

**PRODUKSJON AV EPA- OG DHA-
KONSENTRAT FRA FRYSETØRKET
SILDEROGN OG SILDEMEDELKE VED
HJELP AV UREAKOMPLEKSERING**

AV THEA NGUYEN

MASTEROPPGAVE I FARMASI



SENTER FOR FARMASI
VED KJEMISK INSTITUT
UNIVERSITET I BERGEN

2012

Forord

Denne oppgaven ble utført i samarbeid mellom Kjemisk institutt på Universitet i Bergen og Nofima Ingrediens i Bergen der labarbeidet mitt foregikk i perioden 2011-2012.

Jeg vil takke Universitet i Bergen for fem flotte år som farmasistudent.

Jeg ønsker å rette en spesiell takk til min veileder, førsteamanuensis Svein Are Mjøs, for en lærerik og interessant oppgave og ikke minst en veldig god hjelp i forbindelse med masteroppgaven min. Takk for at du alltid har vært tilgjengelig, til og med søndag, for å gi gode råd, veiledning underveis, og for gjennomlesing og retting av oppgaven. Takk også for hjelpen jeg fikk på laboratoriet, kjøring til Nofima og til Sotra apotek i de travle labdagene.

Jeg vil takke Nofima Ingrediens for å ha stil til rådighet laboratorie plass, utstyr og material som var nødvendig til mitt arbeid, hyggelig julebord og lunsjpauser. En stor takk også til flere av Nofimas ansatte, særlig Bjørn Ole Haugesgjerd og Tor-Arne Krakeli som har delt kunnskap og erfaring, samt hjulpet meg med både laboratorieproblemer og diverse andre ting.

Jeg vil takke mine beste kollegaer på apotek 1 Sotra, Mary Johnsen Seim og Inger Johnsen, apoteker Erik Oscar Pomp, min eksveileder Egil Smestad på apotek 1 Knarvik og medstudenten, Ziar Wasta, for alle gleder jeg fikk under masterskrivingen.

Til sist, vil jeg takke min familie, overalt min mor for all omsorg, støtte og kjærighet.

Thea Nguyen

Bergen, 2012

Sammendrag

Rogn og melke fra sild har et høyt innhold av omega-3 fettsyrer som er dokumentert å ha ulike positive helseeffekter. Effektene er best dokumenterte for hjerte- og karsykdom, samt for inflammatoriske lidelser som leddgikt. Hensikten med denne oppgaven har vært å forsøke å oppkonsentrere de gunstige omega-3 fettsyrene, EPA (eikosapentaensyre) og DHA (dokosaheksaensyre), fra frysetørket silderogn og melke.

Til oppkonsentrering av EPA og DHA ble det anvendt en metode som fjerner uønskede fettsyrer ved at de bindes i ureakrystaller. Oppkonsentreringen foregikk hovedsakelig i 3 trinn. Råstoffene ble først ekstrahert med enten metanol eller etanol. Deretter ble ekstraktet hydrolysert for å danne frie fettsyrer før de frie fettsyrene ble ekstrahert over i heptan. Til slutt ble flerumettede fettsyrer oppkonsentrert ved ureafellingen. Resultatene ble vurdert ved hjelp av fettsyreanalyse på gasskromatografi (GC) og lipidklasseanalyse på væskechromatografi (LC).

To innledende forsøk på tran viste at ureafellingen var vellykket og at utbyttet av omega-3-fettsyrene var høyt (over 90 % i snitt). Innledende forsøk på metanolekstrakt av rogn viste derimot en lite vellykket ureafelling der graden av oppkonsentrering av EPA og DHA var minimal, og produktet hadde høyt innhold av kolesterol. I tillegg var det store problemer med emulsjon ved ekstraksjonen.

Etter det innledende forsøket på rogn med metanol ble det fokusert på å løse emulsjonsproblemet. Metanol ble derfor byttet ut med etanol for å forsøke å redusere ekstraksjon av polare forbindelser som kunne forårsake emulsjonsproblemet, men det gav ingen forbedring. Det hjalp heller ikke tilsetning av salt, oppvarming, eller nedkjøling av blandingen. Filtrering gjennom en byrette fylt av natriumklorid gav resultat men metoden var lite egnet for bruk i større skala da den krevde mye løsemidler og tok lang tid.

For å finne ut mer om kjemien i ekstraksjonen, ved hvilken pH emulsjon ble dannet og når kolesterol ville gå over i heptanfasen ble etanolekstrakter av rognpulver titrert med 2N HCl etter hydrolyse. Resultatene viste at kolesterolet følger fettsyrene inn i heptanfasen og emulsjonen oppstod før mesteparten av fettsyrene gikk over i den upolare fasen. Dette førte til at problemet med kolesterol og emulsjon forble uløst i våre forsøk.

Det ble også gjort fire andre etanolekstraksjonsforsøk på rogn og melke der ekstraktene ble samlet opp for å undersøke om det var mulig å oppnå vellykket ureafelling ved å variere konsentrasjon av fettsyrer og urea på tre ulike nivå: lav, middels eller høy konsentrasjon i totalt ni forsøk. Oppkonsentreringen av EPA og DHA var best for ureaforsøket med høy konsentrasjon av fettsyrer og middels høy konsentrasjon av urea, der forholdet mellom urea og fettsyrer var 1,96:1.

I det mest optimale ureaforsøket var summen av EPA og DHA i den oppkonsentrerte fraksjonen 76 %, der EPA og DHA utgjorde henholdsvis 20 % og 56 % av fettsyrene. Dette er høye nivåer sammenlignet med de fleste omega-3 produktene på markedet. Men høy grad av oppkonsentrering har sin pris i lavt utbytte. Andelen av EPA og DHA tilsatt i ureaprosessen som ble gjenvunnet i den oppkonsentrerte fraksjonen var henholdsvis 73 % og 74 %, dvs. at tapene av EPA og DHA i prosessen er ca. 25 %.

Abstract

Herring roe and milt are high in omega-3 fatty acids that are proven to have various health benefits. The effects are best documented for cardiovascular disease, as well as inflammatory disorders such as arthritis. The purpose of this study has been to try to concentrate the beneficial omega-3 fatty acids, EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid), from lyophilized (freeze-dried) herring roe and milt.

A method for concentration of EPA and DHA that removed unwanted fatty acids by binding in urea crystals was applied. The process mainly consisted of three steps. The raw materials were first extracted with either methanol or ethanol. Then, the extract was hydrolyzed to form free fatty acids and the fatty acids were extracted into heptane. Finally, the polyunsaturated fatty acids were concentrated by urea complexation. The results were assessed by fatty acid analysis on gas chromatography (GC) and lipid class analysis by liquid chromatography (LC).

Two initial experiments with cod liver oil showed that the urea complexation was successful and the yield of omega-3 fatty acids was high (over 90% on average). The initial experiment on methanol extract of herring roe showed, however, a very low degree of concentration of EPA and DHA, and the product had high levels of cholesterol. In addition, there were major emulsion problems when the hydrolyzed fatty acids were extracted.

After the initial methanol-experiment with herring roe, focus was on solving the emulsion problem. Methanol was therefore replaced with ethanol in order to reduce the extraction of polar compounds that might cause the problems, but it gave no improvement. Neither did it help with addition of salts, heating or cooling the emulsified phases. Filtration through a burette filled with sodium chloride gave results but the method was not suitable for use in larger scale since it required large amounts of solvents and was time consuming.

To find out more about the chemistry in the extraction, at which pH emulsion was formed and when cholesterol would go into the heptane phase, the ethanol-extracts of herring roe were titrated with 2N HCl after the hydrolysis. The results showed that the cholesterol followed the fatty acids into the heptane phase and the emulsion occurred before most of the fatty acids passed into the apolar phase. The problem of cholesterol and emulsion therefore remained basically unsolved in our experiments.

Four other experiments with ethanol-extraction were carried out in which extracts of herring roe and milt were collected to examine whether it was possible to achieve successful urea complexation by varying the concentration of fatty acids and urea on three different levels: low, medium or high concentration in total nine urea experiments. Highest concentration of EPA and DHA relative to other fatty acids were achieved with high concentration of fatty acid and medium concentration of urea, where the relationship between urea and fatty acids were 1,96:1.

In the most optimal urea experiment, the sum of EPA and DHA in the free fraction with fatty acids dissolved in ethanol was 76 %, where EPA and DHA were respectively 20 % and 56 % of total fatty acids. This is high levels compared to most omega-3 products on the market. A high degree of concentration has its price in low yield. The percentage of EPA and DHA added to the urea process that was found in the concentrated fraction was respectively 73 % and 74 %. Thus, there was a loss of approximately 25 % of the two fatty acids.

Forkortelser

AA	Arakidonsyre/ Arachidonic acid, 20:4 n-6
ALA	Alfa-linolensyre/ Alfa-linolenic acid , 18:3 n-3
DHA	Dokosaheksaensyre, Docosahexaenoic acid, 22:6 n-3
EPA	Eikosapentaensyre/ Eicosapentaenoic acid, 20:5 n-3
EtOH	Etanol
FA	Fettsyre/ Fatty acids
FAME	Fettsyremetylestre/Fatty acid methyl ester
FFA	Frie fettsyrer/ Free fatty acids
FID	Flammeionisasjonsdetektor
GC	Gasskromatografi/ Gasschromatography
HPLC	Høytrykk væskekromatografi/ High Performance Liquid Chromatographi
IF	Ved ureafelling: Fettsyrefraksjon i urea/ Included fraction
IS	Intern standard/ Internal standard
IUPAC	The International Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Linolsyre, 18:2 n-6/ Linoleic acid
LC	Væskekromatografi/ Liquid Chromatographi
m/z	Molekylmasse/ladning
MS	Massespektrometri
n-3	Omega-3 (ω 3)
n-6	Omega-6 (ω 6)
NIF	Ved ureafelling: Løst fettsyrefraksjon / Non-urea included fraction
PC	Fosfatidylkolin/ Phosphatidyl-cholin
PE	Fosfatidyletanolamin/ Phosphatidyl-ethanolamin
PI	Fosfatidylinositol/ Phosphatidyl-inositol
PUFA	Flerumettede fettysyre / Polyunsaturated fatty acids
TAG	Triasylglyserol / Triglyserid
U/FA	Urea/fettsyre / Urea/fatty acid

Innhold

Forord.....	I
Sammendrag	II
Abstract.....	IV
Forkortelser.....	VI
1 Innledning	1
1.1 Hensikt med oppgaven	1
1.2 Omega-3 fettsyrer og ernærings- og helsemessig betydning.....	1
1.3 Generelt om omega-3 konsentrater og produksjonsmetoder	2
1.4 Behov for nye kilder.....	3
1.5 Biprodukter med fokus på rogn og melke	3
2 Teori	5
2.1 Lipid og lipidklasser	5
2.2 Fettsyrer.....	5
2.2.1 Navnsetting.....	7
2.2.2 Fettsyregrupper	9
2.3 Nøytrale lipider	10
2.3.1 Acylglyseroler:.....	10
2.3.2 Kolesterol	12
2.4 Polare lipider.....	12
2.5 Ekstraksjon:.....	13
2.6 Urea metoden	15
2.7 Analysemetoder.....	18
2.7.1 GC og GC-MS:.....	18
2.7.2 Væskekromatografi (LC).....	22
3 Beregninger og definisjoner.....	23
3.1 Utbytte	23
3.2 Massebalanse.....	23
3.3 Vektprosent.....	24
3.4 Konsentrasjonsfaktor	24
4 Råstoff.....	25

5 Metoder	26
5.1 Ekstraksjon	26
5.2 Hydrolyse	26
5.3 Ureafelling.....	28
5.4 Fettsyreanalyse på GC.....	30
5.4.1 Fettsyreanalyse for fiskeoljer og ekstrakter	30
5.4.2 Fettsyreanalyse for prøvepulver	30
5.4.3 Fettsyreanalyse på GC-MS	32
5.5 Analyse av lipidklasser	32
6 Resultater og diskusjon.....	33
6.1 Forsøk 1-2: Innledende forsøk på tran.....	33
6.2 Forsøk 3: Metanolekstraksjon og ureafelling av rognekstrakt	37
6.3 Forsøk 4-8: Etanolekstraksjon av rogn og melkepulver	44
6.4 Forsøk på å løse emulsjonsproblemet	49
6.5 Titrering av hydrolysat	52
6.6 Optimalisering av ureafellingen	56
6.7 GC-MS analyse av fraksjoner fra optimaliseringsforsøket.....	67
6.8 Sammenligning med omega-3-produkter på markedet	69
7 Konklusjoner	71
8 Referanser.....	73
Appendiks	75
A1. Materialer og utstyr.....	75
A2. Forsøk 1, Innledende forsøk på tran.....	77
A3. Forsøk 2: Innledende forsøk på tran.....	79
A4. Forsøk 3: Metanolekstraksjon og ureafelling av rognpulver	81
A5. Forsøk 4 & 8: Etanolekstraksjon av rogn- og melkepulver	85
A6. Forsøk 5-7: Etanolekstraksjon av rogn og melkepulver.....	89
A7. Titrering av hydrolysat.....	95
A8. Optimalisering av ureafellingen.....	98

1 Innledning

1.1 Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven er å benytte ureafellingen som er en rimelig, enkel og effektiv metode til oppkonsentrering av EPA og DHA fra frysetørket pulver fra rogn og melke.

1.2 Omega-3 fettsyrer og ernærings- og helsemessig betydning

Omega 3- (ω 3- eller n-3) og omega 6- (ω 6 eller n-6) fettsyrer er essensielle fettsyrer som kroppen har behov for men ikke kan lage selv fordi den mangler enzymene (Δ^{12} og Δ^{15} -desaturase) for syntese av disse [1]. De må derfor tilføres gjennom kosten.

Eikosapentaensyre (EPA), dokosaheksaensyre (DHA) som finnes blant annet i fet fisk som laks, sild og sardiner, og alfa-linolensyre (ALA) fra planter som soya og linfrø er de viktigste ω 3-fettsyrene. Vegetabilsk olje som mais-, solsikke- og soyaolje er gode kilder til den essensielle ω 6-fettsyren, linolsyre (LA) [2].

LA er forløper til arakidonsyre (AA), mens ALA er forløper til EPA og DHA. Kroppen har særlig behov for EPA og DHA og kan utnytte dem direkte fra maten, eller de kan produseres ved kjedeforlengelse og desaturering av ALA. Likevel vil den mest effektive måten å dekke behov for ω 3-fettsyrer være å innta både DHA og EPA direkte fra kosten fordi omdanning fra ALA til EPA og DHA er lite effektiv, særlig omdanningen av ALA til DHA [3].

EPA, DHA og AA finnes hovedsakelig i cellemembranen og har viktige fysiologiske funksjoner i kroppen. Hjernen og retina er spesielt rike på AA og DHA og trenger tiltrekkelig mengde av disse for å fungere optimalt. Hos spedbarn hvor det skjer raskere vekst av disse organene vil tilførsel gjennom morsmelken, eventuelt morsmelkserstatning med tilsatt DHA og AA være viktig for normal vekst og utvikling hos barnet [4]. DHA som er viktig bestanddel i hjernen kan også ha beskyttende effekt mot Alzheimers sykdom og positiv virkning på kognitiv funksjon [5].

AA og EPA i cellemembranen konkurrerer om de samme enzymer for syntese av ulike eikosanoider med motsatte biologiske effekter. Eikosanoider som stammer fra EPA er mindre inflammasjonsfremmende og virker til og med inflammasjonsdempende samt vasodilaterende (avslapping av blodårene), mens eikosanoider fra AA virker inflammasjonsfremmende og vasokonstriktive (sammentrekning av blodårene). Dermed vil forholdet mellom ω 6- og ω 3-

fettsyrer være avgjørende for type av eikosanoider som produseres og derfor også immunresponsen. Forholdet mellom ω 6- og ω 3-fettsyrer som synes å være optimalt er 4:1 [5].

Det hevdes at Vestens diett har overflod av ω 6-fettsyrer på grunn av det økende forbruk av LA-rike planteoljer som igjen fører til et stort avvik mellom det virkelige ω 6/ ω 3-inntak (15-16:1) og det anbefalte (4:1). I parallell med økt forbruk av LA, øker også andre inflammasjonsrelaterte sykdommer som kardiovaskulære sykdommer, overvekt, ulike inflammasjonslidelser, kreft og psykiatriske plager som depresjon. Dette kan henge sammen med kroppens overproduksjon av pro-inflammatoriske prostaglandin E_2 og leukotriene B_4 som begge stammer fra AA. Denne overproduksjonen kan reduseres ved å endre på ω 6/ ω 3-forholdet gjennom å øke inntak av ω 3-fettsyrer, særlig EPA og DHA [5].

Positiv effekt av EPA og DHA er best dokumentert for hjerte- og karsykdom, samt kronisk inflammasjon som revmatoid artritt. Nyere studier har også vist at ω 3-fettsyrer ved å modulere immunresponsen forkortet varigheten av innleggelse for pasienter som gjennomgikk kirurgi [5]. Den positive effekten av EPA og DHA på hjerte- og karsykdom kan i tillegg skyldes effekten av redusert triacylglyserol- og kolesterolnivå i blodet og forbedret utskillelse av disse, samt øket fluiditet til cellemembranen og redusert trombose [6].

Fordi helsebringende effekt av essensielle ω 3-fettsyrer er godt vitenskapelig dokumentert, anbefaler Den Amerikanske Hjerteforening (The American Heart Association, AHA) syke mennesker med etablert hjerte- og karsykdom å spise fet fisk minst 2 ganger i uken eller å innta cirka 1 g av EPA og DHA (foretrukket fiskeolje) om dagen [7]. Friske mennesker har trolig mindre behov for ω 3-fettsyrer enn syke mennesker og dermed vil inntak av ca. 0,5 g EPA og DHA daglig være tiltrekkelig for å opprettholde god helse.

1.3 Generelt om omega-3 konsentrater og produksjonsmetoder

Omega-3-produkter har en svært stor variasjon i konsentrasjon og sammensetning av fettsyrer. Variasjonen kan være fra under 10 % og opp til 60 % for EPA og fra under 10 % og opptil 80 % for DHA. Variasjonen kan skyldes både ulikheter i råstoffkilder og anvendelse av forskjellige prosesser for oppkonsentrering av ønskede fettsyrer. Tran og seloljer inneholder lave nivåer av EPA og DHA (ca. 10 % for begge fettsyrene) [8]. Høyere innhold av EPA og DHA (65-80 %) sees i produkter som er fremstilt ved destillasjon eller ureafelling.

Konsentrasjonen kan mulig overstige 90 % ved oppkonsentrering med hjelp av væskechromatografi.

Fiskeoljer er den viktigste råstoffkilden i omega-3-industrien. Andre aktuelle kilder er oljer fra torskelever, hai, musling, sildeavskjær og sildebiprodukter som rogn og melke. Alger, krill og sel er også av betydning.

Fiskeoljer kan ha opphav fra ulike geografiske områder. Fiskeoljer med opphav fra Sør-Amerika/Nord-Afrika har et høyere innhold av ω 3-fettsyrene enn fiskeoljene fra Nord-Europa. De har også vanligvis høyere konsentrasjon av EPA (opp mot 20 %) enn DHA (maks 14 %), i motsetning til Nord-Europeiske fiskeoljer, som har ofte høyere konsentrasjon av DHA enn EPA [9].

Marine oljer er en blanding av fettsyrer med forskjellig kjedelengde og grad av umettethet. Oppkonsentrering av ω 3-fettsyrer fra blandingen skjer ved hjelp av ulike metoder. Destillasjon har vært den mest brukte, men metoder som adsorpsjonskromatografi, enzymsplitting, krystallisering, superkritisk væskeekstraksjon og ureafelling kan også anvendes [10]. Ureametoden som anvendes i dette arbeidet blir nærmere omtalt i teori- og metodedel.

1.4 Behov for nye kilder

Positiv helseeffekt av ω 3-fettsyrer er godt vitenskapelig dokumentert. Dersom alle følger rådet fra AHA (The American Heart Association) om å spise ω 3-kapsler (fiskeolje) daglig eller fet fisk minst 2 ganger i uken med tanken på god helse, vil man ikke kunne møte behovet med tradisjonelle kilder til omega-3. I dag utnyttes verdens fiskeressurser allerede til grensen av sin bærekraft [11]. Derfor vil det være naturlig og fornuftig å tenke på andre mulige kilder som kan benyttes i parallell med tradisjonelle ressurser for å dekke et voksende behov for ω 3-fettsyrer.

1.5 Biprodukter med fokus på rogn og melke

Ubehandlet olje fra fiskerogn og fiskemelke inneholder en høy mengde av palmitinsyre (16:0), mindre mengde av andre mettede fettsyrer som myristinsyre (14:0) og stearinsyre (18:0) og et høyt nivå av umettede fettsyrer, særlig omega-3-fettsyrer. Palmitinsyre er en ugunstig fettsyre og betraktes som helsefarlig fordi den bidrar til økt blodkolesterol og dermed økt risiko for utvikling av hjerte- og karsykdom. Høyt nivå av EPA og DHA har

derimot en gunstig helseeffekt både på hjerte- og karsykdom, inflammasjonslidelser og kognitiv funksjon. Derfor er oppkonsentrering av disse gunstige ω 3-fettsyrene ønsket, mens uønskende mettede fettsyrer inkludert palmitinsyren fjernes, for eksempel ved bruk av metoder som ureafelling.

Silderogn og sildemelke er gode kilder til EPA og DHA. Total fett i disse biproduktene er tidligere bestemt ved Nofima, i prosjektnummer 20527 om ”Isolering av nye biologiske komponenter fra marint råstoff, sluttrapport” [12] som ble utført på Nofima Ingrediens i Bergen i 2008. Det ble vist at de inneholdt en betydelig mengde fett (18,0 % fett i rogn og 15,8 % i melke på tørrvektbasis). Fettsyresammensetningen var også bestemt ved hjelp av gasskromatografi (GC) og deretter sammenlignet blant annet med et omega-3 produkt (Triomega kapsler fra Middelfart A/S). Resultatene viste en fettprofil som var høy i omega-3 og der andre fettsyrer enn omega-3 domineres av mettede fettsyrer, hovedsakelig 16:0 (ca. 20 %). Fettprofilen hadde et svært gunstig ω 3/ ω 6-forhold der nivået av ω 6 var under 5 % av ω 3. Prosentandel av DHA var vesentlig høyere både i rogn (ca. 33,0 %) og i melke (ca. 39,5 %) enn i omega-3 produktet Triomega (ca. 23,1 %), som det ble sammenlignet med [12].

Lipidklassene i silderogn og sildemelke ble også analysert ved hjelp av væskekromatografi. Resultatene viste at ca. 65 % av lipidene i rogn var fosfolipider (hvorav ca. 56 % er fosfatidylkolin og ca. 8,9 % er fosfatidyletanolamin) som tilsvarte over 10 % av fosfolipid av tørrvekten. Triacylglyserol (ca. 18 %) og fritt kolesterol (ca. 8,8 %) dominerte som nøytrale lipider i rogn. Melken var også rik på fosfolipid men mengden er noe lavere enn i rogn (9,1 % av tørrvekten). Mengden av frie fettsyrer (FFA) og fritt kolesterol var mye høyere enn i rogn, noe som kunne tyde på hydrolyse av fett under lagring eller opparbeiding [12].

2 Teori

2.1 Lipid og lipidklasser

Det finnes flere definisjoner på lipid. Lipid er fellesbetegnelse på naturlig forekommende forbindelser, inkludert fettsyrer og deres derivater, steroider, terpenener, karotenoider og gallesyrer, som alle er lett oppløselige i organiske løsemidler som for eksempel kloroform og heksan [13], men har liten eller ingen affinitet for vann.

Lipid kan klassifiseres etter struktur (kompleks eller enkel), livsnødvendighet (essensiell eller ikke essensiell), fysiske egenskaper ved romtemperatur (olje er flytende og fett er fast) eller polaritet (polar eller nøytral). Fettsyrer, steroler og acylglyseroler er blant de nøytrale lipidene, mens glyserofosfolipider og glyseroglykolipider er polare lipider [13].

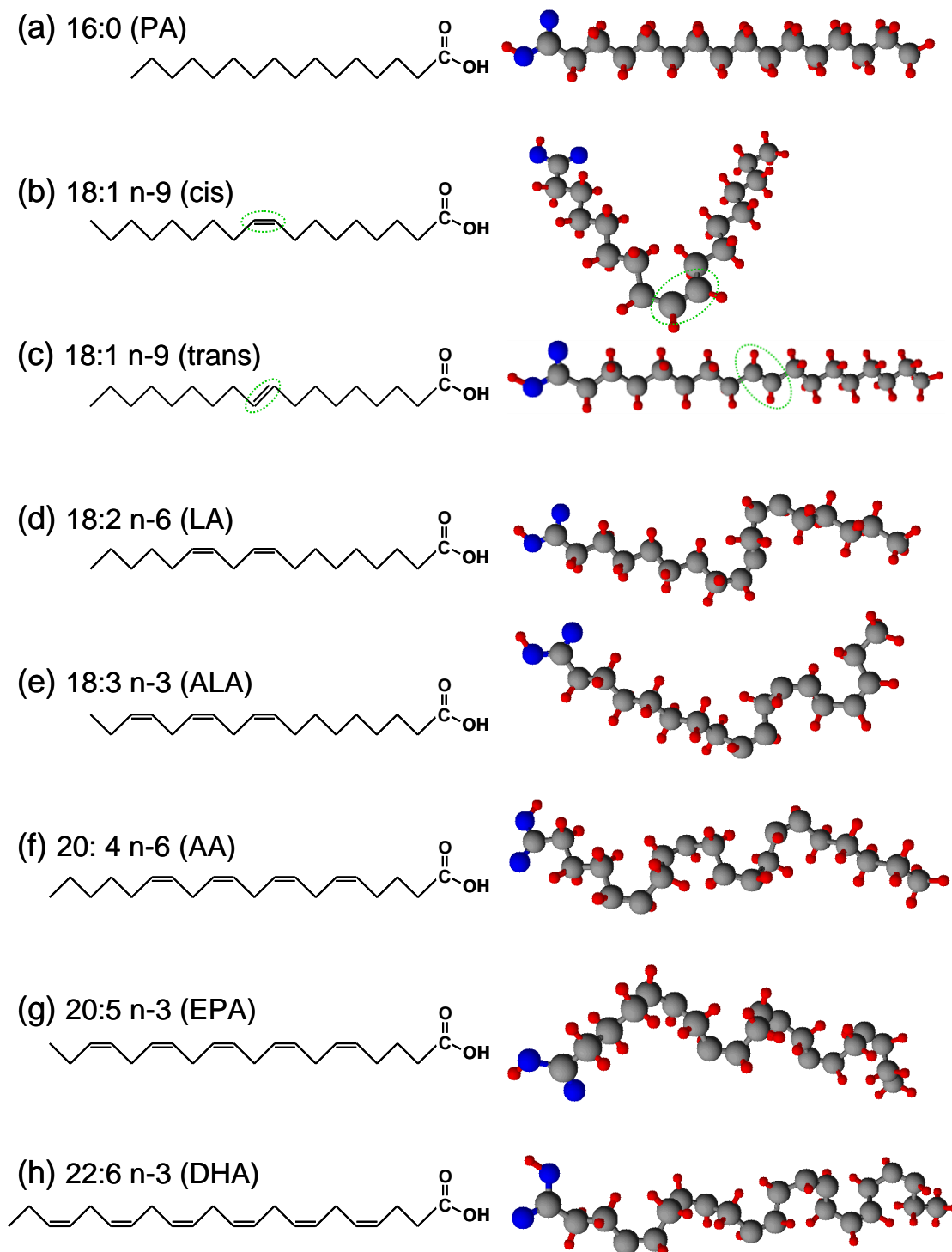
Klassifisering etter polariteten kan være misvisende fordi de veldig korte fettsyrene er polare. Dermed blir kjemisk struktur ofte brukt i klassifiseringen av lipider. Acylglyseroler, steroler og deres estere samt voksesterer klassifiseres som enkle lipider, mens glyserofosfolipider, glyseroglykolipider og sfingolipider er eksempler på komplekse lipider. Generelt frigir enkle lipider to forskjellige produkter ved hydrolyse, vanligvis en alkohol og en syre. Komplekse lipider hydrolyseres til tre eller flere produkter [13]. Fettsyrer, acylglyseroler, kolesterol og glyserofosfolipider er de viktigste lipider i marine fisk og er derfor omtalt nedenfor.

2.2 Fettsyrer

Fettsyrer er de enkleste lipider og inngår som byggesteiner i mange andre lipider. De har en polar og en upolar del. Den polare enden består av en karboksylsyregruppe, mens den upolare enden består av en hydrokarbonkjede (se figur 2.1) [1].

Det skilles mellom mettede og umettede fettsyrer. En mettet fettsyre har kun enkeltbindinger mellom karbonatomene (se figur 2.1a), men en umettet fettsyre har en (se figur 2.1b og c) eller flere dobbeltbindinger (se figur 2.1d-h) mellom karbonatomene i hydrokarbonkjeden. Hydrokarbonkjeden kan være forgrenet og kan inneholde andre funksjonelle grupper som for eksempel epoksy, hydroksyl, keto og etergrupper, samt ringer slik som syklopropen, syklopropan og syklopenten. Likevel har de fleste fettsyrer i naturen rette hydrokarbonkjeder med 4-24 karbonatomer, opptil 6 dobbeltbindinger og ingen andre bindende funksjonelle grupper enn karboksylsyregruppen. De har vanligvis partall karbonatomer, men fettsyrer med

oddetall karbonatomer eksisterer også i mange organismer. Fettsyrer med hydrokarbonkjede på mer enn 24 karbonatomer forekommer også i mindre mengder i marine lipider [14]. Dobbelbindingene i naturlige umettede fettsyrer har vanligvis cis-konfigurasjon og er separert med en metylengruppe (-CH₂-) [15].



Figur 2.1: Struktur og navn til noen av de viktigste fettsyrene.

2.2.1 Navnsetting

Fettsyrer kan navnsettes på forskjellige måter. Tabell 2.1 gir en oversikt over ulike navn til noen av de viktigste fettsyrene.

Systematiske navn

Systematiske navn eller IUPAC-standarden for navnsetting av fettsyrer angir hydrokarbonkjeden med samme antall karbonatomer og legger syre (eventuelt karboksylsyre) i endingen. Posisjonen til dobbeltbindinger beskrives i forhold til karboksylgruppen, og endelsen -ansyre byttes til -ensyre (en dobbeltbinding), -diensyre (to dobbeltbindinger) eller -triensyre (tre dobbeltbindinger), osv. avhenging av antall dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden. Delta (Δ) kan også angi dobbeltbindingsposisjonen, for eksempel $\Delta 5$ betyr at dobbeltbindingen ligger mellom det femte og sjette karbonatomet fra karboksylsyreenden; karboksylkarbonet nummereres som C1 [13].

For fettsyrer med forgreininger som for eksempel metylforgreininger, kan iso og ante-iso brukes for å skille metylforgreiningene ved henholdsvis karbonatomnummer 2 og karbonatomnummer 3 telt fra metylenden [13].

Cis (c)/trans (t) eller E/Z kan benyttes for å beskrive geometrien rundt dobbeltbindingen. For de fleste fettsyrer vil cis og Z være ekvivalente, og det samme med trans og E. Cis brukes når like atomer/atomgrupper ligger på samme side av dobbeltbindingen, og trans når de befinner seg på forskjellige sider av dobbeltbindingen (se figur 2.2). I tilfeller hvor det er umulig å beskrive med cis/trans for eksempel når en dobbeltbinding har mer enn to substituenten, kan E/Z-konfigurasjon benyttes. Da tas det hensyn til om de høyeste prioriterte gruppene (prioriteres etter Cahn-Ingold-Prelog systemet) ligger på samme side av dobbeltbindingen eller ikke [16, 17].



Figur 2.2: Cis (a) og trans (b)-konfigurasjon som representerer fettsyreisomere [16].

Trivialnavn

Trivialnavn som navngir fettsyrer etter hvor de ble identifisert første gang [16] kan i flere sammenhenger være mer praktisk å bruke enn systematiske navn som ofte er lengre og mer detaljert i beskrivelse. For eksempel vil det være lettere å navngi arakidonsyre (trivialnavn) istedenfor 5,8,11,14-eikosatetraensyre (systematisk navn). Når det står verken t- eller c-bokstaven foran tallene som angir dobbeltbindingenes posisjon forstås det at alle fettsyrens dobbeltbindinger har cis-geometri.

Kortnavn

Kortnavn er en annen enklere måte å navngi fettsyrer på og blir derfor også mye brukt. Kortnavnet angir antall karbonatomer i kjeden etterfulgt av et kolon før antall dobbeltbindinger og til slutt plassering av dobbeltbindingene i forhold til metylenden (ω -/n-enden) [16]. Karbonatomet i metylenden nummereres som $\omega 1$. 20:4 $\omega 6$ er kortnavnet til arakidonsyren med 20 karbonatomer og 4 dobbeltbindinger hvor den første dobbeltbindingen er ved karbonnummer 6 fra ω -enden. Ved bruk av kortnavn antas det at dobbeltbindingene har cis-konformasjon og er separert med en metylengruppe.

Dobbeltbindinger kan også være konjugerte eller separert med mer enn en metylengruppe. I slike tilfeller må fettsyrene navngis på andre måter fordi posisjonen til alle dobbeltbindingene spesifiseres.

