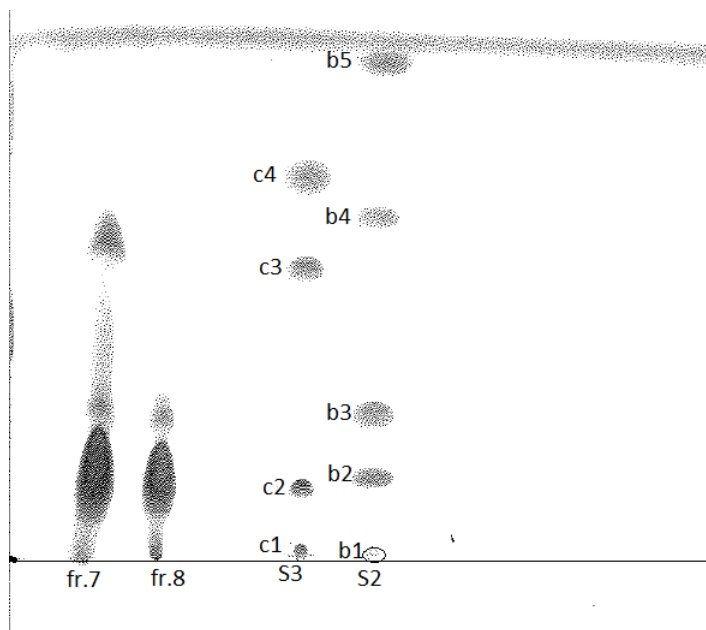
Figur 4.3.1: Kromatogram for 1MET.

4.4 Fast- fase ekstraksjon- separasjon av lipidklasser

Elueringsmetode 0 (figur 4.4.1a og 4.4.1b, tabell 4.4.1) separerte de mest upolare lipidene kolesterylester og/-eller voksester og etylestere fra triacylglycerolene og triacylglycerolene fra de mer polare lipidene frie fettsyrer, diacylglyceroler, kolesterol og monoacylglyceroler. Ingenting eluerte i den første fraksjonen, i fraksjon 2 og 3 eluerte voksester/kolesterylester og etylestere med diklormetan:heptan (1:1) v/v. I fraksjon 4 eluerte bare etylestere med diklormetan. Fraksjon 5 og 6 ble eluert med hhv. diklormetan og diklormetan:etylacetat (1:1) v/v og inneholdt bare triacylglyceroler. En liten andel triacylglyceroler eluerte (diklormetan:etylacetat (1:1) v/v) også i fraksjon 7 sammen med frie fettsyrer, diacylglyceroler, monoacylglyceroler og kanskje kolesterol. Fraksjon 8 ble eluert med etylacetat og inneholdt diacylglyceroler, frie fettsyrer, monoacylglyceroler og kanskje kolesterol.



Figur 4.4.1a: Tynnsjiktskromatografi av elueringsmetode 0, produkt 1, fraksjon 1-6. S2: Lechitin(b1), kolesterol(b2), oljesyre(b3), triolein(b4), kolesteryloleat(b5). S3: monolinolenin(c1), dilinolenin(c2), trilinolenin(c3), metyllinolenat(c4).



Figur 4.4.1b: Tynnsjikt-kromatografi av elueringsmetode 0, produkt 1, fraksjon 7-8. S2: Lechitin(b1), kolesterol(b2), oljesyre(b3), triolein(b4), kolesteryloleat(b5). S3: monolinolenin(c1), dilinolenin(c2), trilinolenin(c3), metyllinolenat(c4).

Tabell 4.4.1: Viser hvilke lipidklasser fraksjonene inneholdt for elueringsmetode 0- 3, produkt 1. For beskrivelse av forkortelser se tabell 4.1.1

Fraksjon	Elueringsmetode	Elueringsmetode	Elueringsmetode	Elueringsmetode
	0	1	2	3
	Innhold	Innhold	Innhold	Innhold
1	-	KE/VE, EE, TAG	-	-
2	KE, EE	TAG, K/ DAG, FF	KE, EE, TAG, FF	KE, EE
3	KE, EE	DAG, MAG	FF, DAG/ K	EE, TAG, FF, DAG/ K
4	EE, TAG	MAG, DAG	MAG	MAG, DAG
5	TAG	MAG		
6	TAG, DAG			
7	MAG, K/ DAG, FF, TAG			
8	MAG, K/DAG, FF			

Elueringsmetode 1 ga ingen god separasjon av lipidklassene. Fraksjon 1, eluert med heptan:dietyleter:eddiksyre (90:10:1) v/v/v, inneholdt kolesterylestere og/-eller voksester, etylestere og triacylglyseroler. Fraksjon 2 ble eluert med samme elueringsmiddel som fraksjon 1 og inneholdt triacylglyseroler, diacylglyseroler, frie fettsyrer og kanskje kolesterol. Både fraksjon 3 og 4 inneholdt monoacylglyseroler og diacylglyseroler og ble eluert med hhv.

heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1) v/v/v og heptan:dietyleter:eddiksyre (50:50:1) v/v/v. Fraksjon 5 inneholdt bare monoacylglyseroler og ble eluert med metanol.

I elueringsmetode 2, produkt 1 og 10 (tabell 4.4.1 og 4.4.2) ble elueringsmiddelet fra fraksjon 1 i elueringsmetode 1 byttet ut med et svakere. Fraksjon 1 ble eluert med heptan:eddiksyre (100:1) v/v, men det viste seg at dette var for svakt og fraksjonene var tom. Fraksjon 2 ble eluert med heptan:dietyleter:eddiksyre (90:10:1) v/v/v og inneholdt kolesterylestere og/-eller voksestere, etylestere, triacylglyseroler og frie fettsyrer for produkt 1 og 10. I tillegg inneholdt fraksjon 2 diacylglyseroler og kanskje kolesterol for produkt 10. Rester av de frie fettsyrene, diacylglyseroler og kanskje kolesterol eluerte med heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1) v/v/v i fraksjon 3 for produkt 1, mens tilsvarende fraksjon for produkt 10 bare inneholdt diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Den siste fraksjonen (fraksjon 4) inneholdt monoacylglyseroler (produkt 1) og fosfolipider (produkt 10) og ble eluert med metanol.

Tabell 4.4.2: Viser hvilke lipidklasser fraksjonene inneholdt for elueringsmetode 2-5, produkt 10. For beskrivelse av forkortelser se tabell 4.1.1

Fraksjon	Elueringsmetode	Elueringsmetode	Elueringsmetode	Elueringsmetode
	2	3	4	5
	Innhold	Innhold	Innhold	Innhold
1	-	FL	FL, KE, EE	KE, EE, TAG, FF
2	KE, EE, TAG, FF, DAG/ K	KE, EE	KE, EE, TAG, FF, DAG, K	TAG, FF
3	DAG/ K	KE, EE, TAG, FF, DAG, K	TAG, DAG, K	TAG, FF
4	FL	FL	DAG, K	TAG, DAG, K
5			DAG, K	DAG, K
6			DAG, K	DAG, K
7			DAG	DAG, K
8			FL	DAG, K
9				DAG, K
10				DAG, K, FL

Elueringsmetode 3, produkt 1 og 10 (tabell 4.4.1 og 4.4.2) ble satt opp og testet samtidig med elueringsmetode 2. For produkt 1 eluerte ingen fettklasser i fraksjon 1 med heptan mens fosfolipidene eluerte i denne fraksjonen for produkt 10. Fraksjon 2 inneholdt kolesterylestere og/-eller voksestere og etylestere for produkt 1 og ble eluert med heptan:diklormetan (80:20) v/v. For produkt 10 inneholdt fraksjon 2 bare kolesterylestere og/-eller voksestere og etylestere. Rester av etylestere, triacylglyseroler, frie fettsyrer,

diacylglyseroler og kanskje kolesterol eluerte i fraksjon 3 for produkt 1 med heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1) v/v/v. For produkt 10 eluerte kolesterylestre og/-eller voksester, etylestere, triacylglyseroler, frie fettsyrer, diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Fraksjon 4 ble eluert med metanol og inneholdt monoacylglyseroler og diacylglyseroler for produkt 1 og fosfolipider for produkt 10.

I elueringsmetode 4 (tabell 4.4.2) ble fraksjon 1 og 2 eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (50:50:1) v/v/v. Fraksjon 1 inneholdt fosfolipider, kolesterylestere og/-eller voksester og etylestere. Fraksjon 2 inneholdt kolesterylestere og/-eller voksester, etylestere, triacylglyseroler, frie fettsyrer, diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Fraksjon 3 og 4 ble eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (40:60:1) v/v/v hvor fraksjon 3 inneholdt triacylglyseroler, diacylglyseroler og kanskje kolesterol og fraksjon 4 inneholdt diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Både fraksjon 5 og 6 inneholdt diacylglyseroler og kanskje kolesterol og ble eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (20:80:1) v/v/v. Fraksjon 7 ble eluert med heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1) v/v/v og inneholdt bare diacylglyseroler. Fosfolipidene i fraksjon 8 ble eluert med metanol:trietylamin (100:1) v/v.

I elueringsmetode 5 (tabell 4.4.2) ble fraksjon 1 og 2 eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (90:10:1) v/v/v. Fraksjon 1 inneholdt kolesterylestere og/-eller voksester, etylestere, triacylglyseroler og frie fettsyrer. Fraksjon 2 inneholdt triacylglyseroler og frie fettsyrer. Fraksjon 3 inneholdt det samme som 2, men ble eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (80:20:1) v/v/v. Triacylglyseroler, diacylglyseroler og kanskje kolesterol ble funnet i fraksjon 4 hvor det ble brukt samme eluent som i fraksjon 3. Fraksjon 5-8 inneholdt bare diacylglyseroler og kanskje kolesterol og ble eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (70:30:1) v/v/v. Eluenten i fraksjon 9 var heptan:diklormetan (50:50) v/v og inneholdt også diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Metanol:trietylamin (100:1) v/v var elueringsmiddelet i fraksjon 10 som inneholdt fosfolipider diacylglyseroler og kanskje kolesterol.

I elueringsmetode 6 (tabell 4.4.3) ble mengden olje påsatt på kolonna halvert. De to første fraksjonene var tomme og ble eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (95:5:1) v/v/v. Fraksjon 3 og 4 ble eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (90:10:1) v/v/v og fraksjon 3

inneholdt kolesterylestere og/-eller voksesterer, etylestere, triacylglyseroler og frie fettsyrer mens fraksjon 4 bare inneholdt triacylglyseroler. Eluenten i fraksjon 5 og 6 var heptan:diklormetan:eddiksyre (80:20:1) v/v/v hvor fraksjon 5 bare inneholdt triacylglyseroler og fraksjon 6 inneholdt triacylglyseroler, diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Fraksjon 7 inneholdt fosfolipider, diacylglyseroler og kanskje kolesterol og ble eluert med metanol:trietylamin (100:1) v/v.

Tabell 4.4.3: Viser hvilke lipidklasser fraksjonene inneholdt for elueringsmetode 6- 9, produkt 10. For forklaring av forkortelser se tabell 4.1.1.

Fraksjon	Elueringsmetode 6	Elueringsmetode 7	Elueringsmetode 8	Elueringsmetode 9
	Innhold	Innhold	Innhold	Innhold
1	-	-	-	KE/VE, EE, TAG
2	-	-	-	TAG
3	EE, KE, TAG, FF	EE, KE, TAG, FF, DAG, FL, K	-	DAG/K
4	TAG	-	-	FF, DAG/K
5	TAG	-	-	DAG, FL
6	TAG, DAG, K	-	-	FL
7	DAG, FL, K	-	-	
8			-	
9			KE/VE, EE, TAG, FF	
10			TAG, DAG/K	
11			TAG, DAG/K, FL	

I elueringsmetode 7 (tabell 4.4.3) ble fraksjon 1 og 2 eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (90:10:1) v/v/v. Ingen lipidklasser eluerte med denne eluenten. Fraksjon 3 og 4 ble eluert med heptan:diklormetan:eddiksyre (70:30:1) v/v/v hvor fraksjon 3 inneholdt alle lipidklassene i produkt 1 og fraksjon 4 var tom. Fraksjon 5-7 ble eluert med sterkere elueringsmiddel enn fraksjon 4, men var allikevel tomme, noe som tyder på at all oljen eluerte med elueringsstyrken i fraksjon 4.

I elueringsmetode 8 var fraksjon 1-8 tomme og eluentene som ble brukt var heptan:diklormetan (95:5)v/v, heptan:diklormetan (90:10) v/v og heptan:diklormetan:eddiksyre (90:10:1) v/v/v. Fraksjon 9 og 10 ble eluert med heptan:diklormetan (70:30) hvor fraksjon 9 inneholdt kolesterylestere og/-eller voksesterer, etylestere, triacylglyseroler og frie fettsyrer og fraksjon 10 inneholdt triacylglyseroler,

diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Fraksjon 11 ble eluert med metanol og inneholdt triacylglyseroler, diacylglyseroler, fosfolipider og kanskje kolesterol.

I elueringsmetode 9 ble mengden olje påsatt på kolonna halvert igjen. Fraksjon 1 ble eluert med heptan:etylacetat (95:5) v/v og inneholdt kolesterylestere og/-eller voksesterer, etylestere og triacylglyseroler. Det ble bare funnet triacylglyseroler i fraksjon 2 eluert med heptan:diklormetan (90:10) v/v. Fraksjon 3 inneholdt diacylglyseroler og kanskje kolesterol og eluerte med heptan:diklormetan:eddiksyre (90:10:1) v/v/v. Fraksjon 4 ble eluert med heptan:etylacetat (80:20) v/v og inneholdt frie fettsyrer, diacylglyseroler og kanskje kolesterol. Det ble funnet diacylglyseroler og fosfolipider i fraksjon 5 og eluenten var heptan:etylacetat (70:30) v/v. Fosfolipidene i fraksjon 6 ble eluert med metanol.

4.5 FAME-analyse etter separasjon av lipidklasser med fast-fase ekstraksjon.

Elueringsmetode 0 på produkt 1 ga en høvelig god separasjon av de mest upolare lipidene (se tabell 4.4.1 og figur 4.4.1a og b), og det ble derfor kjørt FAME-analyse med GC-FID på fraksjon 3, 5, 6 og 8. Programmet som ble brukt var SPR 10-4. Fraksjon 5 og 6 ble slått sammen og kjørt som en fraksjon. Fraksjon 2 skulle også analyseres men forfatter klarte på mystisk vis å forveksle fraksjon 1 og 2. Kromatogrammer kan ses i appendiks.

Tabell 4.5.1: Påviste fettsyrer og tilhørende retensjonstid (R_t), i fraksjon 3, 5, 6 og 8 produkt 1, elueringsmetode 0. Spørsmålsteget menes med at det ikke ble funnet tilsvarende retensjonstid i standardene. Retensjonstiden er oppgitt i minutt.

Produkt 1					
Fraksjon 3		Fraksjon 5 og 6		Fraksjon 8	
R_t	Fettsyre	R_t	Fettsyre	R_t	Fettsyre
17,635	14:0	21,829	16:0	21,814	16:0
21,835	16:0	23,038	16:1(<i>n</i> -7)	23,024	16:1(<i>n</i> -7)
23,040	16:1(<i>n</i> -7)	27,728	18:0	27,716	18:0
27,761	18:0	29,033	18:1(<i>n</i> -9)	29,023	18:1(<i>n</i> -9)
29,073	18:1(<i>n</i> -9)	29,347	18:1(<i>n</i> -7)	29,339	18:1(<i>n</i> -7)
29,388	18:1(<i>n</i> -7)	31,525	18:2(<i>n</i> -6)	31,515	18:2(<i>n</i> -6)
36,789	20:1(<i>n</i> -12)*	35,329	20:0	36,744	20:1(<i>n</i> -12)*
36,911	20:1(<i>n</i> -9)	36,755	20:1(<i>n</i> -12)*	36,871	20:1(<i>n</i> -9)
43,330	20:4(<i>n</i> -6)	36,883	20:1(<i>n</i> -9)	43,293	20:4(<i>n</i> -6)
47,280	20:5(<i>n</i> -3)	43,300	20:4(<i>n</i> -6)	45,441	22:1(<i>n</i> -11)
54,462	?	45,461	22:1(<i>n</i> -11)	45,694	22:1(<i>n</i> -9)
55,106	24:1	45,700	22:1(<i>n</i> -9)**	47,276	20:5(<i>n</i> -3)
57,240	22:5(<i>n</i> -3)	47,279	20:5(<i>n</i> -3)	54,446	?
58,660	22:6(<i>n</i> -3)	54,460	?	55,077	24:1
		55,117	24:1	57,235	22:5(<i>n</i> -3)
		57,240	22:5(<i>n</i> -3)	58,728	22:6(<i>n</i> -3)
		58,758	22:6(<i>n</i> -3)		

* 20:1(*n*-12) co-kromatograferer med 18:4(*n*-3) og en kan derfor ikke vite om fraksjonene inneholder begge fettsyrene eller bare den ene.** 22:1(*n*-9) co-kromatograferer med 20:4(*n*-3) og en kan derfor ikke vite om fraksjonen inneholder begge fettsyrene eller bare den ene.

Lipidklassene i fraksjon 3 var kolesterylestere og/-eller voksestere og etylestere. Fraksjon 5 og 6 inneholdt bare triacylglyseroler mens fraksjon 8 inneholdt frie fettsyrer, diacylglyseroler, monoacylglyseroler og kanskje kolesterol. Fettsyresammensetningen i de analyserte fraksjonene er svært lik (tabell 4.5.1) og alle inneholdt de langkjedete omega-3 fettsyrene EPA, DPA og DHA. Videre inneholdt alle fraksjonene 16:0, 16:1(*n*-7), 18:0, ulike posisjonsisomerer av 18:1, 20:1(*n*-9), 20:1(*n*-12) og/-eller 18:4(*n*-3), 20:4(*n*-6) og 24:1. Fraksjon 3 er den eneste som inneholder 14:0 og den eneste som ikke inneholder 18:2(*n*-6). Fettsyrene 22:1(*n*-11) og 22:1(*n*-9) ble bare funnet i fraksjon 5/ 6 og 8. I alle tre fraksjonene var det også topper med retensjonstider 54,462, 54,460, 54,446 for hhv. fraksjon 3, 5/6 og 8 som ikke tilsvarte noen av retensjonstidene i standardene.

Prosentandelen (tabell 4.5.2) av de ulike fettsyrene varierer ikke i stor grad blant fraksjonene. Prosentandelen EPA, DPA og DHA var høyest i fraksjon 3 med 76,6 %. Fraksjon 5/6 og 8 hadde hhv. 70,4 og 68,2 % av de langkjedete flerumettede fettsyrene. For de mettede fettsyrene var prosentandelen 8,91, 6,17 og 7,42 % for hhv. fraksjon 3, 5/6 og 8. Sum enumettede varierte litt blant fraksjonene, hvor fraksjon 8 hadde mest med 15,3 %, fraksjon 5/6 hadde 13,6 % og fraksjon 3 hadde 8,9 %. Prosentandelen flerumettede fettsyrer utenom EPA, DPA og DHA var lav med 2,70 % for fraksjon 3, 3,02 % for fraksjon 5/6 og 2,29 % for fraksjon 8. De ukjente fettsyrene opptok 2,88, 2,97 og 2,66 % for hhv. fraksjon 3, 5/6 og 8. Bare i fraksjon 3 ble det den totale summen 100 %, i fraksjon 5/6 og 8 ble den totale summen 98,9 %.

Tabell 4.5.2: Fettsyresammensetning (areal %) i fraksjon 3, 5, 6 og 8, produkt 1, elueringsmetode 0, kjørt på program SPR 10-4. Spørsmålsteget menes med at arealet til disse fettsyrene var så lite relativt til de andre at de ikke ble regnet med i det totale arealet og derfor heller ikke i arealprosent.

Produkt 1			
	Fraksjon 3	Fraksjon 5 og 6	Fraksjon 8
Fettsyre	Areal %	Areal %	Areal %
14:0	?	-	-
16:0	6,23	2,00	2,55
16:1(<i>n</i> -7)	?	?	0,83
18:0	2,68	4,17	4,87
18:1(<i>n</i> -9)	4,80	6,85	7,27
18:1(<i>n</i> -7)	?	1,83	2,03
18:2(<i>n</i> -6)	-	0,75	?
18:4(<i>n</i> -3)	?*	1,08*	1,20*
20:0	-	?	-
20:1(<i>n</i> -12)	?*	1,08*	1,20*
20:1(<i>n</i> -9)	?	2,15	2,32
22:1(<i>n</i> -11)	-	1,32	1,39
22:1(<i>n</i> -9)	-	1,68**	1,77**
20:4(<i>n</i> -3)	-	1,68**	1,77**
20:4(<i>n</i> -6)	2,70	2,27	2,29
24:1	4,10	1,43	1,50
20:5(<i>n</i> -3)	29,0	19,9	22,2
22:5(<i>n</i> -3)	6,82	4,48	4,70
22:6(<i>n</i> -3)	40,8	46,0	41,3
Ukjente	2,88	2,97	2,66
Sum total	100	98,9	98,9
Sum mettede	8,91	6,17	7,42
Sum enumettede	8,90	13,6	15,3
Sum flerumettede	2,70	3,02	2,29
Sum	76,6	70,4	68,2
EPA/DPA/DHA			

*, ** Fettsyrene ble bare summert en gang i sum total og er ikke summert i sum enumettede eller sum flerumettede. For mer detaljert beskrivelse, se tabell 4.5.1

5 Diskusjon

Markedet for omega-3 kosttilskudd er stort i Norge og i andre vestlige land. Konsumentene får råd og anbefalinger fra mange ulike hold angående mengde og sammensetning. Ettersom varedeklarasjonen på denne typen kosttilskudd anses å være mangelfull, ble formålet for oppgaven min å gjøre en fullstendig karakterisering av kommersielle omega-3 produkter. Delmål for oppgaven var å finne en ny metode for separasjon av lipidklasser på silika SPE kolonner.

Resultatene av lipidklasse- separasjonen med HPTLC (figur 4.1.1 -4.1.6) viste at triacylglyseroler var den dominerende lipidklassen i produktene som baserer seg på fiskeolje (produkt 7; figur 4.1.1), konsentrert fiskeolje (produkt 1,3 og 8; figur 4.1.4), tran (produkt 2; figur 4.1.6) og selolje (produkt 5; figur 4.1.3). De to produktene som baserte seg på en blanding av tran og konsentrert fiskeolje (produkt 4 og 9; figur 4.1.2) inneholdt omtrent like mye av etylestere som triacylglyseroler. I krilloljene (produkt 6 og 10; figur 4.1.3 og 4.1.5) var fosfolipider den dominerende klassen, tett etterfulgt av frie fettsyrer og triacylglyseroler. Dette er ikke overraskende funn ettersom det meste av fettsyrene i fisk er bundet i triacylglyseroler, mens 30- 65 % av fettsyrene i krill er inkorporert i fosfolipider (Tou *et al.*, 2007). Det ble også funnet diacylglyseroler i alle produkter og monoacylglyseroler i noen av produktene. I pattedyr spaltes triacylglyserolene av lipaser i tynntarmen til monoacylglyseroler, diacylglyseroler, glyserol og frie fettsyrer. Spaltningsproduktene diffunderer så inn i epitelcellene som dekker tynntarmen før de igjen reesterifiseres til triacylglyseroler. Triacylglyserolene pakkes sammen med kolesterol og spesifikke proteiner til lipoproteiner kalt chylomikroner. Chylomikronene fraktes av lymfesystemet og blodårene til bestemmelsesstedet hvor triacylglyserolene igjen blir spaltet opp til glyserol og frie fettsyrer. Glyserol og de frie fettsyrene diffunderer så inn i myocytter eller adipocytter hvor de igjen reesterifiseres til triacylglyseroler (Nelson & Cox, 2005). En liknende metabolismevei er også å finne i fisk. Siden mono og diacylglyserolene omdannes raskt til triacylglyseroler i pattedyr og fisk er dette antagelig bare en liten andel av bidraget til mono og diacylglyserolene funnet i omega-3 produktene. Under produksjonen av fiskeolje og selspekkolje, som etter hvert blir kosttilskudd, gjennomgår oljene en raffineringssprosess hvor uønskede forbindelser som spormetaller, frie fettsyrer, pigmenter, fosfolipider og hydrolyserte fosfolipider, aminosyrer, proteiner, miljøgifter og oksidasjonsprodukter fra lipidene, fjernes. I noen av kosttilskuddene har også oljen blitt oppkonsentrert med hensyn på EPA og DHA. Under oppkonsentreringen spaltes de naturlige triacylglyserolene i frie fettsyrer og glyserol før de reesterifiseres igjen. Reesterifisering med etanol gir produkter med etylestere og

reesterifisering med glyserol gir produkter med mono-di og triacylglyseroler. Selolje produseres på liknende måte som fiskeolje (VKM, 2011). Vanlige raffineringmetoder vil altså i stor grad fjerne fosfolipider og frie fettsyrer fra en olje (Gunstone, 2004). Det høye innholdet av fosfolipider i krillolje er et viktig salgsargument fordi kliniske studier tyder på at EPA og DHA forestret til fosfolipider absorberes bedre enn når de foreligger som triacylglyseroler (Ulven *et al.*, 2011; Rossmesl *et al.*, 2012). Krillolje blir derfor lite raffinert og innholdet av fosfolipider og frie fettsyrer er høyt i disse produktene.

Ettersom to (produkt 1 og 8) av de konsentrerte fiskeolje-produktene også inneholdt en liten andel etylestere, virker det som om produsentene reesterifiserer med både glyserol og etanol etter oppkonsentreringen av EPA og DHA. Den store andelen etylestere i produkt 4 og 9 kommer antagelig fra transesterifiserte triacylglyseroler i fiskeolje, mens andelen triacylglyseroler i produktene kommer fra tran-delen av oljen. Krilloljene inneholder tydeligvis også en liten andel etylestere og diacylglyseroler. Diacylglyserolene kan være en naturlig del av oljen, mens det er usikkert om etylestere er naturlige eller ikke.

Figur 4.1.1 viser at fosfolipider og monoglycider (w_1 , b_1 , c_1 , a_1) har ganske lik retensjonsfaktor i elueringsmidlet brukt. Men om man ser nøye etter kan man se at c_1 og a_1 (monoacylglyseroler) har vandret over streken, mens b_1 (fosfolipider) «sitter fast» midt på. Monoacylglyserolene vandrer altså litt sammenliknet med fosfolipidene på denne platen og jeg antar derfor at w_1 er fosfolipider. På samme grunnlag antar jeg at produkt 4 og 9 (figur 4.1.2) og produkt 1 og 8 (figur 4.1.5) inneholder monoacylglyseroler, mens produkt 6 og 10 (figur 4.1.3 og 4.1.5) inneholder fosfolipider. Produkt nr. 3 (figur 4.1.4) ble imidlertid kjørt på en plate hvor de mer polare lipidene ble separert svært dårlig og det er derfor vanskelig å si om produktet inneholder fosfolipider, monoacylglyseroler eller begge deler. Ettersom produkt 3 baserer seg på fiskeolje, er det sannsynlig at flekk s_1 er monoacylglyseroler. Figur 4.1.1 viser også at kolesterol (b_2) og diacylglyserolene (c_2 , a_2 og w_2) har tilnærmet lik retensjonsfaktor, men i dette tilfellet er ikke w_2 en sirkelformet flekk, men en flekk med haledannelse. Haledannelse kan også observeres hos triacylglyserolene (w_3) og er et resultat av usymmetriske diacylglyseroler og triacylglyseroler. Usymmetrisk menes med at det er bundet ulike fettsyrer intramolekylært i acylglyserolene. Det vil selvfølgelig også være forskjeller intermolekylært. I motsetning til w_2 og w_3 , har c_2 og a_2 en mer symmetrisk struktur nettopp fordi disse diacylglyserolene er symmetriske, med bare en type fettsyre bundet. Ut i fra dette kan en si at produkt 7 inneholder diacylglyseroler og kanskje også

kolesterol. Både fiskeolje og krillolje inneholder en viss mengde kolesterol, og det er derfor ikke usannsynlig at de innkjøpte produktene gjør det (Tou et al., 2007). På grunn av haledannelsen til diacylglyserolene og triacylglyserolene er det vanskelig å oppgi en bestemt retensjonsfaktor for disse lipidklassene. Det anses derfor fornuftig å oppgi retensjonsfaktorene i intervaller.

På platen i figur 4.1.5 ble det kjørt standarder som inneholdt voksester (d1) og kolesterylester (b5). Voksesterne vandrer litt kortere enn kolesterylestene, men fettsyrene som er bundet er identiske. I produktene vil eventuelle kolesterylestere eller voksester kanskje ha andre fettsyrer bundet, noe som vil endre retensjonen. Dersom det er snakk om flerumettede fettsyrer vil retensjonen øke, dersom det er snakk om mettede fettsyrer med korte karbonkjeden vil retensjonen minke. Det er derfor vanskelig å avgjøre om produktene inneholder kolesterylester, voksester eller begge deler, kun på dette grunnlaget. Ettersom fisk ikke syntetiserer voksester, er det fornuftig å anta at flekkene i produktene som baserer seg på fisk er kolesterylestere. Krilloljene som ble kjøpt inneholder olje ekstrahert fra arten *Euphausia superba* og derav navnet superba krill. Denne arten krill bruker ikke voksester som depotfett, men det betyr ikke at arten ikke produserer en liten mengde voksester. Krillararter studert fra de nordatlantiske havområdene inneholdt voksester i varierende grad og en kan dermed tenke seg at også krillararter fra de antarktiske havområdene gjør det.

Tabell 4.1.1 gir en oversikt over lipidklassene, med tilhørende estimerte retensjonsfaktorer, observert i produktene. I tabellen vil en også se at det er forskjeller i retensjonsfaktorer mellom produktene i samme lipidklasse. Dersom man ser på etylesterne, er det et sprang fra 0,67 til 0,76. Dette kan forklares med at produktene ikke ble kjørt på samme plate og at selv om elueringsmidlet i teorien skulle være identisk ved alle kjøringer, vil det alltid være små forskjeller som påvirker retensjonen til klassene. Dessuten har de ulike produktene ulike prosentandeler mettede, enumettede og langkjedete flerumettede fettsyrer, og etylesterne i et produkt vil bestå av andre fettsyrer enn i et annet. I figur 4.4.1 kan en også lett observere at c4 og a4 ikke har lik retensjonsfaktor nettopp fordi disse består av hhv. metyllinolenat og metylpalmitat.

Det eneste produktet som hadde en flekk som ikke stemte overens med standardene var produkt 4 (figur 4.1.2). Flekken (t3) vandret kortere enn triacylglyserolene, men lengre enn de frie fettsyrene og hadde en retensjonsfaktor 0,51. Denne flekken ble ikke funnet i

produkt 9 på tross av produktenes identiske varedeklarasjon. Siden flekken har svært lav intensitet, og det helt klart ble påsatt en høyere konsentrasjon av produkt 4 enn produkt 9, er det mulig at konsentrasjonen av disse lipidene var for lav i produkt 9 til å bli detektert. Dette kan også være grunnen til at kolesterylesterne og/-eller voksesterne i produkt 4 (t7) ble detektert, mens det ikke ble funnet tilsvarende flekk i produkt 9.

Fettsyresammensetningen til de ulike produktene var som sagt svært lik (tabell 4.3.2 og 4.3.6), og dette er ikke overraskende med tanke på at det blant produktene er oljer fra tre ledd i den marine næringskjeden. Det skal likevel nevnes at det generelt sett ble avdekket flere fettsyrer i produktene som ble kjørt på program SPR 10-4 enn de som ble kjørt på program AUT-06. Sammenliknes produkt 6 og 10, som har identiske batchnummer, kan en se at det ble funnet tre fettsyrer i produkt 10 som ikke ble funnet i produkt 6. Produkt 4 og 9 som er av samme produsent og merke, men med ulike batchnummer, følger samme mønster som produkt 6 og 10. I produkt 9 ble det funnet tre fettsyrer som ikke ble funnet i produkt 4. Grunnen til dette kan være at det ble injisert 2 µl i program SPR 10-4, mot 1 µl i program AUT-06, noe som gjør det enklere å skille fettsyrer fra forurensninger. Dessuten hadde program SPR 10-4 en slakere gradient i starten av elueringen noe som fører til bedre separasjon blant fettsyrene med 18-20 karbonatomer. I tillegg ble det brukt flere standarder på program SPR 10-4, som forenkler tolkningen av kromatogrammene.

Tabell 4.3.3 og 4.3.7 gir en oversikt over den estimerte relative arealprosenten til de ulike fettsyrene. Det er ikke vanskelig å se at produkt 1, 3 og 8 er høykonsentrerte fiskeoljer med hensyn på EPA, DPA og DHA. Produkt 4 og 9 er også konsentrerte produkter, men inneholder litt lavere prosentandel av EPA, DPA og DHA. I følge varedeklarasjonen til produkt 7 er fiskeoljen et konsentrat, men prosentandelen EPA, DPA og DHA ligger et godt stykke under de andre konsentrerte fiskeoljeproduktene. Det er derimot ikke overraskende at produkt 2 og 5 inneholdt de minste prosentandelene av de langkjedete flerumettede omega-3 fettsyrene, med tanke på at verken tran eller selolje er oppkonsentrerte produkter. I følge Ulven *et al.* (2011) inneholder krillolje sammenlagt ca. 30 % EPA, DPA og DHA. Dette stemmer godt overens med resultatene som viste at produkt 10 inneholdt 23,1 % og produkt 6 inneholdt 27,7 % EPA, DPA og DHA. Sammenliknes produkt 4 og 9 og produkt 6 og 10, kan en se at det ble funnet en høyere prosentandel EPA, DPA og DHA i produkt 4 og 6. Dette kommer blant annet av at det ble avdekket flere fettsyrer i produkt 9 og 10. På grunn av dette kan de beregnede arealprosentene kun kalles estimerte verdier. Sum total ble bare ved ett

tilfelle summert til 100 %. Restprosenten er andre ukjente fettsyrer utenom de nevnte og som er tilstede i små mengder.