Forkortelser

Forkortelser av fettsyrer brukes også. De kan være basert enten på trivialnavn, f.eks. PA for "Palmitic Acid" (16:0) eller systematiske navn f.eks. EPA for EicosaPentaenoic Acid (22:5 n-3). Flere eksempler på fettsyrsers forkortelser vises i tabell 2.1 under.

Tabell 2.1: Ulike navn og forkortelser til noen viktige fettsyrer

Systematisk navn	Trivial navn	Kortnavn	Forkortelse
Heksadekansyre	Palmitinsyre	16:0	PA
Oktadekansyre	Stearinsyre	18:0	SA
9,12,15-Oktadekatriensyre	α -Linolensyre	18:3 ω 3	ALA
6,9,12,15-Oktadekatetraensyre	Stearidonsyre	18:4 ω 3	SnA
5,8,11,14,17-Eikosapentaensyre	Eikosapentaensyre	20:5 ω 3	EPA
7,10,13,16,19-Dokosapentaensyre	DPA, Klupanodonsyre	22:5 ω 3	DPA
4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaensyre	DHA, Servonsyre	22:6 ω 3	DHA
9,12-Oktadekadiensyre	Linolsyre	18:2 ω 6	LA
5,8,11,14-Eikosatetraensyre	Arakidonsyre	20:4 ω 6	AA
9-Oktadekensyre	Oljesyre	18:1 ω 9	OA

2.2.2 Fettsyregrupper

Mettede fettsyrer

I mettede fettsyrer binder karbonatomene til hverandre med enkeltbinding. De har gjerne en helt uttrekkelig karbonkjede som gir minimalt med sterisk hindring mellom nabo-metylengruppene (se figur 2.1a). Mettede fettsyrer pakkes derfor lett i krystaller. På grunn av sterke van der-Waals bindinger mellom molekylene og har de også relativt høye smeltepunkt. Smeltepunktet er avhengig av fettsyrens lengde og antall dobbeltbindinger. Det øker med økt hydrokarbonlengde og redusert antall dobbeltbindinger [18].

Umettede fettsyrer

En umettet fettsyre har en dobbeltbinding i hydrokarbonkjeden, mens flerumettede fettsyrer har to eller flere dobbeltbindinger mellom karbonatomene i hydrokarbonkjeden.

Cis-dobbeltbindingen(e) gir en "knekk" i karbonkjeden (se figur 2.1b). Jo flere dobbeltbindinger desto mer bulkete blir fettsyren og dermed blir de vanskeligere å pakke i krystaller. Den geometriske strukturen til fettsyrene og tilstedeværelse eller fravær av lange rette karbonkjeder er avgjørende for urea-metoden som har vært anvendt for oppkonstrering av EPA og DHA i dette arbeidet (se seksjon 2.6).

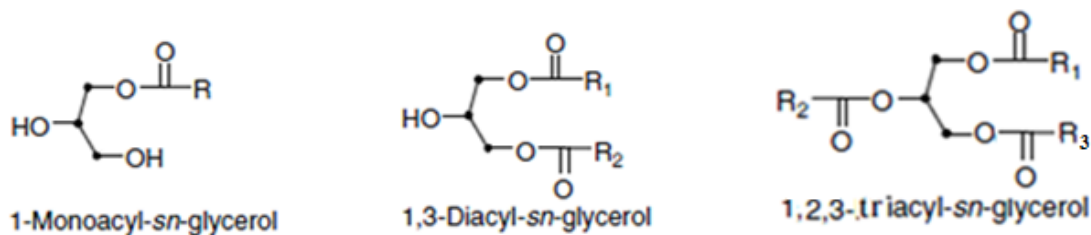
Fettsyrer med trans-dobbeltbinding (figur 2.1c) har en mer utstrakt struktur enn den tilsvarende cis-fettsyren, noe som gir "trans-fett" lignende egenskaper som mettet fett [19]. Cis-dobbeltbindinger reduserer Van der waals-krefter mellom molekylene og forårsaker

lavere smeltepunkter for umettede fettsyrer sammenlignet med de tilsvarende mettede fettsyrene [17]. Cis-fettsyrer har noe lavere smeltepunkt enn sine trans-isomere [20]. Jo flere dobbeltbindinger desto mer ustabil blir en umettet fettsyre ettersom den er mer utsatt for oksidasjon. Harskning av fiskeolje er et eksempel på oksidasjon av fett når den blir utsatt for lys og varme. Harsknet fett smaker og lukter ofte vondt [2].

2.3 Nøytrale lipider

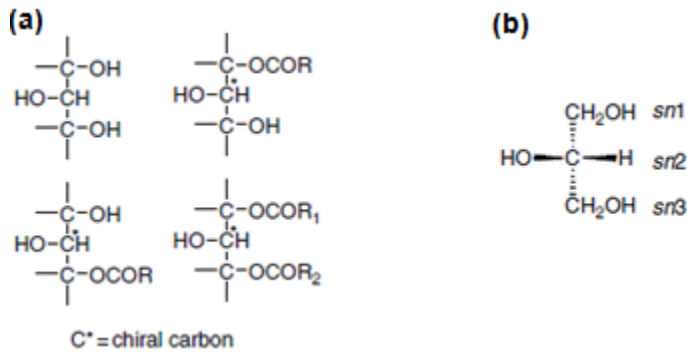
2.3.1 Acylglyseroler:

Acylglyseroler eller glyserider er den dominerende lipidgruppe i oljer og fett av kommersiell betydning. De deles i mono-, di- og triacylglyseroler. Monoacylglyseroler har en fettsyre esterbundet til glyserol, diacylglyseroler har to fettsyrer esterbundet til glyserol og triacylglyseroler har tre fettsyrer esterbundet til glyserol (se figur 2.3) [13]. Triacylglyseroler er de mest forekommende acylglyserolene og er hovedkomponenter i nesten alle fett og oljer. Monoacylglyseroler og diacylglyseroler finnes bare i spormengder i planter og dyr. Diacylglyseroler er viktig intermediater i biosyntese av triacylglyseroler og andre lipider [20].



Figur 2.3: Monoacylglyserol, diacylglyserol [13] og triacylglyserol.

Karbonatomene i glyserol nummereres sn1, sn2 og sn3 fra topp til bunn (se figur 2.4b). Glyserol er ikke et kiralt molekyl. Men dersom forskjellige fettsyrer esterbinder til hydroksylgruppene i sn-1 og sn-3 posisjoner, eller kun en fettsyre esterbinder til en av de to posisjonene blir molekylet kiralt (se figur 2.4a).



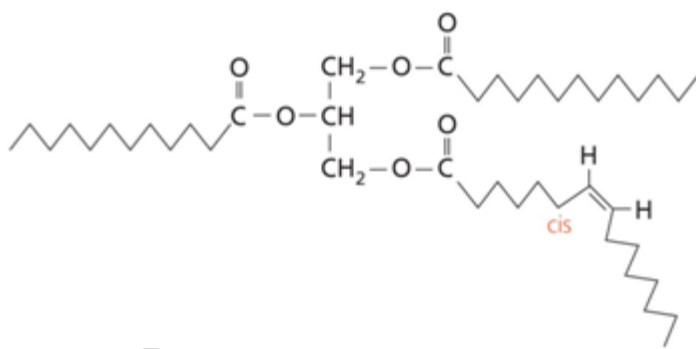
Figur 2.4: Glyceriders kirale karbonatomer (a) og stereospesifikk nummerering (b) [13].

Triacylglyseroler kan være enkle eller blandende. Et enkel triacylglyserol har den samme fettsyren esterbundet til alle hydroksylgruppene, men et blandet triacylglyserol (se figur 2.5) har forskjellige fettsyrer esterbundet til glyserol. Det er mest vanlig med to eller tre forskjellige fettsyrer på glyserolmolekylet slik at ved hydrolyse splitter triacylglyserolet til glyserol og en blanding av ulike fettsyrer [21].

Et triglyserid med umettede (se figur 2.5) eller flerumettede fettsyrer smelter ved en lavere temperatur enn triglyseridet med mettede fettsyre(r) av samme kjedelengde [22].

Triglyserider som inneholder mest mettede fettsyrer har dermed faste former ved romtemperatur slik som i fettvev hos dyr, der fungerer de hovedsakelig som energilager.

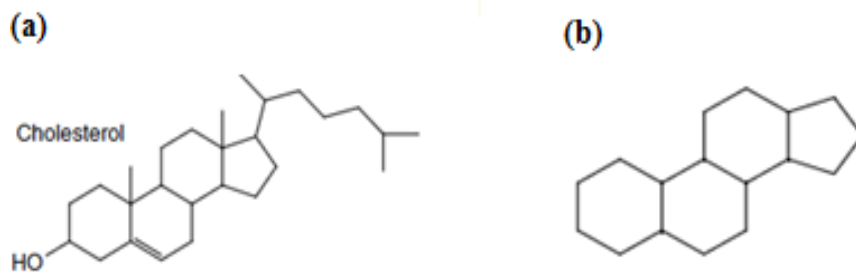
Triglyserider med mest innhold av umettede fettsyrer er derimot flytende ved romtemperatur slik som soyaoljer eller solsikkeolje [17].



Figur 2.5: Et blandet triglyserid der to av fettsyreene er mettede og en er enumettet (cis) [22].

2.3.2 Kolesterol

Kolesterol (se figur 2.6a) er en undergruppe av steroider. Steroider er forbindelse som er bygd opp rundt et 4-ringsystem (syklopentanoperhydrofenantren) (se figur 2.6b). Alle cellemembranene og sirkulerende lipoproteiner inneholder kolesterol. Kolesterol nyttes ikke som energilager slik som acylglyseroler, men er likevel svært viktig i kroppen. Det er forstadium til gallesyrer, D-vitamin og flere hormoner, blant annet kjønnshormonene. Kolesterol er et viktig stoff i kroppen, men for høyt kolesterol i blodet kan føre til økt risiko for utvikling av aterosklerose og dermed hjerte- og karsykdom. Ved et stort inntak av kolesterolholdige matsorter kan kroppen egen syntese av kolesterol reduseres. Kolesterol som inntas via kosten bidrar trolig lite til det totale kolesterolnivået i kroppen [2].



Figur 2.6: Struktur til kolesterol (a) og syklopentanoperhydrofenantren (b) [13].

2.4 Polare lipider

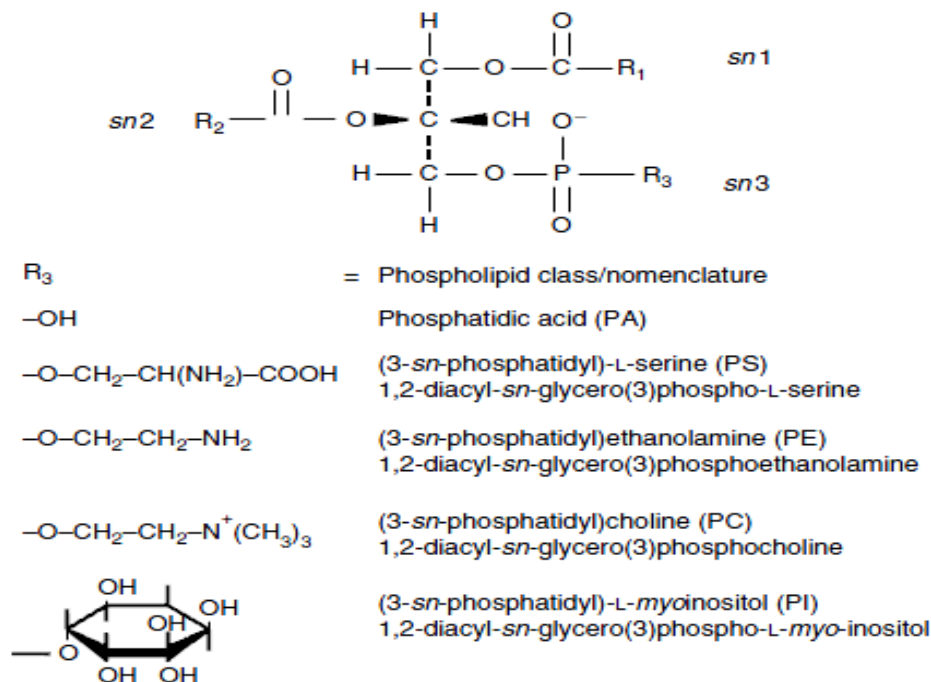
Glyserofosfolipider

Glyserofosfolipider eller fosfolipider har glyserol som grunnleggende struktur. I fosfolipidene esterbinder fettsyrer til glyserolmolekylet i sn1- og sn2- posisjonene mens sn3 kobles til en fosfatgruppe. Ulike fosfatgrupper gir ulike fosfolipider (se figur 2.7). Fosfatidylkolin (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylserin (PS) og fosfatidylinositol (PI) er de viktigste fosfolipidene.

Fettsyrene som esterbinder til sn1 er ofte mettet mens sn2- posisjon har ofte en umettet fettsyre. I marine organismer finnes det fosfolipider med umettede fettsyrer i både sn1- og sn2- posisjonene [23].

Fosfolipider (PC og PE) er viktige bestanddeler i cellemembranen og har også en rolle som signalmolekyl (PI). I tillegg, på grunn av den amfipatiske egenskapen som får vann og fett til

å blande seg sammen, blir fosfolipidene mye brukt som emulgatorer i mange matvarer og hudpleieprodukter.



Figur 2.7: Ulike fosfolipider [13].

2.5 Ekstraksjon:

Løsemidler som brukes til ekstraksjon av fett må tilfredsstillere flere krav. De må blant annet være lite giftige, kostnadseffektive, flyktige slik at de kan lett fjernes etterpå. I tillegg, må de ikke reagere med eller degradere produkter [10]. I noen tilfeller, som for eksempel ved ekstraksjon av fett fra marine råstoffer vil det være en fordel om løsemidlet har evne til å danne to faser med vann slik at vannfasen med ikke-lipidkomponenter fjernes fra blandingen.

Prinsippet for ekstraksjon er "likt løser likt". Løsemiddel i lipidekstraksjon må derfor være polare nok til å bryte hydrogenbindinger og andre elektrostatiske bindinger som holder polare lipider og proteiner sammen. Samtidig trenger de å være upolare nok til å løse nøytrale lipider fra andre forbindelser.

Van der-waals bindinger som holder nøytrale lipider til andre lipider og til membranproteiner er svake bindinger. Derfor vil upolare organiske løsemidler som kloroform eller heksan være egnet i ekstraksjon av dem. For ekstraksjon av polare lipider vil det være best å benytte

alkoholer som metanol eller etanol [10]. Blandinger av kloroform og metanol brukes ofte for å ekstrahere et bredt spekter av lipider [24, 25].

Bligh- og Dyer- metoden [24] bruker blanding av kloroform-metanol-vann i forholdet 1:2:0,8 til å ekstrahere lipider. Ekstraktet fortynnes med kloroform og vann og gir et tofasesystem med en apolar (hovedsakelig kloroform) og en polar (metanol/vann) fase. Den nederste kloroformbaserte fasen inneholder da lipider, mens den øverste fasen med metanol og vann inneholder polare komponenter. Metoden er enkel, rask og mild. Ekstraksjonen kan foregå ved romtemperatur og kan benyttes til ekstraksjon av et stort spekter prøver (dyr eller planter og mikroorganismer), men på grunn av helseeffekten er kloroform uaktuelt å bruke til produksjon av kosttilskudd og næringsmidler. Metanol er i tillegg brannfarlig [10].

Noen biologiske materialer kan inneholde enzymer som degraderer lipider under ekstraksjonen. Typisk alkoholdige løsemidler kan inaktivere mange enzymer som lipaser og fosfatidaser. Alkohol kan også bryte ned komplekser mellom lipider og proteiner, samt løse lipidkomponentene. En ulempe er at de i tillegg ekstraherer noe av cellulære kontaminanter som sukker, aminosyrer, salt, hydrofobiske proteiner og pigmenter. Dermed må rå alkoholholdig ekstrakt renses for de vannløselige kontaminantene. Metoden for rensningen er vanligvis basert på ulikhet i affinitet av de polare lipidene og kontaminanter for et bestemt løsemiddel. Råekstraktet kan renses ved hjelp av upolart løsemiddel som kloroform, heksan eller dietyleter som har liten evne til å løse polare komponenter som ikke er lipider. De mest polare lipider (f.eks. proteolipider) har også dårlig affinitet for det upolare løsemidlet og blir dermed ikke fullstendig ekstrahert [10].

Lipider kan være mekanisk innesperret i celler. Dermed kan løsemidler med dårlig permeabilitet for celleveggen hindre ekstraksjon. I slike tilfeller kan ekstraksjonsutbyttet øke ved tilsetning av en liten porsjon av vann i ekstraktanten fordi vannet fører til svelling av cellulære strukturer som er rike på polysakkarider og dermed økt permeabilitet for lipider. Derfor er tilsetningen av vann i ekstraktanten ofte nødvendig for kvantitativ ekstraksjon av polare lipider [10].

I masteroppgaven til Bjørn Ole Haugsgjerd [26], "Ekstraksjon av feit med høgt innhold av fosfolipid og omega-3 fettsyrer frå frysetørka silderogn ved bruk av løsemiddel som er godkjende til framstilling av næringsmiddel", ble det konkludert med at metanol var det mest effektive løsemidlet til å trekke ut fett fra silderogn, men problemet var at metanolrester

forble i fett. Etanol var ikke like effektiv som metanol, men hadde også god evne til å løse fett og er vesentlig mindre skadelig enn metanol. Etanol foretrekkes dermed fram for metanol som løsemiddel av helsemessige hensyn.

2.6 Urea metoden

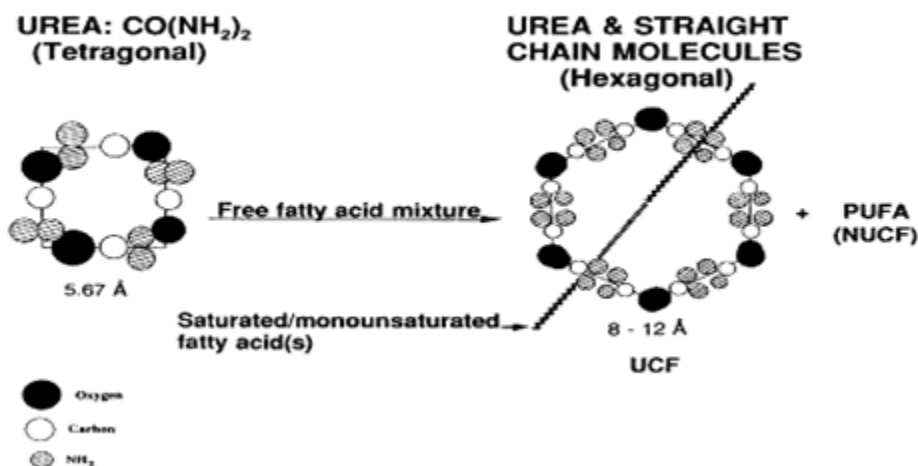
Ureakompleksring er brukt til oppkonsentrering av flerumettede fettsyrer (PUFA) med fire eller flere dobbeltbindinger av flere gode grunner. Prosessen kan foretas på store mengder og med enkelt utstyr, lite giftige løsemiddel som etanol kan brukes, prosessen foregår ved lave temperaturer, og separasjon er mer effektiv enn ved bruk av for eksempel fraksjonell krystallisering eller selektiv løsemiddelekstraksjon, samt at kostnaden er lav. I tillegg, kan prosessen lett optimaliseres ved å forandre på mengde av enten løsemiddelet eller urea [10].

Prosessen kan utføres på frie fettsyrer eller enkle estere som metyl- eller etylestre og fett må først omdannes til en av disse formene. Uforsåpbare forbindelser som steroler, vitaminer og organiske polymerer bør fjernes før ureakomplekseringen. Fettsyrene er mer løselig i alkohol enn deres korresponderende estere og dermed kreves mindre volum av alkohol om prosessen utføres på frie syrer. Men dersom estersform av fettsyrer velges, kan re-esterifisering av konsentrat unngås [27].

Det har blitt hevdet at ureakompleksene kan beskytte ω 3-PUFA fra autooksidasjon [27]. Kompleksene er også svært stabile og filtreringen behøver derfor ikke å skje ved veldig lav temperatur som ved krystallisering av fettsyrer i løsning. I tillegg er kompleksdannelse mer avhengig av fettsyrrers dobbeltbindingskonfigurasjon enn rene fysiske egenskaper som smeltepunkt eller løselighet [27].

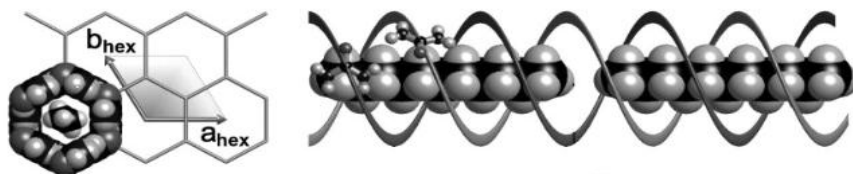
Alene krystalliserer urea i en tettpakket tetragonal struktur med kanaldiameter på 5,67 Å, men dersom lange og rette organiske molekyler er til stede krystalliserer den i heksagonal struktur med kanaldiameter på 8-12 Å (se figur 2.8) med tiltrekkelig plass til lange og rette karbonkjeder [27].

UREA COMPLEXATION



Figur 2.8: Ureakrystaller med eller uten tilstedeværelse av rettkjedete fettsyrer [27].

Urea kan brukes til å separere rette og lange fettsyrer fra fettsyrer som furanfetsyrer, isoprensyre og metylforgreinende fettsyrer [27] ved hjelp av den heksagonale strukturen som tillater de rette og lange fettsyrene å pakke godt sammen i sine kanaler. Figur 2.9 under illustrerer dette [10].



Figur 2.9: Illustrering for heksagonal kanal dannet av urea [28].

Samme prinsippet gjelder når urea benyttes i separasjon av fettsyrer med variert grad av umetting. Mens lange mettede og monomettede fettsyrer fanges i ureakanalene forblir PUFA i løsningen. Grunnen er at dobbeltbindinger i PUFA gir en knekk på fettsyrekjeden som gjør at de er sterisk hindret mot å pakkes i ureakanalene [10].

Evnen til å danne komplekser med urea reduseres med redusert kjedelengde og økt grad av umetting. Derfor vil en fettsyre med en dobbeltbinding lettere bindes i krystallene enn en fettsyre med to dobbeltbindinger som igjen bindes lettere enn en med tre dobbeltbindinger [27].

Ureakompleksing skjer eksotermt. Jo høyere varme som frigis desto stabil blir kompleksene. Den molare varmen (kcal/mol) øker med økt kjedelengde og minker med antall dobbeltbindinger i fettsyrekjeden. For eksempel frigir palmitinsyre (16:0), stearinsyre (18:0) og oljesyre (18:1) henholdsvis 22,7, 29,0 og 27,4 kcal/mol [10].

Metanol og etanol brukes mest som løsemidler til ureakompleksing, særlig metanol siden det tillater høyere konsentrasjoner av oppløst urea. Likevel kan bruk av denne forårsake metylering av noen fettsyrer og dannelsen av metylestre [10]. Metylestere kan omdannes tilbake til metanol og forgifte kroppen.

Høyere hydrokarbonforbindelser, som for eksempel heptan kan konkurrere med fettsyrer om å binde til urea fordi begge er rette og lange molekyler. Derfor bør de unngås i løsningen [10].

Mengden av gjenvunnet PUFA påvirkes av mange faktorer blant annet ureakonsentrasjon, urea/fettsyre-(U/FA-) forhold og temperatur. Ureakonsentrasjon bør være tilnærmet mettet fordi mengden av PUFA som gjenvinnes reduseres med redusert ureakonsentrasjon [10].

Temperatur og U/FA-forholdet, som begge er sterkt relatert til hverandre, har mest innflytelse på PUFA-konsentrasjon. Ved temperaturer som er høyere enn -12°C øker PUFA-konsentrasjonen med U/FA. Et forsøk gjort på fettsyrer fra tran med ureafelling ved 4°C og metanol som løsemiddel, gav U/FA på 4:1 de beste resultatene for både EPA og DHA, mens U/FA på 1:1 gav den dårligste oppkonsentreringen. Mengden gjenvunnet EPA og DHA for U/FA på 3:1 og 4:1 lå ganske nært hverandre [10]. Derfor ble det konkludert med at U/FA på ca. 4:1 er det mest hensiktsmessige forholdet for maksimal oppkonsentrering av PUFA. Et økt U/FA forhold favoriserer dannelsen av ureakomplekser fordi kompleksenes stabilitet øker. Ved temperaturer lavere enn -12°C ble det observert redusert konsentrasjonsfaktor og utbytte med økt U/FA [10].

Når mengden av urea er utilstrekkelig i løsningen konkurrerer ulike fettsyrer etter sine evner om å danne komplekser med urea. Dannende komplekser kan fjernes fra resten av løsningen ved filtreringen. Når U/FA er 1:1, fjernes mettede fettsyrer delvis mens konsentrasjonen av monoumettede fettsyrer forblir uforandret i løsningen. Monoumettede fettsyrer fjernes delvis ved U/FA på 2:1 og fullstendig sammen med mettede fettsyrer ved U/FA på 4:1 [10].

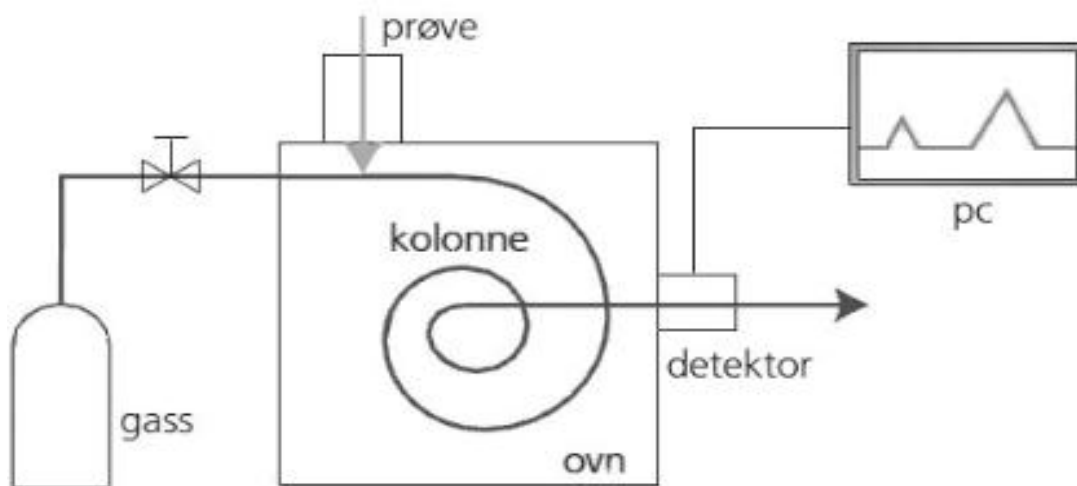
Dannelsen av ureakomplekser har en tendens til å øke med redusert temperatur. Den optimale temperaturen varierer fra PUFA til PUFA. Temperaturen på ca. 4°C gir maksimal PUFA-

konsentrasjonsfaktor. Den er særlig gunstig for oppkonsentrering av SA (18:4 n-3) og DHA. Høyere temperatur gir lavere dannelse av ureakomplekser og dermed et lavere PUFA-konsentrasjonsfaktor. Men dersom det er EPA som ønskes oppkonsentrert, bør krystalliseringen skje ved en høyere temperatur (20-28 °C) fordi det vil gi høyere konsentrasjon og utbytte [10].

2.7 Analysemetoder

2.7.1 GC og GC-MS:

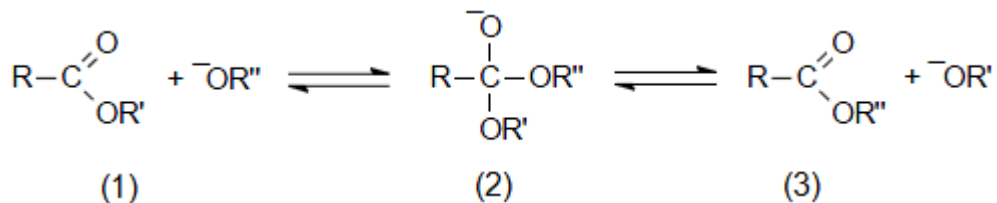
Kromatografi er metode for separasjon basert på at ulike forbindelser fordeler seg ulikt mellom to faser. Den ene fasen, *mobilfasen*, er i bevegelse i forhold til den andre (*stasjonærfasen*). I gasskromatografi (GC) er mobilfasen som frakter forbindelsene gjennom kolonnen en gass, vanligvis helium eller hydrogen. Kolonnen til moderne gasskromatografi har ofte indre diameter på 0,1 – 0,5 mm og lengde på 10 - 50 m. Stasjonærfasen ligger på innsiden av kolonnen som en tynn film med tykkelse på typisk 0,1- 0,5 µm og er oftest en høytkokende væske eller en polymer som f.eks. polysiloksan [29]. En skisse av et gasskromatografisk system er vist i figur 2.10.



Figur 2.10: Prinsippskisse av et GC- kromatograf [22].

Før analyse på GC må fettsyrene derivatiseres til mer flyktige og termisk stabile fettsyremetylestre (FAME – fatty acid methyl ester). Derivatiseringen kan skje syrekatalysert eller basekatalysert. Ved basekatalysert transesterifisering kan en base (f.eks. NaOH) i overskudd av vannfri metanol benyttes. Reaksjonen skjer veldig raskt; det tar bare noen få

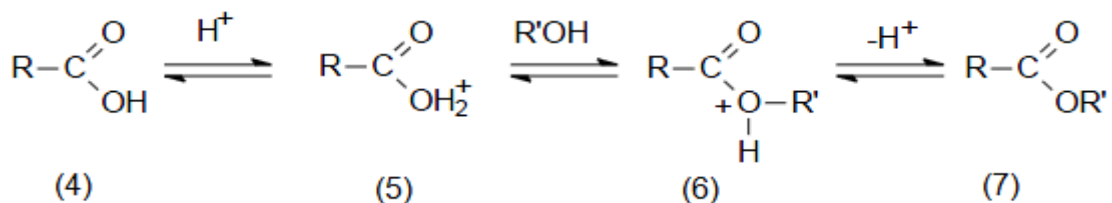
minutter for basisk transesterifisering av triglyserider og fosfolipider [30]. Figur 2.11 beskriver reaksjonsmekanismene. Intermediatet (2) som dannes fra lipider (triglyserider/fosflipider) (1) kan gå i begge retningene siden reaksjonen er reversibel. Derfor tilsettes metanol i overskudd for å forskyve reaksjonslikevekten mot høyre slik at mer sluttprodukter, FAME, (3) blir dannet. Det er viktig å bruke vannfri metanol for å unngå hydrolyse av triglyserider og dermed dannelse av FFA [31].



Figur 2.11: Reaksjonslikning for basekatalysert transesterifisering av lipider [31].

Basisk esterifisering kan ikke brukes til derivatisering av FFA fordi da danner de karboksyationer RCOO^- , som beskytter mot nukleofilt angrep av basen [31]. Derfor vil syrekatalysering være egnet i esterifisering av FFA. Syrekatalysering kan også benyttes i transesterifisering av triglyserider og andre esterifiserte lipider. Reaksjonsbetingelser er som for basekatalysert esterifisering, dvs. overskudd av vannfritt metanol. Bortrifluorid (BF_3) i metanol med forhold 10-14 % w/v kan (trans)esterifisere de fleste lipidklasser, men esterifiseringen bør foregå under oppvarming [32]. Oppvarmingen trengs også ved valg av metanolysereagens (HCl i vannfri metanol) som er en annen effektiv katalysator for metylering av FFA og TAG. Den benyttes under andre forhold og reaksjonen er noe annerledes enn ved bruk av BF_3 [30].

Figur 2.12 illustrerer denne reversible reaksjonen. FFA (4) protonerer og danner oksoniumion (5) som reagerer videre med metanol og gir intermediatet (6). FAME (7) dannes når intermediatet mister et proton [31].



Figur 2.12: Reaksjonslikning for syrekatalysert esterifisering av FFA [31].

Løsemiddel med FAME sprøytes inn i gasskromatografen der det blir fordampet.

Forbindelsene i prøven føres så gjennom kolonnen ved hjelp av bæregassen og når til slutt en detektor som for eksempel en FID (flammeionisasjonsdetektor). FID registrerer FAME etter hvert som de kommer ut av kolonnen. Rekkefølgen avhenger av polariteten til den stasjonære fasen i kolonnen og egenskapen til ulike FAME. Signalet som registreres av detektoren sendes videre til en datamaskin hvor dataene blir behandlet før et gasskromatogram kan skrives ut. Gasskromatogrammet er en graf som vanligvis inneholder tilnærmet normalfordelte topper hvor den horisontale aksen er retensjonstiden dvs. tiden fra injeksjon av prøven [22].

Ideelt sett kommer hver topp fra hver enkelt fettsyre. Dermed vil antall topper være lik antall forbindelser i prøven, men det kan hende at forskjellige forbindelser overlapper i samme topp (koeluering). For å identifisere toppene i kromatogrammet, sammenlignes de ofte med kromatogrammer av referanseblandinger med kjent innhold som er analysert under de samme betingelsene. Topper med den samme retensjonstid representerer da de samme fetttsyrene mens arealet av toppen angir mengden av den tilsvarende fettsyren [22].