Det ble forsøkt to metoder for å separere lipidklassene før FAME analyse med GC-FID; preparativ HPTLC og fast- fase ekstraksjon på silika. Det oppsto flere problemer ved bruk av preparativ HPTLC. Til å begynne med ble det applisert for lite olje, i for lav konsentrasjon til at flekkene kunne ses under UV-lys. Prøven ble deretter applisert etter beskrevet metode under kapittel 3.3, men det viste seg da at prøvevolumet var for stort til at platen var i stand til å gi god oppløsning, og det ble derfor bare avdekket tre bånd som beskrevet i kapittel 4.2. Kromatogrammene etter metylering og GC-FID var tomme, antagelig fordi lipidene ikke hadde blitt ekstrahert/eluert fra silikapartiklene. En kan derfor si at metanol og etylacetat ikke er egnede løsemidler til ekstraksjon av lipider fra silika. På et senere tidspunkt ble det funnet en artikkel hvor det ble beskrevet en metode der de vellykket ekstraherte/eluerte med kloroform:metanol (1:1) v/v (Gigliotti *et al.*, 2011). Grunnet disse problemene og problemene nevnt innledningsvis i oppgaven ble det bestemt å forsøke fast-fase ekstraksjon. Metoder beskrevet tidligere, hvor hensikten har vært den samme, innebærer flere kjøring på flere kolonner for å oppnå god separasjon av lipidklassene. Dette er tungvint og tidskrevende og en god separasjon i en kjøring er derfor ønskelig. Dessverre begrenses oppløsningen av silikakolonnene av partikkelstørrelsen som ligger mellom 55-105 μm i de kolonnene som ble benyttet. Det beste alternativet er uten tvil separasjon på HPLC hvor oppløsningen er svært høy. Ulempene med denne metoden er at utstyret er dyrt, det kreves store mengder løsemiddel og ikke minst kreves personell med kompetanse på området. Fast- fase ekstraksjon er på den annen side en enkel metode som krever et minimum av kompetanse, løsemiddel og utstyr. På tross av oppløsningsbegrensningene og på grunn av sin enkelthet ble fast-fase ekstraksjon valgt. De ulike elueringsmetodene som ble brukt er beskrevet i kapittel 3.5. Elueringsmetode 0-3 (tabell 4.4.1 og 4.4.2) gav ikke ønsket separasjon og det ble derfor spekulert i om det ble påsatt for stor mengde olje og at kolonnen derfor var mett. I elueringsmetode 3, produkt 1, eluerte dessuten en del av fosfolipidene i første fraksjon, noe som økte mistanken om mett kolonne ytterligere. I elueringsmetode 4 (tabell 4.4.2) ble derfor mengden olje applisert nedsatt fra 25 mg til 20 mg. Dessverre viste det seg at fosfolipidene eluerte i den første fraksjonen også i elueringsmetode 4. I elueringsmetode 5 ble prøven påsatt i og kolonnen vasket med 1 % eddiksyre i heptan. Dette ble gjort for å forbedre bindingsstyrken mellom silika og de basiske sidegruppene i fosfolipidene. I denne elueringsmetoden ble også prøven påsatt i et 10 ganger mindre volum,

dette for å forhindre eventuell båndspredning. Selv om fosfolipidene eluerte i «rett» fraksjon i elueringsmetode 5, var separasjonen fortsatt ikke tilfredsstillende og i elueringsmetode 6-8 ble mengden påsatt olje halvert. I elueringsmetode 6 - 9 ble det lagt et lag med natriumsulfat på kolonnen før kjøring for å forhindre at vann i løsemidlene skulle undertrykke binding av lipidene. Kolonnen ble også vasket med diklormetan før eluering for å fjerne eventuelle forurensninger. Halveringen av mengden olje hjalp ikke på separasjonen i elueringsmetode 6, 7 og 8 og tilsvarende mengde olje skulle også blitt testet ut på elueringsmetode 0-5 for sammenlikning. I elueringsmetode 9 ble mengden olje halvert nok en gang og heller ikke her ble separasjonen tilfredsstillende. En annen faktor som kan ha påvirket resultatet er «båndspredningen» av triacylglyserolene og diacylglyserolene som ble observert på HPTLC platen. En kan tenke seg at det samme skjer i en SPE-kolonne.

Ettersom elueringsmetode 0 på produkt1 (figur 4.4.1a og 4.4.1b; tabell 4.4.1) gav en høvelig god separasjon av lipidklassene, ble fraksjon 3, 5/6 og 8 transesterifisert til fettsyremetylestere og kjørt på GC-FID for bestemmelse av fettsyresammensetning. Fettsyresammensetningen av de tre fraksjonene var svært like og alle fraksjonene inneholdt en høy prosentandel EPA, DPA og DHA på 76,6, 70,4 og 68,2 % for hhv. fraksjon 3, 5/6 og 8. Dette er ikke overraskende siden produkt 1 er en svært konsentrert fiskeolje. Ettersom mange av fettsyrene funnet i fraksjon 3 hadde for lav konsentrasjon til å bli regnet med i det totale arealet, er antakeligvis 76,6 % høyere enn den reelle prosentandelen i denne fraksjonen. Generelt gjenspeilet de summerte arealprosentene i fraksjonene, arealprosentene funnet i analysen av oljen i produkt 1 (tabell 4.2.3). Det er også verdt å nevne at fettsyren 14:0 ble funnet i fraksjon 3, men ikke i produkt 1. Grunnen til dette er nok at det ble injisert for liten mengde av produkt 1 og at konsentrasjonen av denne fettsyren var for lav til å bli detektert.

6 Konklusjon

Lipidklasseinnhold og fettsyresammensetning av ti kommersielle omega-3 produkter har blitt bestemt. Lipidklassene som ble funnet varierte litt blant produktene og var fosfolipider, mono, di- og triacylglyseroler, frie fettsyrer, etylestere, kolesterylestere og/-eller voksester. Produktene inneholdt kanskje også kolesterol. Fettsyresammensetningen til produktene var svært lik, som følge av at produktene baserte seg på olje fra tre ledd i den marine næringskjeden. Prosentandelen av de ulike fettsyrene varierte derimot mye og innholdet av EPA/DPA og DHA lå mellom 73,2 % og 15,7 %. Årsaken til dette var hovedsakelig at noen av produktene var svært konsentrerte, mens andre var naturlige oljer. Det viste seg å være vanskelig å lage en metode som enkelt separerte lipidklassene for videre analyse. Preparativ HPTLC gav ikke ønsket separasjon når det ble applisert nok olje til at flekkene kunne bli detektert med UV-lys. Fast-fase ekstraksjon på silika gav heller ikke ønsket separasjon av lipidklassene, kanskje som følge av for lav oppløsningsevne. Elueringsmetode 0 på produkt 1 ga god nok separasjon til at det ble kjørt FAME analyse på noen av fraksjonene. Verken fettsyresammensetningen eller prosentandelene varierte mye i de ulike fraksjonene, hovedsakelig på grunn av at produktet var svært oppkonsentrert. Resultatet av elueringsmetode 9 ga imidlertid håp, og dersom en hadde hatt mulighet til å jobbe videre med dette kunne konklusjonen kanskje vært annerledes.

7 Referanser

Araujo, P.; Zeng, Y.; Du, Z.; Nguyen, T. & Frøyland, L. (2010) «Discrimination of n-3 Rich Oils by Gas Chromatography.» *Lipids*. **45**(12): 1147-1158

Australia and New Zealand National Health and Medical Research Council. (2006) Nutrient reference values for Australia and New Zealand including recommended dietary intakes, Reference no: N35, N36, N37.

Bang, H.O. Dyerberg, J. & Hjörne, N. (1976) «The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos.» *Acta Medica Scandinavica*. **200**: 69-73

Barison, A.; Pereira da Silva, C.; Campos, R.; Simonelli, F.; Lenz, C. & Ferreira, A. (2010) «A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy.» *Magnetic Resonance in Chemistry*. **48**: 642-650

Burdge, G.; Wright, P.; Jones, A. & Wootton, S. (2000) «A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid- phase extraction.» *British Journal of Nutrition* **84**(5): 781-787

Carvalho, M.; Mendonca, M.; Pinho, D.; Resck, I. & Suarez, P. (2012) «Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID.» *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **23**(4)

Christie, W.W. (1992) «*Advances in Lipid Methodology-One*» Tilgjengelig fra: http://lipidlibrary.aocs.org/topics/spe_alm/index.htm

Christie, W.W. (1987) «*High- performance Liquid Chromatography and Lipids: A Practical Guide*» 1st, ed. Oxford: Pergamon Press

Christie, W.W. (1985) «Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light- scattering) detection.» *Journal of Lipid Research*. **26**: 507-512

Din, J.; Harding, S.; Valerio, C.; Sarma, J.; Lyall, K.; Riemersma, R.; Newby, D. & Flapan, A. (2007) «Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man.» *Atherosclerosis*. **197**: 290-296

Dubois, N.; Barthomeuf, C. & Berge, J-P. (2006) «Convenient preparation of picolinyl derivatives from fatty acid esters.» *European Journal of Lipid Science and Technology*. **108**: 28-32

Dybvik, A.; Falch, E. & Rustad, T. (2008) «Solid Phase Extraction as a Tool to Separate Lipid Classes and Study Deterioration of Marine Lipids.» *Journal of Aquatic Food Product Technology*. **17**(1): 39-59

Ellingsen, T. & Mohr, V. (1981) «Lipids in Antarctic krill. Composition and post mortem changes.»

FAO/WHO (2003) Technical Report N. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Fritsche, K. & Johnston, P. (1990) «Effect of Dietary α -Linolenic Acid on Growth, Metastasis, Fatty Acid Profile and Prostaglandin Production of Two Murine Mammary Adenocarcinomas.» *Journal of Nutrition*. **120**: 1601-1609

Fuchs, B.; Bresler, K. & Schiller, J. (2011b) «Oxidative Changes of lipids monitored by MALDI MS.» *Chemistry and Physics of Lipids*. **164**: 782-795

Fuchs, B.; Suss, R. & Schiller, J. (2010) «An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research» *Progress in Lipid Research*. **49**: 450-475

Fuchs, B.; Suss, R.; Teuber K.; Eibisch, M. & Schiller, J. (2011a) «Lipid analysis by thin layer chromatography- A review of the current state.» *Journal of Chromatography A*. **1218**: 2754-2774

Giacometti, J.; Milosevic, A. & Milin, C. (2002) « Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction.» *Journal of Chromatography A*. **976**: 47-54

Gigliotti, J. C.; Davenport, M. P.; Beamer, S.; Tou, J. & Jaczynski, J. (2011) «Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*).» *Food chemistry*. **125**: 1028-1036

Graeve, M. & Janssen, D. (2009) «Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids.» *Journal of Chromatography B*. **877**: 1815-1819

Gunstone, F. (2004) «*The chemistry of oils and fats. Sources, Composition, Properties and Uses.*» 1th.ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd

Hamilton, J. & Comai, K. (1988) «Rapid Separation of Neutral Lipids, Free Fatty Acids and Polar Lipids Using Prepacked Silica Sep-Pak Columns.» *Lipids*. **23**(12)

Harris, W.; Pottala, J.; Sands, S. & Jones, P. (2007) «Comparison of the effects of fish and fish-oil capsules on the n-3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids.» *American Journal of Clinical Nutrition*. **86**: 1621-1625

Harrison, R.; Sagara, M.; Rajpura, A.; Armitage, L.; Birt, N.; Birt, C. & Yamori, Y. (2004) «Can foods with added soya-protein or fish-oil reduce risk factors for coronary disease? A factorial randomised controlled trial.» *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. **14**: 344-350

Indrasena, W.M.; Henneberry, K.; Barrow, C.J. & Kralovec, J.A. (2005) «Qualitative and Quantitative Analysis of Lipid Classes in Fish Oils by Thin- Layer Chromatography with an Iatroscan Flame Ionization Detector and Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector.» *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **28**(16): 2581-2595

Kaluzny, L.; Duncan, M.; Merritt, D. & Epps, J. (1985) «Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns.» *Lipid Research*.**26**(1): 135-140

Kew, S.; Mesa, M.; Tricon, S.; Buckley, R., Minihane, A. & Yaqoob, P. (2004) «Effects of foils rich in eicosapentaenoic and docosahexanoic acids on immune cell composition and function in healthy humans.» *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**: 674-81

Kolanowski, W. (2010) «Omega-3 LC PUFA contents and oxidative stability of encapsulated fish oil dietary supplements.» *International Journal of Food Properties*. **13**: 498-511

Kris- Etherton, P.; Grieger, J. & Etherton, T. (2009) «Dietary reference intakes for DHA and EPA.» *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. **81**: 99-104

Lankinen, M.; Schwab, U.; Erkkila, A.; Seppanen-Laakso, T.; Hannila, M-L.; Mussalo, H.; Lehto, S.; Uusitupa, M.; Gylling, H. & Oresic, M. (2009) «Fatty fish intake decreases lipids related to inflammation and insulin signalling: a lipidomics approach.» *PLoS One* **4**(4): e5258

Larsen, R.; Eilertsen, K-E. & Elvevoll, E. (2011) «Health benefits of marine foods and ingredients.» *Biotechnology Advances*. **29**: 508-518

Lauritzen, L.; Christensen J.; Damsgaard, C. & Michaelsen, K. (2008) «The effects of fish oil supplementation on heart rate in healthy Danish infants.» *Pediatric Research*. **64**: 610-614

Lopez-Garzia, E.; Schulze, M.; Manson, J.; Meigs, J.; Albert, C.; Rifai, N.; Willett, W. & Hu, F. (2004) «Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women.» *Journal of Nutrition*. **134**: 1806-1811

Metcalf. R.; James, M.; Gibson, R.; Edwards, J.; Stubberfield, J.; Stuklis, R.; Roberts-Thomson, K.; Young, G. & Cleland, L. (2007) «Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans.» *American Journal of Clinical Nutrition*. **85**: 1222-1228

Milte, C.; Coates, A.; Buckley, D.; Hill, A. & Howe, P. (2008) «Dose-dependent effects of docosahexaenoic acid-rich fish oil on erythrocyte docosahexaenoic acid and blood lipid levels.» *British Journal of Nutrition*. **99**: 1083-1088

Mitchell, T.; Pham, H.; Thomas, M. & Blanksby, S. (2009) «Identification of double bond position in lipids: From GC to OzID.» *Journal of Chromatography B* **877**: 2722-2735

Myher, J. & Kuksis, A. (1995) «General Strategies in chromatographic analysis of lipids.» *Journal of Chromatography B* **671**: 3-33

Neff, L.; Culiner, J.; Cunningham-Rundles, S.; Seidman, C.; Meehan, D.; Maturi, J.; Wittkowski, K.; Levine, B. & Breslow, J. (2011) «Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults.» *Journal of Nutrition*. **141**(2): 207-213

Nelson, D. & Cox, M. (2005) «*Lehninger Principles of Biochemistry*.» 4th.ed. New York: W.H.Freeman and Company

Nordback, J.; Lundberg, E. & Christie, W. (1997) «Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection.» *Marine Chemistry*. **60**: 165-175

Olsen, R. (2007) «*Lipidkjemi med vekt på fisk*.» 3 utgave. Norges fiskerihøgskole. Universitetet i Tromsø

Quehenberger, O.; Amando, A.M. & Dennis, E. (2011) «High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry.» *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids*. **1811**(11): 648-656

Rocha, J.; Kalo, P.; Ollilainen, V. & Malcata, X. (2010) «Separation and identification of neutral cereal lipids by normal phase high-performance liquid chromatography, using evaporative light-scattering and electrospray mass spectrometry for detection.» *Journal of Chromatography A*. **1217**: 3013-3025

Rodriguez-Alcala, L. & Fontecha, J. (2010) «Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an

evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction.» *Journal of Chromatography A*. **1217**: 3063-3066

Rossmesl, M.; Jilkova, Z.; Kuda, O.; Jelenik, T.; Medrikova, D.; Stankova; B.; Kristinsson, B.; Haraldsson, G.; Svensen, H.; Stoknes, I.; Sjoval, P.; Magnusson, Y.; Balvers, M.; Verhoeckx, K.; Tvrzicka, E.; Bryhn, M. & Kopecky, J. (2012) «Metabolic Effects of n-3 PUFA as Phospholipids Are Superior to Triglycerides in Mice Fed a High-Fat Diet: Possible Role of Endocannabinoids.» *PLoS ONE*. **7**(6): e38834

Rubio-Rodriguez, N. Beltran, S.; Jaime, I.; de Diego, S.; Sanz, M. & Carballido, J. (2010) «Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review.» *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **11**: 1-12

Ruiz, J.; Antequera, T.; Andres, A.; Petron, M. & Muriel, E. (2004) «Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods.» *Analytica Chimica Acta*. **520**: 201-205

Ruiz-Gutierrez, V. & Perez-Camino, M. (2000) «Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds.» *Journal of Chromatography A*. **885**: 321-341

Saether, O.; Ellingsen, T. & Mohr, V. (1986) «Lipids of North Atlantic krill.» *Journal of Lipid Research*. **27**:274-285

Saga, L.; Rukke, E-O.; Liland, K.; Kirkhus, B.; Egelanddal, B.; Karlsen, J. & Volden, J. (2011) «Oxidative Stability of Polyunsaturated Edible Oils Mixed With Microcrystalline Cellulose.» *Journal of the American Oil Chemists Society*. **88**: 1883-1895

Sattler, W.; Reicher, H.; Ramos, P.; Panzenboeck, U.; Hayn, M.; Esterbauer, H.; Malle, E. & Kostner, G. (1996) «Preparation of Fatty Acid Methyl Esters from Lipoprotein and Macrophage Lipid Subclasses on Thin-Layer Plates.» *Lipids*. **31**(2):1303-1310

Serizawa, S.; Osawa, K.; Togashi, K.; Yamamoto, A.; Ito, M. & Hamanaka, S. (1992) «Relationship Between Cholesterol Sulfate and Intercellular Cohesion of the Stratum Corneum: Demonstration Using a Push- Pull Meter and an Improved High- Performance

Thin-Layer Chromatographic Separation System of All Major Stature Corneum Lipids.» *The Journal of Investigative Dermatology*. **99**(2)

Singer, P.; Melzer, S.; Melzer, S.; Goschel, M. & Augustin, S. (1990) «Fish oil amplifies the effect of propranolol in mild essential hypertension.» *Hypertension*. **16**: 682-691

Sommer, U.; Herscovitz, H.; Welty, K. & Costello, C. (2006) «LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures.» *Journal of Lipid Research*. **47**: 804-814

Tou, J.; Jaczynski, J. & Chen, Y. (2007) «Krill for Human Consumption: Nutrition Value and Potential Health Benefits.» *Nutrition Reviews*. **65**(2): 63-77

Touchstone, J. (1995) «Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation.» *Journal of Chromatography B*. **671**: 169-195

Ulven, S.; Kirkhus, B.; Lamglait, A.; Basu, S.; Elind, E.; Haider, T.; Berge, K.; Vik, H. & Pedersen, J. (2011) « Metabolic Effects of Krill Oil are Essentially Similar to Those of Fish Oil but at Lower Dose of EPA and DPA, in Healthy Volunteers.» *Lipids*. **46**: 37-46

Vaghela, 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**(10): 1117-1121

Vieler, A.; Wilhelm, C.; Goss, R.; Suss, R. & Schiller, J. (2007) «The Lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC.» *Chemistry and Physics of Lipids*. **150**: 143-155

Vitenskapskomiteen for matvaretrygghet. (2011) «*Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils.*» Tilgjengelig fra: <http://www.vkm.no/dav/4be9bee090.pdf>

Vognild, E.; Elvevoll, E.; Brox, J.; Olsen, R.; Barstad, H.; Aursand, M. & Østerud, B. (1998) «Effects of Dietary Marine Oils and Olive Oil on Fatty Acid Composition, Platelet Membrane Fluidity, Platelet Responses, and Serum Lipids in Healthy Humans.» *Lipids*. **33**: 427-436

Wang, C.; Harris, V.; Chung, M.; Lichtenstein, A.; Balk, E.; Kupelnick, B.; Jordan, H. & Lau, J. (2006). «n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary-and secondary-prevention studies: a systematic review.» *The american journal of clinical nutrition*. **84**:5-17

Watson, J. & Sparkman, O. (2007). «*Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*» 4th. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Yao, H.; Shi, Y.; Gao, R.; Zhang, G.; Zhang, R.; Zheng, C. & Xu, B. (2006) «Isolation of lipids from photosystem I complex and its characterization with high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry.» *Journal of Chromatography B*. **837**: 101-107

8 Appendiks

AUT-06

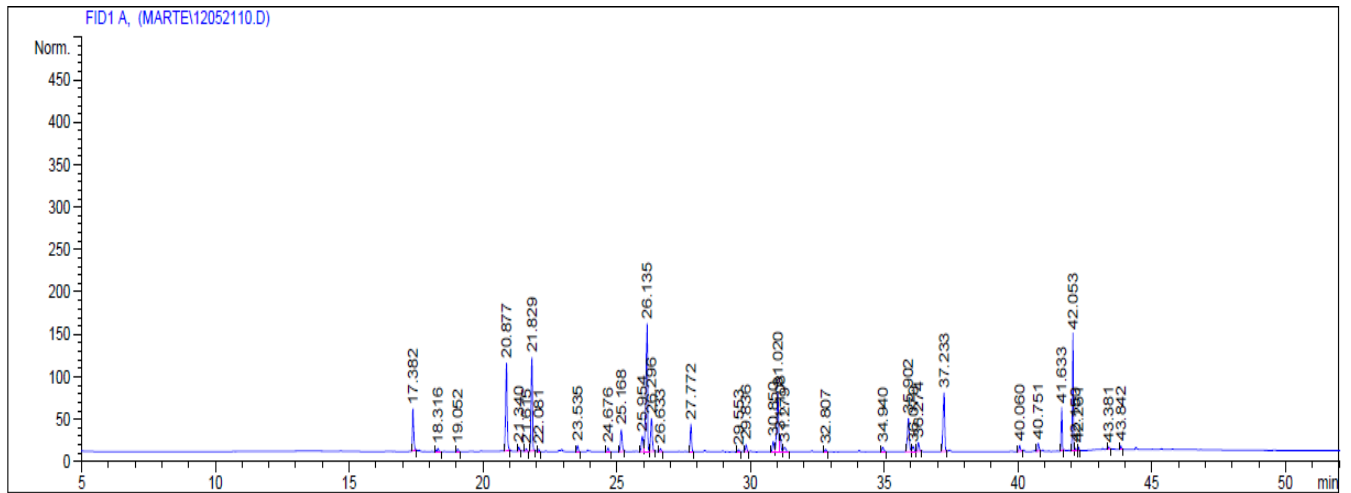


Figure 1: Kromatogram for PUFA-1.

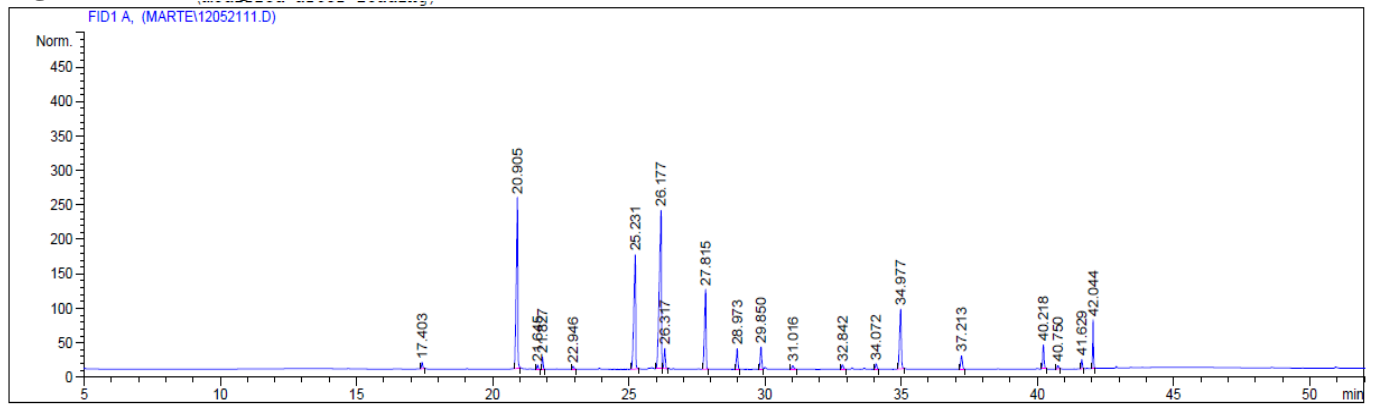


Figure 2: Kromatogram for PUFA-2.

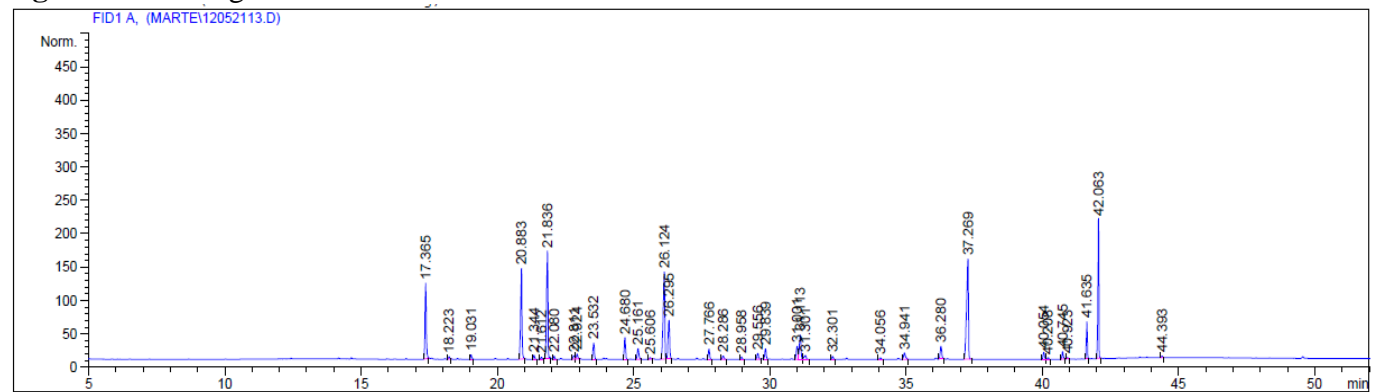


Figure 3: Kromatogram for PUFA-3.

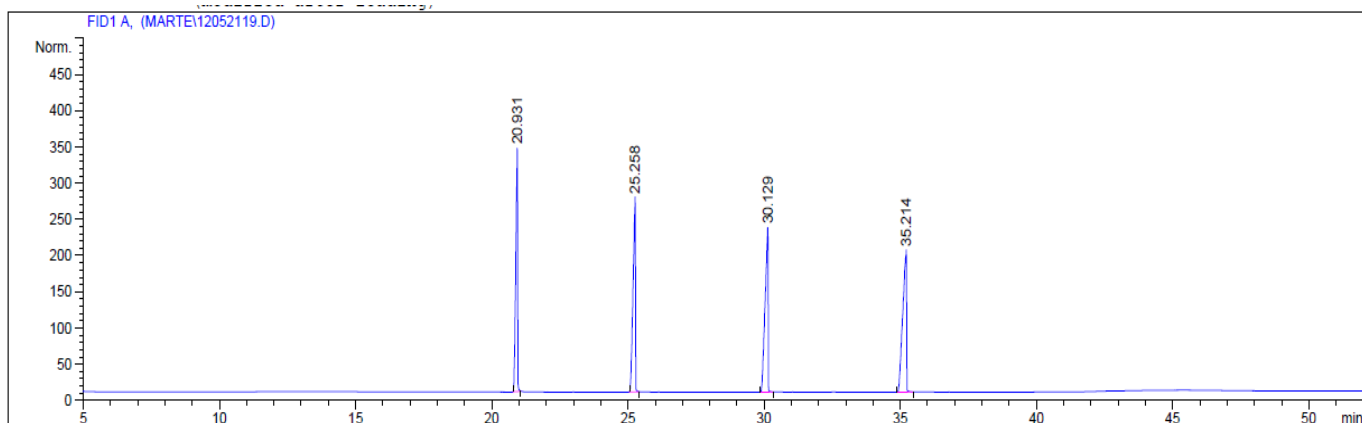


Figure 4: Kromatogram for GLC-40

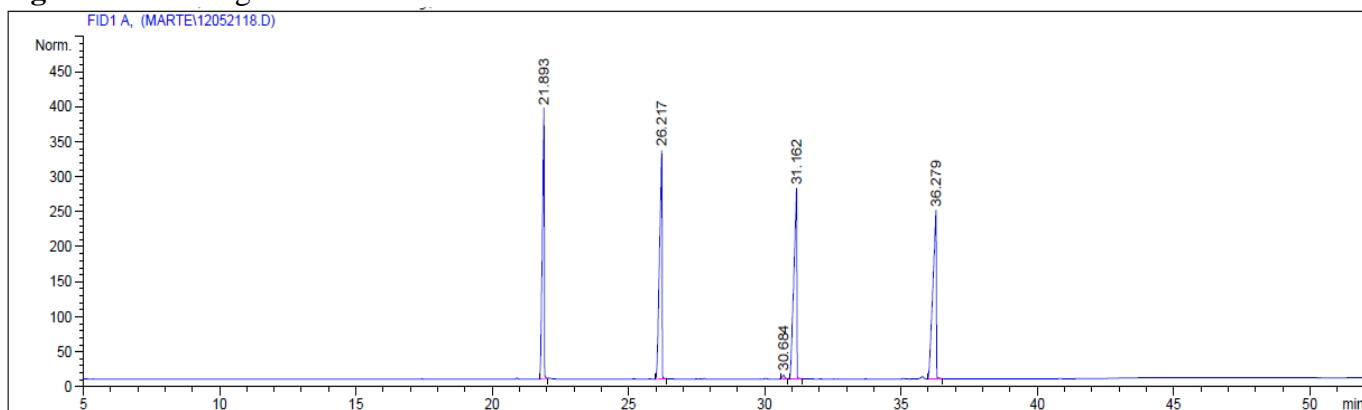


Figure 5: Kromatogram for GLC-50

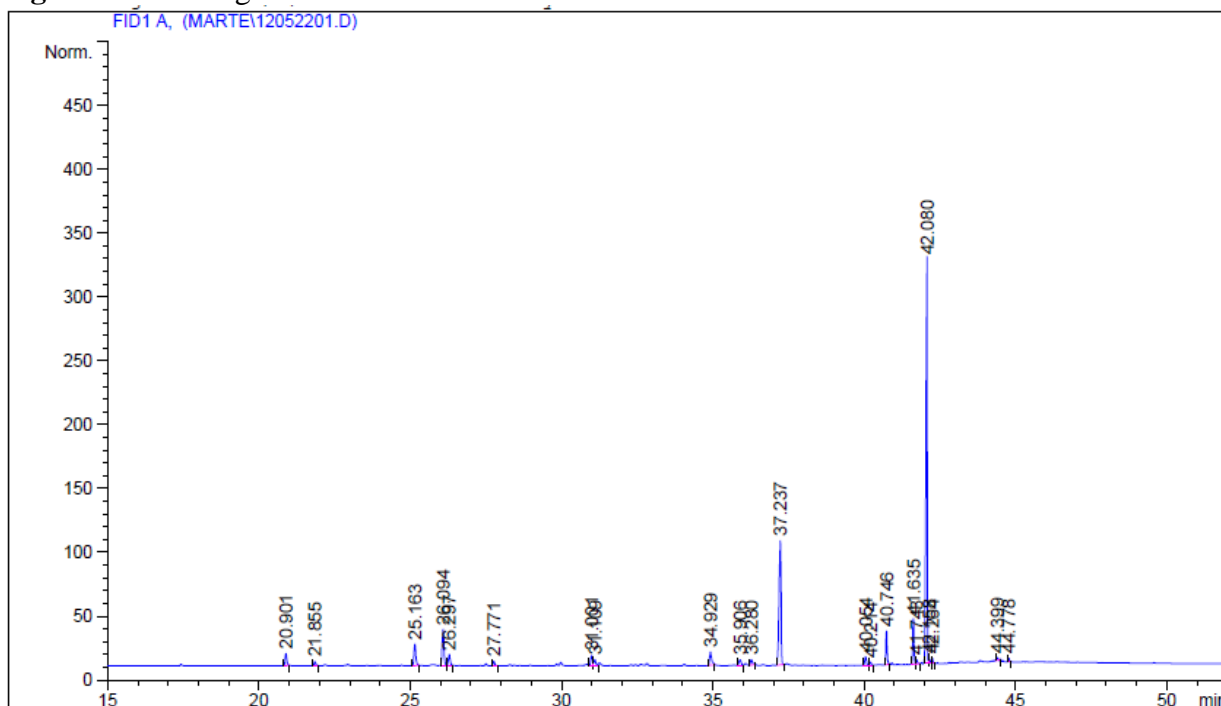


Figure 6: Kromatogram for produkt 1.