De forskjellige fetttsyrene har noe forskjellig detektorrespons i forhold til massen. Fra kromatogrammet av kjente mengder av indre standard og andre fettstyrer kan en responsfaktor (F) beregnes. Responsfaktoren er forholdet mellom areal per masseenheter av indre standard (A_{IS}/m_{IS}) og areal per masseenheter av den kjente fettsyren (A_{FA}/m_{FA}). Ettersom 23:0 ble brukt som intern standard i dette arbeidet kan formelen oppgis som:

$$F = (A_{23:0} / m_{23:0}) / (A_{FA} / m_{FA}) \quad (1)$$

Når responsfaktoren er kjent kan hver enkelt fettsyre kvantifiseres etter formelen:

$$m_{FA} = m_{23:0} \cdot (A_{FA} / A_{23:0}) \cdot F \quad (2)$$

I dag brukes både pakkede og kapillærkoloner. Pakkede kolonner har høy kapasitet, men lav oppløsningsevne, dvs. dårlig separasjon av analyttene. Kapillærkolonnen har derimot en høy oppløsningsevne, men kan lett overbelastes slik at oppløsningen og kvantitativ kapasitet reduseres. Den trenger i tillegg en mer følsom detektor med høyere respons. FID høy sensitivitet, stabilitet, lite dødvolum, rask responstid og responsen er lineær over et stort konsentrasjonsområde. Pakkede kolonner brukes fortsatt i separasjon av FAME i enkle blandinger slik som vegetabiliske oljer der fettstyrer sjelden er lengre enn 18 karbonatomer. Kapillærkolonner anvendes mer til analyse av FAME i komplekse blandinger med lange

karbonkjeder. Oppløsningsevnen til slike koloner er avhenging av stasjonærfasens polaritet, filmtykkelse, kolonnenes lengde og indre diameter [30].

Redusert indre diameter, redusert filmtykkelse og økt kolonnelongde vil gi økt oppløsningsevne, men økt kolonnelongde vil også gi økt retensjonstid. Stasjonærfasen kan være upolar, middels polar eller veldig polar. Upolare stasjonærfaser består vanligvis av metylsilikoner. På upolare kolonner vil FAME eluere etter kokepunkt og umettede FAME eluerer før de mettede. På polare stasjonærfaser som polyetylen-glykol eller faser med høyt innhold cyanopropylgrupper vil mettede FAME eluere før umettede. Veldig polare kolonner er best egnet til separasjon av trans og cis isomerer av FAME [30].

Polare kolonner eluerer FAME etter kjedelengder, antall og plassering av dobbeltbindinger. FAME med kortere kjeder eluerer før de lange. FAME med samme antall karbonatomer men færre dobbeltbindinger eluerer før de med flere dobbeltbindinger (18:0-FAME eluerer før 18:1-FAME). For likt antall dobbeltbindinger, vil FAME med den siste dobbeltbindingen som ligger lengst unna omega- enden elueres først [30, 33].

Som alternativ til deteksjon med FID kan GC kobles til et massespektrometer (MS). MS bestemmer molekylmasse og strukturen til et molekyl og kan dermed være et godt komplementært hjelpemiddel for GC i identifisering av toppene som ikke la seg identifiseres med GC alene, som f.eks. ved identifisering av marine lipider [14] hvor koeluering kan oppstå slik at identifiseringen av de overlappende fettsyrene kun på bakgrunn av retensjonstid vil være vanskelig.

GC-kolonnen ledes inn i ionisasjonskammeret der molekylene blir bombardert av elektroner med høy energi. Dette fører til ionisasjon av molekylene og de danner positivt ladde molekylion. Molekylionet er ustabil og spaltes til fragmenter. Fragmenter med positiv ladning kalles fragmentioner. Molekylionet og fragmentionene akselereres og separeres etter masse ved hjelp av magnetiske eller elektriske felt før de detekteres. Signalene overføres til en datamaskin som tar opp massespekteret. Molekylarionet har samme masse som molekylet og fragmentionenes masse som plasseres langs førsteaksen i massespekteret kan inneholde informasjon om molekylets struktur [22]. Ut fra molekylmassen per ladning (m/z) og ulike fragmentionene kan utgangsmolekylet identifiseres.

2.7.2 Væskekromatografi (LC)

Væskekromatografi har i dette arbeidet vært benyttet til å bestemme lipidklassesammensetning. Som GC, separerer LC forbindelser etter deres ulikheter i fordelingen mellom mobilfasen og stasjonærfasen, som i LC er et fast stoff [22]. Fordeler med LC er at alle stoffene som er løselige i et vanlig løsemiddel kan analyseres, mens GC egner seg bare for stoffene som kan fordampes [22]. Moderne væskekromatografer har vanligvis stasjonærfasen av silicagel (silium oksid) med kovalent bundne organiske grupper på overflaten som kan være polare, f.eks. amino eller hydrokso, eller upolare som alkylgrupper med 18 karbonatomer. De er godt pakket i LC-kolonnen som typisk har indre diameter på 1-5 mm og lengde på 10-25 cm [29].

Retensjonstiden, som er avhengig av styrken på interaksjonen mellom hver enkelt forbindelse og stasjonærfasen, kan gi opplysningen om forbindelsenes kjemiske struktur. I normalfase kromatografi er stasjonærfasen polar mens og mobilfasen er upolar. Dette fører til lengre oppholdstid for polare forbindelser i kolonnen og dermed lengre retensjonstid [29].

HPLC (High performance Liquid Chromatography) er den mest brukte formen for væskekromatografi der høyt trykk brukes for å føre væskefasen gjennom kolonnen, noe som gir økt kontakt mellom de to fasene og dermed effektiv separasjon [29]. Kolonnens effektivitet øker med økt antall oppløste topper i kromatogrammet. Dårlige oppløste topper, dvs. topper som ikke er tilfredsstillende separert forårsaker unøyaktig kvantifisering av de enkelte forbindelsene fordi arealene under toppene ikke kan bestemmes nøyaktig.

3 Beregninger og definisjoner

I dette arbeidet er det benyttet tre typer kjemiske prosesser, ekstraksjon, hydrolyse og urea-krystallisering. For ekstraksjon og hydrolyse er det en fraksjon som går inn i prosessene og en fraksjon som kommer ut av prosessene. For ureafelling er det en fraksjon som går inn i prosessen (ufraksjonert, UF) og to fraksjoner som kommer ut av prosessen, henholdsvis ureabundne (IF) og ikke-ureabundne (NIF) fettsyrer. På bakgrunn av kvantifiserte fettsyrer er det gjort beregninger av *utbytte*, *massebalanse*, *vektprosent* og *konsentrasjonsfaktor* slik de er definert under.

3.1 Utbytte

Utbytte refererer til forholdet mellom absolutte masser av fettsyrene som kommer ut av prosessen og absolutte masser som gikk inn prosessen. Utbytte kan beregnes for total mengde fettsyrer, grupper av fettsyrer (for eksempel omega-3 eller mettede) eller enkeltfettsyrer (for eksempel EPA eller DHA). Verdier for utbytte oppgis normalt i prosent. Verdier under 100 % indikerer tap i prosessen pluss analytisk usikkerhet, mens verdier over 100 % indikerer analytisk usikkerhet siden fettsyrer ikke vil dannes i prosessene. Utbytte for ekstraksjon og hydrolyse beregnes etter formelen:

$$\text{Utbytte} = 100 \% \cdot m_{\text{ut}} / m_{\text{inn}} \quad (3)$$

For urea-felling vil man normalt være interessert i det som befinner seg i NIF-fraksjonen, slik at utbytte for urea-felling referer til mengden i NIF i forhold til mengden som ble tilsatt i prosessen (UF). Utbytte for NIF-fraksjonen etter ureafelling beregnes etter følgende formel:

$$\text{Utbytte} = 100 \% \cdot m_{\text{NIF}} / m_{\text{UF}} \quad (4)$$

3.2 Massebalanse

Massebalanser beregnes for ureafelling og refererer til summen av absolutte mengder i NIF+IF dividert på absolutte mengder som ble tilsatt i prosessen (UF). Massebalanser kan beregnes for total mengde fettsyrer, grupper av fettsyrer (for eksempel omega-3 eller mettede) eller enkeltfettsyrer (for eksempel EPA eller DHA). Verdien oppgis normalt i prosent. Verdier under 100 % indikerer tap i prosessen pluss analytisk usikkerhet, mens verdier over 100 % indikerer analytisk usikkerhet. Massebalanse beregnes etter følgende formel:

$$\text{Massebalanse} = 100 \% \cdot (m_{\text{NIF}} + m_{\text{IF}}) / m_{\text{UF}} \quad (5)$$

3.3 Vektprosent

Dersom ikke annet er angitt refererer vektprosent av en fettsyre (eller grupper av fettsyrer) i en prøve til massen av den aktuelle fettsyren relativt til summen av massene av alle fettsyrer i den samme prøven.

$$\%FA = 100 \% \cdot m_{\text{FA}} / \Sigma m_{\text{alle fettsyrer}} \quad (6)$$

3.4 Konsentrasjonsfaktor

Konsentrasjonsfaktor refererer til økning eller reduksjon av vektprosenten av en fettsyre som resultat av en prosess. For ureafelling vil man normalt være interessert i det som befinner seg i NIF-fraksjonen. Dersom ikke annet er angitt vil konsentrasjonsfaktor for ureafelling derfor referere til vektprosent av en fettsyre i NIF i forhold til vektprosent av fettsyren i produktet som ble tilsatt i prosessen (UF). Siden formålet med arbeidet er å øke konsentrasjonen av omega-3 fettsyrer som EPA og DHA bør konsentrasjonsfaktoren for disse i NIF normalt være vesentlig over 1. Konsentrasjonsfaktoren for NIF beregnes etter formelen:

$$\text{Konsentrasjonsfaktor} = \%FA_{\text{NIF}} / \%FA_{\text{UF}} \quad (7)$$

4 Råstoff

Det ble benyttet tre typer råstoff i forsøket. Rogn, melke og tran. Tran som ble brukt i innledende forsøk for å teste urea-metodikken var Møllers Tran innkjøpt fra Rema 1000 Kjerreidviken, i november 2011.

Rogn benyttet i forsøk 3, 4 og 5 ble tatt ut fra Norway Pelagic i Kalvåg 9. februar 2011, transportert til Nofima i Bergen og lagret på -80°C frem til frysetørking 28. november 2011. Etter frysetørking ble rognen malt til et fint pulver på en Retch Grindomix GM 200 mølle i ca. 20 s ved 8000 rpm. Rognpulveret ble deretter vakuumpakket i porsjoner på >100 g og lagret ved -36°C frem til det ble brukt. Tørrstoffinnholdet ble bestemt til 29.8 % fra forskjellen mellom våtvekt og frysetørket produkt.

Rogn benyttet i forsøk 6 og 7 ble tatt ut fra Norway Pelagic i Kalvåg 26. januar 2012, frysetørket 23. februar 2012 og ellers behandlet som beskrevet over. Tørrstoffinnholdet ble bestemt til å være 34.2 %.

Melke ble tatt ut fra Norway Pelagic i Kalvåg 9. februar 2011, frysetørket 23. februar 2012 og ellers behandlet som beskrevet for rogn. Tørrstoffinnholdet ble bestemt til å være 25.1 %.

5 Metoder

Formålet med arbeidet har vært å forsøke å oppkonsentrere EPA og DHA fra frysetørket pulver av rogn og melke. Prosessen foregår i tre trinn. 1) ekstraksjon av råstoffet, 2) hydrolysering av lipidekstraktet for å danne frie fettsyrer og 3) oppkonsentrering av flerumettede fettsyrer ved ureafelling. Resultatene ble vurdert ved hjelp av fettsyreanalyse på gasskromatografi (GC) og lipidklasseanalyse på væskrokromatografi (LC). Prosedyrene slik de normalt ble utført er beskrevet i dette kapittelet. Avvik fra standardprosedyrene er beskrevet nærmere under de enkelte forsøkene i resultat/diskusjon. Utstyrliste er gitt i appendiks A1. Utstyr brukt i analysemetodene (gasskromatografi og væskrokromatografi) er gitt sammen med beskrivelsen av metodikken.

5.1 Ekstraksjon

Ca. 100 g frysetørket og oppmalt råstoff ble ekstrahert enten med metanol eller etanol i en 1 liter glassflaske med skrukork. Blandingen ble blandet godt hjelp av en ristemaskin i ca. 15 minutter og deretter filtrert på Büchnertrakt. Med etanol ble det ekstrahert 4 ganger (400+200+200+200 ml), mens det ble ekstrahert tre ganger med metanol (400+200+200 ml). Total brukt volum var dermed 1000 ml for etanol og 800 ml for metanol. Ekstraktene ble samlet opp og veid deretter.

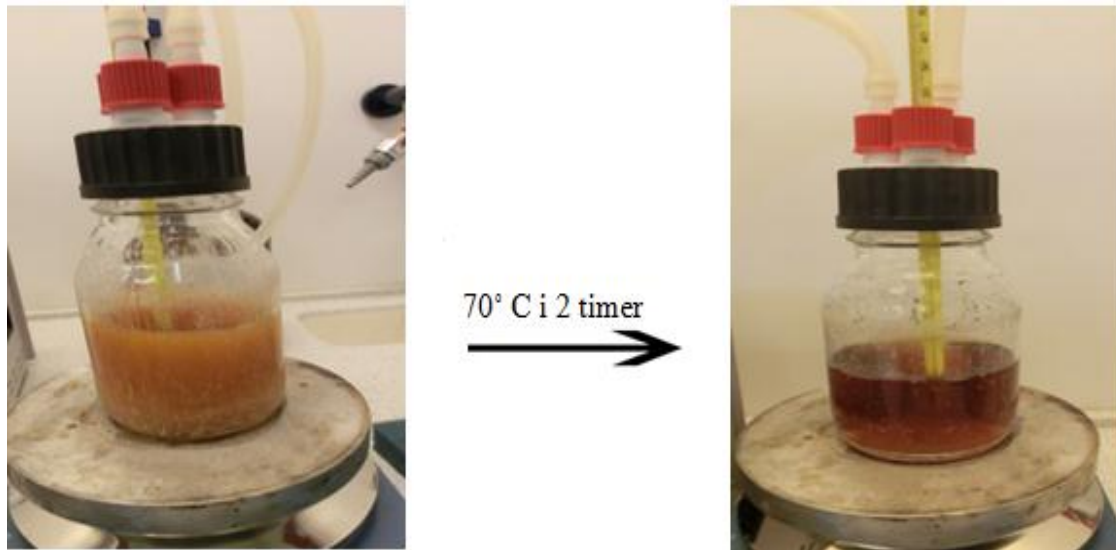
5.2 Hydrolyse

Frie fettsyrer (FFA) ble tillaget ved å forsåpe olje med natriumhydroksid (NaOH) i etanol og vann. Heptan ble tilsatt i den hydrolyserte løsningen (hydrolysatet) og hydrolysatet ble ekstrahert. Den upolar øverste fasen (heptanfasen) ble fjernet siden fettsyrene befant seg i den polare vandige fasen i den basiske løsningen. Vannfasen ble tilsatt 2N HCl og ekstrahert 2 ganger med heptan. Da gikk fettsyrene over i heptanfasen ettersom den polare fasen ble surgjort. Heptanekstraktet ble samlet opp og tørket med natriumsulfat (Na₂SO₄). Deretter ble heptan dampet av på rotavapor slik at resultatet var en olje av frie fettsyrer.

Prosedyre

2,5 g NaOH, 50 ml etanol og 50 ml vann ble tilsatt i en 200 ml glassflaske med lokk. Blandingen ble varmet opp til cirka 70° C på en kokeplate under kraftig omrøring på magnetrører. 15 g fett ble overført til glassflasken og omrøringen fortsatte i ca. 2 timer ved 70° C til reaksjonen var fullført. Da forandret løsningen farge fra ugjennomsiktig lys brun til

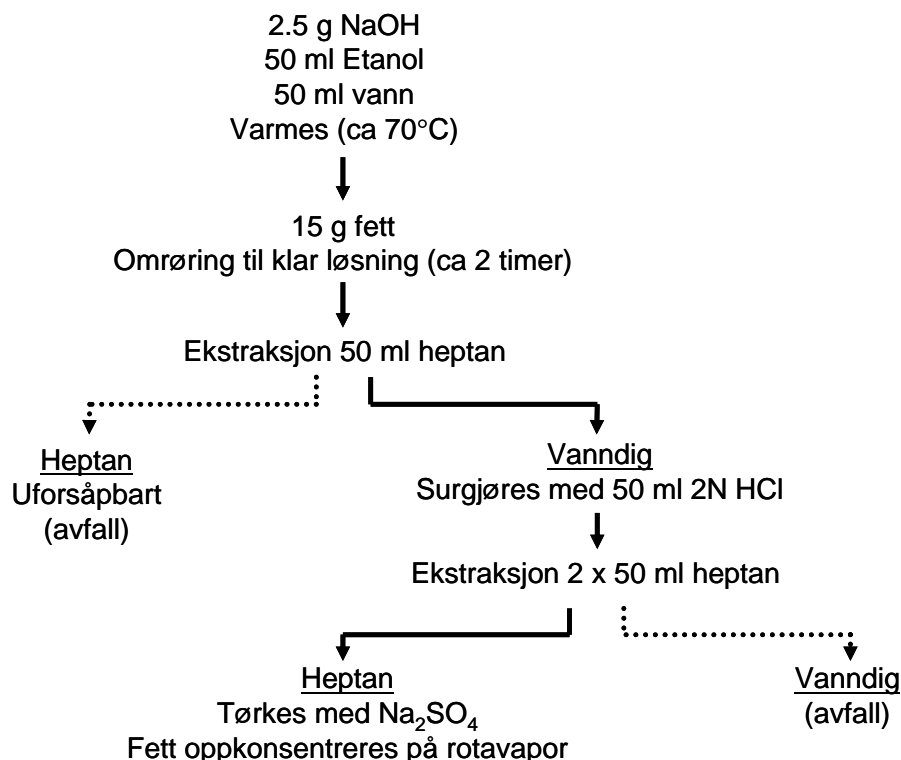
gjennomsiktig mørk brun som mørk øl (se figur 5.1). Løsningens temperatur ble målt ved hjelp av en termometerstav som penetrerte gjennom lokket og stod loddrett ned i glassflasken. Nitrogengass som var koblet til strømmet skånsomt inni glassflasken med en konstant hastighet av cirka 400-500 ml/minutt.



Figur 5.1: Tillaging av frie fettsyrer

Etter at reaksjonen var fullført, ble hydrolysatet overført til en 250 ml skilletrakt. 50 ml heptan ble tilsatt og skilletrakten ble ristet kraftig i minst 1 min og satt til henstand inntil fasene hadde separert seg. Den uforståelige fasen (øverste fasen) ble fjernet og den nederste fasen ble tilsatt 50 ml vann, 50 ml 2N HCl og 50 ml heptan. Heptanfasen som lå øverst ble overført til en 500 ml glassflaske og den nederste fasen ble ekstrahert en gang til med 50 ml heptan. Heptanekstraktet ble overført til den samme glassflasken som det første. Skilletrakten ble vasket med 20 ml heptan som ble overført til den samme glassflasken som ekstraktene. Heptanekstraktene ble tørket over Na_2SO_4 og konsentrert på rotavapor. Figur 5.2 gir en oversikt over prosedyren for tillaging av frie fettsyrer.

Tillaging av frie fettsyrer



Figur 5.2: Tillaging og av FFA [12].

5.3 Urefelling

Prinsippet for ureafellingen er at frie fettsyrer og urea løses i varm etanol. Blandingen avkjøles og det dannes ureakrystaller som binder mettede og monoumettede fettsyrer. Det blir i utgangspunktet utført 2 parallelle ureafellinger som hver gav krystallisert fraksjon (IF) med fettsyrer fanget i krystallstrukturen av urea og fri fraksjon (NIF) med fettsyrer løst i etanol. NIF separeres fra IF ved filtrering på Büchnertrakt før de blir surgjort med 2N HCl og ekstrahert med heptan.

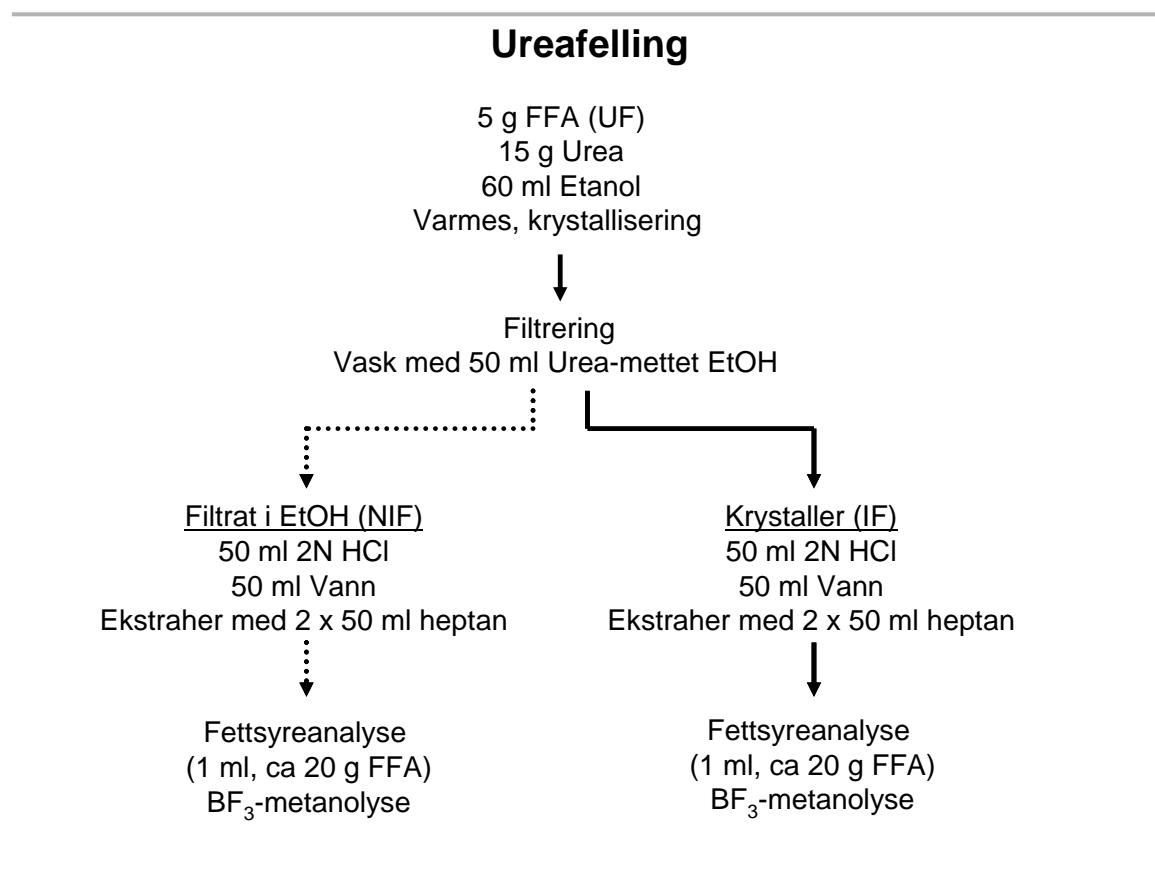
Prosedyre:

I et 100 ml bergeglass ble 5 g FFA, 15 g urea og 60 ml etanol veid inn. Blandingen ble varmet opp under omrøring av magnetrører til all urea var løst. Deretter ble bergeglasset satt i isbad til krystallisering ved 0°C over natten i kjøleskap. Fra resten av de frie fettsyrene ble det tatt ut 1-2 dråper (ca. 20-40 mg) til fettsyreanalyse.

Ureakrystallene ble filtrert på Büchnertrakt og vasket med 50 ml (0°C) ureamettet etanol. Filtratet ble overført til skilletrakten sammen med 50 ml vann og 50 ml 2N HCl og ekstrahert to ganger med 50 ml heptan. 20 ml heptan ble brukt for å skylle skilletrakten og kombinert med heptanekstraktene. Heptanekstraktene ble merket med NIF (NIF₁ for parallell 1 og NIF₂ for parallell 2), tørket over Na₂SO₄ og veid. 1 ml av NIF₁ og NIF₂ ble også veid inn til fettsyreanalyse.

Prosedyren ble gjentatt for krystallene som løses lett når vann og saltsyre tilsettes.

Heptanekstraktene ble merket IF₁ for parallell 1 og IF₂ for parallell 2. 1 ml av IF₁ og IF₂ ble veid inn til fettsyreanalyse. Figur 5.3 gir en oversikt over ureakrystalliseringen.



Figur 5.3: Ureakrystallisering [12].

5.4 Fettsyreanalyse på GC

5.4.1 Fettsyreanalyse for fiskeoljer og ekstrakter

En 250 µl gradert sprøyte ble rensert 2 ganger med metanol og 2 ganger med intern standard (IS) før måling av nøyaktig mengde IS til et 15 ml reagensrør. 20-35 mg av fiskeolje eller ekstrakt med tilsvarende mengde fettsyrer ble veid inn i reagensrøret. Løsemiddel for internstandard og eventuelt ekstrakt ble deretter fordampet under nitrogen-gass ved en skånsom temperatur (ca. 70°C). I de fleste tilfeller ble det tilsatt 500 µl IS (1,00 mg) til ca. 20 mg lipid, men i noen tilfeller ble mengden justert opp eller ned etter antatt lipidmengde.

1,5 ml 0,5 N NaOH i metanol ble tilsatt og atmosfæren i reagensrøret ble erstattet av nitrogen-gass. Reagensrøret ble korket godt og satt i kokende vannbad ved 100°C i 5 minutter før det ble tatt ut og avkjølt. Prøven ble deretter tilsatt 2 ml 12 % BF₃ i metanol og varmet på vannbadet i ytterligere 10 min.

Etter avkjøling til romtemperatur ble reagensrøret tilsatt 1 ml isooktan og ristet godt i ca. 30 sekunder på en whirlmixer. Prøven ble deretter tilsatt 5 ml mettet NaCl-løsning og ristet i ytterligere 30 sekunder.

Etter at fasene hadde separert ble den øverste fasen overført til et 2 ml glassrør med lokk. Ekstraksjonen ble gjentatt med ytterligere 1 ml isooktan og isooktanfasen ble overført til det samme glassrøret. Dette ekstraktet ble normalt fortynnet med 10 µl til 1 ml i isooktan i 1,5 ml autosamplerglass før analyse på GC.

5.4.2 Fettsyreanalyse for prøvepulver

250 µl-sprøyten ble rensert på samme måte som for analyse av olje og ekstrakter før måling av nøyaktig 500 µl intern standard til et 15 ml reagensrør. Løsemiddelet ble deretter dampet av med nitrogen-gass ved ca. 70°C.

200 mg prøvepulver ble nøyaktig veid inn og 2 ml metanolysereagens (2,5 M HCl i metanol) ble tilsatt i reagensrøret. Atmosfæren i reagensrøret ble erstattet av nitrogen-gass før det ble korket godt for innkubering i en ovn i 2 timer ved 100°C.

Etterpå ble røret tatt ut fra oven og avkjølt til romtemperatur. Lokket ble åpnet forsiktig og ca. 50 % av metyleringsreagenset ble dampet bort med nitrogen-gass ved ca. 70°C.

2 ml mettet NaCl løsning og 1 ml isooktan ble tilsatt i røret og blandingen ble ristet godt på whirlmixeren i ca. 30 sekunder. Deretter ble det sentrifugert i 10 minutter. Den øverste fasen ble overført til et 2 ml glassrør med lokk. Ekstraksjonen ble gjentatt med ytterligere 1 ml isooktan og isooktanfasen ble overført til det samme glassrøret. 1 ml isooktan og 10 µl løsning fra glassrøret ble overført til et autosamlerrør for fettsyreanalyse.

Den gasskromatografiske analysen med FID-deteksjon ble utført på en Trace GC (Thermo Fisher Scientific) utstyrt med en 60 m × 0,25 mm BPX-70 kolonne med 0,25 µm stasjonærfasetykkelse (SGE, Ringwood, Victoria, Australia). Helium ble brukt som bæregass med 2,20 bar injektortrykk. Injektortemperaturen var 280°C og detektortemperaturen var 260°C. Følgende temperaturprogram ble benyttet: 60°C i 4 min, deretter 30°C/min til 166°C etterfulgt av 1.1°C/min til 213°C, and 120°C/min til 250°C hvor temperaturen ble holdt i 10 min. Prøven (1.0 µl) ble injisert “splitless” og splitt-ventilen ble åpnet etter 2 min. Fettsyremetylestre ble identifisert ved å sammenligne elueringsmønsteret med en referanseblanding (GLC-793, Nu-Chek Prep, Elysian, MN, USA) og en kontrollprøve som benyttes rutinemessig på Nofima. Kromatografiske arealer ble korrigert med empiriske responsfaktorer kalkulert fra arealene til toppene i GLC-793 referanseblandingen (ligning 1 og 2). Kromatografisk databehandling ble gjort i Chrombox C (www.chrombox.org) som automatisk gjenkjenner referanseblandingen og oppdaterer arealene med reponsfaktorer, før mengdene av hver fettsyre beregnes fra de kromatografiske arealene.

Innenfor analyse av næringsmidler og omega-3 produkter er det vanlig at massen av fettsyrer oppgis som om de var bundet i et triglyserid, dvs. at massen av 1/3 glyserolmolekyl legges til massen av hver fettsyre. 1/3 av massen til glyserol tilsvarer omtrent massen av metanol som er esterifisert til fettsyren i FAME. Derfor brukes FAME som indre standard og vekten oppgis som FAME selv om en analyserer frie fettsyrer eller fettsyrer bundet i andre molekyler enn triglyserider. Dette fører til at innholdet av fettsyrer oppgis som ca. 5 % høyere i råstoffene enn hva en ville oppgitt om fettsyrene ble rapportert som frie fettsyrer. For andre beregninger har det minimal betydning om massen oppgis som FAME eller frie fettsyrer fordi metylgruppen er lagt til på begge sider av ligningene som brukes.

5.4.3 Fettsyreanalyse på GC-MS

FAME opparbeidet som beskrevet for gasskromatografi ble analysert på en HP-5890 gasskromatograf (Agilent, Santa Clara, CA, USA) koblet til et HP-5972 massespektrometer. Det ble benyttet samme kolonne som i den ordinære fettsyreanalysen.

Temperaturprogrammet var: Injeksjon ved 60°C hvor temperaturen ble holdt i 4 min, deretter gradient på 30°C/min til 160°C etterfulgt av en gradient på 20°C/min til 260°C.

Bæregasshastighet var 26 cm/s, 1 µl prøve ble injisert ved en injektortemperatur på 250°C.

Massespektrometeret scannet fra m/z 50-438. All databehandling ble gjort i Chrombox Q 12-01 (www.chrombox.org). Til identifikasjon av forbindelsene ble det brukt biblioteker over massespektra bygd opp i mastergradsarbeidet til Ziar Wasta, og flere detaljer om analysen er beskrevet her [34].

5.5 Analyse av lipidklasser

Lipidklassesammensetning ble analysert med væskrokromatografi på en Series 200 væskrokromatograf (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) utstyrt med "Charged Aerosol" detektor (ESA, Chelmsford, MA, USA) og en 125 × 4 mm LiChrospher diol kolonne med partikkeldiameter på 5 µm (Merck, Darmstadt, Tyskland). Kolonnetemperaturen var 45°C. Det ble benyttet mobilfasesammensetning og gradientprogram som beskrevet i [35]. Lipidklasseanalysene ble utført av Nofima BioLab.

Slik analysen normalt utføres kreves jevnlig kalibreringer med standarder. Det ble ikke benyttet i dette arbeidet siden det er relativt arbeidskrevende og vi primært var interessert i å benytte metoden som en grov sjekk på hva som var av lipidklaser i ekstraktene, og for å sjekke om hydrolysen av ekstrakter var fullstendig. Resultatene for lipidklassene må derfor ses på som kvalitative eller semi-kvantitative, dvs. at metoden gir et bilde på hva som er høyere og lavere når prøver sammenlignes, men de gir ikke nøyaktige absolutte tall. Alle tall for lipidklasser er oppgitt som prosent av totale kromatografisk arealer for toppene som ble identifisert.