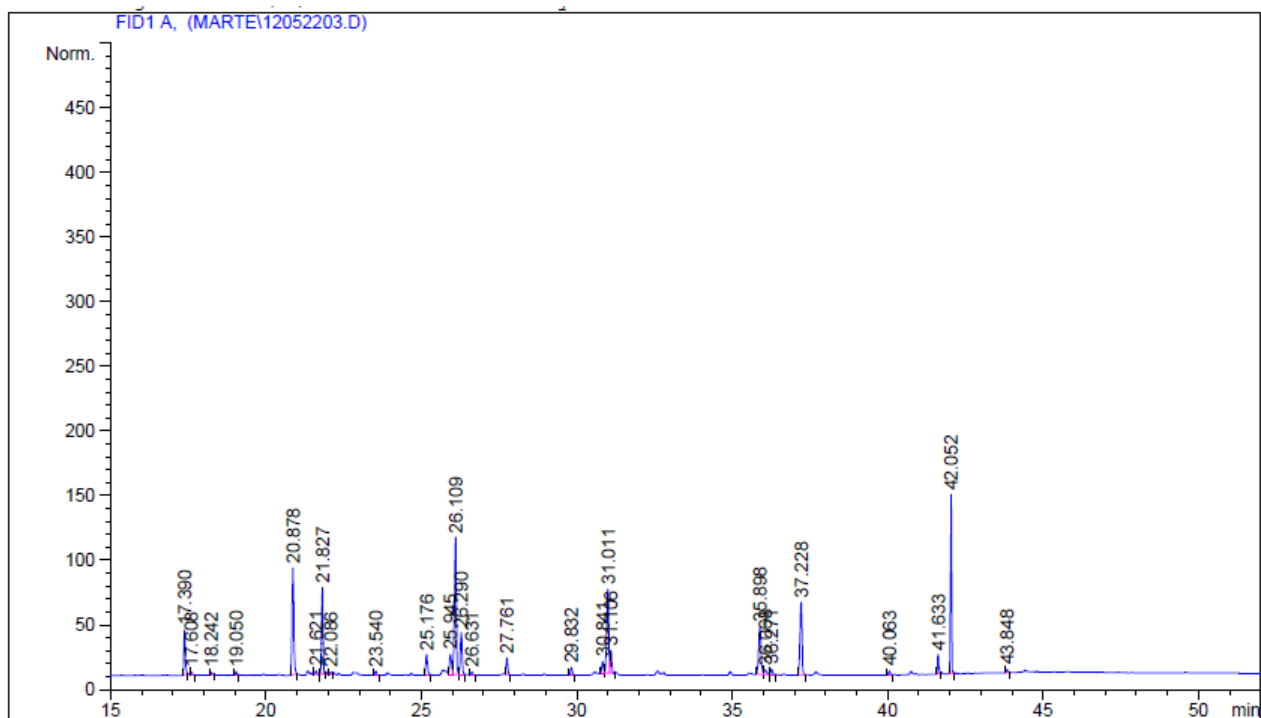


Figure 8: Kromatogram for produkt 2.

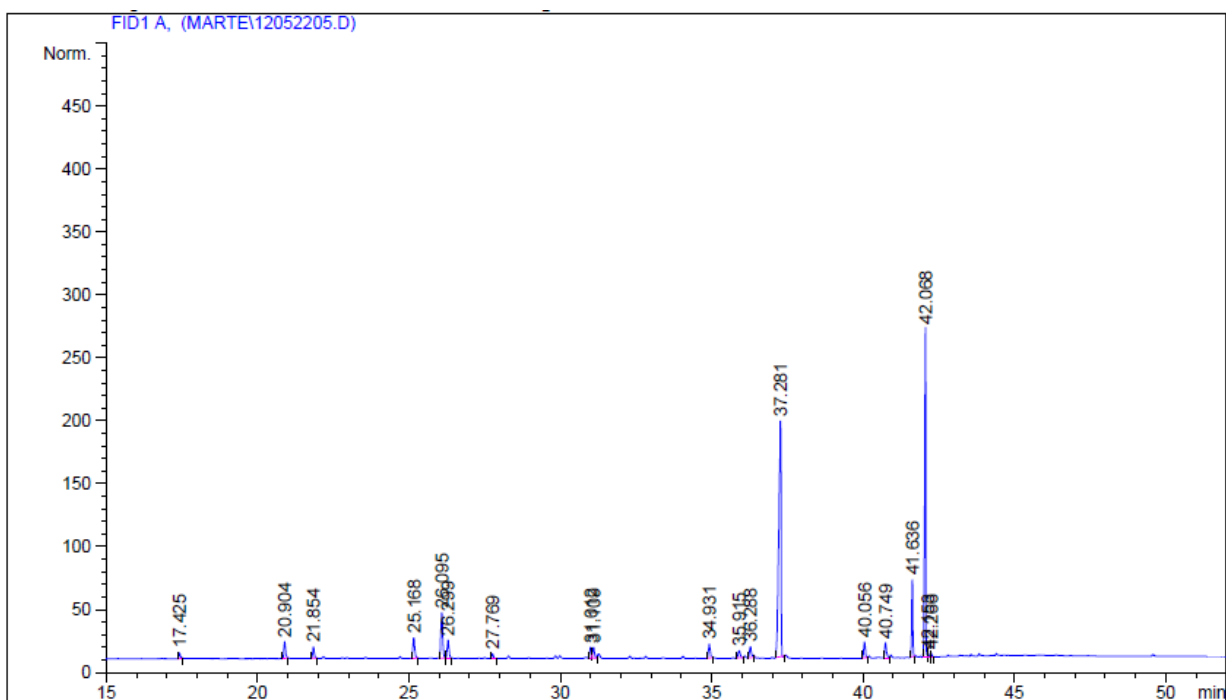


Figure 9: Kromatogram for produkt 3.

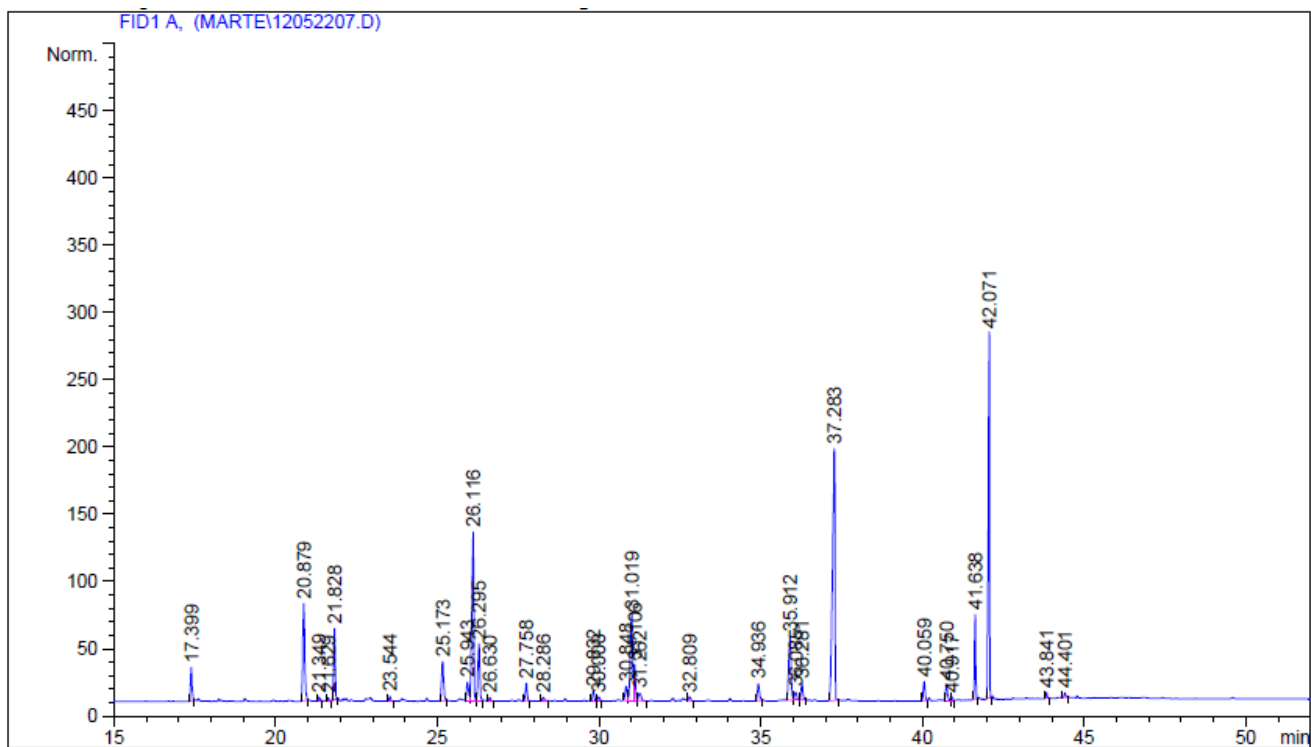


Figure 10: Kromatogram for produkt 4.

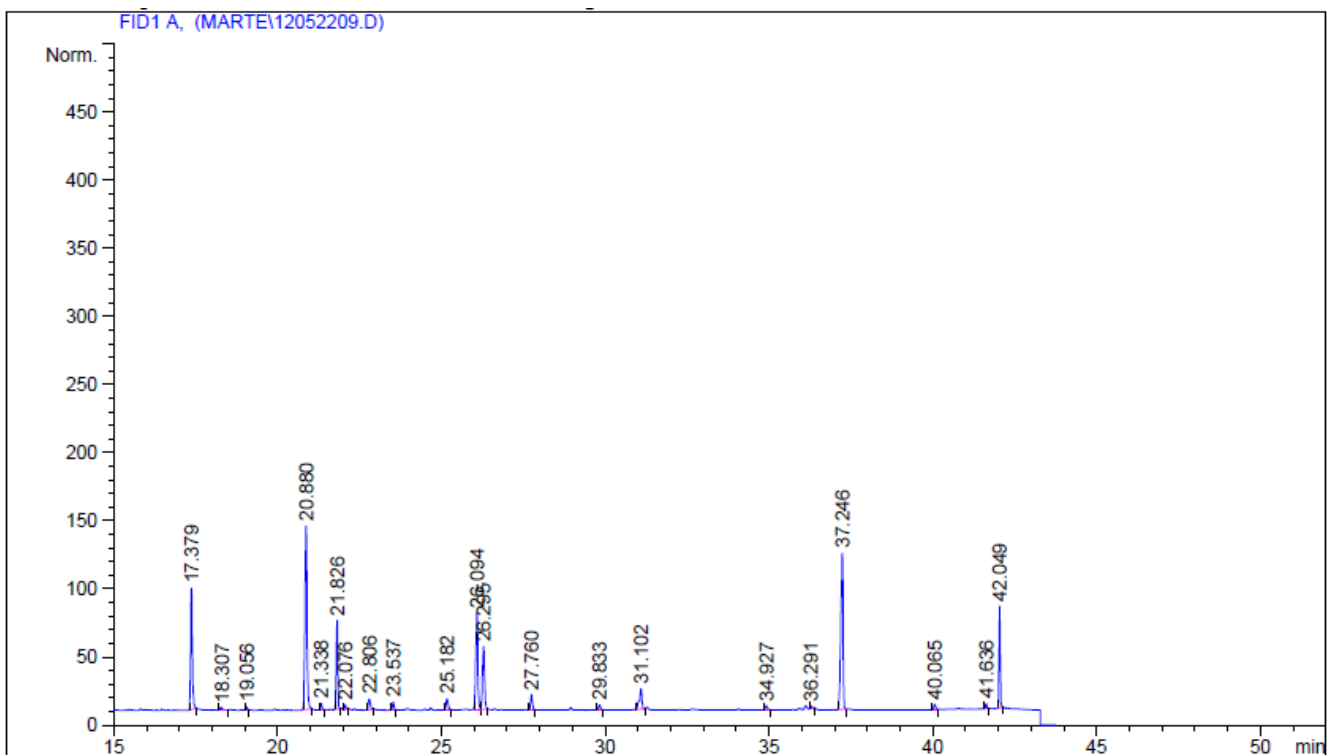


Figure 11: Kromatogram for produkt 6.

SPR 10-4

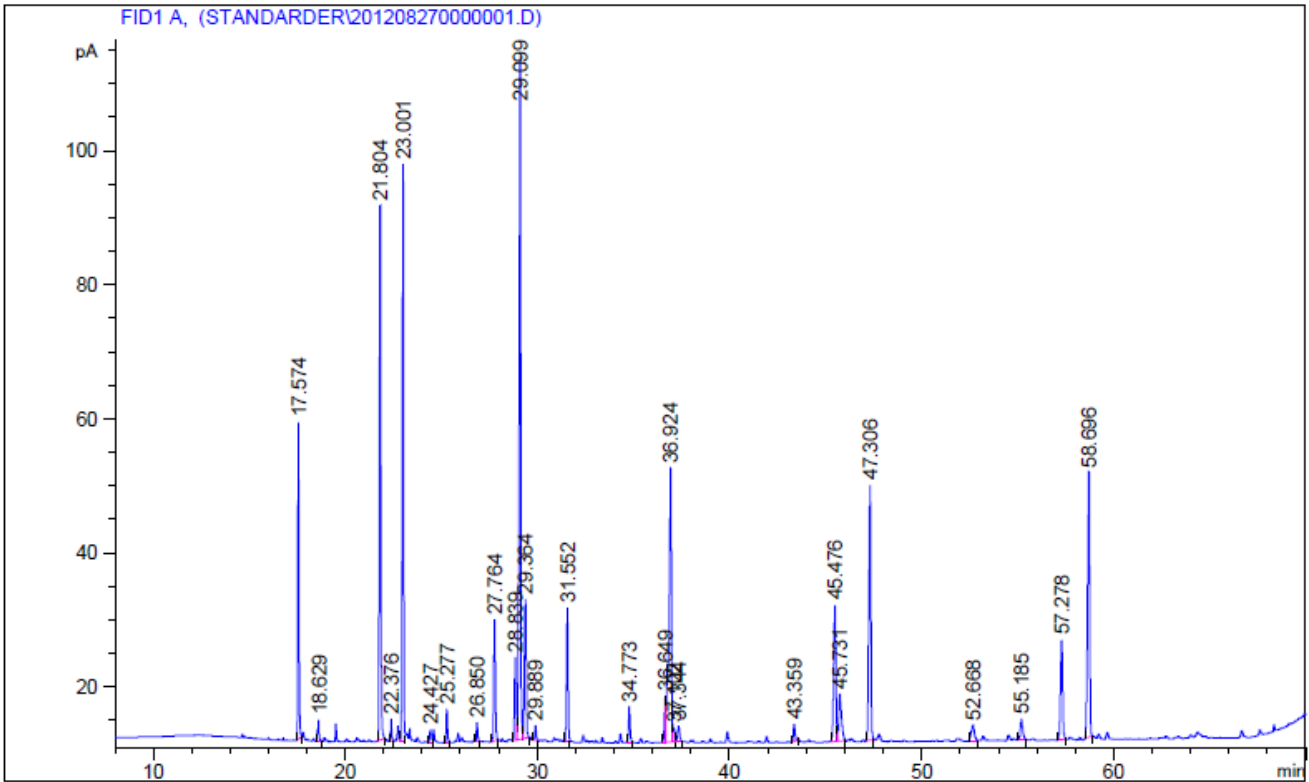


Figure 12: Kromatogram for PUFA-1

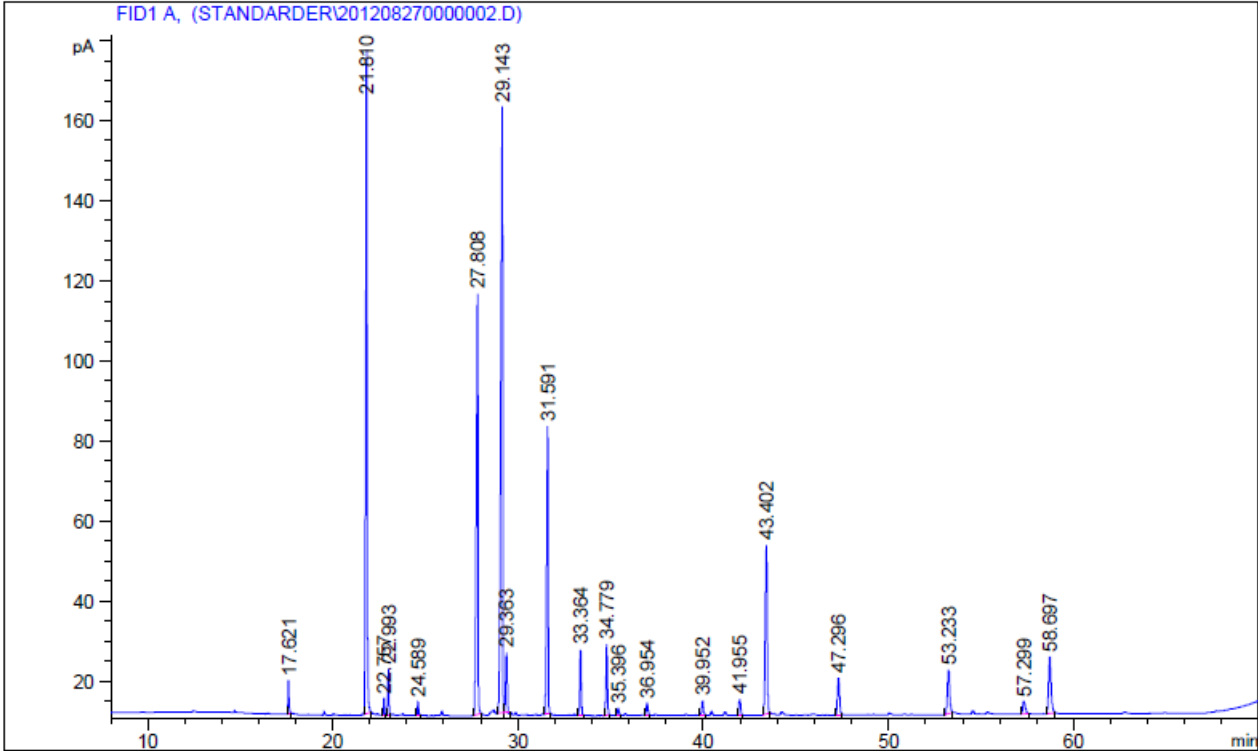


Figure 13: Kromatogram for PUFA-2.

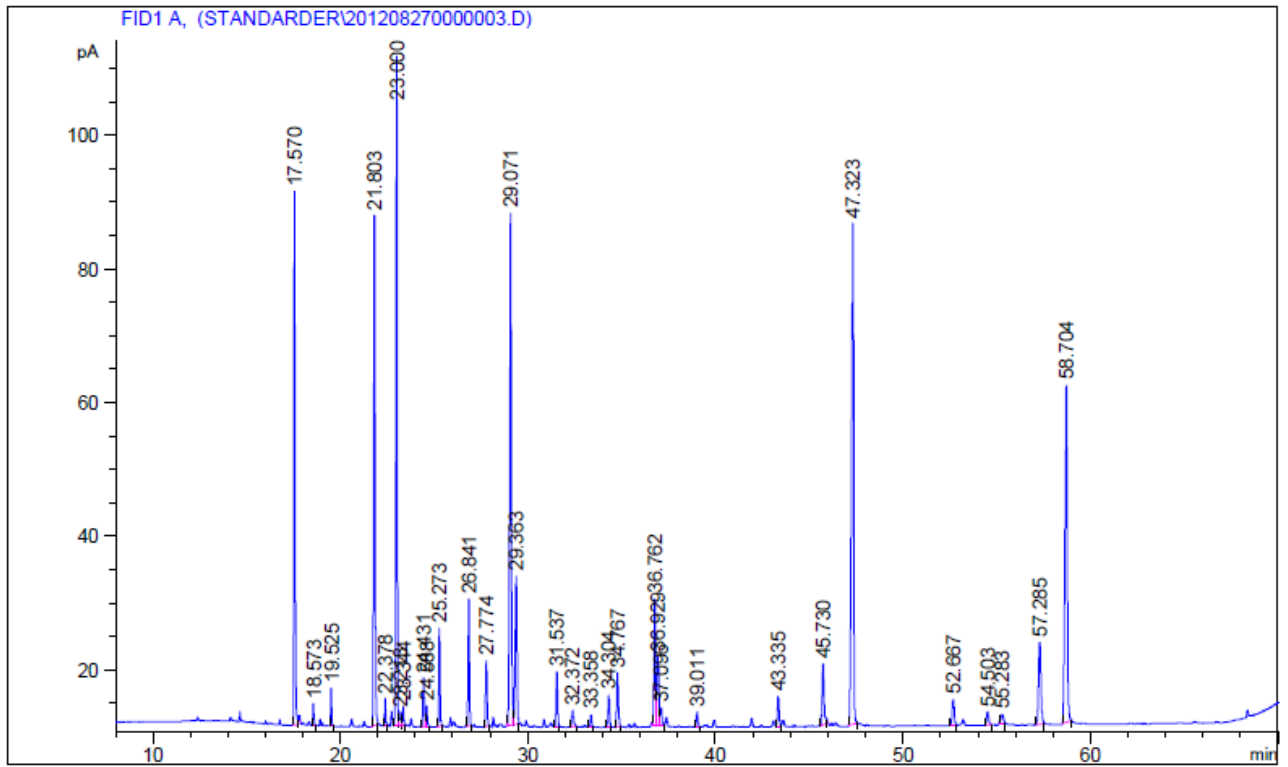


Figure 14: Kromatogram for PUFA-3.

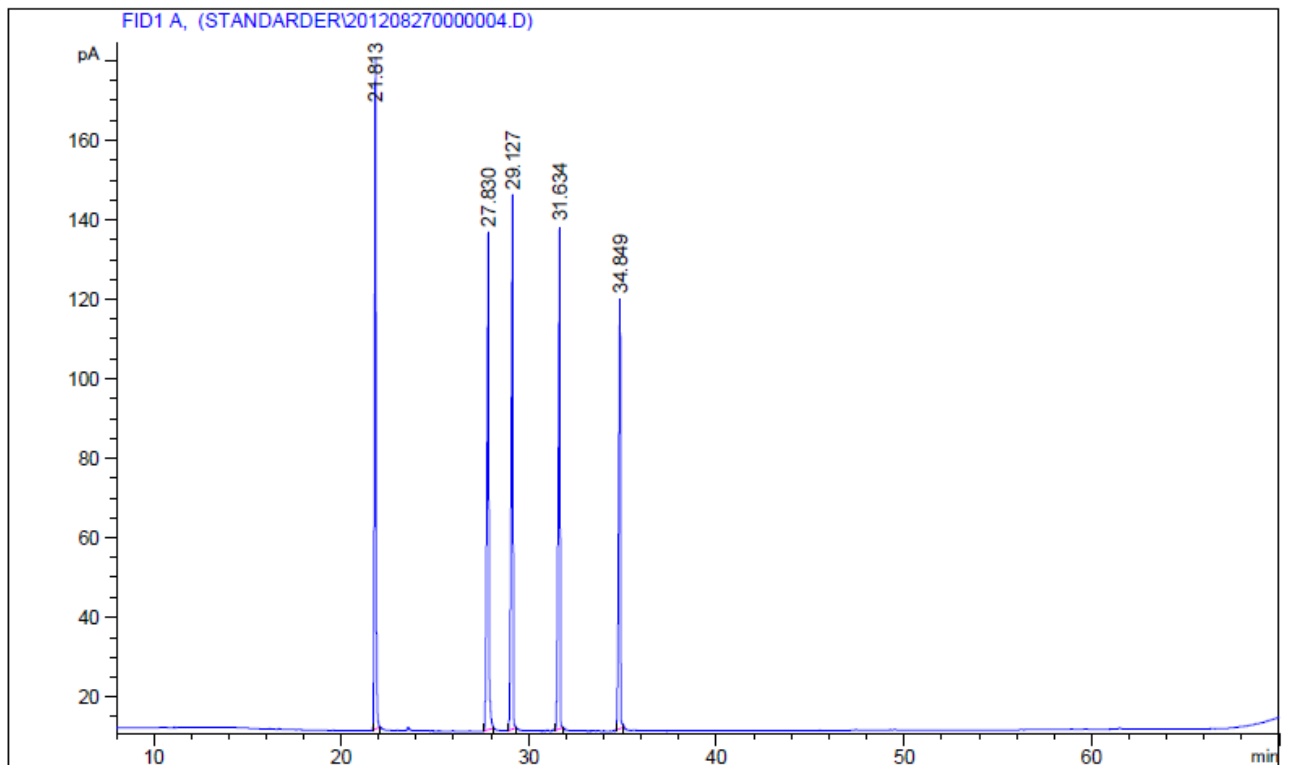


Figure 15: Kromatogram for GLC-10

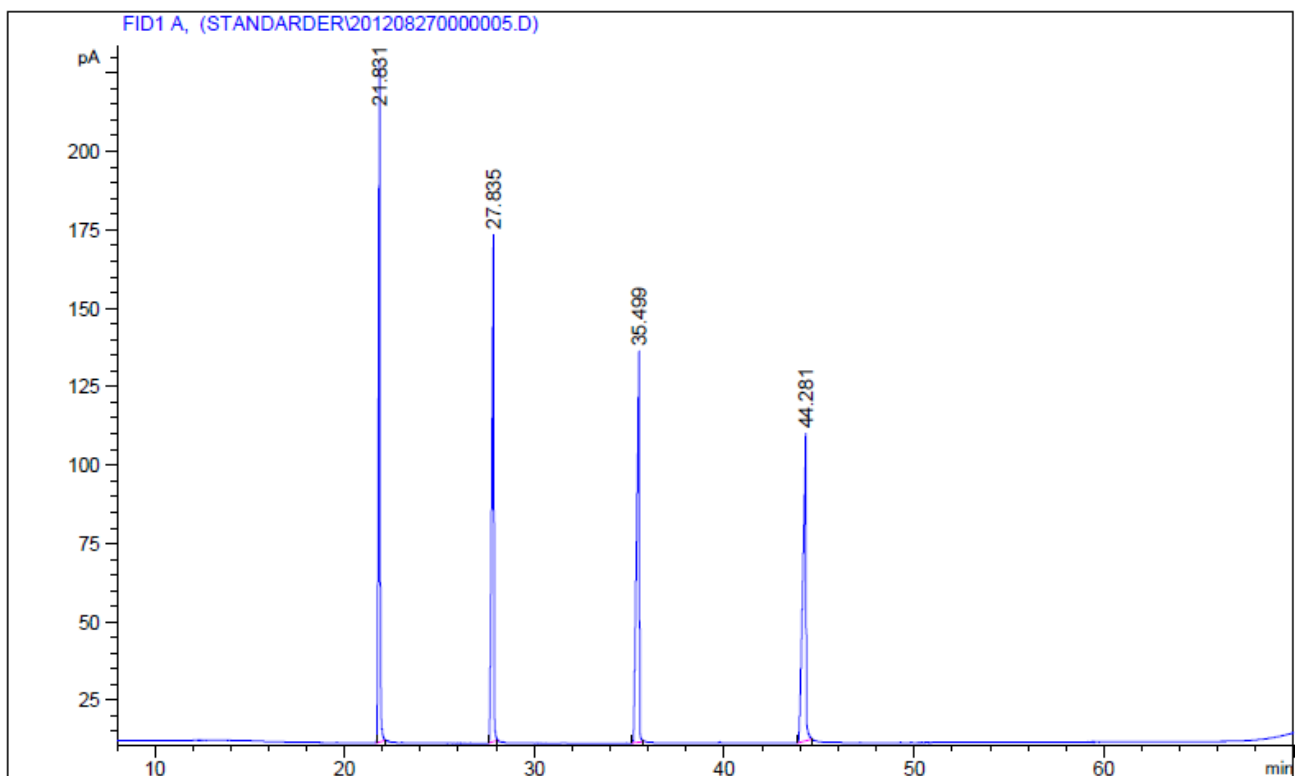


Figure 16: Kromatogram for GLC-40

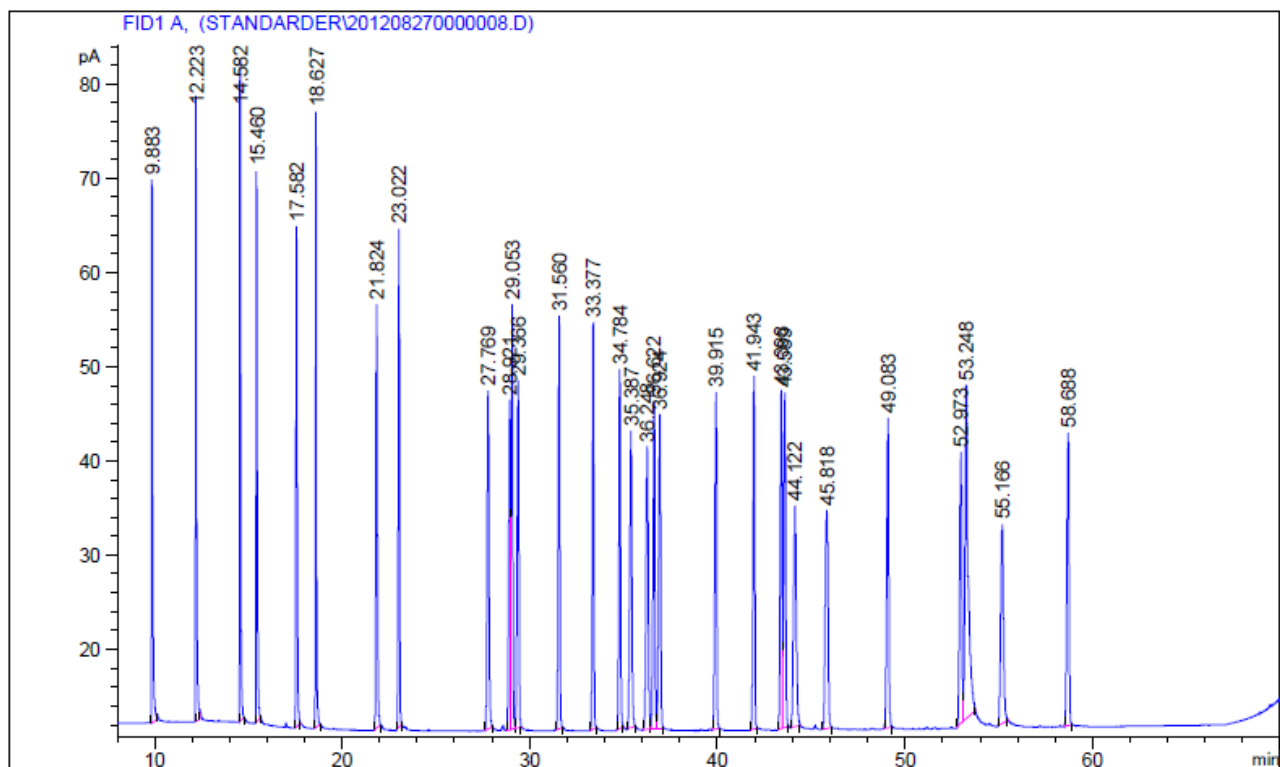
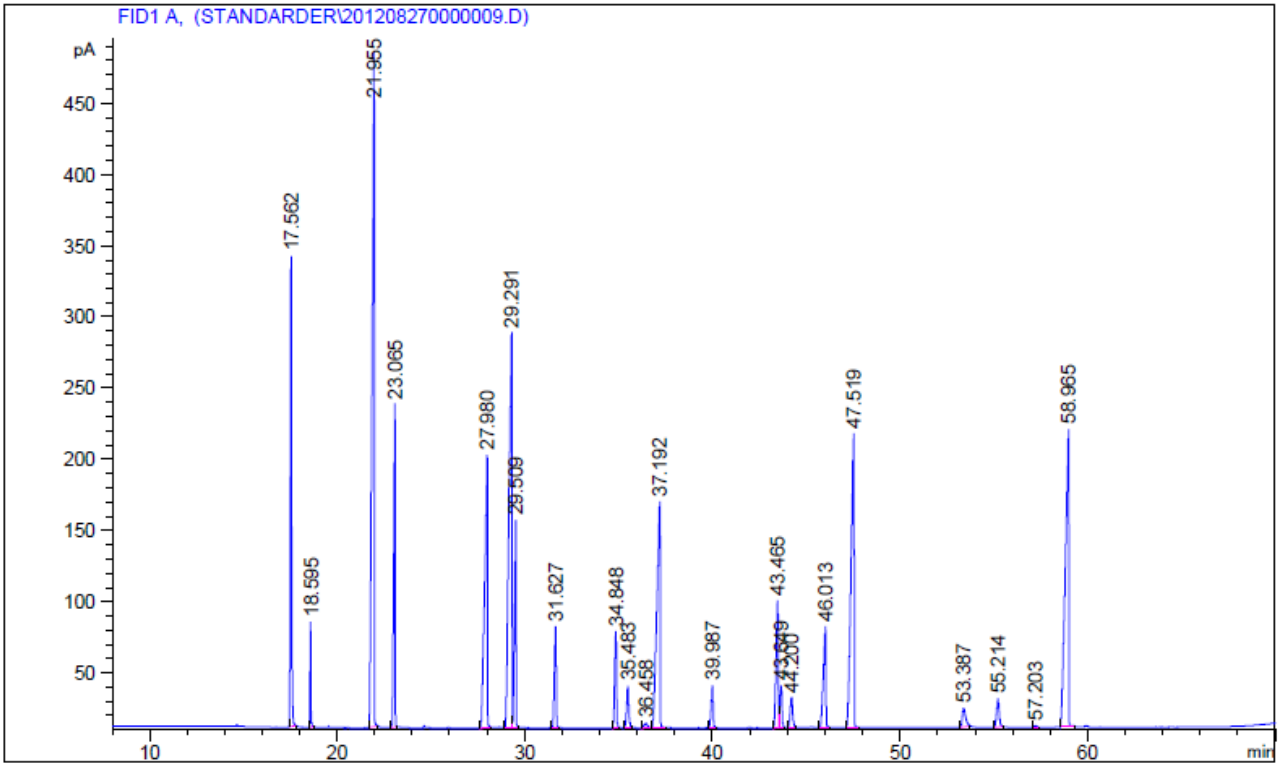
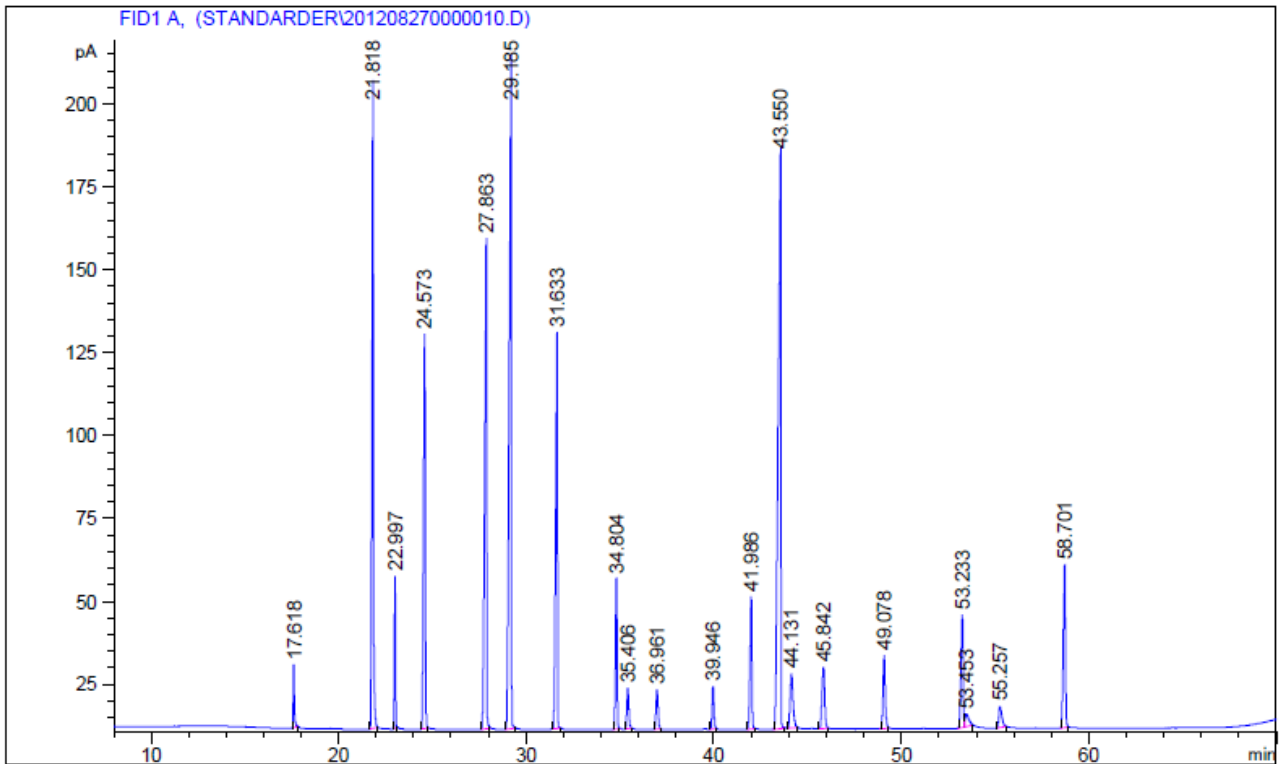


Figure 17: Kromatogram for GLC-411



Figur 18: Kromatogram for GLC-68D.