6 Resultater og diskusjon

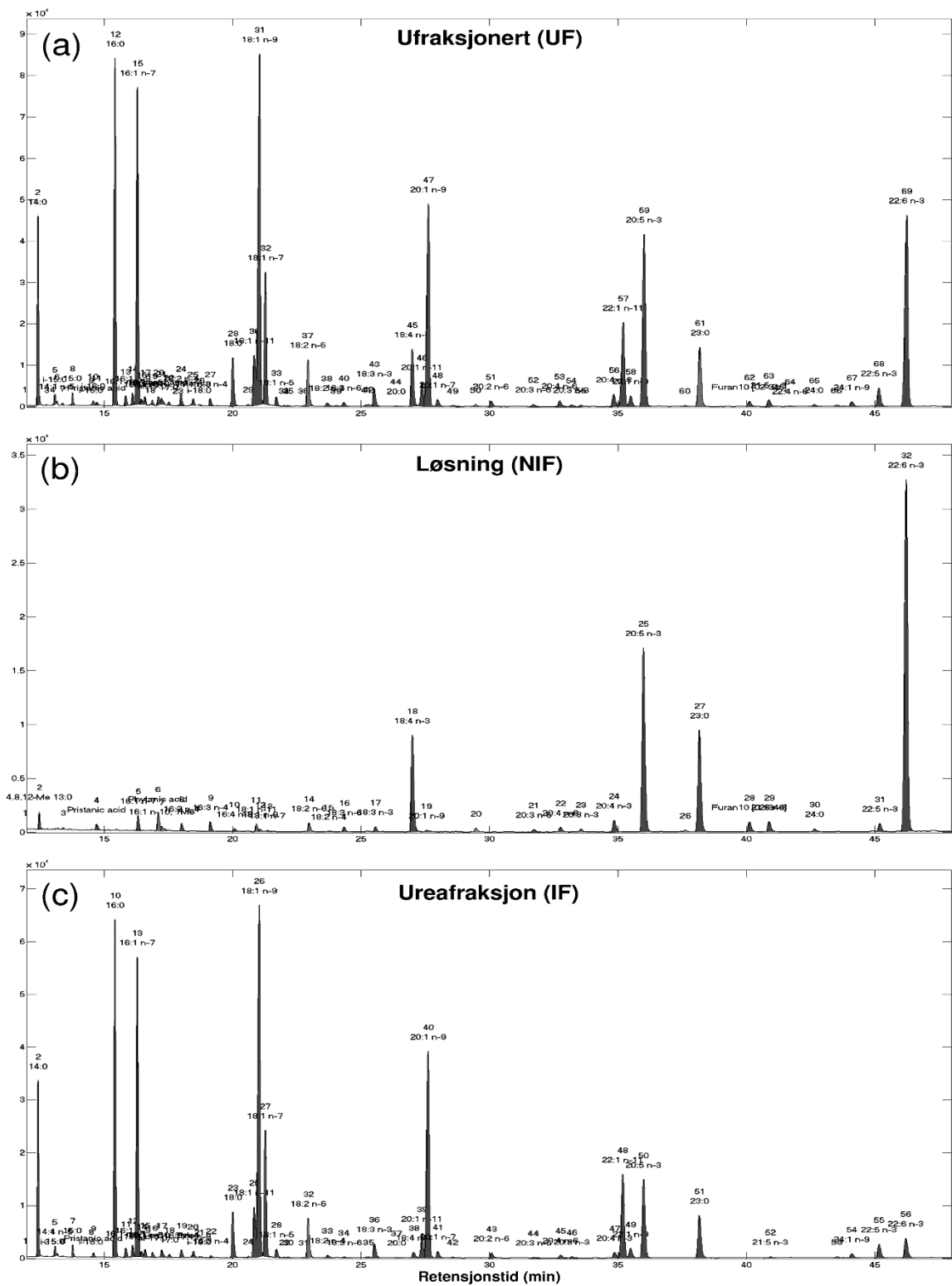
6.1 Forsøk 1-2: Innledende forsøk på tran

Den nedskalerte prosedyren for ureafelling ble først testet på Møllers tran som er en ren olje fra torskelever. Det ble utført to paralleller og kromatogrammer fra parallell 1 er vist i figur 6.1.

Kromatogrammet av NIF-fraksjon viser at EPA og DHA, samt 18:4 n-3 har økt betydelig i NIF i forhold til utgangsstoffet. Likevel ser det ut til at EPA ikke går i NIF- fraksjonene i samme grad som de to sistnevnte. Derfor sees en betydelig mengde av EPA igjen i IF- fraksjonene sammenliknet med de to øvrige PUFA.

Selv om 18:4 n-3 er en omega-3 fettsyre av betydning vil videre beregninger fokusere på EPA og DHA siden dette normalt er fettsyrene som er av størst betydning i omega-3 konsentrater.

Lipidklasseanalysen av hydrolysatet fra tran gav et svært høy topp av FFA (større enn 99 %) og ubetydelig små topper av TAG og kolesterol, som viste at hydrolysen hadde vært fullstendig. Kromatogrammet for lipidklasseanalysen av tran er gitt i appendiks A2.



Figur 6.1: Kromatogrammer av ufraksjonert FFA-olje fra tran (a) samt NIF-fraksjon (b) og IF-fraksjon (c) etter fraksjonering (23:0 ble tilsatt som intern standard).

Beregninger

Resultater og grunnlag for beregninger for første parallell i forsøket er vist i tabell 6.1.

Tilsvarende tabell for den andre parallellen er gitt i appendiks A2. Et eksempel på hvordan utbytte, massebalanse og konsentrasjonsfaktor beregnes er vist for EPA. Resultater for DHA og for andre parallell beregnes på tilsvarende måte.

Tabell 6.1.: Resultater for første ureaforsøk med tran, 1. parallell

	A	B	C	D	E	
	Total fettsyrer	EPA	DHA	%EPA	%DHA	
1	Tran til analyse (mg)	27,7	27,7	27,7		
2	FAME analysert (mg)	25,9	2,42	3,39	9,33 %	13,1 %
3	FFA olje til analyse (mg)	27,0	27,0	27,0		
4	FAME analysert (mg)	25,3	2,36	3,29	9,32 %	13,0 %
5	mg FAME/g prøve	936	87,3	122		
6	Innveid FFA-olje (g)	5,04	5,04	5,04		
7	Innveid FAME (g)	4,718	0,440	0,614		
8	Total vekt NIF- løsnings (g)	89,16	89,16	89,16		
9	Innveid til analyse (g)	0,8028	0,8028	0,8028		
10	FAME i NIF (mg)	9,15	1,90	4,78	20,8 %	52,2 %
11	Total FAME i NIF (mg)	1016	211	531		
12	Total FAME NIF (g)	1,016	0,211	0,531		
13	% FAME i NIF	21,5 %	48,0 %	86,5 %		
14	Totalvekt IF-løsning (g)	90,18	90,18	90,18		
15	Innveid til analyse (g)	0,6988	0,6988	0,6988		
16	FAME i IF (mg)	27,0	1,60	0,525	5,92 %	1,94 %
17	Total FAME i IF (mg)	3486	206	67,8		
18	Total FAME i IF (g)	3,49	0,206	0,0678		
19	% FAME i IF	73,9 %	46,9 %	11,0 %		
20	Massebalanse	95,4 %	94,9 %	97,5 %		

Eksempel på beregning for EPA (kolonne B)

Etter hydrolyse og inndamping av FFA ble 27,0 mg av prøven veid inn til fettsyreanalyse (rad 3). Fettsyreanalysen gav 2,36 g EPA FAME (celle 4B), dvs. 87,3 mg EPA FAME per g innveid prøve (celle 5B). Av FFA-løsningen ble 5,04 g brukt i første parallell av ureafraksjoneringen (rad 6) og en skal da forvente 0,44 g EPA når dette konverteres til FAME i fettsyreanalysen (celle 7B = celle 5B • celle 6B).

Etter fraksjoneringen var totalvekten av NIF-løsningen 89,16 g (rad 8). Av denne ble 0,803 g tatt ut til fettsyreanalyse (rad 9) og det ble funnet 1,90 mg EPA FAME (celle 10B). Total

mengde EPA (som FAME) blir da 211 mg (celle 8B • celle 10B / celle 9B) eller 0,211 g (celle 12B). Utbyttet, dvs. andelen EPA som endte opp i NIF blir da 48,0 % (100 % • celle B12 / celle B7)

Tilsvarende beregnes mengdene i IF fra rad 14-19. Massebalansen blir da % FAME i NIF + % FAME i IF, dvs. 94,9 % (celle B13 + celle B19). En massebalanse nær 100 % tyder på minimale tap i prosessen.

Selv om utbyttet av EPA var under 50 % ble det likevel oppnådd en betydelig oppkonsentrering fordi mesteparten av de øvrige fettsyrene ligger i IF-fraksjonen (74 %). Kolonne D viser % EPA i forhold til totale fettsyrer i de forskjellige analyserte prøvene. Når %EPA i NIF er 20,8 % og utgangspunktet var 9,32 % blir konsentrasjonsfaktoren 2,2.

For DHA er forholdene annerledes. Her var utbyttet hele 86,5 % og konsentrasjonsfaktoren var 4,0. DHA utgjør også mer enn halvparten av fettsyrene i NIF-fraksjonen. Ureametoden ser ut til å være vesentlig mer selektiv for DHA enn for EPA, noe som også har blitt rapportert av andre [36].

Analyseresultater for tran som ikke har gjennomgått hydrolyse er vist i rad 1-2.

Prosentinnholdet av EPA og DHA før hydrolyse er omtrent som prosentinnholdet etter hydrolyse, noe som tyder på at det ikke har vært vesentlige tap av EPA/DHA på grunn av oksidasjon i hydrolysen. Massebalansene for EPA og DHA er også omtrent like til massebalansen for totale fettsyrer. Det tyder på at oksidasjon heller ikke er et problem i ureafellingen, da skulle vi eventuelt sett et tap av EPA/DHA som var større enn for andre fettsyrer.

Det ble utført et forsøk til med tran. Forskjellen på de to forsøkene var at det første forsøket ble utført uten inert atmosfære (nitrogengass) og kontinuerlig temperaturkontroll, mens forsøk 2 (og alle senere forsøk) ble utført etter at oppsettet vist i figur 5.1 var på plass. Resultatene for de to forsøkene er oppsummert i tabell 6.2. Tabellene som tilsvarer tabell 6.1 er gitt i appendiks A3.

Tabell 6.2: Oppsummering av innledende forsøk med tran

	Forsøk 1 parallell 1	Forsøk 1 parallell 2	Forsøk 2 parallell 1	Forsøk 2 parallell 2	Gjennomsnitt
Total fettsyrer					
Utbytte	21,50 %	19,70 %	20,70 %	21,80 %	20,90 %
Massebalanse	95,40 %	91,40 %	95,10 %	94,60 %	94,10 %
EPA					
Utbytte	48,00 %	45,70 %	37,80 %	42,50 %	43,50 %
Massebalanse	94,90 %	88,70 %	89,90 %	90,10 %	90,90 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i UF	9,30 %	9,30 %	9,30 %	9,30 %	9,30 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i NIF	20,80 %	21,70 %	17,00 %	18,20 %	19,40 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i IF	5,90 %	5,60 %	6,50 %	6,10 %	6,00 %
Konsentrasjonsfaktor	2,23	2,32	1,83	1,95	2,08
DHA					
Utbytte	86,50 %	77,00 %	77,40 %	80,50 %	80,40 %
Massebalanse	97,50 %	86,60 %	89,30 %	90,90 %	91,10 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i UF	13,00 %	13,00 %	13,00 %	13,00 %	13,00 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i NIF	52,20 %	51,00 %	48,80 %	48,10 %	50,00 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i IF	1,90 %	1,70 %	2,10 %	1,90 %	1,90 %
Konsentrasjonsfaktor	4,02	3,92	3,75	3,69	3,84

(1) Relativt til sum fettsyrer i den aktuelle prøven

Som vist i oppsummeringstabellen overfor er det mulig å oppkonsentrere DHA i tran ca. fire ganger (3,84 i snitt), mens EPA oppkonsentreres ca. to ganger (2,08 i snitt). Men prisen er at en del av disse fettsyrene tapes i IF-fraksjonen og eventuelt andre steder i prosessen. For EPA tapes over halvparten (snitt av utbytte på 43,5 %), mens tapene for DHA er langt mindre, ca. 20 % siden gjennomsnittlig utbytte var 80,4 %.

6.2 Forsøk 3: Metanolekstraksjon og ureafelling av rognekstrakt

Ekstraksjonsforsøkene

To paralleller for ekstraksjon av rognpulver med metanol ble utført. Resultater og grunnlag for beregninger for første parallell er vist i tabell 6.3. Tilsvarende tabell for parallell 2 er gitt i appendiks A4. Et eksempel på hvordan utbytte og massebalanse av EPA er beregnet er vist under. Resultater for DHA og for andre paralleller bergenes tilsvarende.

Tabell 6.3: Resultater for ekstraksjon, 1. parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	100,1	100,1	100,1		
2	Rogn til analyse (mg)	200,5	200,5	200,5		
3	FAME analysert (mg)	20,7	2,45	6,33	11,8 %	30,6 %
4	mg FAME/g prøve	103	12,2	31,6		
5	FAME i rogn (g)	10,3	1,22	3,16		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	421,8	421,8	421,8		
7	Innveid til analyse (mg)	850,2	850,2	850,2		
8	FAME analysert (mg)	18,8	2,44	6,82	13,0 %	36,3 %
9	mg FAME/g prøve	22,1	2,87	8,02		
10	FAME i ekstraktet (g)	9,32	1,21	3,38		
11	Utbytte	90,2 %	98,9 %	107 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	200,6	200,6	200,6		
13	FAME analysert (mg)	4,02	0,430	0,830	10,7 %	20,7 %
14	mg analysert/g innveid	20,0	2,14	4,14		
15	Estimert totalvekt rest (g)	79,5	79,5	79,5		
16	FAME i rest (g)	1,59	0,170	0,329		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	10,9	1,38	3,71		
18	Massebalanse	106 %	113 %	117 %		

Eksempel på beregning for EPA i ekstraksjonsforsøk (kolonne B)

Av 100,1 g rognpulver (rad 1) ble første parallell av 200,5 mg tatt ut til fettsyreanalyse (rad 2). Fettsyreanalysen gav 2,45 mg EPA FAME (celle 3B), dvs. 12,2 mg EPA per g innveid prøve (celle 4B). Da ble EPA i rogn 1,22 g (celle 5B = 4B • 1B • 0,001).

Rognpulver ble ekstrahert med metanol og gav 421,8 g totalvekt ekstrakt (celle 6B) hvor første parallell av 850,2 mg ble veid inn til fettsyreanalyse (celle 7B). Fettsyreanalysen gav 2,44 mg EPA FAME (celle 8B), dvs. 2,87 mg EPA per g innveid prøve. Da ble EPA FAME i ekstraktet 1,21 g (celle 10B = 9B • 6B • 0,001). Ubyttet, dvs. andelen av tilsatt EPA som endte opp i ekstraktet ble da 98,9 % (celle 11B = 100% • 10B / 5B).

Etter ekstraksjon ble rognpulver overført til rotavapor for avdamping av metanol og det ble igjen 97,7 g rest av rogn (celle 15B). Av denne ble 200,6 mg tatt ut til fettsyreanalyse (celle 12 B) som gav 0,430 mg EPA FAME (celle 13B), dvs. 2,14 mg EPA per g innveid prøve (celle 14B). EPA FAME i ekstraksjonsresten blir da 0,170 g (celle 16B = 15B•14B•0,001).

Sum EPA FAME i rest og i ekstraktet ble 1,42 g (celle 17B= celle 16B+ celle 10B) som gir massebalanse på 113 % (celle 18B = celle 17B/ celle 5B). Tilsvarende beregnes mengdene for DHA og totalfettsyrer fra rad 1-18.

Fra tabellene for ekstraksjon ser vi at gjennomsnittlig total mengde fettsyrer, EPA og DHA er henholdsvis 10,3, 1,22 og 3,15 g i rognpulver, dvs. at over 84 % av de øvrige fettsyrene har blitt ekstrahert siden mengdene i ekstraktet henholdsvis var 8,68, 1,12 og 3,14 g i snittet, noe som tyder på at ekstraksjonen var god.

EPA økte gjennomsnittlig med 108 % og DHA med 118 % i ekstraktet sammenliknet med utgangspunktet, noe som tyder på at ekstraksjonen hadde en viss selektivitet for EPA og DHA relativt til de andre fettsyrene ettersom mengdene i ekstraktet var noe oppkonsentrert enn i råstoffet. Dette kan også sees i rest av rogn der prosent av EPA og DHA som forble igjen var lav, kun 13,9 % for EPA og 10,4 % for DHA i gjennomsnitt.

Resultatene for de to parallellene til ekstraksjonsforsøk er oppsummert i tabell 6.4. Der er de gjennomsnittlige utbyttene for totale fettsyrer, EPA og DHA henholdsvis 84,6, 91,4, 100 %, som tyder på en effektiv ekstraksjon siden ekstrahert prosent av EPA og DHA var over 91 %.

Massebalansen for fettsyrene lå veldig nært 100 % som tyder på at tapet var minimalt under ekstraksjonen samt ved inndampingen av rognresten, men fordi verdiene oversteg 100 % tyder det også på analytisk usikkerhet. Den største usikkerheten i forsøket er sannsynligvis bestemmelse av vekten av rognrest, som var vanskelig å veie. I tillegg er det usikkert om all metanolen ble fjernet ved tørking på rotavapor.

Tabell 6.4 Oppsummert resultater for ekstraksjon av rognpulver med metanol

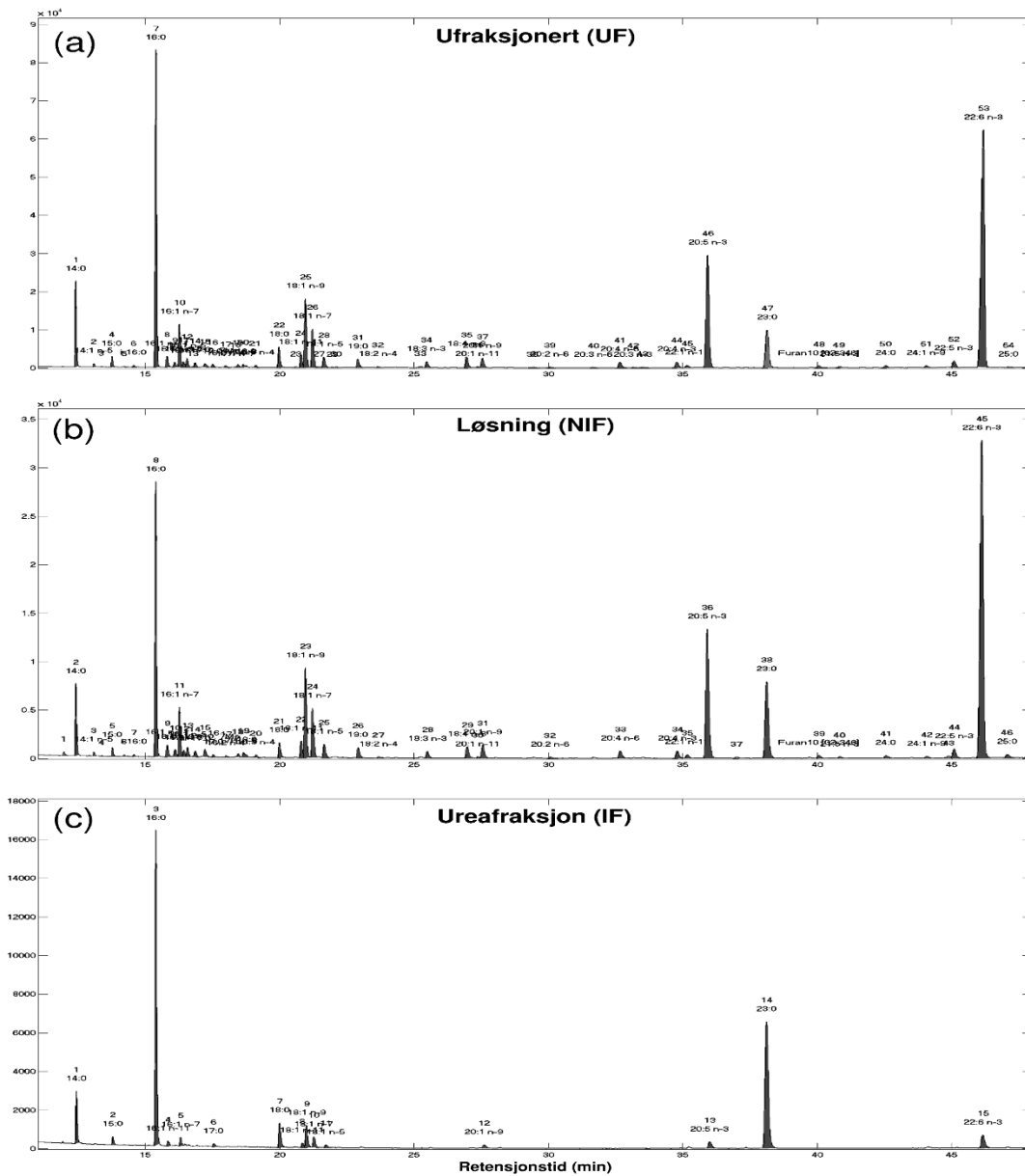
	Parallell 1	Parallell 2	Gjennomsnitt
Total fettsyrer			
Utbytte	90,2 %	78,9 %	84,6 %
Massebalanse	106 %	99,4 %	103 %
EPA			
Utbytte	98,9 %	83,9 %	91,4 %
Massebalanse	113 %	102 %	108 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i rogn	11,8 %	11,9 %	11,9 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i ekstraktet	13,0 %	12,7 %	12,9 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i rest av rogn	10,7 %	10,8 %	10,7 %
DHA			
Utbytte	107 %	92,6 %	100 %
Massebalanse	117 %	106 %	112 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i rogn	30,6 %	30,7 %	30,7 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i ekstraktet	36,3 %	36,1 %	36,2 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i rest av rogn	20,6 %	20,6 %	20,6 %

(1) Relativt til sum av fettsyrer

Urefellingen

To paralleller for ureafelling på rognpulver ble også utført. Ved dette forsøket var det store problemer med emulsjon i ekstraksjonen med heptan etter hydrolyse, noe som ikke ble observert med det tilsvarende forsøket med heptan. På grunn av emulsjonsproblemene er det mulig at denne ekstraksjonen ikke har vært lite effektiv og at fraksjonene ble mindre rene enn i de foregående forsøkene med tran.

Kromatogrammer fra parallell 1 er vist i figur 6.2. IF-fraksjonen ser bra ut med liten andel av EPA og DHA, men høy andel av mettede fettsyrer, særlig 14:0 og 16:0. Dvs. at selektiviteten (Krystallenes evne til å ekskludere umettede fettsyrer slik at de ikke ender opp i IF) var høy. NIF-fraksjonen er derimot ikke god nok. I tillegg til EPA og DHA inneholdt fraksjonen en høy mengde mettede og monoumettede, og oppkonsentrasjonen av EPA/DHA i forhold til utgangspunktet er ubetydelig (Konsentrasjonsfaktorene var gjennomsnittlig ca. 1). Mulige årsaker som førte til en lite vellykket ureafelling i forsøket vil drøftes senere.



Figur 6.2: Kromatogrammer av ufraksjonert FFA-olje fra silderogn (a) samt NIF-fraksjon (b) og IF-fraksjon (c) etter fraksjonering (23:0 er intern standard).

Resultatene for de to parallelene av ureaforsøket er oppsummert i tabell 6.5 der utbytte, massebalanse og konsentrasjonsfaktor for fettsyrene er beregnet på liknende måte som for innledende forsøk med tran og gitt i appendiks A4.

Tabell 6.5: Oppsummert resultater for ureaforsøket

	Parallell 1	Parallell 2	Gjennomsnitt
Total fettsyrer			
Utbytte	75,7 %	78,5 %	77,1 %
Massebalanse	85,1 %	87,4 %	86,3 %
EPA			
Utbytte	77,7 %	76,8 %	77,3 %
Massebalanse	79,9 %	78,7 %	79,3 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i UF	12,9 %	12,9 %	12,9 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i NIF	13,2 %	12,70 %	13,0 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i IF	3,0 %	2,8 %	2,9 %
Konsentrasjonsfaktor ⁽²⁾	1,02	0,98	1,00
DHA			
Utbytte	84,4 %	83,3 %	83,9 %
Massebalanse	86,1 %	84,9 %	85,5 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i UF	35,7 %	35,7 %	35,7 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i NIF	39,7 %	37,8 %	38,8 %
Vektprosent ⁽¹⁾ i IF	6,5 %	6,3 %	6,4 %
Konsentrasjonsfaktor ⁽²⁾	1,11	1,06	1,09

(1) Relativt til sum av fettsyrer

(2) Vektprosent i NIF / vektprosent i ufraksjonert

Som vist i tabell 6.5, var oppkonsentrering av umettede fettsyrer ikke god nok. IF-fraksjonen ser ut som forventet med lite EPA (2,9 % i snitt) og DHA (6,4 % i snitt), men NIF-fraksjonen er ikke som forventet. Den var omtrent som utgangspunktet med ingen eller ubetydelig oppkonsentrering av EPA og DHA siden den gjennomsnittlige konsentrasjonsfaktoren var ca. 1. I tillegg var andelen av tilsatte fettsyrer som ble funnet igjen i NIF svært høy (77,1 % i snitt), dvs. ca. 3,7 ganger så høy som for tran (21,0 % i snitt) i forsøk 1 og 2. Dette kan tyde på at det har blitt dannet for lite krystaller eller at for liten andel av fettsyrene har blitt bundet i de krystallene som ble dannet.

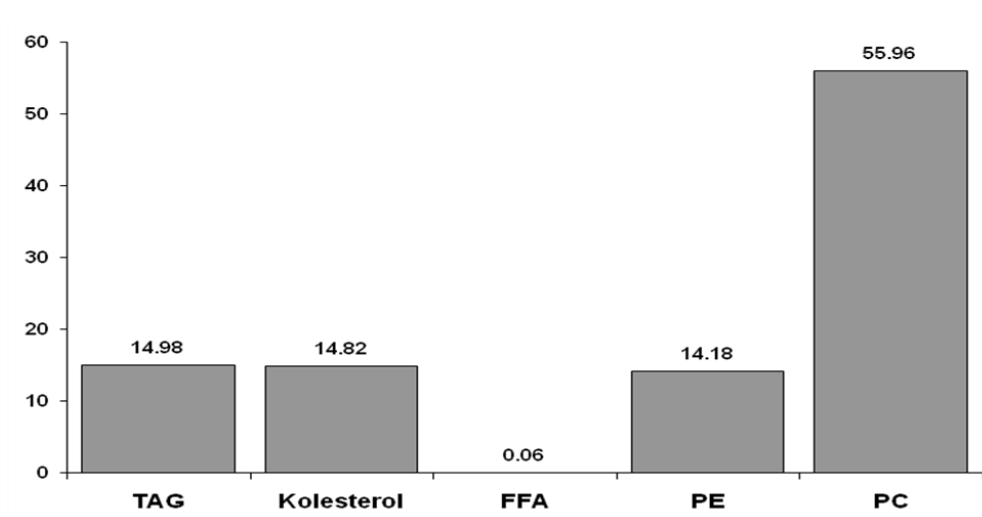
Årsaker som kan gi et slikt resultat kan være flere. Ureakrystallisering vil for eksempel ikke fungere dersom fettsyrene fremdeles er bundet i større molekyler. Dette kan utelukkes fordi lipidklasseanalysen av rognhydrolysat (rognestrakt etter hydrolyse) i figur 6.4 viser at de foreligger som FFA. Andre mulige forklaringer er da tilstedeværelse av andre molekyler som kolesterol. Kolesterol har en komplisert fire-ring struktur som trolig ikke lar seg pakke i ureakrystallene og dermed vil den forbli i NIF-løsningen. I tillegg kan heptanrester fra et ufullstendig inndampet ekstrakt kunne konkurrere med fettsyrene om binding i krystallene.

Under hydrolysen vil triglyserider- og fosfolipidmolekylene brytes ned til enklere produkter som for eksempel glyserol, fosforsyre, fritt etanolamin eller fritt kolin. Ved delvis hydrolysering dannes mellomprodukter som glyserylfosfat, glyserofosforylkolin, fosforylkolin eller tilsvarende molekyler fra PE. Disse molekylene er polare og dermed forventes det at de i ingen eller begrenset grad vil gå over i heptanekstraktet etter hydrolysen, men på grunn av emulsjonsproblemene i ekstraksjonen etter hydrolyse kan de ha fulgt med i produktet som gikk inn i ureafellingen. I tillegg kan andre stoffklasser ha vært til stede slik som vitaminer, fargestoffer og organiske polymerer.

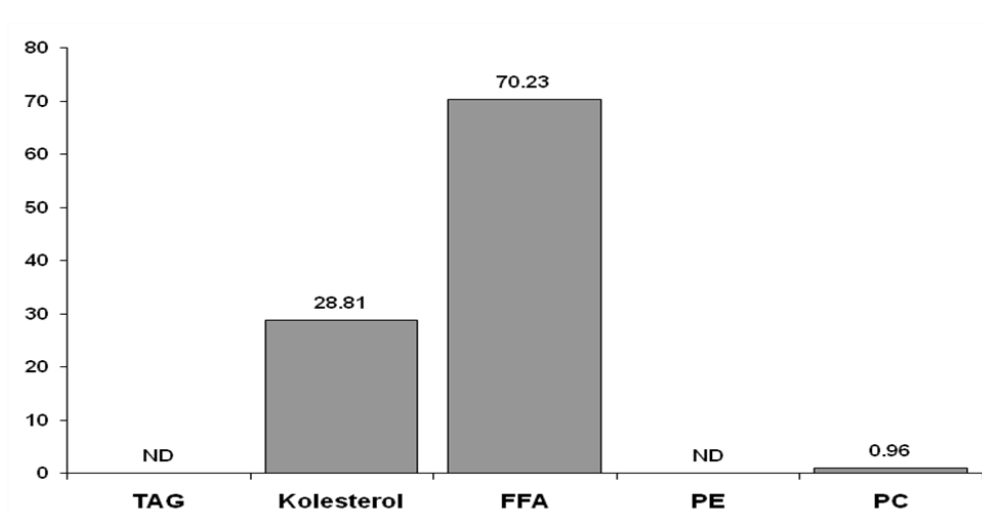
Lipidklasser ble analysert for rogneekstraktet før og etter hydrolyse. Rogneekstraktet (se figur 6.3) var klart dominert av PC ved siden av vesentlige mengder av PE, TAG og kolesterol. Hydrolysen ser ut til å ha vært fullstendig fordi de tre førstnevnte lipidklassene forsvant (bortsett fra en ubetydelig rest av PC) og ble erstattet med markant høyt FFA (se figur 6.4).

Kolesterolnivået i hydrolysatet var overraskende økt og nesten doblet i forhold til utgangspunktet til tross for at løsningen hadde blitt vasket med heptan etter hydrolysen før den polare fraksjonen ble surt gjort med saltsyre. Dersom kolesterol ikke fjernes i denne prosessen kan en forvente en økning i prosentandelen kolesterol i heptanfraksjonen med fettsyrer som ekstraheres etter hydrolyse. Dette vil skje fordi polare rester etter andre lipidmolekyler slik som glyserol, fosforsyre, kolin og etanolamin, som utgjør en betydelig del av lipidvekten i råekstraktet, ikke vil følge med i heptanekstraktet.

Etter forsøk 3 ble det fokusert på å løse emulsjonsproblemene og å finne ut mer om hvordan kolesterol oppfører seg i ekstraksjonen etter hydrolyse.



Figur 6.3: Lipidklasseanalyse av metanolekstrakt av rogn før hydrolyse



Figur 6.4: Lipidklasseanalyse av hydrolysert rogn ekstrakt

6.3 Forsøk 4-8: Etanolekstraksjon av rogn og melkepulver

I denne delen av oppgaven omtales det kun innledende ekstraksjon av råstoff. Metanol ble byttet med 96 % etanol i ekstraksjon av råstoff for å forsøke å få mindre av eventuelle polare forbindelser som kan ha ført til problemer med emulsjonen i forsøk 3. Råstoffet ble ekstrahert en gang mer med etanol fordi det antas at etanol er litt mindre effektivt enn metanol for ekstraksjon av fosfolipider [26]. Forsøk på å løse emulsjon etter hydrolyse er nærmere omtalt i seksjon 6.5.

Ekstraksjonsresultatene

Resultatene til den første parallellen for ekstraksjon av rognpulver i forsøk 4 og melkepulver i forsøk 8 er gitt henholdsvis i tabellen 6.6 og 6.7. Tilsvarende tabeller for den andre parallellen er gitt i appendiks A5. Tabeller for rognforsøk 5 og 6, samt melkeforsøk 7 er gitt i appendiks A6. Utbyttene og massebalansene for disse forsøkene beregnes på tilsvarende måte som vist for rogn i forsøk 3.

Tabell 6.6: Resultatene for etanolekstraksjon av rognpulver, forsøk 4, 1. parallell

		A	B	C	D	E
EKSTRAKSJON		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	126,9	126,9	126,9		
2	Rogn til analyse (mg)	200,7	200,7	200,7		
3	FAME analysert (mg)	19,3	2,21	5,85	11,5 %	30,3 %
4	mg FAME/g prøve	96,1	11,0	29,1		
5	FAME i rogn (g)	12,2	1,40	3,70		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	641,3	641,3	641,3		
7	Innveid til analyse (mg)	1715	1715	1715		
8	FAME analysert (mg)	35,9	4,32	11,4	12,0 %	31,8 %
9	mg FAME/g prøve	20,9	2,52	6,66		
10	FAME i ekstraktet (g)	13,4	1,62	4,27		
11	Utbytte	110 %	116 %	115 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	200,6	200,6	200,6		
13	FAME analysert (mg)	0,573	0,0956	0,154	16,7 %	26,9 %
14	mg analysert/g innveid	2,86	0,477	0,768		
15	Totalvekt rest (g)	102,5	102,5	102,5		
16	FAME i rest (g)	0,293	0,0489	0,0787		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	13,7	1,66	4,35		
18	Massebalanse	112 %	119 %	118 %		

I tabell 6.6 er totalt fett i rognpulver og i rognrest henholdsvis ca. 12,2 og 0,29 (ca.12,5 og 0,32 g i snitt), dvs. ca. 2,6 % av fettene har ikke latt seg ekstrahere. Denne prosenten er ca. en syvdel av det som ble funnet i ekstraksjonsresten i forsøk 3 der snittet av totalt restfett var ca. 18%. Det stemmer også med utbyttet der prosenten var ca. 27 % lavere for ekstraksjon med metanol enn med etanol, noe som tyder på at ekstraksjonen med etanol var mer effektiv enn ekstraksjonen med metanol.