Figur 19: Kromatogram for GLC-96.

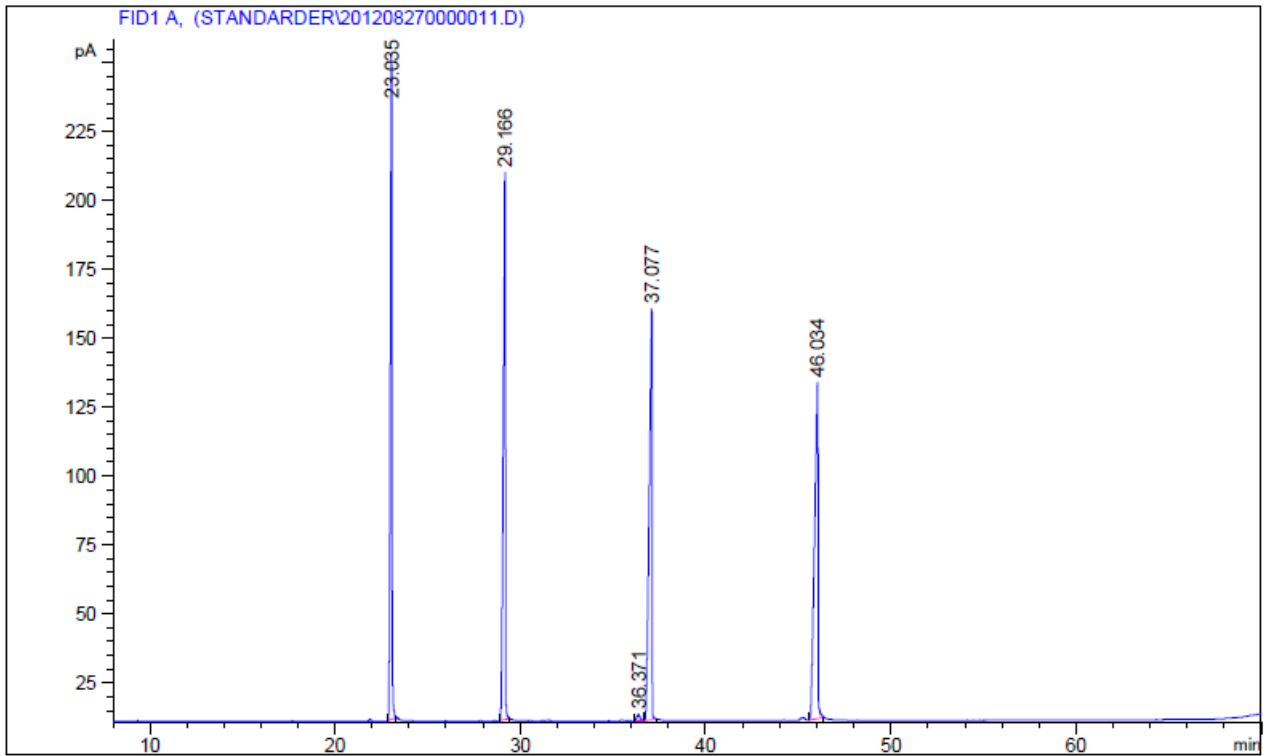


Figure 20: Kromatogram for GLC-50.

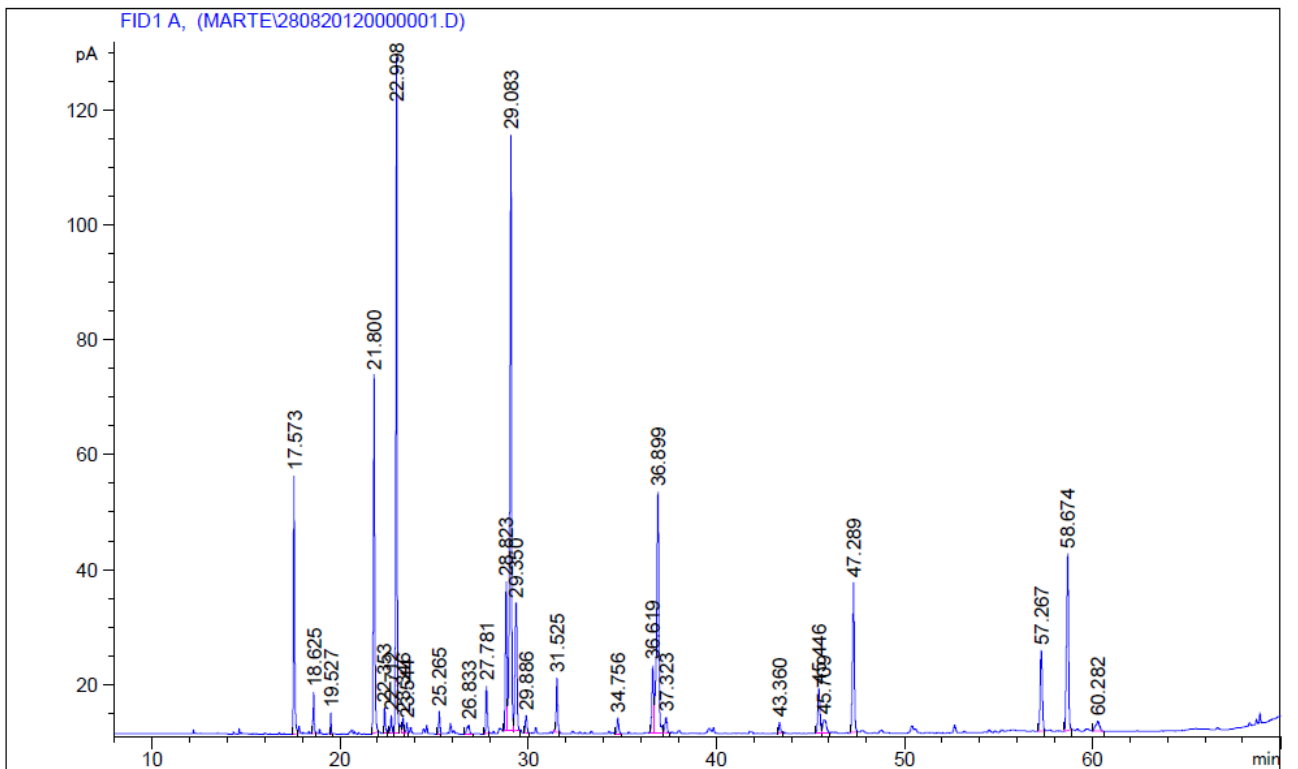
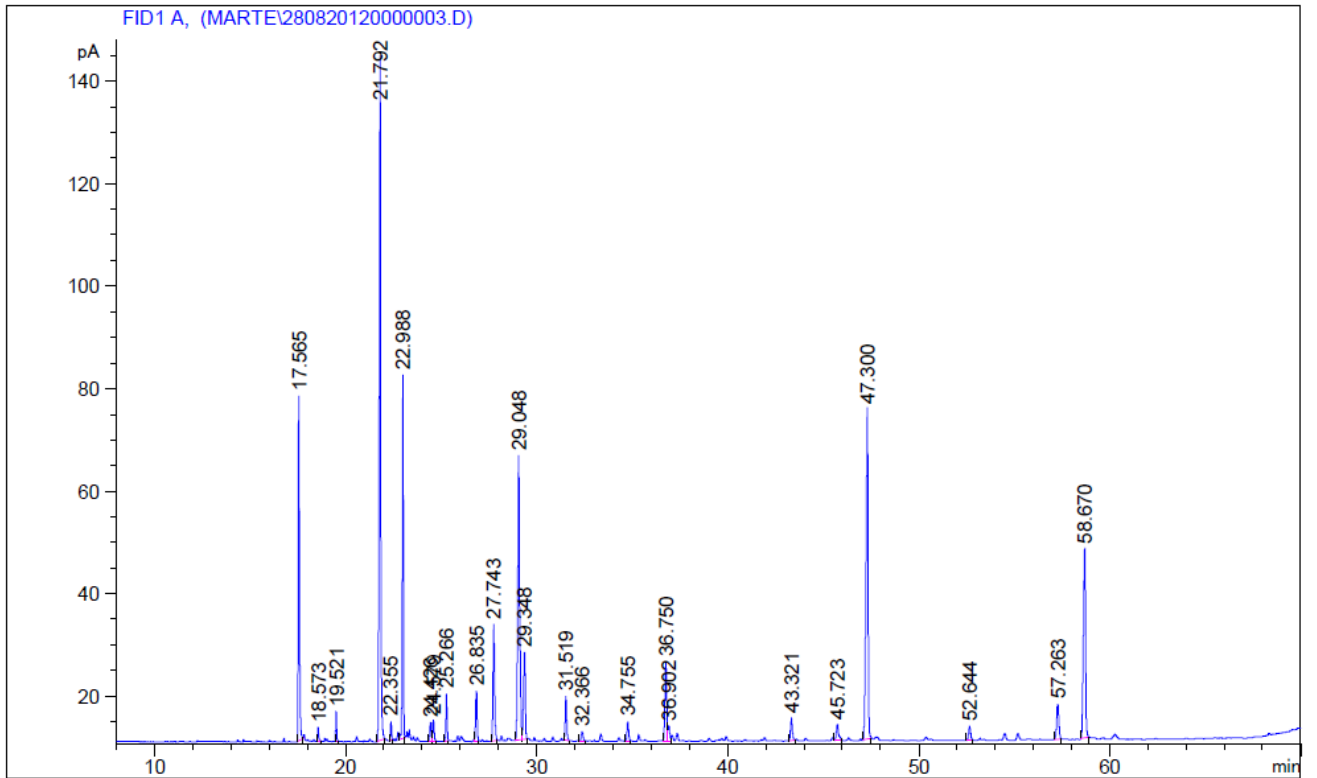
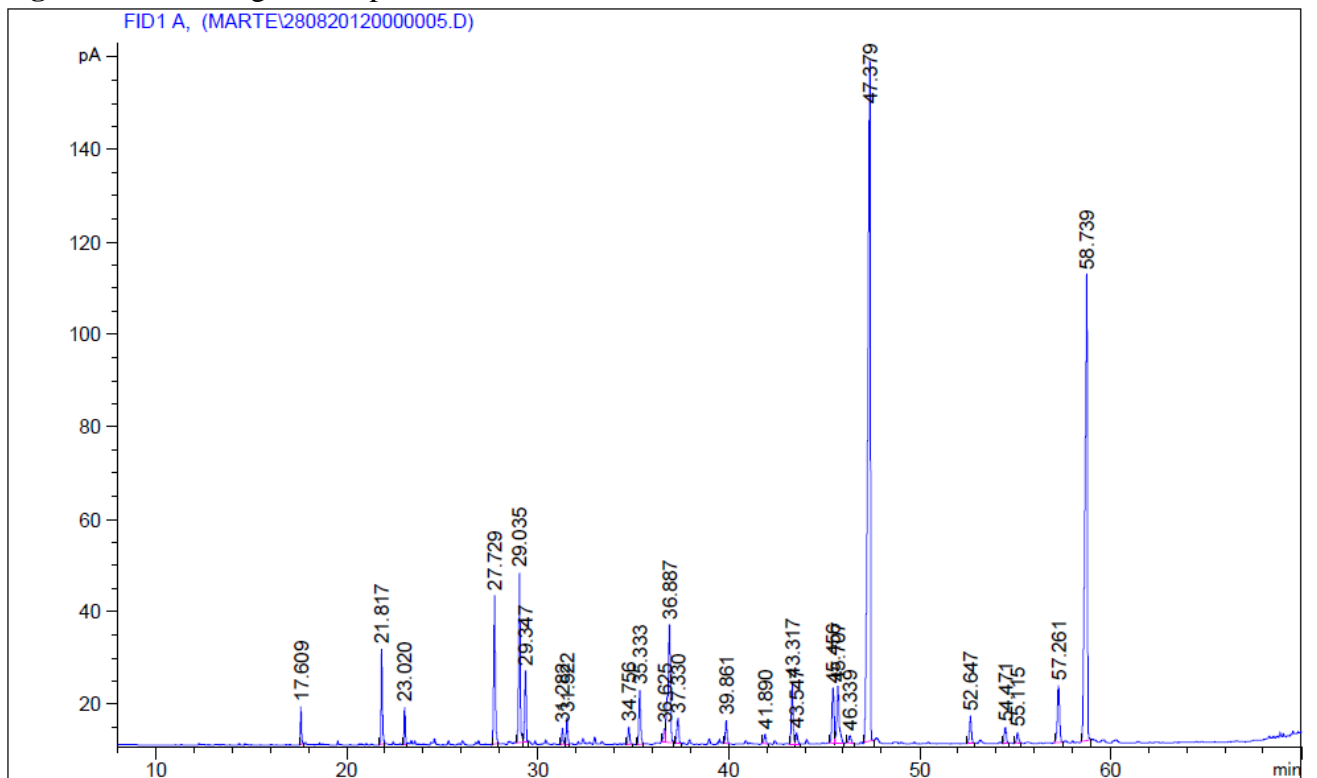


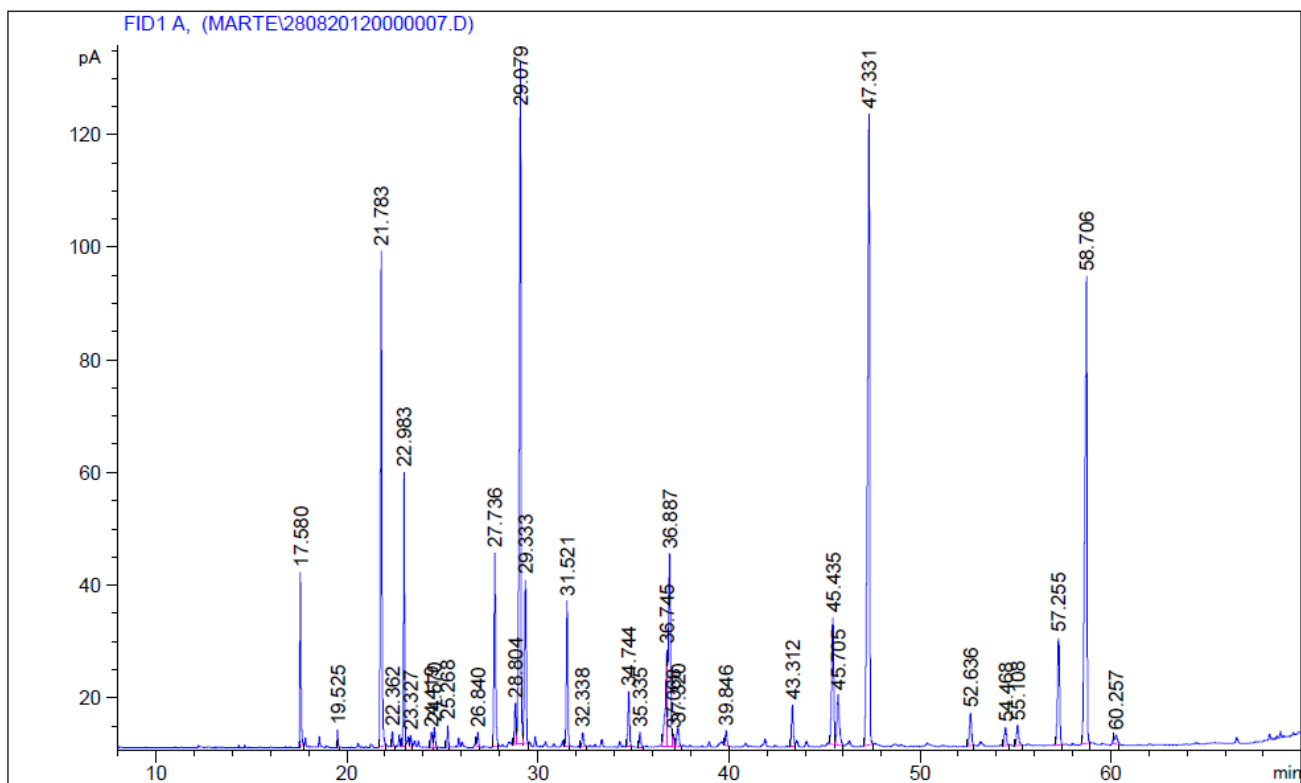
Figure 21: Kromatogram for produkt 5.



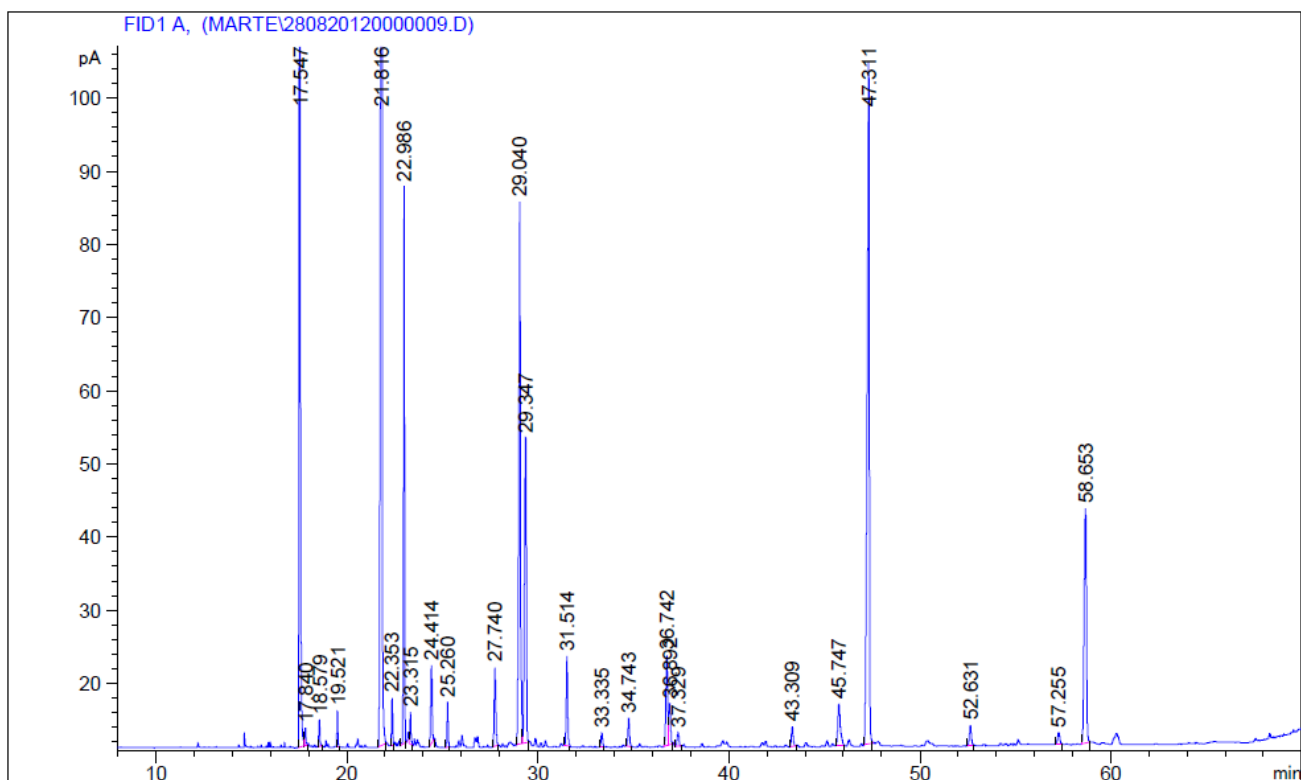
Figur 22: Kromatogram for produkt 7.



Figur 23: Kromatogram for produkt 8.



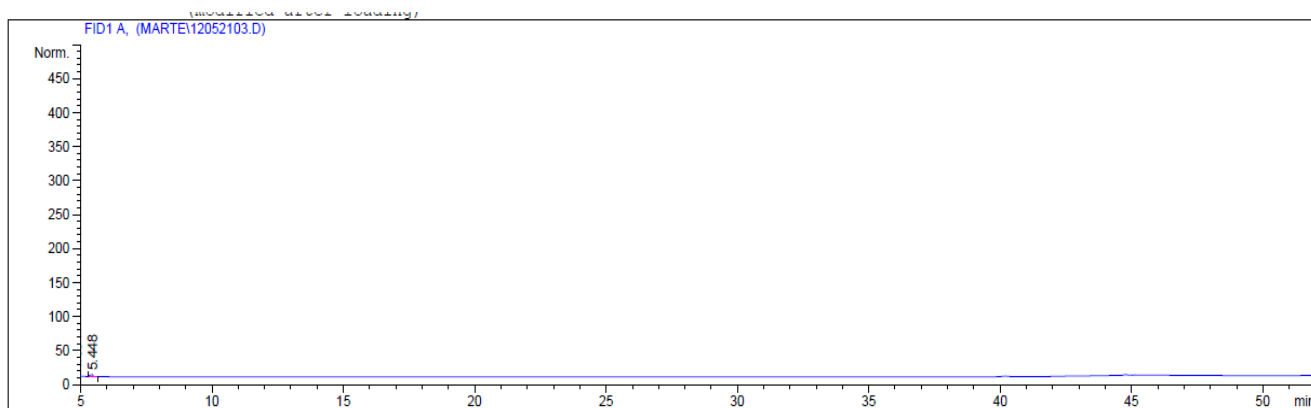
Figur 24: Kromatogram for produkt 9.



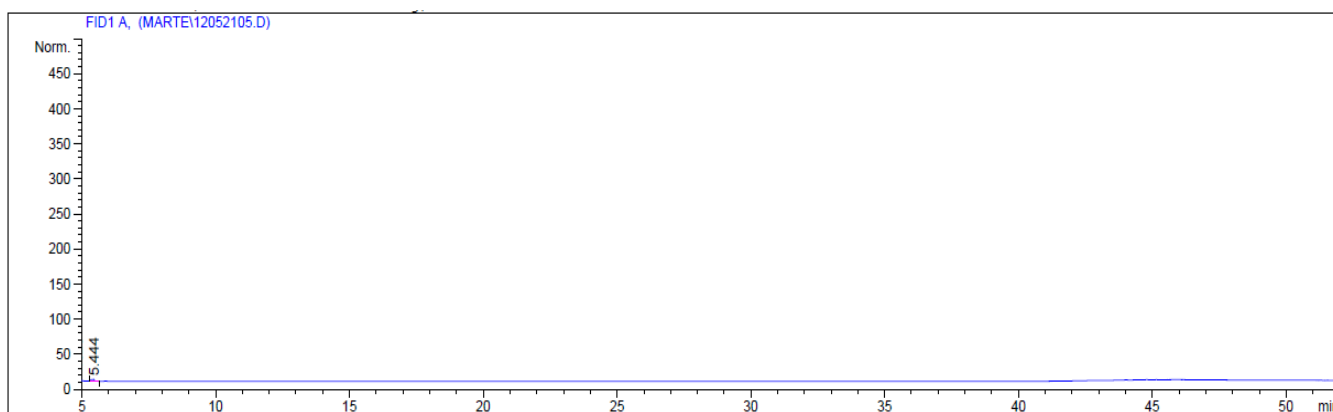
Figur 25: Kromatogram for produkt 10.

Preparativ HPTLC

Aut 06

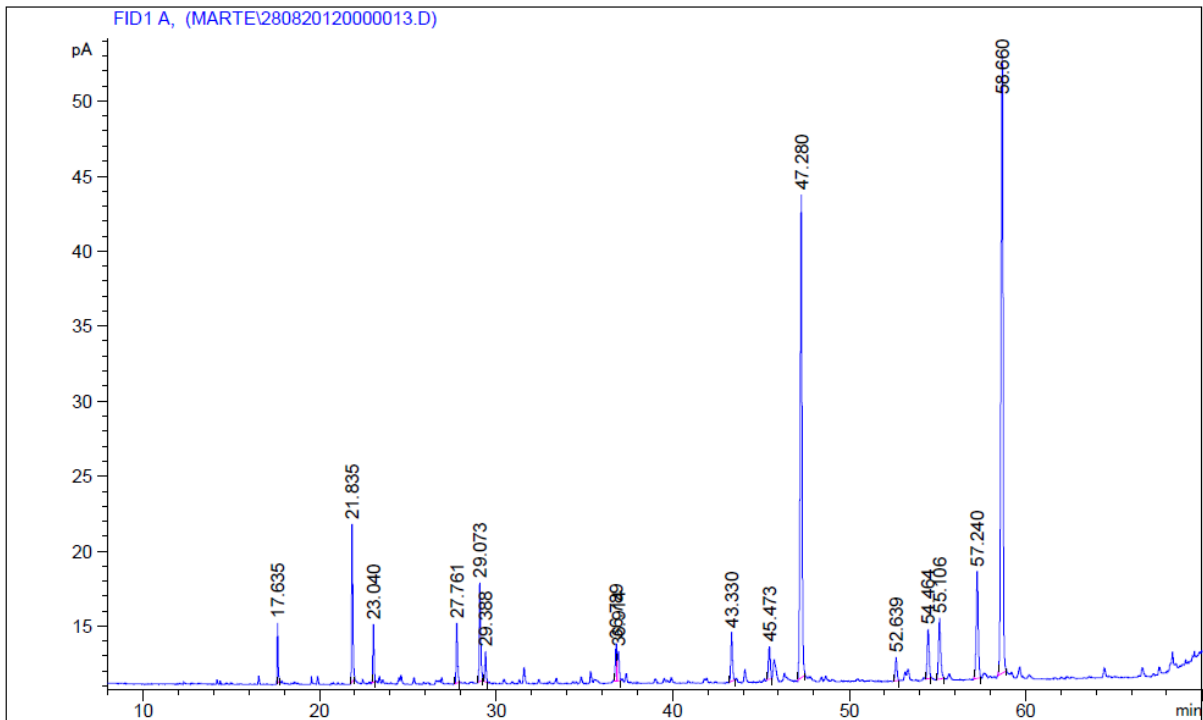


Figur 26: Kromatogram for 2MET

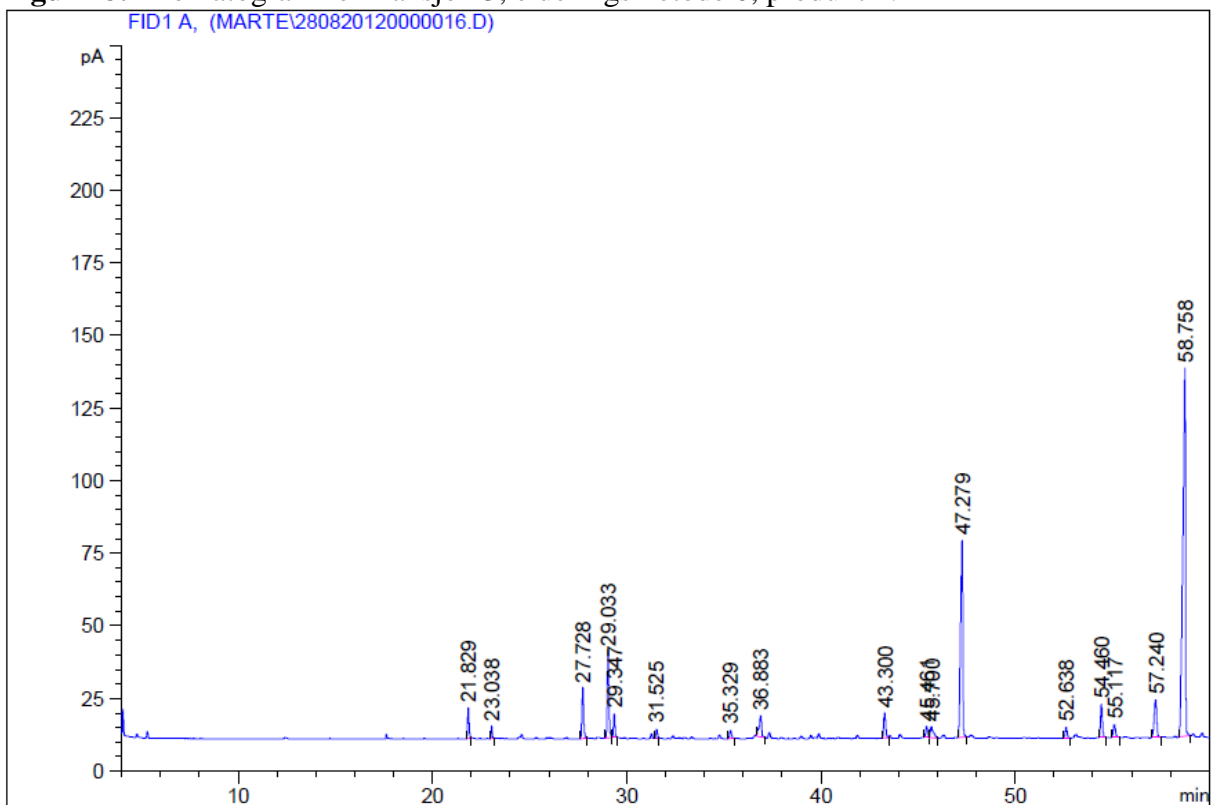


Figur 27: Kromatogram for 3MET.

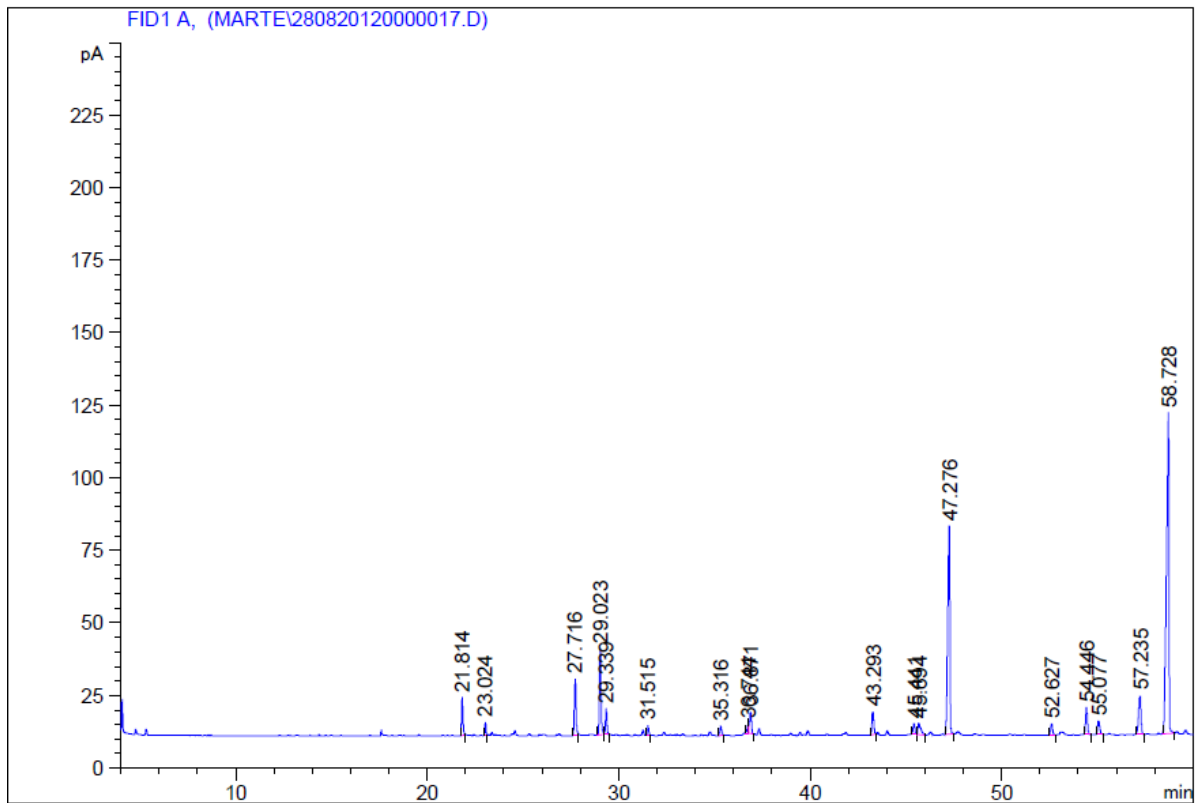
Fame analyse med GC-FID etter separasjon av lipidklasser med fast-fase ekstraksjon



Figur 28: Kromatogram for fraksjon 3, elueringsmetode 0, produkt 1.



Figur 29: Kromatogram for fraksjon 5 og 6, elueringsmetode 0, produkt 1.



Figur 30: Kromatogram for fraksjon 8, elueringsmetode 0, produkt 1.