Lipidklasseanalysene av metanolekstrakt (se figur 6.3) og etanolekstrakt av rogn (se figur 6.6) viser at ekstraksjon med etanol gav ca. 2,3 ganger større utbytte av TAG og et mye

høyere utbytte av FFA (ca. 48,5 ganger høyere) i sammenlikning med metanol, i tillegg til litt økt i prosentandel (ca. 12,6 %) av kolesterol. Utbyttet for fosfolipider var derimot 55 % lavere med etanol. Grunnen kan være at metanol er mer polar enn etanol. PC og PE er polare lipider og løser seg dermed bedre i metanol, mens de upolare lipidene som TAG, FFA samt kolesterol er bedre løselige i etanol.

Ekstraksjon av rogn med metanol gav et utbytte på ca. 85 % i snitt for totale fettsyrer; med etanol var utbyttet høyere (ca. 107 % i snitt). Dette tyder på at begge er gode løsemidler til ekstraksjon av fett fra rogn, særlig etanol, siden det gav det høyeste utbyttet. Dette strider litt mot det som har vært rapportert i [26] der det ble konkludert med at metanol var et bedre løsemiddel enn etanol i ekstraksjonen av fosfolipider. Men her må det understrekkes at vi i dette forsøket ikke måler ekstraherte fosfolipider, men totalt ekstraherte fettsyrer. I tillegg ble det benyttet 200 ml mer løsemiddel ved ekstraksjonen med etanol enn det ble brukt med metanol.

Utbyttet samt massebalansen ved bruk av etanol oversteg 100 %, noe som tyder på minimalt tap under ekstraksjonen men det innebærer også analytisk usikkerhet. Det er sannsynligvis stor usikkerhet i massen av ekstraksjonsresten siden den var vanskelig å få ut av kolben etter inndamping. I tillegg vil det normalt være løsemiddel igjen etter inndamping på rotavapor. Men siden mengden fett i ekstraksjonsresten er lav vil disse feilene sannsynligvis ha liten påvirkning på massebalansen. Etter dette forsøket ble prosedyren for bestemmelse av massen av ekstraksjonsresten endret og massen ble bestemt ved å veie kolben med og uten tørket ekstraksjonsrest

Resultatene for ekstraksjonen av begge rognprøver, samt for melken, viser at EPA og DHA i ekstraktet var noe oppkonsentrert (Konsentrasjonsfaktorene er litt større enn 1) i forhold til råstoffene. Dette tyder på at ekstraksjonen hadde en viss selektivitet for EPA og DHA sammenlignet med andre fettsyrer.

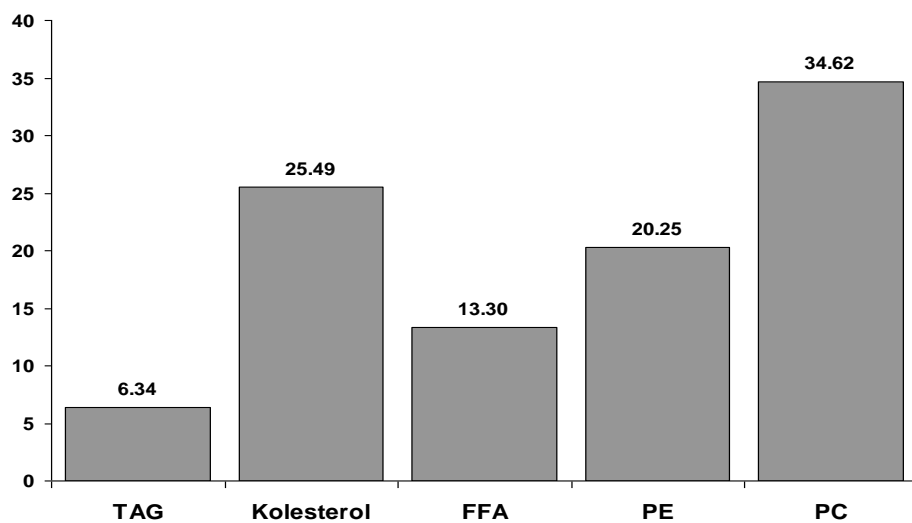
Tabell 6.7 Resultater for etanolekstraksjon av melkepulver, forsøk 8, 1. parallell

Ekstraksjon		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt melke (g)	118,2	118,2	118,2		
2	Melke til analyse (mg)	200,9	200,9	200,9		
3	FAME analysert (mg)	17,4	2,06	5,81	11,8 %	33,3 %
4	mg FAME/g prøve	86,8	10,3	28,9		
5	FAME i melke (g)	10,3	1,21	3,42		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	718,1	718,1	718,1		
7	Innveid til analyse (mg)	821,9	821,9	821,9		
8	FAME analysert (mg)	9,93	1,32	3,72	13,3 %	37,5 %
9	mg FAME/g prøve	12,1	1,61	4,53		
10	FAME i ekstraktet (g)	8,68	1,15	3,25		
11	Utbytte	84,6 %	95,2 %	95,1 %		
12	Rest av melke til analyse (mg)	208,8	208,8	208,8		
13	FAME analysert (mg)	1,24	0,0900	0,420	7,26 %	33,9 %
14	mg analysert/g innveid	5,94	0,431	2,01		
15	Totalvekt rest (g)	90,2	90,2	90,2		
16	FAME i rest (g)	0,536	0,0389	0,181		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	9,21	1,19	3,43		
18	Massebalanse	89,8 %	98,4 %	100 %		

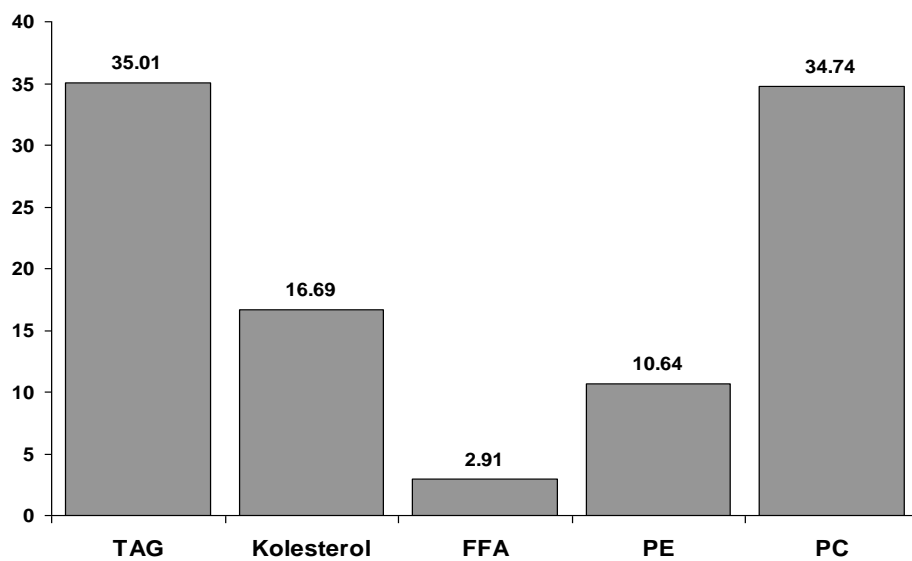
Tabell 6.7 viser at FAME i råstoff og i rest av melke er henholdsvis ca. 10,3 og 0,54 g dvs. ca. 5,2 % (5,7 % i snitt) av fett forble uekstrahert. Dette er omtrent dobbelt så høyt som det ble funnet i ekstraksjonsresten (2,6 % i snitt) i forsøk 4 der etanol også ble benyttet som løsemiddel. Utbyttet for forsøket med melken var ca. 88,4 % i snitt, dvs. ca. 20 % mindre enn for rognen. Etanol ser dermed ut til å ekstrahere mer fett fra rogn enn fra melke. Trolig fordi rogn og melke har ulike lipidsammensetninger.

Lipidklassesammensetningen av etanolekstraktet av melke er vist i figur 6.5. Den har høyere innhold av fosfolipider enn rogn der PE (20 % høyere enn i rogn) utgjorde hovedforskjellen. Prosentandelen av TAG var derimot ca. en femdel av det som var i rogn. Utbyttet ble dermed lavere for melken enn for rogn trolig fordi fosfolipidene hadde mindre affinitet for etanol i sammenlignet med TAG.

Lipidanalysen av melken viser også et svært høyt nivå av FFA i melken (ca. 4,6 ganger så høyt som i rogn). Det samme ble sett i tidligere analyser av melke [12], noe som tyder på at lipider i melke lett hydrolyserer eller at melke inneholder naturlig høyt nivå av frie fettsyrer.



Figur 6.5: Lipidklasseanalyse av etanolekstrakt av melke



Figur 6.6: Lipidklasseanalyse av etanolekstrakt av rogn

6.4 Forsøk på å løse emulsjonsproblemet

I motsetning til ekstraksjonen av hydrolysatet fra tran med klar faseseparasjon (se figur 6.7a), gav ekstraksjonen av hydrolysatet fra rogn og melke ingen atskilte faser (se figur 6.7b), noe som forhindret god separasjon. Formålet med dette forsøket har vært å løse emulsjonsproblemet i forsøk 3 og 4 ved hjelp av ulike metoder, men det gav generelt dårlig resultat.

Emulsjonen som ble dannet for rogn- og melkeekstraksjon skyldes sannsynligvis ikke fettsyrene, men noe annet som kunne ha fulgt med i ekstraktene siden fettsyrene i tranhydrolysatet ikke førte til emulsjonen ved ekstraksjonen (se figur 6.7). Et slikt problem ble heller ikke rapportert i [12] der det ble brukt ekstraksjonsmetoden av Blich og Dyer [24] som vasker vekk polare molekyler. Dette tyder på at molekylene som forårsaket emulsjonen var relativt polare

Bytte ut løsemidlet:

Metanol er mer polar enn etanol og dermed ekstraheres mer polare forbindelser som kan ha forårsaket mer emulsjonen. Dermed ble denne byttet ut med etanol fra forsøk 4, men det gav ikke noen forbedring.

Frysing og fordamping av vann:

Nedkjøling kan gi krystalldannelse eller utfelling av stoffene som fungerer som emulgatorer. Derfor ble den emulsjonsholdige løsningen fra forsøk 3 satt i fryseren med minus 34°C i 30 minutter men det viste ingen tegn til krystallisering eller utfelling. Løsningen ble deretter tilsatt ren (99 %) etanol, og vann ble dampet av på rotavaporen sammen med etanol i form av azeotrop.

Oppvarming

Den emulsjonsholdige løsningen fra forsøk 4 ble varmet opp på en kokeplate ved ca.60-70°C med tanken på at høyere temperatur kunne fremskynde separasjon av fasene. Likevel ble emulsjonen ble ikke brutt ned.

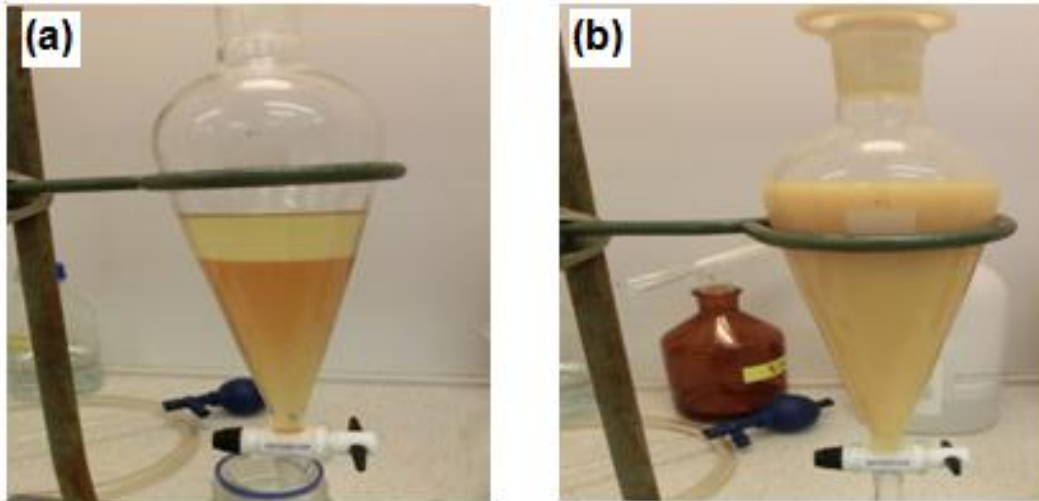
Bruk av salter

1 g av tre ulike salter av to-verdige kationer, magnesiumsulfat, kalsiumkarbonat og sinksulfat-heptahydrat ble tilsatt i et reagensrør med løsningen av emulsjon fordi de kan være

effektive emulsjonsbrytere. Blandingen ristet godt men det viste ingen tegn til faseseparasjon. Slik som vist på figur 6.8 under forble emulsjonen uforandret i reagensrøret.

Den emulsjonsholdige løsningen ble etterpå filtrert på en byrette som var fylt med ca. 4 cm NaCl. Et lite overtrykk med Nitrogen ble brukt for å få løsningen til å strømme hurtigere igjennom kolonnen. Figur 6.9 viser at filtreringen gav resultat selv om det var litt igjen av emulsjonen i løsningen. Likevel vil metoden være upraktisk og ikke kostnadseffektiv for bruk i stor skala fordi den krevde mye løsemiddel og tidsforbruket var høyt fordi gjennomstrømningen gikk langsomt.

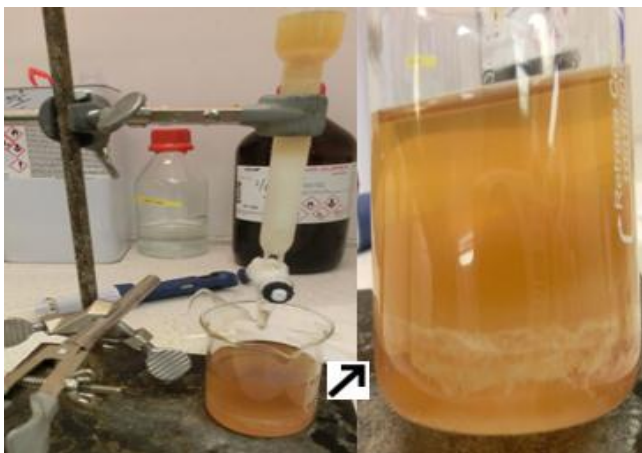
Det kan være mulig å unngå ekstraksjonen med heptan som gir emulsjonsproblemer. I en oppskalert prosess ville man sannsynligvis bruke sentrifuger i stedet for ekstraksjon til å separere ut lipidene slik at det kan være mulig å ha en prosess som kun er basert på etanol som løsemiddel.



Figur 6.7: Faseseparasjon for ekstraksjon av tranhydrolysat (a) men ikke for rognhydrolysat (b).



Figur 6.8: Magnesium sulfat i forsøk med å løse opp emulsjon



Figur 6.9: Kolonneseparasjon av emulsjonsløsning

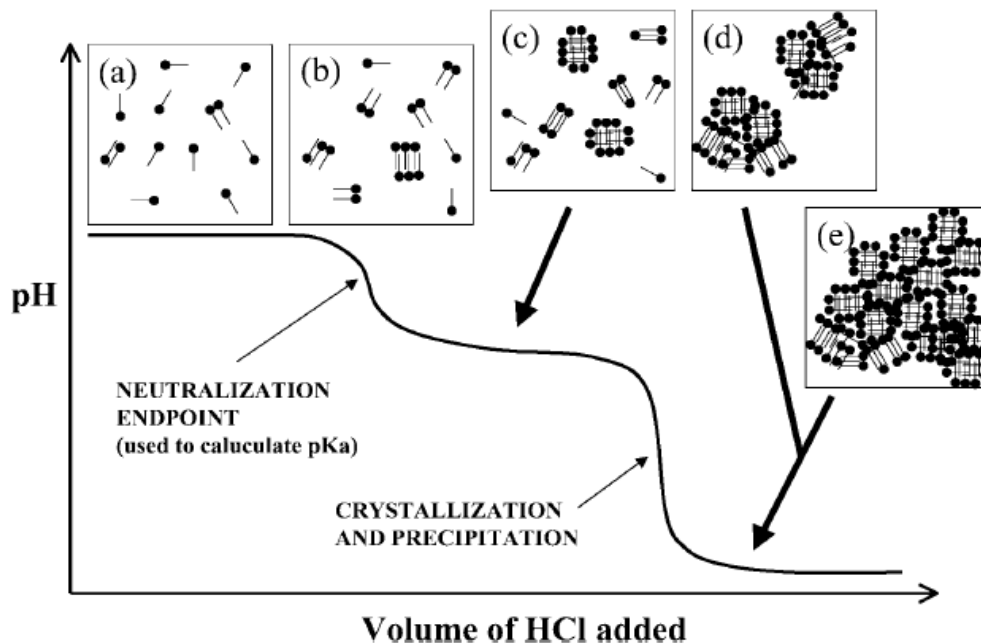
6.5 Titrering av hydrolysat

For å finne ut mer om kjemien i hydrolysatene ble hydrolysater fra tran og ekstrakter av rogn og melke titrert med HCl under betingelser som ligner de som benyttes i ekstraksjonen. Formålet var å finne ut ved hvilken pH emulsjonen ble dannet, men også når kolesterol og fettsyrer går over i heptanfasen, siden fjerningen av kolesterol hadde vist seg å være lite effektiv i både forsøk 3 og 4. Dersom fettsyrene går over i heptanfasen før emulsjonen dannes kunne emulsjonsproblemet vært løst ved å justere til riktig pH. Det ble utført parallelle titreringer med og uten tilsatt heptan for å finne ut hvilken effekt heptan har. For titreringen av hydrolysatet fra rogn med heptan ble det kontinuerlig tatt ut prøver fra heptanfasen som ble analysert for fettsyrer og lipidklassesammensetning.

Hydrolysatet ble tilsatt 50 ml vann og 50 ml heptan. Vann ble tilsatt for å gjøre polariteten til løsningen tilsvarende den ordinære ekstraksjonen. Heptan ble tilsatt slik at forholdet mellom heptan og den polare fasen tilsvarte forholdet som var ved den første vasken med heptan i den ordinære ekstraksjonen. Deretter ble 2N HCl tilsatt gradvis ved kontinuerlig måling av pH. Det ble utført to titreringer for hydrolysat fra tran og rogn med eller uten heptan for å se hvordan heptanen ville påvirke kjemien. Hydrolysatet fra melken ble titrert med tilsatt heptan. Ved titreringen av rogn med tilsatt heptan ble det for hver andre ml tilsatt HCl tatt ut 50 µl av heptanfasen til fettsyreanalyse og 50 µl til lipidklasseanalyse.

Før start av titreringen er løsningen basisk som resultat av overskuddet av NaOH brukt i hydrolysen. Kjemien som skjer når fettsyrer løst i basisk miljø titreres med syre er forklart i referanse [37] og figur 6.10. I utgangspunktet foreligger fettsyrene i sterk basisk miljø på grunn av overskuddet av NaOH i hydrolysen. Fettsyrene er da tilnærmet fullstendig hydrolysert, det vil si at de foreligger som RCOO^- i løsningen (se figur 6.10a). Ved tilsetning av syre vil H^+ gå med til å protonere RCOO^- til RCOOH . Fettsyren vil derfor i utgangspunktet fungere som en buffer inntil bufferkapasiteten er brukt opp ved titreringens første omslagspunkt, der pH synker markant ved tilsetning av mer syre. Ved dette punktet vil fettsyrene begynne å assosiere (se figur 6.10b), men en del av fettsyrene vil fremdeles foreligge som RCOO^- . Ved fortsatt tilsetning av syre vil en økende andel av fettsyrene foreligge som RCOOH , graden av assosiering øker fordi fettsyrenes løselighet i polare løsninger reduseres, og etter hvert vil det dannes misceller (se figur 6.10c) der den apolare karbonkjeden i fettsyrene er isolert fra vannfasen ved at den peker inn miscellen. Syregruppen til fettsyrene i miscellene peker ut mot den polare fasen og vil fremdeles påvirke

kjemien i denne, men etter hvert vil fettsyrene danne sin egen fase slik at de ikke lenger er en del av kjemien i den polare fasen. Når løsningsens totale bufferkapasitet er brukt opp vil pH igjen synke kraftig ved tilsetning av mer syre. Fettsyrene vil da være fullstendig protonerte og vil være tilnærmet uløselige i den polare fasen (se figur 6.10d og e).

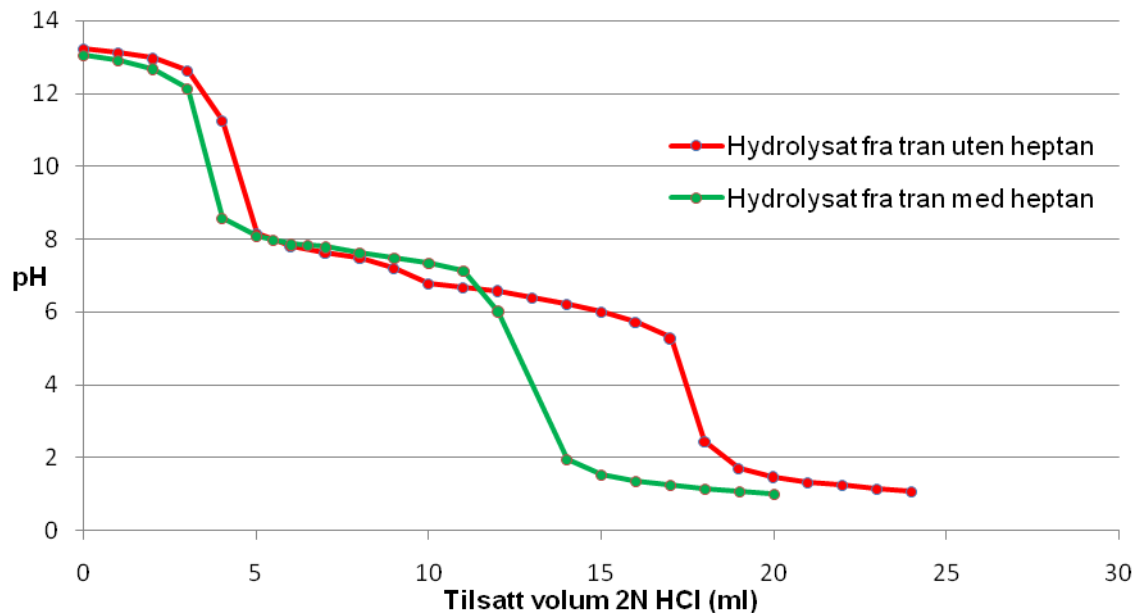


Figur 6.10: pH-titreringskurve for lange fettsyrer [37].

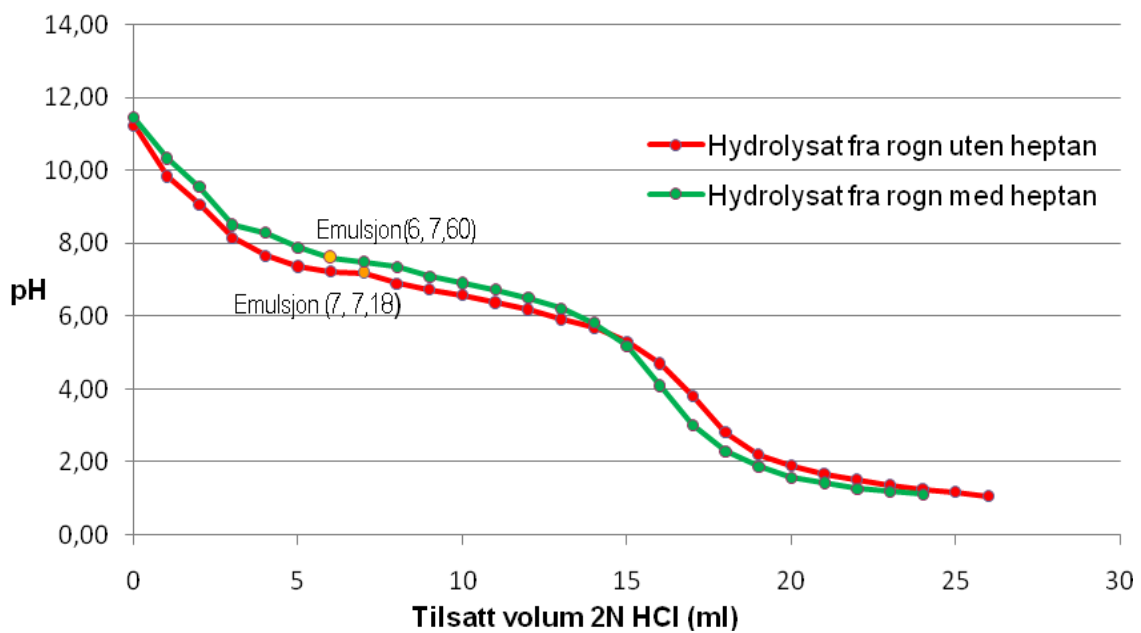
I titreringene av hydrolysat fra tran og rogn uten heptan, ble det observert oljelag av fettsyrene på toppen av løsningen etter første omslagspunkt. I titreringene av hydrolysatet med tran med og uten heptanfasen (se figur 6.11) var det stor forskjell på når det andre omslagspunktet inntraff. Tilsetning av heptanfasen førte til at det andre omslagspunktet inntraff tidligere, sannsynligvis fordi fettsyrene trekkes ut av den polare fasen etter det første omslagspunktet.

Titreringene for hydrolysatet fra rogn med og uten heptan gav to tilnærmet like kurver (se figur 6.12), noe som indikerer at tilsetning av heptan ikke ville påvirke verdien av pH og dermed fettsyrenes dannelse av misceller. Ved disse titreringene mangler også det første plataet, noe som tyder på at en andel av fettsyrene foreligger som RCOOH allerede fra starten. pH ved starten var under 12, og da hadde første omslagspunkt for titreringen av tran allerede inntruffet. Omslagspunktene er også mer diffuse, noe som tyder på at det er andre stoffer enn bare fettsyrer til stede i blandingen som påvirker syre/base-kjemien. Titreringen

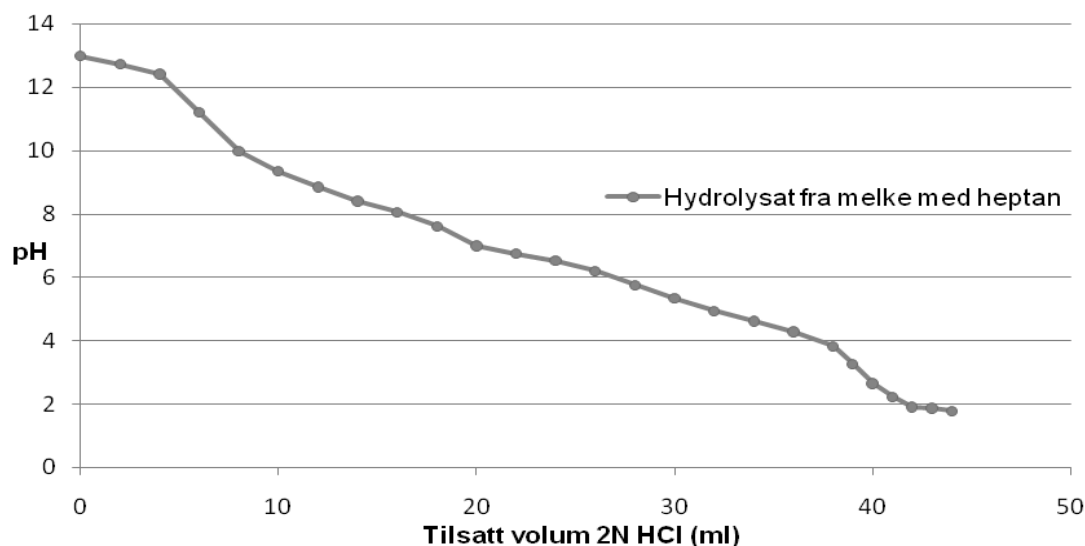
av hydrolysatet fra melke (se figur 6.13) gav en enda mer diffus kurve, men de to omslagspunktene kan fremdeles anes.



Figur 6.11: Titreringskurve for tranhydrolysat uten og med heptan



Figur 6.12: Titreringskurve for rognhydrolysat uten og med heptan



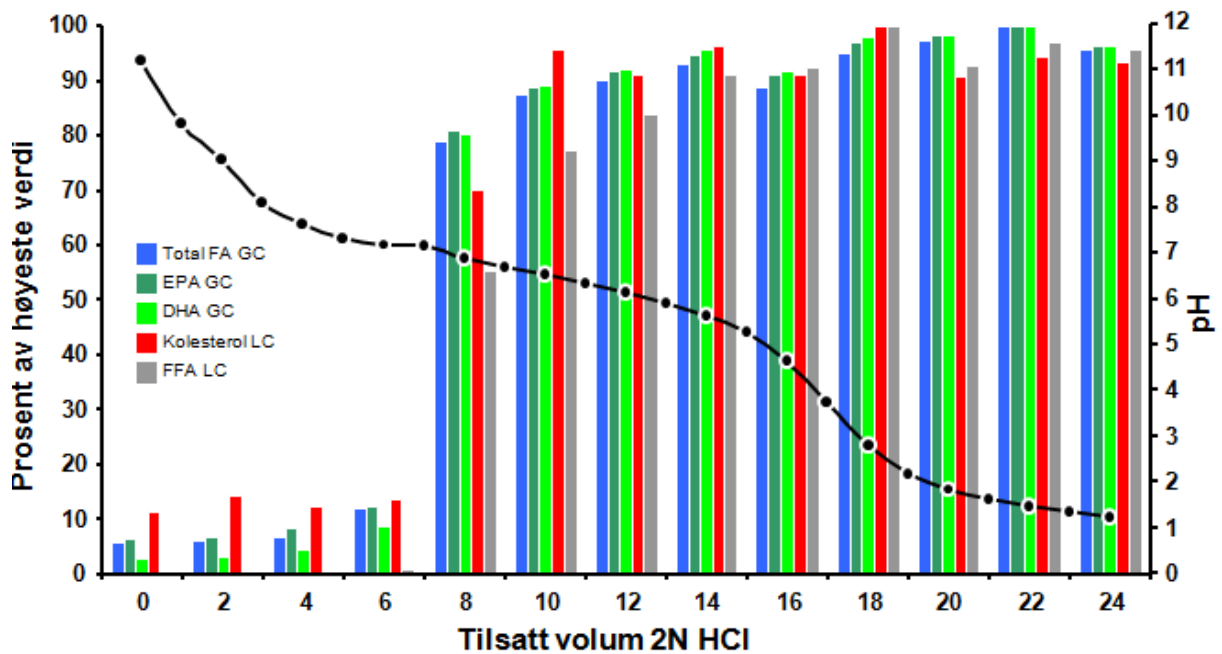
Figur 6.13: Titreringskurve for melkehydrolysat med heptan

Figur 6.14 viser mengden av fettsyrer og kolesterol i heptanfasen ved titrering av rogn relativt til det høyeste nivået som ble målt (normalisert til 100 %). Kolesteroler så ikke ut til å gå over i heptanfasen før EPA og DHA gjorde det. Den første ekstraksjonen med heptan, som gjøres før surgjøring av den polare fasen, er ment å fjerne apolare forbindelser som ikke er fettsyrer (uforsåpbare). Dette resultatet viser at kolesterol ikke blir effektivt fjernet ved den første vasken med heptan i den ordinære ekstraksjonen. Ved pH ca. 7 gikk mesteparten (over 80 %) av fettsyrene over heptanfasen. Dermed kan det være unødvendig å fortsette titreringen til pH under 2.

Ved titreringen av rognhydrolysat (se figur 6.12) ble emulsjonen observert tidligere i forsøket med tilsatt heptan (6 ml tilsatt HCl, pH 7,60) enn uten heptan (7 ml tilsatt HCl, pH 7,18).

Dersom emulsjonen hadde oppstått ved lavere pH som f.eks. ved pH 6, kunne problemet med emulsjonen blitt løst. Da kunne man ha fått mesteparten av fettsyrene over i heptanfasen før emulsjonen ble dannet og emulsjonsproblemet kunne vært løst ved justering til riktig pH.

Tabellene for verdier som ble brukt til plotting av figurene 6.11-6.14 er gitt i appendiks A7.

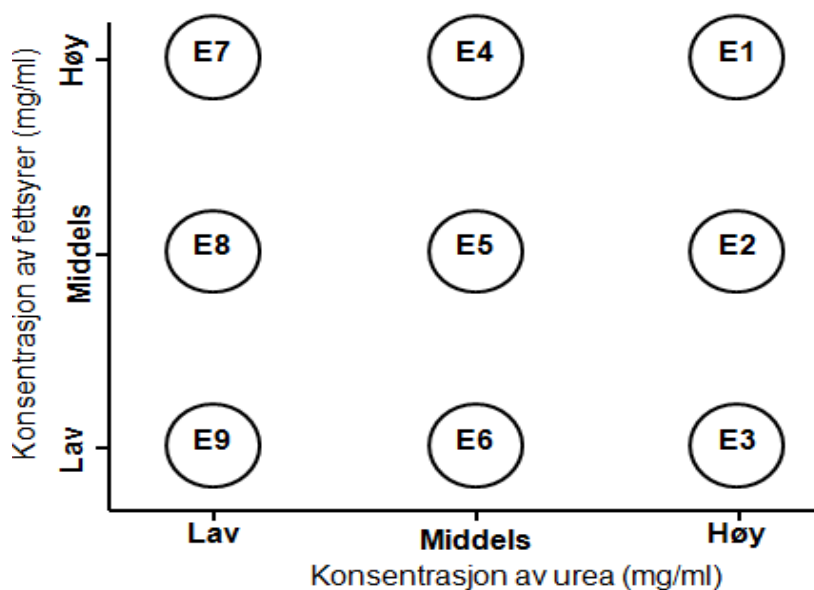


Figur 6.14: Titreringskurve for rogn med mengde av hver enkelt fraksjon

6.6 Optimalisering av ureafellingen

Ureafellinger med varierende betingelser ble utført på en blanding av ekstraktene samlet opp fra forsøk 4 og forsøk 6-8 (to hydrolyserte ekstrakter av rogn og to av melke) for å undersøke om det var mulig å oppnå vellykket ureafraksjonering ved å variere konsentrasjon av fettsyrer og urea, samt å finne ut hvordan prosentandelen av EPA og DHA i NIF, og deres utbytte, vil variere med forskjellige betingelser. Resultatene for ureafellingene er gitt i appendiks A8.

Det ble brukt et 2-faktor faktorielt design der hver variabel (konsentrasjon av urea og konsentrasjon av fettsyrer) ble variert på tre nivåer. Figuren 6.15 illustrerer designet og tabellen 6.8 gir de faktiske parametrene brukt i forsøkene. Prosedyren for ureafellingen er ellers som beskrevet i metoddelen. Fettsyrer ble tilsatt i forsøkene løst i etanol, og totalvolumet av etanol ble justert til å være 60 ml ved å anta at fettsyrer har en tetthet på 0,8.



Figur 6.15: Skisse av det eksperimentelle designet brukt

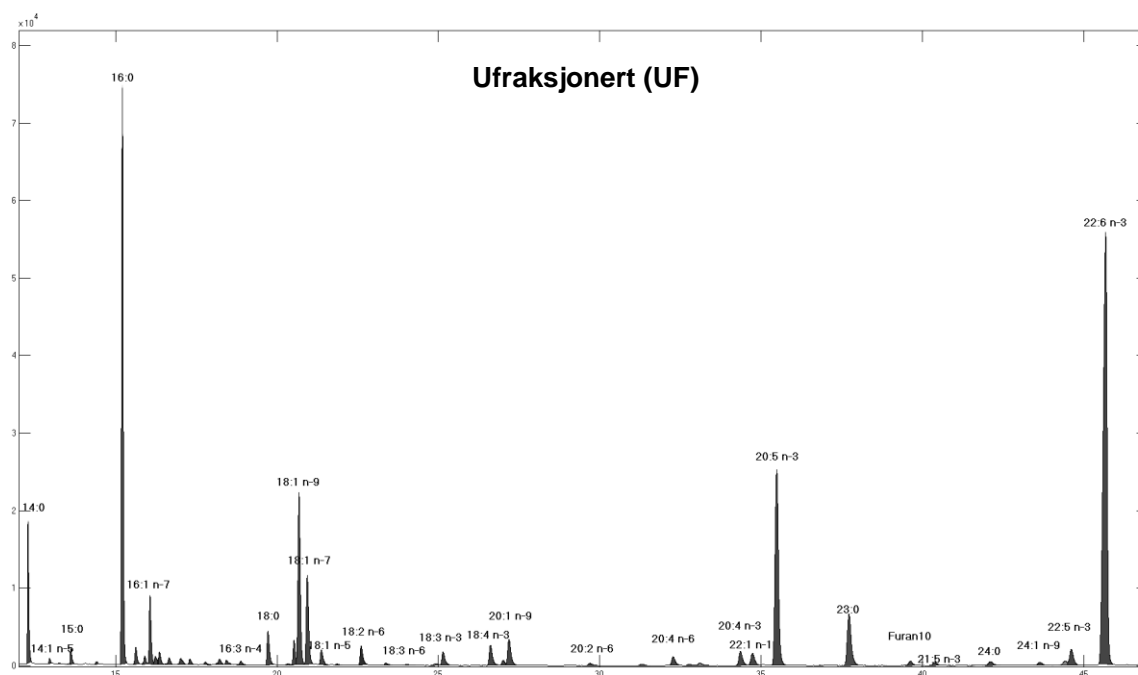
Tabell 6.8: Forsøksbetingelser brukt

Forsøk	Mengde Urea (g)	Mengde fettsyrer (g)	Urea/FFA (g/g)	Kons* Urea (mg/ml)	Kons* FA (mg/ml)
E1	15,0	5,75	2,61	250	95,9
E2	15,0	4,31	3,48	250	71,9
E3	15,0	2,88	5,22	250	47,9
E4	11,3	5,75	1,96	188	95,9
E5	11,3	4,31	2,61	188	71,9
E6	11,3	2,88	3,91	188	47,9
E7	7,5	5,75	1,30	125	95,9
E8	7,5	4,31	1,74	125	71,9
E9	7,5	2,88	2,61	125	47,9

* Alle forsøk gjort i totalt 60 mL 96 % etanol

Utgangsoljen:

Utgangspunktet var hydrolyserte ekstrakter fra de fire ekstraksjonene (rognforsøk 4, 6 og melkeforsøk 7, 8). Heptanekstraktene fra disse forsøkene ble kombinert, dampet inn på rotavapor og løst i ca. 200 ml etanol. Ved hjelp av fettsyreanalyse ble konsentrasjoner av fettsyrer i løsningen bestemt til å være 230 mg/ml totalt, 40,3 mg/ml 16:0, 28,9 mg/ml EPA og 78,6 mg/ml DHA, dvs. at 16:0, EPA og DHA utgjorde henholdsvis 17,5, 12,6 og 34,2 % av fettsyrene i utgangspunktet. Kromatogrammet for den ene parallellen i fettsyreanalysen er vist i figur 6.16.

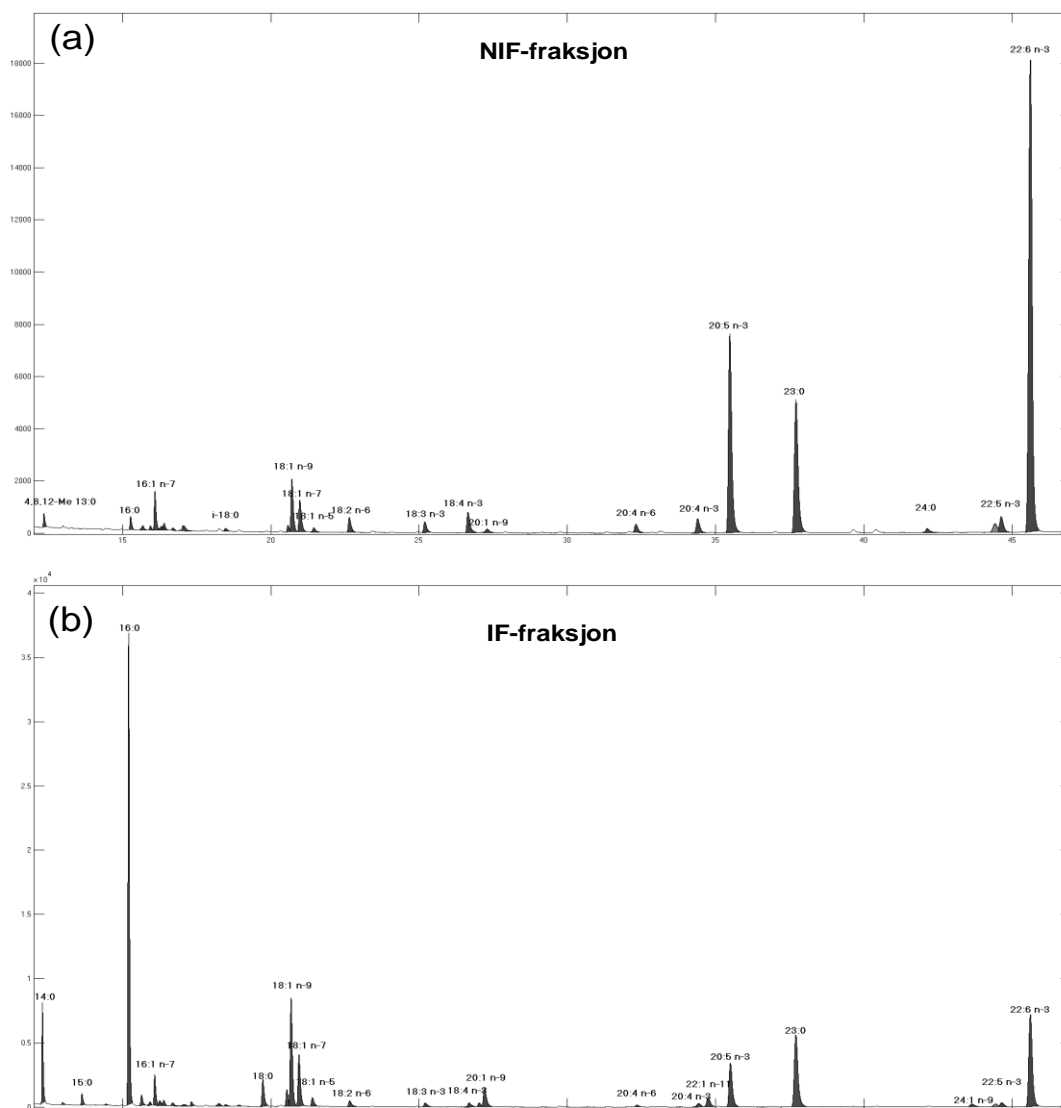


Figur 6.16: Kromatogram av den ufraksjonerte oljen som ble tilsatt i forsøkene (23:0 er intern standard)

Resultater:

Resultater for de ulike eksperimentene er oppsummert i tabell 6.9 til 6.12. Prosentinnhold av 16:0, EPA og DHA i de forskjellige fraksjonene er gitt i tabell 6.9. Hvor vellykket fraksjoneringen har vært kan først og fremst ses på innholdet av 16:0 i NIF-fraksjonen. Denne skal være lavest mulig. Det er store forskjeller og forsøk E4 og E3 er de mest ekstreme. E4 var det mest vellykkede eksperimentet i form av høyest grad av oppkonsentrering av EPA/DHA med laveste innhold av 16:0 i NIF. E3 var minst vellykkede med høyest innhold av 16:0 og laveste prosentandel EPA/DHA i NIF (tabell 6.9).

Kromatogrammene for NIF- og IF-fraksjonene for E4 er vist i figur 6.17. NIF-fraksjonen inneholder store topper av EPA og DHA og er nesten fri for 16:0. Fordi krystallene var effektive i å fange opp mettede fettsyrer blir det dermed observert en markant topp av 16:0 i IF-fraksjonen, med kun små topper av EPA og DHA.



Figur 6.17: Kromatogram av NIF-(a) og IF-fraksjonene (b) fra forsøk E4 (23:0 er intern standard)

DHA og EPA er sterkt korrelert til hverandre. Dersom det er mye DHA i fraksjonen vil det også være mye EPA. Videre diskusjon fokuserer derfor på DHA, men det som gjelder DHA gjelder i hovedsak også for EPA.

Konsentrasjonsfaktorer er gitt i tabell 6.10. Konsentrasjonsfaktor for DHA i NIF var høyere enn 1 for alle forsøkene. Den var høyest for E4 og lavest for E3. Konsentrasjonsfaktorene i NIF-fraksjonene er noe høyere for DHA enn for EPA. Urefellingene ble utført ved ca. 0°C og ved disse temperaturene er dette som forventet ut fra tidligere funn [10].

Konsentrasjonsfaktor for 16:0 i NIF-fraksjonene var mindre enn 1, men i IF-fraksjonene var

denne faktoren derimot mye høyere, minst 3,5 ganger høyere enn for DHA. Dette indikerer at krystallene har hatt en god selektivitet for 16:0.

Det er ingen direkte sammenheng mellom selektiviteten til krystallene og prosentandelene av EPA og DHA i NIF-fraksjonen. Forsøket E4 som hadde høyest % DHA i NIF har for eksempel mye DHA i IF også, dvs. dårlig selektivitet. E8 hadde klart best selektivitet med lavest %DHA i IF (se tabell 6.9). Men likevel gir dette forholdsvis lav grad av oppkonsentrering av EPA og DHA i NIF. Årsaken til at det ikke er en direkte sammenheng mellom selektiviteten til krystallene og grad av oppkonsentrering av EPA/DHA i NIF-fraksjonen, er at oppkonsentreringen ikke bare er avhengig av selektiviteten, men også av hvor stor andel av fettsyrene som går inn i IF-fraksjonen (tabell 6.11). Det hjelper ikke med høy selektivitet i IF hvis total mengden som bindes i IF er for lav til at de tilsatte mettede og monoumettede fettsyrene fanges opp. E2, E3 og E9 i er konkrete eksempler på dette (tabell 6.9 og 6.11).

Tabell 6.9: Prosent av 16:0, EPA, og DHA relativt til total mengde fettsyrer i NIF og IF fraksjonene fra de forskjellige forsøkene.

Forsøk	NIF			IF		
	% 16:0	% EPA	% DHA	% 16:0	% EPA	% DHA
E1	9,43	15,44	44,26	32,62	7,95	17,99
E2	13,03	13,70	37,47	58,24	4,26	9,74
E3	16,01	13,23	36,40	43,32	5,67	11,19
E4	0,71	20,16	55,55	32,27	6,66	16,68
E5	7,59	17,20	50,36	31,14	7,17	14,93
E6	11,95	14,64	42,11	33,82	8,02	15,22
E7	7,59	15,40	42,28	56,37	3,13	7,18
E8	6,19	16,20	44,63	54,28	2,03	3,55
E9	14,09	13,80	37,74	43,57	4,95	10,26

Tabell 6.10: Konsentrasjonsfaktorer for ulike fettsyrer

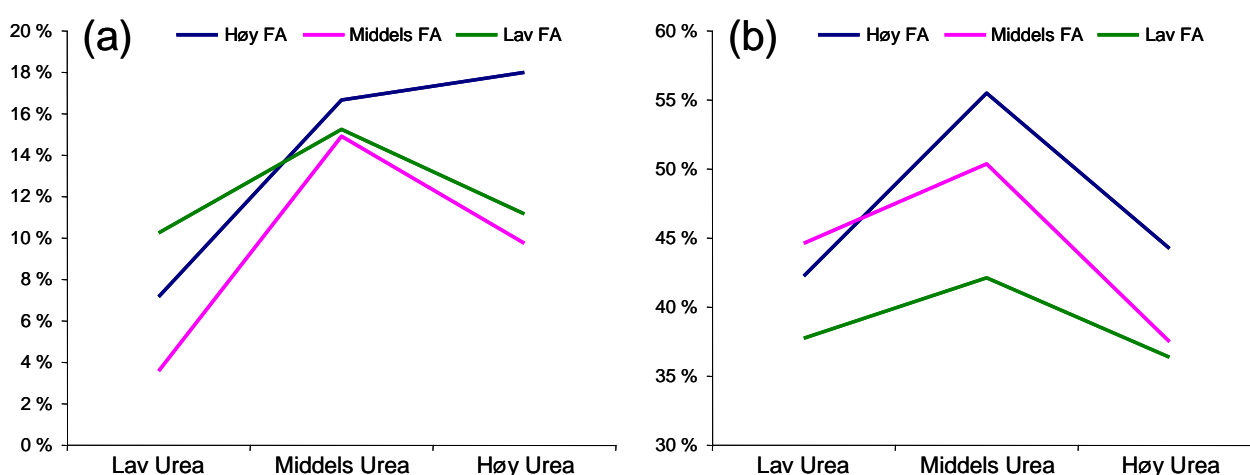
Forsøk	NIF			IF		
	EPA	DHA	16:0	EPA	DHA	16:0
E1	1,23	1,29	0,54	0,63	0,53	1,86
E2	1,09	1,10	0,74	0,34	0,29	3,33
E3	1,05	1,06	0,92	0,45	0,33	2,48
E4	1,60	1,63	0,04	0,53	0,49	1,84
E5	1,37	1,47	0,43	0,57	0,44	1,78
E6	1,16	1,23	0,68	0,64	0,45	1,93
E7	1,22	1,24	0,43	0,25	0,21	3,22
E8	1,29	1,31	0,35	0,16	0,10	3,10
E9	1,10	1,10	0,81	0,39	0,30	2,49

Tabell 6.11: % av total FAME tilsatt som ble gjenfunnet i IF og NIF samt massebalanse for forsøkene

Forsøk	Total FAME i IF ⁽¹⁾	Total FAME i NIF ⁽¹⁾	Massebalanse ⁽²⁾
	(%)	(%)	(%)
E1	33,3	59,7	93,0
E2	8,1	77,2	85,4
E3	6,8	88,0	94,8
E4	52,8	45,3	98,1
E5	37,4	51,4	88,8
E6	27,3	68,4	95,7
E7	16,8	67,3	84,1
E8	22,1	69,6	91,7
E9	9,7	80,2	89,9

(1) % av tilsatt mengde som ble funnet igjen i fraksjonene

(2) Sum av % FAME i NIF og IF



Figur 6.18: %DHA i forhold til sum fettsyrer i IF (a) og NIF (b) ved de forskjellige betingelsene.

Prosentandelen av DHA i NIF og IF kan bestemmes ved å benytte figur 6.18. %DHA i NIF (se figur 6.18b) var høyest (55.6 %) for høy konsentrasjon av FA og middels høy konsentrasjon av urea (E4). %DHA var lavest (36,4 %) for lav konsentrasjon av FA og høy konsentrasjon av urea (E3).

IF-fraksjonen i figur 6.18a hadde den laveste prosentandelen av DHA (ca. 3,5 %) for lav konsentrasjon av urea og middels høy konsentrasjon av FA (E8). Prosentandelen av DHA var høyest (17,99 %) i IF for høykonsentrasjon av både urea og FFA (E1).

Utbytte:

Utbytte av EPA og DHA vil være avhengig både av selektiviteten til urea, dvs. krystallenes evne til å ekskludere umettede fettsyrer slik at de ikke ender opp i IF, og total mengde av fettsyrer som går i IF-fraksjonen. Dårlig selektivitet vil redusere utbytte fordi det øker andelen av EPA/DHA som havner i IF. Høy andel fett i IF vil også gi redusert utbytte av samme årsak.

Tabell 6.12 viser utbytte av EPA og DHA ved de forskjellige forsøksbetingelsene. E3 har utbytte av EPA (92,5 %) og DHA (93,7 %) som var ca. 20 % høyere enn for E4 og høyest blant alle forsøkene. Utbyttet var høyest for forsøk E3 fordi % FAME var lavest i IF (6,8 %) men høyest i NIF (88,0 %), samt at mindre mengder av EPA og DHA hadde dannet kompleks med urea siden prosentandelene er lavere i NIF og i IF. Forsøk E4 hadde derimot de laveste utbyttene (72,5 % for EPA og 73,6 % for DHA) fordi selektivitet til urea var dårlig; total FAME var nesten likt delt i IF (52,8 %) og i NIF (45,3 %) i tillegg til at EPA- og DHA-prosentandelene var høyest blant alle NIF-fraksjonene.

Tabell 6.12. Utbytte av EPA og DHA i de forskjellige forsøkene

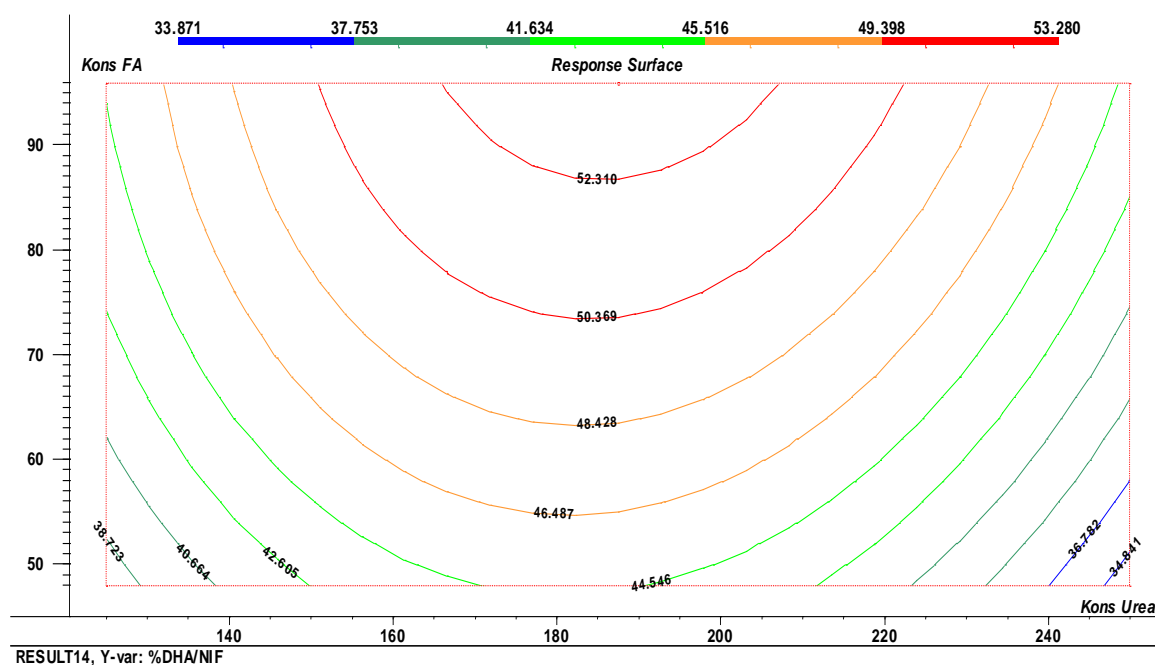
Forsøk	Utbytte EPA (%)	Utbytte DHA (%)
E1	73,2	77,2
E2	84,1	84,7
E3	92,5	93,7
E4	72,5	73,6
E5	70,2	75,7
E6	79,6	84,3
E7	82,3	83,2
E8	89,6	90,9
E9	88,0	88,6

Responsflater

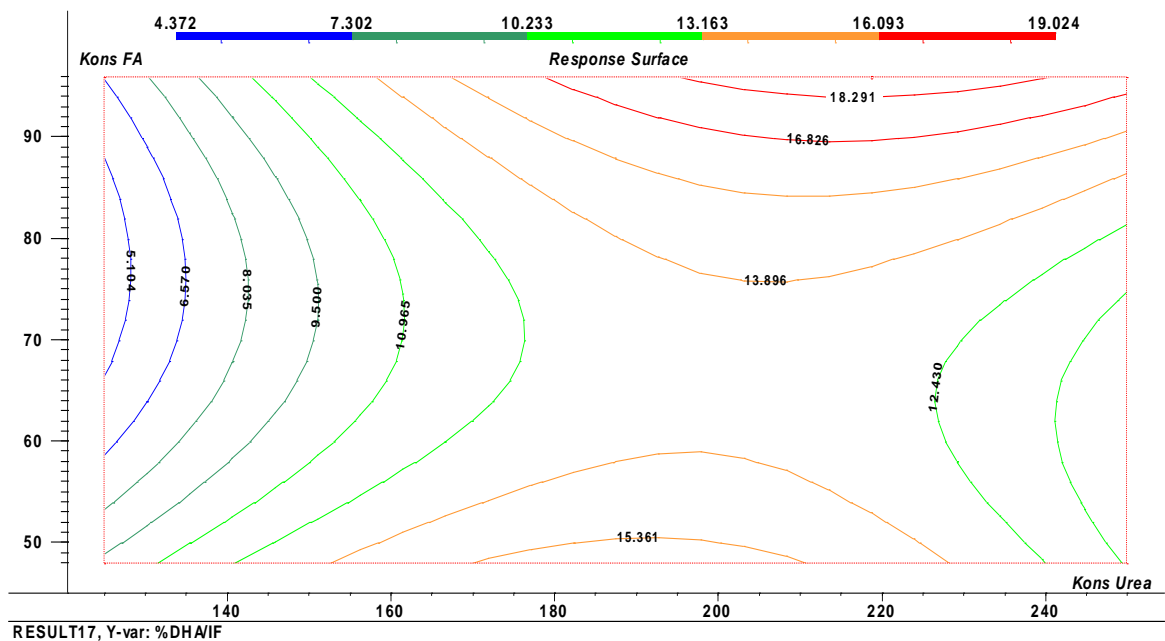
Siden det er vanskelig å få en god oversikt ved å kun se på tallene kan det lages responsflatemodeller for %DHA i NIF og IF, samt for utbytte, som funksjon av konsentrasjon av urea og fettsyrer. %EPA og %DHA er sterkt korrelert derfor vil plottene for DHA være representativt for begge.

En kvadratisk responsflatemodell med to x-variabler slik det er brukt her forsøker å forklare responsen som funksjon av de to x-variablene, deres interaksjoner og kvadratet av de to x-variablene (x^2). Responsflatemodellene ble beregnet i Unscrambler 9.2 (CAMO, Oslo, Norge). Responsflatene er illustrert med kontourplott i figur 6.19-6.21.

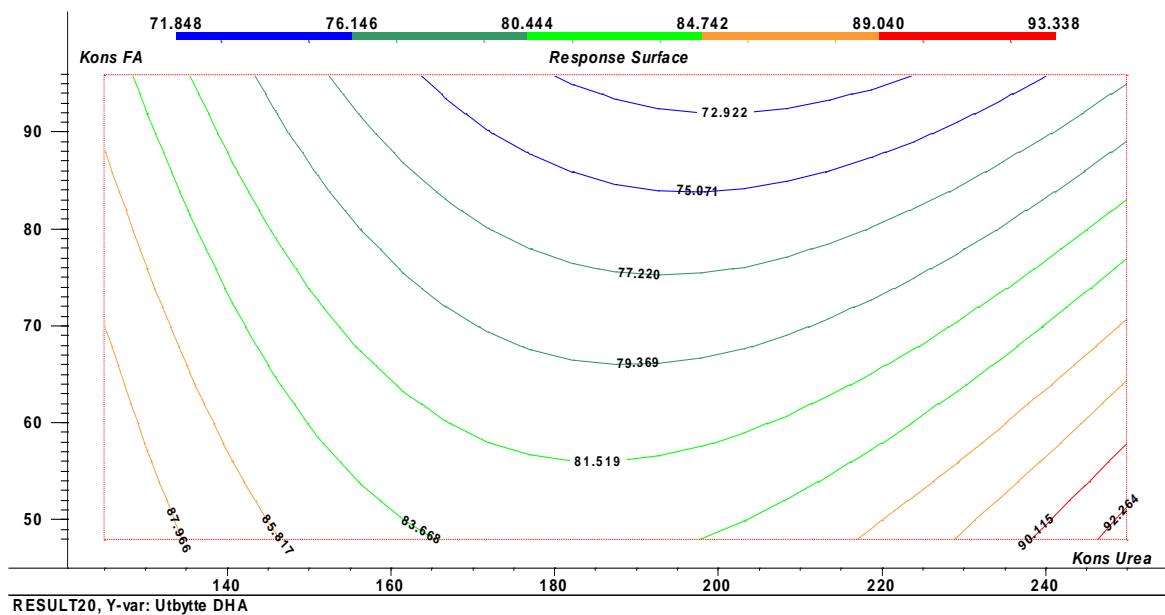
%DHA i NIF ved ulike betingelser kan enkelt bestemmes ved hjelp av responsflatemodellen vist i figur 6.19. Et eksempel er forsøk E4. For 188 mg/ml urea (x-aksen) og 95,9 mg/ml FFA (y-aksen) overstiger DHA 52,31 % i responsflateplottet. Virkelig verdi for %DHA ved disse betingelsene (E4) er 55,55 % (tabell 6.9). DHA-prosent i IF kan vurderes fra figur 6.20 og verdien leses på samme måte som for %DHA i NIF; da blir %DHA i IF ca. 16,7 % ved de samme betingelsene. Ubyttet av DHA bestemmes tilsvarende som vist for de to overnevnte responsflatemodellene ved hjelp av figur 6.21. For den samme konsentrasjon av FA og urea, ligger utbyttet på ca. 72,9 % og det stemmer relativt bra med resultatet (73,6 %) i tabell 6.12.



Figur 6.19: Responsflate plott for % av DHA i forhold til total mengde fettsyrer i NIF som funksjon av konsentrasjon av fettsyrer og urea.



Figur 6.20: Responsflate plott for % av DHA i forhold til total mengde fettsyrer i IF som funksjon av konsentrasjon av fettsyrer og urea.



Figur 6.21: Responsflateplott for utbytte av DHA som funksjon av konsentrasjon av fettsyrer og urea.

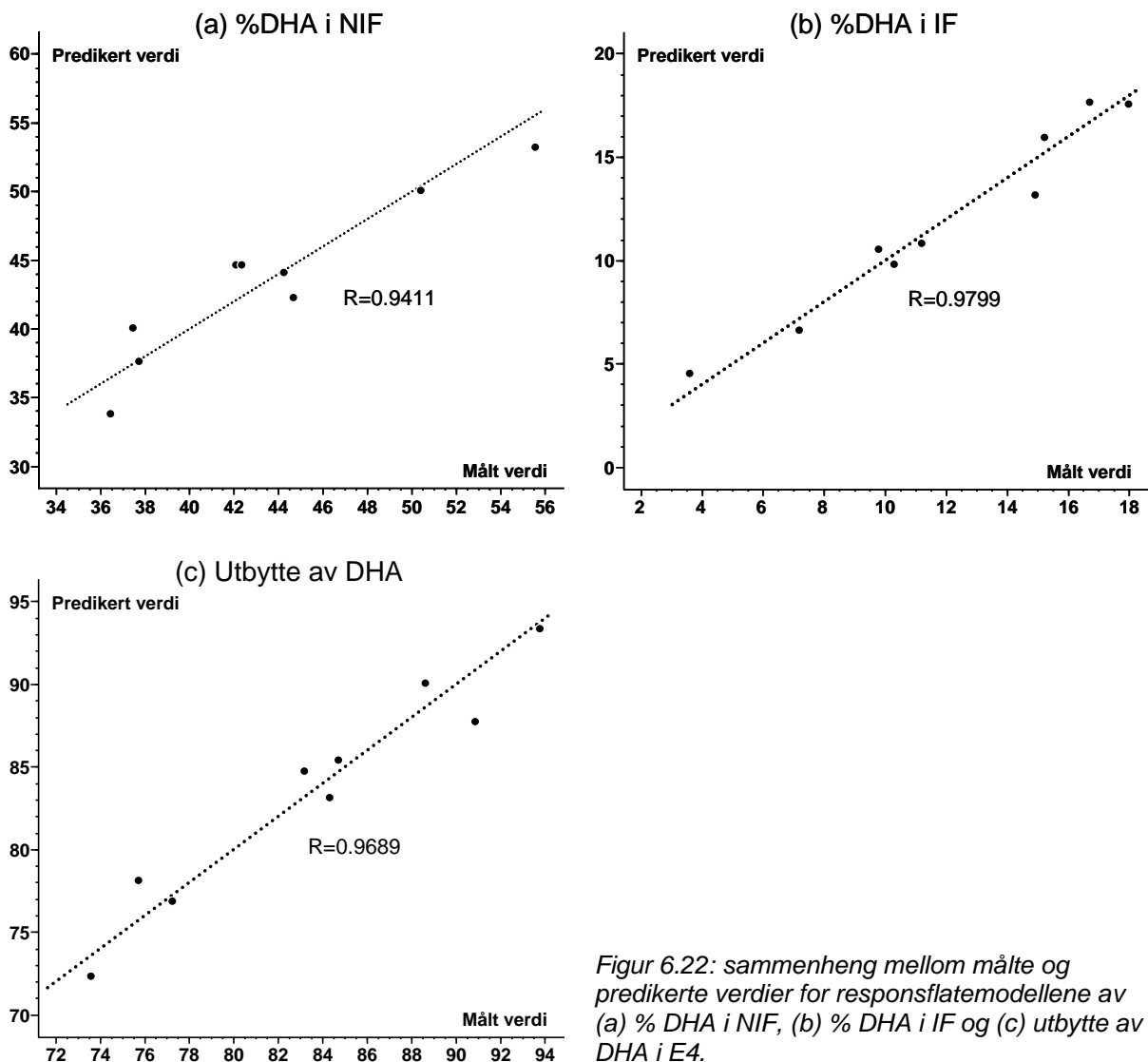
E4 med urea/FFA-forhold av 1,96:1 hadde det beste resultatet for oppkonsentrering av de gunstige fettsyrene, noe som stemmer dårlig med teorien som var beskrevet i seksjon 2.6 for ureafellingen siden forholdet lå langt fra det oppgitte optimale forholdet som var 4:1. Resultatet var derimot lavest for E3 som teoretisk sett hadde det gunstige forholdet 5,22:1. En mulig årsak kan være at utgangsoljen vår allerede innholdt mye EPA (12,6 %) og DHA (34,2 %) og derfor mindre av de fettsyrene som går inn i krystallene sammenlignet med de oljene som ofte har vært brukt til ureafelling. Siden det er mindre av de mettede og monoumettede fettsyrene behøves mindre urea for å fange dem opp.

For lav konsentrasjon av urea i (E7-E9) gav lave verdier av EPA og DHA i NIF, trolig fordi det ikke dannes nok urea-krystaller til å fange opp mettede og monoumettede fettsyrer. For høy konsentrasjon av urea (E1-E3) gav heller ikke gode resultater. Ved de høyeste konsentrasjonene av urea ligger konsentrasjonen nær metningspunktet for urea i etanol. Da kan det dannes krystaller med tetragonal struktur uten fettsyrer (se seksjon 2.6). En for rask dannelse av krystaller med heksagonal struktur kan også ha ført til lav selektivitet. Dannelse av krystaller uten fettsyrer skulle ført til lav andel av fettsyrer i IF. To av de tre forsøkene med de høyeste urea-konsentrasjonene (E1-E3) har relativt lav andel av fettsyrene i IF (se tabell 6.10), det ene av disse forsøkene (F1) som har høy andel fettsyrer i IF har dårlig selektivitet (høy %DHA i IF, tabell 6.9). Så sannsynligvis er det en kombinasjon av disse to faktorene til stede.

Resultatene for alle optimaliseringsforsøkene er gitt på bakgrunn av en parallell fordi vi ikke hadde nok utgangsolje til to paralleller. Da er det vanskelig å gi et eksakt mål på reproduserbarhet i forsøkene. Men forholdet mellom virkelige (målte) verdier og predikerte verdier, den verdien reposflatemodellen sier vi vil få ved en gitt betingelse, kan benyttes til å si noe om dette. Så lenge det er flere eksperimenter (i dette tilfellet 9) enn det som trengs for å beregne responsflaten (6 forsøk) vil tilpasningen av hvert enkelt forsøk til modellen si noe om i hvor stor grad forsøket er preget av tilfeldige feil.

Forholdet mellom målte og predikerte verdier for de tre responsflatemodellene er vist i figur 6.22. Ideelt sett skal punktene for de ni forsøkene ligge på den stiplede linjen der målte og predikerte verdier tilsvarer hverandre. Selv om det er forskjell mellom målte og predikerte verdier er det ingen av eksperimentene som viser ekstreme avvik. Modellen for % DHA i IF var den mest nøyaktige, det er også denne som er resultat av de enkleste sammenhengene.

Den vil være avhengig av selektiviteten til krystallene, mens de to andre modellene vil være avhengig både av selektiviteten til krystallene og andre faktorer i tillegg. Det skal understrekes at avvik fra den stiplede linjen ikke nødvendigvis kun er et resultat av eksperimentelle feil, det kan også skyldes at andregradsmodellene ikke fullt ut kan forklare sammenhengene i forsøket.



Figur 6.22: sammenheng mellom målte og predikerte verdier for responsflatemodellene av (a) % DHA i NIF, (b) % DHA i IF og (c) utbytte av DHA i E4.

6.7 GC-MS analyse av fraksjoner fra optimaliseringsforsøket

NIF og IF-fraksjonene fra E4 i optimaliseringsforsøket, samt utgangsoljen, ble analysert på GC-MS for å få bedre innblikk i hva som finnes av andre fettsyrer i ekstraktene og hvordan de oppfører seg i ureafellingen. Resultatene er gitt som % av totale fettsyrer i tabell 6.13. Kun fettsyrer som både ble funnet i utgangsoljen og i minst en av de andre fraksjonene er tatt med. Andre fettsyrer er oppsummert under “andre”. Siden resultatene er fra GC-MS er de kromatografiske arealene ikke korrigert med responsfaktorer, men en kan se at verdiene for EPA og DHA er relativt like til de som ble funnet med GC-FID (Tabell 9 E4 og beskrivelsen av utgangsoljen). Prosent relativt til UF er verdien i fraksjonen (NIF eller IF) relativt til utgangsoljen. Ev verdi under 100 % indikerer derfor lavere prosentandel i fraksjonen, mens verdier over 100 % indikerer en økning.

For mettede og monoumettede fettsyrer er det tydelig at fraksjoneringen blir mer effektiv med lengre kjedelengder. For 14:0 er verdien i NIF 17% av hva den var i utgangsoljen, for 16:0 er den kun 3% og øvrige mettede er fraværende i NIF. For 16:1 er verdien i NIF 83%, mens den for 18:1 og 20:1 er henholdsvis 49 og 18%. 22:1 og 24:1 er fraværende i NIF. For de flerumettede fettsyrene kan en se at graden av oppkonsentrering i NIF øker med antall dobbeltbindinger og den er høyest for DHA. Andre fettsyrer som øker i NIF er en metylforgrenet 16:1-fettsyre (16:1 n-10, 7Me) og en furanfettsyre. Cholestiener er nedbrytningsprodukter fra kolesterol. Disse øker i NIF, men det er også en betydelig andel igjen i IF. På grunn av formen til molekylet er det lite trolig at kolesterol kan gå inn i ureakrystallene. En mulighet er at kolesterol til en viss grad krystalliserer under prosessen slik at en andel av kolesterolet følger IF-fraksjonen.

Tabell 6.13: Arealprosent i ufraksjonert olje (UF), NIF og IF fra E4 i forsøkene med optimalisering av ureametoden, og prosent i IF/NIF relativt til UF. "i.d." betyr ikke detektert.

	Arealprosent (GC-MS)			% relativt til UF	
	UF	NIF	IF	NIF	IF
14:0	3,59	0,62	6,08	17 %	169 %
i-15:0	0,11	0,08	0,12	74 %	108 %
15:0	0,43	i.d.	0,76	-	180 %
16:0	19,76	0,61	37,43	3 %	189 %
Sum 16:1	3,70	3,06	4,02	83 %	109 %
i-17:0	0,50	i.d.	0,51	-	100 %
ai-17:0	0,29	0,19	0,27	66 %	94 %
16:1 n-10, 7Me	0,29	0,41	0,25	140 %	85 %
17:0	0,21	i.d.	0,34	-	165 %
Sum 17:1	0,29	0,14	0,29	50 %	103 %
i-18:0	0,15	0,15	0,13	95 %	84 %
18:0	1,45	i.d.	2,67	-	184 %
Sum 18:1	13,25	6,52	18,87	49 %	142 %
18:2 n-6	0,80	0,96	0,55	120 %	69 %
18:3 n-3	0,52	0,66	0,30	126 %	58 %
18:4 n-3	0,87	1,43	0,33	165 %	37 %
Sum 20:1	1,67	0,29	2,57	18 %	154 %
20:4 n-6	0,34	0,52	i.d.	156 %	-
20:4 n-3	0,63	0,96	0,34	153 %	54 %
22:1 n-11	0,73	i.d.	1,08	-	148 %
20:5 n-3	11,90	19,99	5,50	168 %	46 %
Furan10 ⁽¹⁾	0,14	0,15	i.d.	110 %	-
21:5 n-3	0,11	0,20	i.d.	174 %	-
22:5 n-6	0,13	0,21	i.d.	167 %	-
24:1 n-9	0,13	i.d.	0,19	-	150 %
22:5 n-3	0,70	1,08	0,27	155 %	39 %
22:6 n-3	33,25	57,32	14,75	172 %	44 %
Cholestdiener ⁽²⁾	2,71	3,39	1,89	125 %	70 %
Andre	1,36	1,03	0,48	76 %	35 %

(1) 13,14-Dimetyl-12,15-eposkyeikosa-12,14-diensyre

(2) Kolestdiener er nedbrytningsprodukter fra kolesterol

6.8 Sammenligning med omega-3-produkter på markedet

Figur 6.23 gir en sammenligning av våre oppkonsentrerte produkter med omega-3-produkter som selges i det Europeiske markedet [8]. Ufraksjonert rogn/melke (verdier fra utgangsoljen brukt i optimaliseringsforsøket), NIF-fraksjonen av tran (forsøk 1 og 2) og NIF-fraksjonen fra optimaliseringsforsøket med høyest % EPA og DHA (E4) er vist med røde sirkler.

Det viser at vi har oppnådd en høy oppkonsentrering av DHA, i tillegg til en god oppkonsentrering av EPA. Før ureafellingen lå tran i området for selolje og tran (CLO = cod liver oil) med lav prosentandel av EPA og DHA (ca. 10 %).

Ufraksjonert rogn og melke har i utgangspunktet en ganske gunstig fettsyreprofil og skiller seg klart fra typiske produkter som tran (CLO), selolje og 18/12-oljer (typiske fiskeoljer fra Syd-Amerika), særlig på nivået av DHA.

Det beste resultatet (E4) fra optimaliseringsforsøket ligger noe høyere enn den fraksjonerte tranen. Det grå feltet i plottet markerer en teoretisk grense der sum av EPA og DHA vil være over 100 %. Produktene som ligger nærmest denne grensen er derfor produktene som har høyest totalt innhold av EPA/DHA og det er få av produktene som har høyere sum enn E4 fra optimaliseringsforsøket.

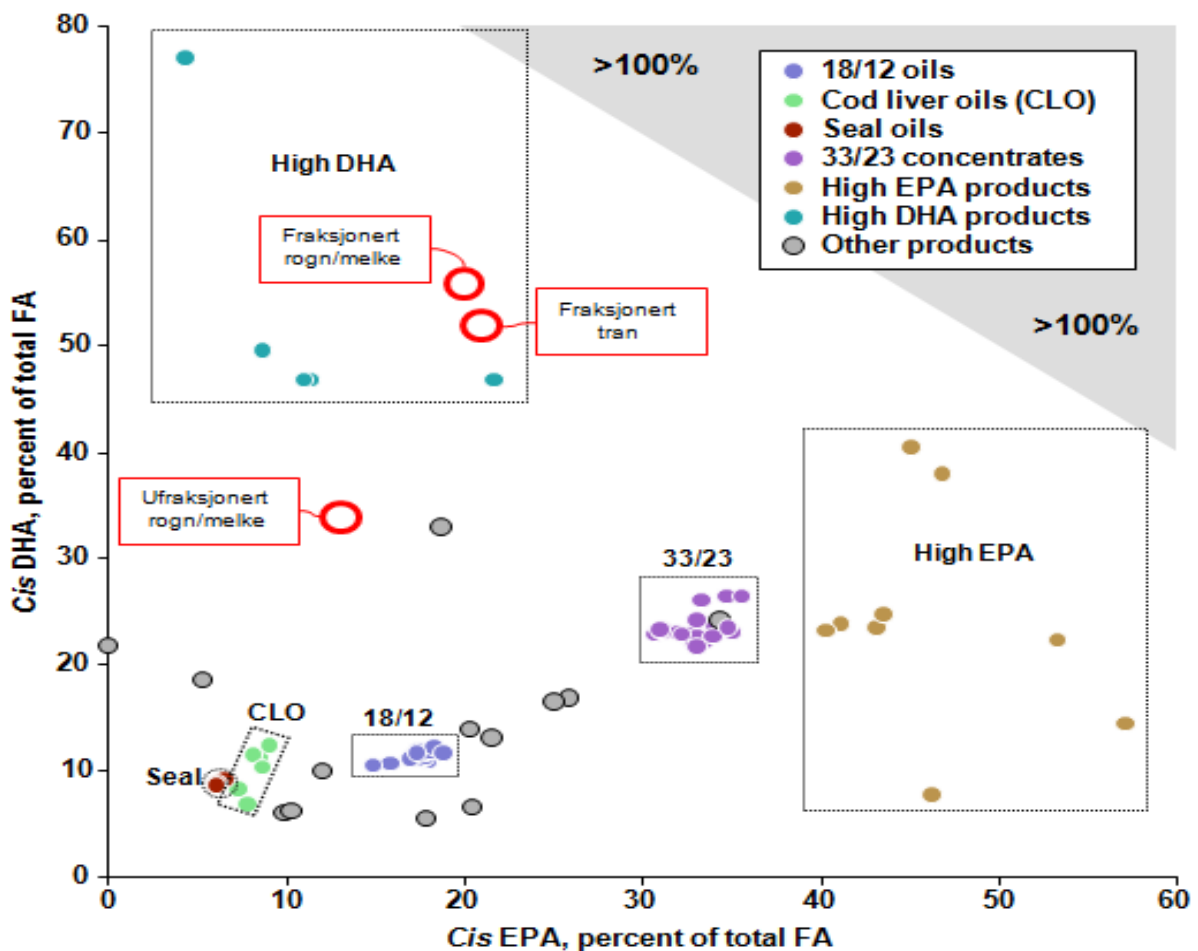
Siden rogn og melke fra sild i utgangspunktet har en gunstig fettsyreprofil kan en stille spørsmål ved om det er noe stor gevinst i å oppkonsentrere EPA og DHA ytterligere. Fra tabellene for ekstraksjon ser vi at i 100 g tørt rognpulver er det ca. 10 g FAME hvorav 1,2 g EPA og 3,2 g DHA. Dersom vi følger rådet å spise 0,5 g EPA og DHA daglig, vil ca. 40 g rogn i våt vekt (tørrstoffinnholdet i fersk rogn/melke er ca. 30 %) eller 11 g tørt rognpulver dekke behovet for EPA og DHA.

Etanolekstraktene av rogn og melke hadde sum EPA og DHA på ca. 43 % av totale fettsyrer. Det vil si at ca. 1,2 g av fettsyrefraksjonen ville dekket dagsbehovet for omega-3-fettsyrer dersom fettsyrene ble isolert fra ekstraktet. Omega-3-kapsler inneholder typisk 500-1000 mg olje, så 2-3 kapsler av en olje med samme fettsyreprofil som rogn og melke kunne dekket dagsbehovet for omega-3.

Det kan også være en viktig faktor at ekstraktene fra rogn/melke er i fosfolipidform. De fleste tilgjengelige produktene på markedet er i triglyseridform men etylester- og fosfolipidform finnes også men i mindre grad. Etylesterform av ω 3-PUFA er mindre fortrukket enn

triglyseridform fordi dyreforsøk har vist en begrenset intestinal absorpsjon i forhold til triglyseridsform [27]. Fosfolipidform er derimot rapportert å være en bedre kilde til omega-3 enn triglyserider [26]. EPA og DHA adsorberes også mer effektivt når de er i fosfolipidform [38].

Krillolje er et annet produkt som i stor grad er fosfolipider, og der sum av EPA og DHA er rundt 40 % av fettsyrene, men med mer EPA enn DHA. Dersom etanolektraktene fra rogn og melke ble effektivt inndampet og kapslet, ville vi få et produkt som i lipidsammensetning var ganske likt krilloljen men med høyere DHA og lavere EPA. Typiske anbefalinger for inntak av krillolje er ca.1000 mg (2 x 500 mg kapsler) per dag.



Figur 6.23: Prosentandel av EPA og DHA i ulike produkter på markedet [8].

7 Konklusjoner

Oppsummeringstabellen for de innledende forsøkene på tran viser at EPA og DHA var høyt oppkonsentrert ved hjelp av ureafellingen (NIF-fraksjonene viste høyere selektivitet for EPA og DHA enn de andre mettede fettsyrene). DHA økte gjennomsnittlig ca. 3,8 ganger mens EPA ca. 2,1 ganger sammenlignet med utgangspunktet.

Oppkonsentreringen var lavere for rogn og melke der EPA og DHA økte ca. 1,6 ganger i snitt i E4 som var det mest vellykkede forsøket i optimaliseringen av ureametoden. Men rogn og melke har i utgangspunktet en gunstig fettsyreprofil med ca. 12 % EPA og 31 % DHA, slik at den relativt moderate konsentrasjonsfaktoren gav et produkt med 20 % EPA og 56 % DHA i det mest vellykkede forsøket, noe som er høyt sammenlignet med omega-3-produkter på markedet. Andelen av EPA og DHA tilsatt i ureaprosessen som ble gjenvunnet i den oppkonsentrerte fraksjonen var henholdsvis 73 % og 74 %, dvs. at tapene av EPA og DHA i prosessen er ca. 25 %.

Ekstraksjon av rogn og melke med etanol eller metanol viste seg å gi betydelige problemer med emulsjon i ekstraksjonen etter hydrolyse, noe som ikke ble sett i forsøkene med tran. Det er derfor sannsynlig at emulsjonsproblemet skyldes forbindelser enn fettsyrer som følger med i ekstraksjonen. Emulsjonsproblemet forble i stor grad uløst.

Kolesterol som forekommer i høye nivåer i råstoffene er en utfordring i forhold til å utvikle et omega-3 produkt fra rogn og melke. Kolesterol ble ikke effektivt fjernet i ekstraksjonstrinnet som har som formål å fjerne apolare forbindelser som ikke er fettsyrer (uforsåpbare komponenter). Titrering av det hydrolyserte ekstraktet viste at kolesterolet i stor grad følger fettsyrene i ekstraksjonen.

Forslag til videre arbeid

Det trengs videre arbeid på å løse emulsjonsproblemet og på fjerning av kolesterol før en kan konkludere med at rogn og melke er et egnet utgangspunkt for omega-3-produkter. I industrielle prosesser benyttes sentrifuger i større grad enn i lab-skala, og med disse metodene kan det være mulig å erstatte heptan-ekstraksjonen slik at en får en prosess som utelukkende er basert på etanol som løsemiddel. Kolesterol kan f.eks. fjernes ved nedkjøling av løsningene fordi det krystalliserer ved høyere temperatur enn de flerumettede fettsyrene [6].

Det finnes andre metoder for oppkonsentrering av EPA og DHA enn de som ble benyttet i denne oppgaven. Det har blitt vist at omega-3-PUFA er høyest i fosfolipidene, mens omega-6-PUFA og monoener er høyest i de nøytrale lipidene i rogn [12]. Derfor kan bruken av andre metoder som f.eks. fosfolipaser, som er enzymer for selektiv hydrolysering av fosfolipider, være et bedre alternativ for videre oppkonsentrering av EPA og DHA enn urea metoden.

8 Referanser

1. Mathews, C.K., K.G. Ahern, and K.E. Van Holde, *Biochemistry*. 2000, Benjamin/Cummings, San Francisco, CA, USA
2. Nes, M., Muller, H. & Pedersen, I. J., *Ernæringslære*. 2006, Gyldendal Akademisk, Oslo, Norge.
3. Burdge, G.C., *Metabolism of alpha-linolenic acid in humans*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 2006. **75**: p. 161-8.
4. Koletzko, B., et al., *The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations*. J. Perinat. Med., 2008. **36**: p. 5-14.
5. Wall, R., et al., *Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids*. Nutr. Rev., 2010. **68**: p. 280-9.
6. Wanasundara, U.S., F. Shahidi, *Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions*. Food Chem., 1999. **65**: p.41-49.
7. Kris-Etherton, P.M., W.S. Harris, and L.J. Appel, *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**: p. 2747-57.
8. Sciotto, C. and S.A. Mjøs, *Trans Isomers of EPA and DHA in Omega-3 Products on the European Market*. Lipids, 2012. **47**: p. 659-67.
9. Thorkildsen, T., *Oksidasjonsnivå i marine omega-3 produkter tilgjengelig for norske forbrukere*. (Masteroppgave) 2010, Høgskolen i Akershus.
10. Robles Medina, A., et al., *Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids*. Biotechnol. Adv., 1998. **16**: p. 517-80.
11. FAO, *The state of the world fisheries and aquaculture*. 2010, FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, Italia.
12. Mjøs, S.A., *Isolering av nye biologiske komponenter fra marint råstoff*, 2008. (Sluttrapport Prosjektnr: 20527). Nofima Ingrediens, Bergen, Norge.
13. Akoh, C.C., and Min, B.D., *Food lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2. ed. Vol. 1005. 2002, Marcel Dekker, Inch, New York, USA.
14. Mjøs, S., *Interpretation of chromatographic and mass spectrometric data from analyses of fatty acid methyl esters. Application of multivariate methods*, 2006. (Doktoravhandling) Universitet i Bergen, Norge
15. Gunstone, F.D., J.L. Harwood and F.B. Padley, *The Lipid Handbook*, 1994, Chapman & Hall, London, UK.
16. Vaclavik, A.V. and E.W. Christian, *Essentials of Food Science*. 3.edition. 2007, Springer, Berlin, Tyskland.
17. Kates, M., *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. 1986, Elsevier, Amsterdam, Nederland
18. Solomons, T.W.G., and Fryhle B. C., *Organic Chemistry*. 10th.ed. 2011: John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA.

19. Damodaran, S., K. Parkin, and O.R. Fennema, *Fennema's food chemistry*. 2008, Taylor & Francis, Oxford, UK.
20. Christie, W.W., *Gas chromatography and lipids: a practical guide* 1989, The Oily Press, Ayr, Scotland.
21. Gross, J.H., *Mass spectrometry: a textbook*. 2011, Springer, Berlin, Tyskland
22. Grønneberg, T., Hannisdal, M., Pedersen, B., Ringes, V., *Kjemien stemmer. Kjemi 2 Grunnbok. 3. utg.* 2011, Cappelen Damm AS, Oslo, Norge.
23. Bell, M.V. and D.R. Tocher, *Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (Salmo gairdneri). Occurrence of high levels of di-(n-3)polyunsaturated fatty acid species*. *Biochem. J.*, 1989. **264**: p. 909-15.
24. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959. **37**: p. 911-7.
25. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J. Biol. Chem.*, 1957. **226**: p. 497-509.
26. Haugsgjerd, B.O., *Ekstraksjon av feit med høgt innhold av fosfolipid og omega-3 fettstoffer frå frysetørka silderogn (Clupea harengus) ved bruk av løysemiddel som er godkjende til framstilling av næringsmiddel*. 2008, (Masteroppgave) Universitet i Bergen, Norge.
27. Shahidi, F., and Wanasundara N. U., *Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies*. *Trends Food Sci. Tech.*, 1998. **9**: p. 230-240.
28. Toudic, B., Garcia, P., Odin, C., Rabiller, P., Ecolivet, C., Collet, E., Bourges, P., McIntyre, J. G., Hollingsworth, D. M., Breczewski, T. *Hidden Degrees of Freedom in Aperiodic Materials*. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/319/5859/69.full>.
29. Grahl-Nielsen, O., A.G. Frøystein & S.A. Mjøs, *Laboratoriehefte. Kjemi/farm 250. Analytisk kjemi*, 2012, Kjemisk institutt, Universitetet i Bergen, Norge.
30. Eder, K., *Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters*. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 1995. **671**: p. 113-31.
31. Christie, W.W., *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis*. *Adv. Lipid Meth.*, 1993. **2**: p. 69-111.
32. Morrison, W.R. and L.M. Smith, *Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol*. *J. Lipid Res.*, 1964. **5**: p. 600-8.
33. Teale, M.C., *Omega 3 fatty acid research*, 2006, Nova Science Publishers, NY, USA.
34. Wasta, Z., *Identifikasjon av fettstoffer i omega-3 produkter ved hjelp av gasskromatografi med massespektrometrisk deteksjon*, 2012, (Masteroppgave) Universitet i Bergen, Norge
35. Xiao, L., Mjøs, S.A., and Haugsgjerd, B.O., *Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids*. *J. Food Compos. Anal.*, 2012. **25**: p. 198-207.
36. Medina, R.A., Grima, M. E, Giménez, G. A, González, I. MJ., *Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids*. *Biotechnol. Adv.*, 1998. **16**: p.517-580.
37. Kanicky, J.R. and D.O. Shah, *Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids*. *J. Colloid Interface Sci.*, 2002. **256**: p. 201-7.
38. Rubin, *Sildeavskjær som råstoff til spesialprodukter for helse og ernæring*. 2012, Rapportnummer 216, Stiftelsen Rubin, Trondheim, Norge.

Appendiks

A1. Materialer og utstyr

Kjemikalier:

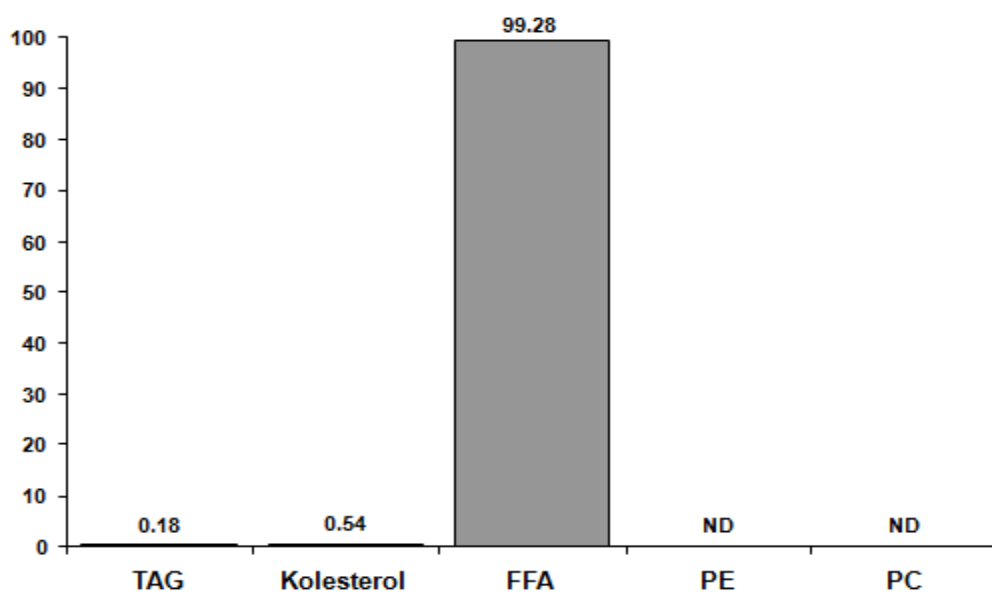
- Etanol, 96 % (Arcus)
- Metanol, HPLC grad
- 2N HCl (Saltsyre)
- NaOH, p.a.(lut)
- Destillert vann
- Heptan, HPLC grad
- Urea-mettet etanol
- Na₂SO₄ (tørket)
- Nitrogengass (Næringsmiddelkvalitet)
- Intern standard (2,00 mg/ml; FAME 23:0, Nu-Chek Prep, Elysian, MN, USA)
- Destillert vann
- Isooktan (HPLC-grad)
- Mettet NaCl
- 0,5 N NaOH
- BF₃ i metanol (12 %, Sigma-Aldrich)

Utstyr:

- Magnetrører med varme
- Termometer
- Glassflasker > 200 ml med skru- lokk
- Skilletrakt, ca. 250 ml
- Stativ og vekt
- Målesylinder > 50 ml
- Erlenmeyerkolber med vid hals > 150 ml eller begerglass > 150 ml
- Büchnertrakt med filter
- Filterpapir
- Vannstrålepumpe
- Vakuumflaske
- Rotavapor
- Stor spatel
- Røremagnet
- Ovn, 100° C
- Induksjonskokeplate
- Kokegryte
- Gasskromatograf (Thermo)

- whirlmixer
- Sentrifuge
- Pasteur pipetter
- Regulerbar pipette (200- 1000 μ l)
- Fint graderte sprøyter (10 μ l, 250 μ l og 500 μ l)
- Reagensrør (15 ml) med skru- lokk
- 2,0 ml glassrør med med lokk
- 1.5 ml autosampler rør for GC

A2. Forsøk 1, Innledende forsøk på tran



Figur A2.1: Lipidklasseanalyse av tran i forsøk 1

Tabell A2.2: Resultater for det første ureaforsøk med tran, 1.parallell

	A	B	C	D	E
	Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1 Tran til analyse (mg)	27,7	27,7	27,7		
2 FAME analysert (mg)	25,9	2,42	3,39	9,33 %	13,1 %
3 FFA olje til analyse (mg)	27,0	27,0	27,0		
4 FAME analysert (mg)	25,3	2,36	3,29	9,32 %	13,0 %
5 mg FAME/g prøve	936	87,3	122		
6 Innveid FFA-olje (g)	5,04	5,04	5,04		
7 Innveid FAME (g)	4,718	0,440	0,614		
8 Total vekt NIF- løsnng (g)	89,16	89,16	89,16		
9 Innveid til analyse (g)	0,8028	0,8028	0,8028		
10 FAME i NIF (mg)	9,15	1,90	4,78	20,8 %	52,2 %
11 Total FAME i NIF (mg)	1016	211	531		
12 Total FAME NIF (g)	1,016	0,211	0,531		
13 % FAME i NIF	21,5 %	48,0 %	86,5 %		
14 Totalvekt IF-løsning (g)	90,18	90,18	90,18		
15 Innveid til analyse (g)	0,6988	0,6988	0,6988		
16 FAME i IF (mg)	27,0	1,60	0,525	5,92 %	1,94 %
17 Total FAME i IF (mg)	3486	206	67,8		
18 Total FAME i IF (g)	3,49	0,206	0,0678		
19 % FAME i IF	73,9 %	46,9 %	11,0 %		
20 Massebalanse	95,4 %	94,9 %	97,5 %		

Tabell A2.3: Resultater for det første ureaforsøk med tran, 2.parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Tran til analyse (mg)	27,7	27,7	27,7		
2	FAME analysert (mg)	25,9	2,42	3,39	9,33 %	13,1 %
3	FFA olje til analyse (mg)	27,0	27,0	27,0		
4	FAME analysert (mg)	25,3	2,36	3,29	9,32 %	13,0 %
5	g FAME/g prøve	936	87,3	122		
6	Innveid FFA-olje (g)	5,00	5,00	5,00		
7	Innveid FAME (g)	4,68	0,436	0,609		
8	Total vekt NIF- løsning (g)	91,16	91,16	91,16		
9	Innveid til analyse (g)	0,6767	0,6767	0,6767		
10	FAME i NIF (mg)	6,83	1,48	3,48	21,7 %	51,0 %
11	Total FAME i NIF (mg)	920	199	469		
12	Total FAME NIF (g)	0,920	0,199	0,469		
13	% FAME i NIF	19,7 %	45,7 %	77,0 %		
14	Totalvekt IF-løsning (g)	90,58	90,58	90,58		
15	Innveid til analyse (g)	0,6995	0,6995	0,6995		
16	FAME i IF (mg)	25,9	1,45	0,450	5,59 %	1,74 %
17	Total FAME i IF (mg)	3356	188	58,3		
18	Total FAME i IF (g)	3,36	0,188	0,0583		
19	% FAME i IF	71,7 %	43,0 %	9,57 %		
20	Massebalanse	91,4 %	88,7 %	86,6 %		

A3. Forsøk 2: Innledende forsøk på tran

Tabell A3.1: Resultater for det andre ureaforsøk på tran, 1.parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Tran til analyse (mg)	24,9	24,9	24,9		
2	FAME analysert (mg)	21,6	2,03	2,87	9,39 %	13,3 %
3	FFA olje til analyse (mg)	24,9	24,9	24,9		
4	FAME analysert (mg)	23,4	2,18	3,05	9,31 %	13,0 %
5	mg FAME/g prøve	941	87,6	122		
6	Innveid FFA-olje (g)	5,04	5,04	5,04		
7	Innveid FAME (g)	4,74	0,441	0,617		
8	Totalvekt NIF- løsnings (g)	75,80	75,80	75,80		
9	Innveid til analyse (g)	0,6867	0,6867	0,6867		
10	FAME i NIF (mg)	8,87	1,51	4,33	17,0 %	48,8 %
11	Total FAME i NIF (mg)	979	167	478		
12	Total FAME NIF (g)	0,979	0,167	0,478		
13	% FAME i NIF	20,7 %	37,8 %	77,4 %		
14	Totalvekt IF-løsning (g)	79,50	79,50	79,50		
15	Innveid til analyse (g)	0,7054	0,7054	0,7054		
16	FAME i IF (mg)	31,3	2,04	0,650	6,52 %	2,08 %
17	Total FAME i IF (mg)	3528	230	73,3		
18	Total FAME i IF (g)	3,53	0,230	0,0733		
19	% FAME i IF	74,4 %	52,1 %	11,9 %		
20	Massebalanse	95,1 %	89,9 %	89,3 %		

Tabell A3.2: Resultater for det andre ureaforsøk på tran, 2.parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Tran til analyse (mg)	24,9	24,9	24,9		
2	FAME analysert (mg)	21,6	2,03	2,87	9,39 %	13,3 %
3	FFA olje til analyse (mg)	24,9	24,9	24,9		
4	FAME analysert (mg)	23,4	2,18	3,05	9,31 %	13,0 %
5	mg FAME/g prøve	941	87,6	122		
6	Innveid FFA-olje (g)	5,01	5,01	5,01		
7	Innveid FAME (g)	4,71	0,439	0,614		
8	Total vekt NIF- løsning (g)	75,26	75,26	75,26		
9	Innveid til analyse (g)	0,6979	0,6979	0,6979		
10	FAME i NIF (mg)	9,53	1,73	4,58	18,2 %	48,1 %
11	Total FAME i NIF (mg)	1028	187	494		
12	Total FAME NIF (g)	1,028	0,187	0,494		
13	% FAME i NIF	21,8 %	42,5 %	80,5 %		
14	Totalvekt IF-løsning (g)	81,28	81,28	81,28		
15	Innveid til analyse (g)	0,7124	0,7124	0,7124		
16	FAME i IF (mg)	30,1	1,83	0,56	6,09 %	1,86 %
17	Total FAME i IF (mg)	3429	209	63,9		
18	Total FAME i IF (g)	3,43	0,209	0,0639		
19	% FAME i IF	72,8 %	47,6 %	10,4 %		
20	Massebalanse	94,6 %	90,1 %	90,9 %		

A4. Forsøk 3: Metanolekstraksjon og ureafelling av rognpulver

Tabell A4.1: Resultater for metanolekstraksjon av rognpulver, forsøk 3, 1.parallell

EKSTRAKSJON		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	100,1	100,1	100,1		
2	Rogn til analyse (mg)	200,5	200,5	200,5		
3	FAME analysert (mg)	20,7	2,45	6,33	11,8 %	30,6 %
4	mg FAME/g prøve	103	12,2	31,6		
5	FAME i rogn (g)	10,3	1,22	3,16		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	421,8	421,8	421,8		
7	Innveid til analyse (mg)	850,2	850,2	850,2		
8	FAME analysert (mg)	18,8	2,44	6,82	13,0 %	36,3 %
9	mg FAME/g prøve	22,1	2,87	8,02		
10	FAME i ekstraktet (g)	9,32	1,21	3,38		
11	Utbytte	90,2 %	98,9 %	107 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	200,6	200,6	200,6		
13	FAME analysert (mg)	4,02	0,430	0,830	10,7 %	20,6 %
14	mg analysert/g innveid	20,0	2,14	4,14		
15	Estimert totalvekt rest (g)	79,5	79,5	79,5		
16	FAME i rest (g)	1,59	0,17	0,33		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	10,9	1,38	3,71		
18	Massebalanse	106 %	113 %	117 %		

Tabell A4.2: Resultater for metanolekstraksjon av rognpulver, forsøk3, 2.parallel

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	100,1	100,1	100,1		
2	Rogn til analyse (mg)	200,4	200,4	200,4		
3	FAME analysert (mg)	20,4	2,44	6,27	11,9 %	30,7 %
4	mg FAME/g prøve	102	12,2	31,3		
5	FAME i rogn (g)	10,2	1,22	3,13		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	421,8	421,8	421,8		
7	Innveid til analyse (mg)	841,5	841,5	841,5		
8	FAME analysert (mg)	16,1	2,04	5,79	12,7 %	36,1 %
9	mg FAME/g prøve	19,1	2,42	6,88		
10	FAME i ekstraktet (g)	8,05	1,02	2,90		
11	Utbytte	78,9 %	83,9 %	92,6 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	201,6	201,6	201,6		
13	FAME analysert (mg)	5,29	0,570	1,09	10,8 %	20,6 %
14	mg analysert/g innveid	26,2	2,83	5,39		
15	Estimert totalvekt rest (g)	79,7	79,7	79,7		
16	FAME i rest (g)	2,09	0,225	0,430		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	10,1	1,25	3,33		
18	Massebalanse	99,4 %	102 %	106 %		

Tabell A4.3: Resultater for ureafelling av rognekstrakt, forsøk 3, 1.parallell

	A	B	C	D	E
	Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (g)	52,66	52,66	52,66	
2	Innveid til analyse (mg)	865,6	865,6	865,6	
3	FAME analysert (mg)	54,1	6,96	19,28	12,9 %
4	mg FAME/g prøve	62,5	8,04	22,3	
5	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	3,29	0,423	1,17	
6	Totalvekt NIF- løsning (g)	78,28	78,28	78,28	
7	Innveid til analyse (g)	0,6707	0,6707	0,6707	
8	FAME analysert (mg)	21,3	2,82	8,48	
9	Total FAME i NIF (mg)	2491	329	990	
10	Total FAME NIF (g)	2,49	0,329	0,990	13,2 %
11	% FAME i NIF	75,7 %	77,7 %	84,4 %	39,7 %
12	Totalvekt IF-løsning (g)	63,68	63,68	63,68	
13	Innveid til analyse (g)	0,7001	0,7001	0,7001	
14	FAME i IF (mg)	3,38	0,102	0,225	
15	Total FAME i IF (mg)	307	9,23	20,5	3,00 %
16	% FAME i IF	9,35 %	2,18 %	1,75 %	6,66 %
17	Massebalanse	85,1 %	79,9 %	86,1 %	

Tabell A4.4: Resultater for ureafelling av rognekstrakt, forsøk 3, 2.parallel

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (g)	52,66	52,66	52,66		
2	Innveid til analyse (mg)	859,5	859,5	859,5		
3	FAME analysert (mg)	53,3	6,90	19,0	12,9 %	35,7 %
4	mg FAME/g prøve	62,0	8,03	22,1		
5	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	3,26	0,423	1,16		
6	Totalvekt NIF- løsning (g)	71,22	71,22	71,22		
7	Innveid til analyse (g)	0,7062	0,7062	0,7062		
8	FAME analysert (mg)	25,4	3,22	9,62		
9	Total FAME i NIF (mg)	2564	325	970		
10	Total FAME NIF (g)	2,56	0,325	0,970	12,7 %	37,8 %
11	% FAME i NIF	78,5 %	76,8 %	83,3 %		
12	Totalvekt IF-løsning (g)	66,90	66,90	66,90		
13	Innveid til analyse (g)	0,6583	0,6583	0,6583		
14	FAME i IF (mg)	2,86	0,0882	0,183		
15	Total FAME i IF (mg)	291	8,96	18,6	3,08 %	6,41 %
17	% FAME i IF	8,90 %	2,12 %	1,60 %		
18	Massebalanse	87,4 %	78,9 %	84,9 %		

A5. Forsøk 4 & 8: Etanolekstraksjon av rogn- og melkepulver

Tabell A5.1: Resultater for etanolekstraksjon av rognpulver, forsøk 4, 1, parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	%EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	126,9	126,9	126,9		
2	Rogn til analyse (mg)	200,7	200,7	200,7		
3	FAME analysert (mg)	19,3	2,21	5,85	11,5 %	30,3 %
4	mg FAME/g prøve	96,1	11,0	29,1		
5	FAME i rogn (g)	12,2	1,40	3,70		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	641,3	641,3	641,3		
7	Innveid til analyse (mg)	1715	1715	1715		
8	FAME analysert (mg)	35,9	4,32	11,4	12,0 %	31,8 %
9	mg FAME/g prøve	20,9	2,52	6,66		
10	FAME i ekstraktet (g)	13,4	1,62	4,27		
11	Utbytte	110 %	116 %	115 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	200,6	200,6	200,6		
13	FAME analysert (mg)	0,573	0,0956	0,154	16,7 %	26,9 %
14	mg analysert/g innveid	2,86	0,477	0,768		
15	Estimert totalvekt rest (g)	102,5	102,5	102,5		
16	FAME i rest (g)	0,293	0,0489	0,0787		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	13,7	1,66	4,35		
18	Massebalanse	112 %	119 %	118 %		

Tabell A5.2: Resultater for etanolekstraksjon av rognpulver, forsøk 4, 2.parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	126,9	126,9	126,9		
2	Rogn til analyse (mg)	200,8	200,8	200,8		
3	FAME analysert (mg)	20,2	2,39	6,22	11,8 %	30,8 %
4	mg FAME/g prøve	101	11,9	31,0		
5	FAME i rogn (g)	12,8	1,51	3,93		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	641,3	641,3	641,3		
7	Innveid til analyse (mg)	1694	1694	1694		
8	FAME analysert (mg)	34,9	4,22	11,1	12,1 %	31,8 %
9	g FAME/g prøve	20,6	2,49	6,55		
10	FAME i ekstraktet (g)	13,2	1,60	4,20		
11	Utbytte	103 %	106 %	107 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	200,2	200,2	200,2		
13	FAME analysert (mg)	0,705	0,112	0,188	15,9 %	26,7 %
14	mg analysert/g innveid	3,52	0,560	0,941		
15	Estimert totalvekt rest (g)	101,4	101,4	101,4		
16	FAME i rest (g)	0,357	0,0568	0,0954		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	13,6	1,65	4,30		
18	Massebalanse	106 %	109 %	109 %		

Tabell A5.3: Resultater for etanolekstraksjon av melkepulver 8,1.parallel

EKSTRAKSJON		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt melke (g)	118,2	118,2	118,2		
2	Melke til analyse (mg)	200,9	200,9	200,9		
3	FAME analysert (mg)	17,4	2,06	5,81	11,8 %	33,3 %
4	mg FAME/g prøve	86,8	10,3	28,9		
5	FAME i melke (g)	10,3	1,21	3,42		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	718,1	718,1	718,1		
7	Innveid til analyse (mg)	821,9	821,9	821,9		
8	FAME analysert (mg)	9,93	1,32	3,72	13,3 %	37,5 %
9	mg FAME/g prøve	12,1	1,61	4,53		
10	FAME i ekstraktet (g)	8,68	1,15	3,25		
11	Utbytte	84,6 %	95,2 %	95,1 %		
12	Rest av melke til analyse (mg)	208,8	208,8	208,8		
13	FAME analysert (mg)	1,24	0,0900	0,420	7,26 %	33,9 %
14	mg analysert/g innveid	5,94	0,431	2,01		
15	Totalvekt rest (g)	90,2	90,2	90,2		
16	FAME i rest (g)	0,536	0,0389	0,181		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	9,21	1,19	3,43		
18	Massebalanse	89,8 %	98,4 %	100 %		

Tabell A5.4: Resultater for etanolekstraksjon av melkepulver 8, 2.parallell

		A	B	C	D	E
EKSTRAKSJON		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt melke (g)	118,2	118,2	118,2		
2	Melke til analyse (mg)	201,7	201,7	201,7		
3	FAME analysert (mg)	16,5	1,96	5,64	11,9 %	34,3 %
4	mg FAME/g prøve	81,6	9,72	28,0		
5	FAME i melke (g)	9,65	1,15	3,31		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	718,1	718,1	718,1		
7	Innveid til analyse (mg)	824,2	824,2	824,2		
8	FAME analysert (mg)	10,2	1,35	3,78	13,2 %	37,1 %
9	mg FAME/g prøve	12,4	1,64	4,59		
10	FAME i ekstraktet (g)	8,89	1,18	3,29		
11	Utbytte	92,1 %	102 %	99,6 %		
12	Rest av melke til analyse (mg)	201,2	201,2	201,2		
13	FAME analysert (mg)	1,34	0,100	0,450	7,46 %	33,6 %
14	mg analysert/g innveid	6,66	0,497	2,24		
15	Totalvekt rest (g)	90,2	90,2	90,2		
16	FAME i rest (g)	0,601	0,0448	0,202		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	9,49	1,22	3,50		
18	Massebalanse	98,4 %	106 %	106 %		

A6. Forsøk 5-7: Etanolekstraksjon av rogn og melkepulver

Tabell A6.1: Resultater for etanolekstraksjon av rognpulver, forsøk 5, 1.parallell

		A	B	C	D	E
EKSTRAKSJON		Total fettsyrer	EPA	DHA	%EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	110,2	110,2	110,2		
2	Rogn til analyse (mg)	200,7	200,7	200,7		
3	FAME analysert (mg)	19,3	2,21	5,85	11,5 %	30,3 %
4	mg FAME/g prøve	96,1	11,0	29,1		
5	FAME i rogn (g)	10,6	1,21	3,21		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	531,8	531,8	531,8		
7	Innveid til analyse (mg)	814,9	814,9	814,9		
8	FAME analysert (mg)	15,1	1,85	4,79	12,3 %	31,7 %
9	mg FAME/g prøve	18,5	2,27	5,88		
10	FAME i ekstraktet (g)	9,85	1,21	3,13		
11	Utbytte	93,1 %	99,5 %	97,3 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	209,0	209,0	209,0		
13	FAME analysert (mg)	2,13	0,330	0,657	15,5 %	30,8 %
14	mg analysert/g innveid	10,2	1,58	3,14		
15	Estimert totalvekt rest (g)	96,45	96,45	96,45		
16	FAME i rest (g)	0,983	0,152	0,303		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	10,8	1,36	3,43		
18	Massebalanse	102 %	112 %	107 %		

Tabell A6.2: Resultater for etanolekstraksjon av rognpulver, forsøk 5, 2.parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	%EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	110,2	110,2	110,2		
2	Rogn til analyse (mg)	200,8	200,8	200,8		
3	FAME analysert (mg)	20,2	2,39	6,22	11,8 %	30,8 %
4	mg FAME/g prøve	101	11,9	31,0		
5	FAME i rogn (g)	11,1	1,31	3,41		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	531,8	531,8	531,8		
7	Innveid til analyse (mg)	804,0	804,0	804,0		
8	FAME analysert (mg)	15,3	1,88	4,86	12,3 %	31,8 %
9	mg FAME/g prøve	19,0	2,34	6,04		
10	FAME i ekstraktet (g)	10,1	1,24	3,21		
11	Utbytte	91,3 %	94,8 %	94,2 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	209,5	209,5	209,5		
13	FAME analysert (mg)	2,21	0,333	0,639	15,1 %	28,9 %
14	mg analysert/g innveid	10,5	1,59	3,05		
15	Estimert totalvekt rest (g)	96,45	96,45	96,45		
16	FAME i rest (g)	1,02	0,153	0,294		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	11,1	1,40	3,51		
18	Massebalanse	110 %	112 %	109 %		

Tabell A6.3: Resultater for etanolekstraksjon av rognpulver, forsøk 6,1.parallell

		A	B	C	D	E
EKSTRAKSJON		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	108,8	108,8	108,8		
2	Rogn til analyse (mg)	200,7	200,7	200,7		
3	FAME analysert (mg)	19,3	2,21	5,85	11,5 %	30,3 %
4	mg FAME/g prøve	96,1	11,0	29,1		
5	FAME i rogn (g)	10,5	1,20	3,17		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	606,5	606,5	606,5		
7	Innveid til analyse (mg)	793,8	793,8	793,8		
8	FAME analysert (mg)	13,3	1,60	4,25	12,0 %	31,9 %
9	mg FAME/g prøve	16,8	2,02	5,35		
10	FAME i ekstraktet (g)	10,2	1,22	3,25		
11	Utbytte	97,5 %	102 %	102 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	202,4	202,4	202,4		
13	FAME analysert (mg)	1,56	0,271	0,423		
14	mg analysert/g innveid	7,71	1,34	2,09		
15	Totalvekt rest (g)	96,90	96,90	96,90		
16	FAME i rest (g)	0,747	0,130	0,203		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	10,9	1,35	3,45		
18	Massebalanse	105 %	113 %	109 %		

Tabell A6.6: Resultater for ekstraksjon med etanol for rognforsøk 6,2.parallell

		A	B	C	D	E
EKSTRAKSJON		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt rogn (g)	108,8	108,8	108,8		
2	Rogn til analyse (mg)	200,8	200,8	200,8		
3	FAME analysert (mg)	20,2	2,39	6,22	11,8 %	30,8 %
4	mg FAME/g prøve	101	11,9	31,0		
5	FAME i rogn (g)	10,9	1,29	3,37		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	606,5	606,5	606,5		
7	Innveid til analyse (mg)	828,1	828,1	828,1		
8	FAME analysert (mg)	13,6	1,63	4,35	12,0 %	32,1 %
9	mg FAME/g prøve	16,4	1,97	5,25		
10	FAME i ekstraktet (g)	9,93	1,19	3,19		
11	Utbytte	90,7 %	92,2 %	94,5 %		
12	Rest av rogn til analyse (mg)	202,2	202,2	202,2		
13	FAME analysert (mg)	1,42	0,251	0,390		
14	mg analysert/g innveid	7,02	1,24	1,93		
15	Totalvekt rest (g)	96,90	96,90	96,90		
16	FAME i rest (g)	0,681	0,120	0,187		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	10,6	1,31	3,37		
18	Massebalanse	97,0 %	101 %	100 %		

Tabell A6.7: Resultater etanolekstraksjon av melkepulver, forsøk 7, 1.parallell

		A	B	C	D	E
		Total fettsyrer	EPA	DHA	%EPA	%DHA
1	Totalvekt melke (g)	107,3	107,3	107,3		
2	Melke til analyse (mg)	202,2	202,2	202,2		
3	FAME analysert (mg)	17,0	1,99	5,69	11,7 %	33,5 %
4	mg FAME/g prøve	84,1	9,82	28,1		
5	FAME i melke (g)	9,02	1,05	3,02		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	735,5	735,5	735,5		
7	Innveid til analyse (mg)	845,2	845,2	845,2		
8	FAME analysert (mg)	7,96	0,889	2,57	11,2 %	32,3 %
9	mg FAME/g prøve	9,42	1,05	3,04		
10	FAME i ekstraktet (g)	6,93	0,773	2,24		
11	Utbytte	76,8 %	73,4 %	74,1 %		
12	Rest av melke til analyse (mg)	201,2	201,2	201,2		
13	FAME analysert (mg)	0,870	0,0766	0,340	8,8 %	39,1 %
14	mg analysert/g innveid	4,32	0,381	1,69		
15	Totalvekt rest (g)	75,50	75,50	75,50		
16	FAME i rest (g)	0,326	0,0287	0,128		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	7,25	0,802	2,36		
18	Massebalanse	80,4 %	76,1 %	78,3 %		

Tabell A6.8: Resultater for ekstraksjon med etanol for melkeforsøk 7.2. parallell

		A	B	C	D	E
EKSTRAKSJON		Total fettsyrer	EPA	DHA	% EPA	%DHA
1	Totalvekt melke (g)	107,3	107,3	107,3		
2	Melke til analyse (mg)	204,1	204,1	204,1		
3	FAME analysert (mg)	17,0	1,98	5,71	11,7 %	33,6 %
4	mg FAME/g prøve	83,1	9,69	28,0		
5	FAME i melke (g)	8,92	1,04	3,00		
6	Totalvekt ekstrakt (g)	735,5	735,5	735,5		
7	Innveid til analyse (mg)	835,8	835,8	835,8		
8	FAME analysert (mg)	7,96	0,906	2,62	11,4 %	32,9 %
9	mg FAME/g prøve	9,52	1,08	3,13		
10	FAME i ekstraktet (g)	7,00	0,797	2,31		
11	Utbytte	78,5 %	76,6 %	76,8 %		
12	Rest av melke til analyse (mg)	217,2	217,2	217,2		
13	FAME analysert (mg)	0,970	0,0853	0,370	8,79 %	38,1 %
14	mg analysert/g innveid	4,47	0,393	1,70		
15	Totalvekt rest (g)	75,50	75,50	75,50		
16	FAME i rest (g)	0,337	0,0296	0,129		
17	Sum FAME i rest og ekstrakt (g)	7,34	0,827	2,43		
18	Massebalanse	82,3 %	79,5 %	81,1 %		

A7. Titrering av hydrolysat

Tabell A7.1: Tranhydrolysat med heptan (a) og uten heptan (b)

(a) Tilsatt 2N HCl (ml)	pH	(b) Tilsatt 2N HCl (ml)	pH
0	11,44	0	11,23
1	10,33	1	9,84
2	9,55	2	9,07
3	8,50	3	8,14
4	8,28	4	7,66
5	7,88	5	7,36
6	7,60	6	7,22
7	7,48	7	7,18
8	7,35	8	6,90
9	7,08	9	6,73
10	6,90	10	6,58
11	6,72	11	6,37
12	6,50	12	6,18
13	6,20	13	5,92
14	5,81	14	5,68
15	5,17	15	5,30
16	4,09	16	4,70
17	3,00	17	3,79
18	2,29	18	2,82
19	1,86	19	2,21
20	1,57	20	1,88
21	1,43	21	1,67
22	1,26	22	1,50
23	1,19	23	1,37
24	1,11	24	1,25
		25	1,17
		26	1,06

Tabell A7.2: Rognhydrolysat med heptan (a) og uten heptan (b)

(a)Tilsatt 2N HCl (ml)	pH	(b)Tilsatt 2 N HCl (mL)	pH
0	13,05	0	13,22
1	12,91	1	13,12
2	12,68	2	12,96
3	12,15	3	12,63
4	8,59	4	11,25
5	8,08	5	8,14
5,5	7,97	6	7,81
6	7,86	7	7,62
6,5	7,84	8	7,47
7	7,79	9	7,2
8	7,63	10	6,77
9	7,49	11	6,67
10	7,35	12	6,58
11	7,14	13	6,38
12	6,02	14	6,2
14	1,95	15	5,99
15	1,54	16	5,72
16	1,36	17	5,28
17	1,25	18	2,44
18	1,14	19	1,69
19	1,08	20	1,47
20	1,01	21	1,31
		22	1,23
		23	1,13
		24	1,07

Tabell A7.3: Melkehydrolysat med heptan

Tilsatt 2N HCl(ml)	pH	Tilsatt 2N HCl(ml)	pH
0	12,98	26	6,2
2	12,73	28	5,76
4	12,41	30	5,34
6	11,21	32	4,94
8	9,97	34	4,62
10	9,35	36	4,29
12	8,85	38	3,82
14	8,41	39	3,26
16	8,06	40	2,65
18	7,61	41	2,22
20	7	42	1,91
22	6,75	43	1,88
24	6,52	44	1,79

Tabell A7.4: pH og beregnet fraksjon av fettsyrene (Rådata før normalisering til prosent av maks)

Prøve	Volum 2N HCl	pH	HPLC	HPLC	GC	GC	GC
			Kolesterol	FFA	Tot FA	EPA	DHA
			mg i heptan	mg i heptan	mg i heptan	mg i heptan	mg i heptan
T067/S067	0	11,23	0,08	0,00	0,27	0,04	0,04
	1	9,84					
T068/S068	2	9,07	0,10	0,00	0,29	0,04	0,05
	3	8,14					
T069/S069	4	7,66	0,09	0,00	0,33	0,05	0,07
	5	7,36					
T070/S070	6	7,22	0,10	0,02	0,57	0,07	0,13
	7	7,18					
T071/S071	8	6,90	0,50	1,93	3,74	0,47	1,21
	9	6,73					
T072/S072	10	6,58	0,68	2,69	4,14	0,52	1,35
	11	6,37					
T073/S073	12	6,18	0,64	2,92	4,26	0,53	1,39
	13	5,92					
T074/S074	14	5,68	0,68	3,18	4,41	0,55	1,45
	15	5,30					
T075/S075	16	4,70	0,64	3,22	4,20	0,53	1,39
	17	3,79					
T076/S076	18	2,82	0,71	3,48	4,50	0,56	1,48
	19	2,21					
T077/S077	20	1,88	0,64	3,23	4,60	0,57	1,49
	21	1,67					
T078/S078	22	1,50	0,67	3,38	4,73	0,58	1,51
	23	1,37					
T079/S079	24	1,25	0,66	3,33	4,53	0,56	1,46
	25	1,17					
	26	1,06					

A8. Optimalisering av ureafellingen

Tabell A8.1: Ureforsøk E1

	A	B	C	D	E	F	G
	Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	25,0	25,0	25,0	25,0		
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0		
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3		
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505		
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3		
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	5,75	0,724	1,97	1,01		
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	90,4	90,4	90,4	90,4		
9	Innveid til analyse (g)	0,210	0,210	0,210	0,210		
10	FAME analysert (mg)	7,97	1,23	3,53	0,751		
11	Total FAME i NIF (mg)	3431	530	1518	323		
12	Total FAME i NIF (g)	3,43	0,530	1,52	0,323	15,4 %	44,3 %
13	% FAME I NIF	59,7 %	73,2 %	77,2 %	32,1 %		
14	Totalvekt IF-løsning (g)	77,7	77,7	77,7	77,7		
15	Innveid til analyse (g)	0,204	0,204	0,204	0,204		
16	FAME analysert (mg)	5,02	0,399	0,903	1,64		
17	Total FAME i IF (mg)	1916	152	345	625		
18	Total FAME i IF (g)	1,92	0,152	0,345	0,625	7,95 %	18,0 %
19	% FAME I IF	33,3 %	21,1 %	17,5 %	62,1 %		
20	Massebalanse	93,0 %	94,3 %	94,8 %	94,2 %		

Tabell A8.2: Ureaforsøk E2

	A	B	C	D	E	F	G
	Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	18,8	18,8	18,8	18,8		
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0		
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3		
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 % 17,5 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505		
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3		
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	4,31	0,543	1,47	0,755		
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	91,3	91,3	91,3	91,3		
9	Innveid til analyse (g)	0,286	0,286	0,286	0,286		
10	FAME analysert (mg)	10,4	1,43	3,91	1,36		
11	Total FAME i NIF (mg)	3332	457	1249	434		
12	Total FAME i NIF (g)	3,33	0,457	1,25	0,434	13,7 %	37,5 % 13,0 %
13	% FAME I NIF	77,2 %	84,1 %	84,7 %	57,5 %		
14	Totalvekt IF-løsning (g)	83,3	83,3	83,3	83,3		
15	Innveid til analyse (g)	0,277	0,277	0,277	0,277		
16	FAME analysert (mg)	1,17	0,0496	0,114	0,679		
17	Total FAME i IF (mg)	351	14,9	34,2	204		
18	Total FAME i IF (g)	0,351	0,0149	0,0342	0,204	4,26 %	9,74 % 58,2 %
19	% FAME I IF	8,13 %	2,75 %	2,32 %	27,0 %		
20	Massebalanse	85,4 %	86,9 %	87,0 %	84,6 %		

Tabell A8.3: Ureaforsøk E3

		A	B	C	D	E	F	G
		Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	12,5	12,5	12,5	12,5			
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0			
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3			
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %	17,5 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505			
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3			
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	2,88	0,362	0,983	0,503			
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	93,2	93,2	93,2	93,2			
9	Innveid til analyse (g)	0,409	0,409	0,409	0,409			
10	FAME analysert (mg)	11,1	1,47	4,05	1,78			
11	Total FAME i NIF (mg)	2532	335	921	405			
12	Total FAME i NIF (g)	2,53	0,335	0,921	0,405	13,2 %	36,4 %	16,0 %
13	% FAME I NIF	88,0 %	92,5 %	93,7 %	80,6 %			
14	Totalvekt IF-løsning (g)	86,6	86,6	86,6	86,6			
15	Innveid til analyse (g)	0,413	0,413	0,413	0,413			
16	FAME analysert (mg)	0,932	0,0528	0,104	0,404			
17	Total FAME i IF (mg)	196	11,1	21,9	84,8			
18	Total FAME i IF (g)	0,196	0,0111	0,0219	0,0848	5,67 %	11,2 %	43,3 %
19	% FAME I IF	6,80 %	2,11 %	2,29 %	13,6 %			
20	Massebalanse	94,8 %	94,7 %	96,0 %	94,1 %			

Tabell A8.4: Ureaforsøk E4

		A	B	C	D	E	F	G
		Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	25,0	25,0	25,0	25,0			
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0			
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3			
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %	17,5 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505			
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3			
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	5,75	0,724	1,97	1,01			
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	89,1	89,1	89,1	89,1			
9	Innveid til analyse (g)	0,211	0,211	0,211	0,211			
10	FAME analysert (mg)	6,18	1,25	3,43	0,0437			
11	Total FAME i NIF (mg)	2603	525	1446	18,4			
12	Total FAME i NIF (g)	2,60	0,525	1,45	0,0184	20,2 %	55,5 %	0,71 %
13	% FAME I NIF	45,3 %	72,5 %	73,6 %	1,83 %			
14	Totalvekt IF-løsning (g)	89,5	89,5	89,5	89,5			
15	Innveid til analyse (g)	0,214	0,214	0,214	0,214			
16	FAME analysert (mg)	7,26	0,483	1,21	2,34			
17	Total FAME i IF (mg)	3038	202	507	980			
18	Total FAME i IF (g)	3,04	0,202	0,507	0,980	6,66 %	16,7 %	32,3 %
19	% FAME I IF	52,8 %	27,9 %	25,8 %	97,4 %			
20	Massebalanse	98,1 %	100 %	99,3 %	99,2 %			

Tabell A8.5: Ureaforsøk E5

	Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1 FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	18,8	18,8	18,8	18,8			
2 FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0			
3 FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3			
4 FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %	17,5 %
5 mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505			
6 FFA (mg/ml)	230,1	28,9	78,6	40,3			
7 Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	4,31	0,543	1,47	0,755			
8 Totalvekt NIF- løsning (g)	91,2	91,2	91,2	91,2			
9 Innveid til analyse (g)	0,284	0,284	0,284	0,284			
10 FAME analysert (mg)	6,89	1,19	3,47	0,523			
11 Total FAME i NIF (mg)	2216	381	1116	168			
12 Total FAME i NIF (g)	2,22	0,381	1,12	0,168	17,2 %	50,4 %	7,59 %
13 % FAME i NIF	51,4 %	70,2 %	75,7 %	22,3 %			
14 Totalvekt IF-løsning (g)	82,9	82,9	82,9	82,9			
15 Innveid til analyse (g)	0,278	0,278	0,278	0,278			
16 FAME analysert (mg)	5,42	0,388	0,808	1,69			
17 Total FAME i IF (mg)	1613	116	241	502			
18 Total FAME i IF (g)	1,61	0,116	0,241	0,502	7,17 %	14,9 %	31,1 %
19 % FAME i IF	37,4 %	21,3 %	16,3 %	66,5 %			
20 Massebalanse	88,8 %	91,5 %	92,0 %	88,8 %			

Tabell A8.6: Ureaforsøk E6

		A	B	C	D	E	F	G
		Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	12,5	12,5	12,5	12,5			
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0			
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3			
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %	17,5 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505			
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3			
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	2,88	0,362	0,983	0,503			
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	90,7	90,7	90,7	90,7			
9	Innveid til analyse (g)	0,419	0,419	0,419	0,419			
10	FAME analysert (mg)	9,09	1,33	3,83	1,09			
11	Total FAME i NIF (mg)	1968	288	828	235			
12	Total FAME i NIF (g)	1,97	0,288	0,828	0,235	14,6 %	42,1 %	12,0 %
13	% FAME I NIF	68,4 %	79,6 %	84,3 %	46,7 %			
14	Totalvekt IF-løsning (g)	85,2	85,2	85,2	85,2			
15	Innveid til analyse (g)	0,419	0,419	0,419	0,419			
16	FAME analysert (mg)	3,85	0,309	0,586	1,30			
17	Total FAME i IF (mg)	784	62,9	119	265			
18	Total FAME i IF (g)	0,784	0,0629	0,119	0,265	8,02 %	15,2 %	33,8 %
19	% FAME I IF	27,3 %	17,4 %	12,1 %	52,7 %			
20	Massebalanse	95,7 %	97,0 %	96,4 %	99,4 %			

Tabell A8.7: Ureaforsøk E7

		A	B	C	D	E	F	G
		Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	25,0	25,0	25,0	25,0			
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0			
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3			
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %	17,5 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505			
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3			
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	5,75	0,724	1,97	1,01			
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	95,2	95,2	95,2	95,2			
9	Innveid til analyse (g)	0,210	0,210	0,210	0,210			
10	FAME analysert (mg)	8,54	1,32	3,61	0,648			
11	Total FAME i NIF (mg)	3869	596	1636	294			
12	Total FAME i NIF (g)	3,87	0,596	1,64	0,294	15,4 %	42,3 %	7,59 %
13	% FAME I NIF	67,3 %	82,3 %	83,2 %	29,2 %			
14	Totalvekt IF-løsning (g)	82,5	82,5	82,5	82,5			
15	Innveid til analyse (g)	0,216	0,216	0,216	0,216			
16	FAME analysert (mg)	2,54	0,0795	0,182	1,43			
17	Total FAME i IF (mg)	969	30,3	69,7	546			
18	Total FAME i IF (g)	0,969	0,0303	0,0697	0,546	3,13 %	7,18 %	56,4 %
19	% FAME I IF	16,8 %	4,19 %	3,54 %	54,2 %			
20	Massebalanse	84,1 %	86,5 %	86,7 %	83,4 %			

Tabell A8.8: Ureaforsøk E8

		A	B	C	D	E	F	G
		Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	18,8	18,8	18,8	18,8			
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0			
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3			
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %	17,5 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505			
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3			
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	4,31	0,543	1,47	0,755			
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	90,3	90,3	90,3	90,3			
9	Innveid til analyse (g)	0,287	0,287	0,287	0,287			
10	FAME analysert (mg)	9,54	1,55	4,26	0,591			
11	Total FAME i NIF (mg)	3002	486,5	1340	186,0			
12	Total FAME i NIF (g)	3,00	0,486	1,34	0,186	16,2 %	44,6 %	6,19 %
13	% FAME I NIF	69,6 %	89,6 %	90,9 %	24,6 %			
14	Totalvekt IF-løsning (g)	84,0	84,0	84,0	84,0			
15	Innveid til analyse (g)	0,273	0,273	0,273	0,273			
16	FAME analysert (mg)	3,11	0,0632	0,110	1,69			
17	Total FAME i IF (mg)	954	19,4	33,9	518			
18	Total FAME i IF (g)	0,954	0,0194	0,0339	0,518	2,03 %	3,55 %	54,3 %
19	% FAME I IF	22,1 %	3,57 %	2,30 %	68,6 %			
20	Massebalanse	91,7 %	93,2 %	93,2 %	93,2 %			

Tabell A8.9: Ureaforsøk E9

		A	B	C	D	E	F	G
		Total fettsyrer	EPA	DHA	16:0	%EPA	%DHA	%16:0
1	FFA/EtOH-løsning i forsøk (ml)	12,5	12,5	12,5	12,5			
2	FFA tetthet (mg/ml)	798,0	798,0	798,0	798,0			
3	FFA til analyse (mg)	85,3	85,3	85,3	85,3			
4	FAME analysert (mg)	24,6	3,09	8,41	4,30	12,6 %	34,2 %	17,5 %
5	mg FAME/mg FFA	0,288	0,0363	0,0985	0,0505			
6	FFA (mg/ml)	230	28,9	78,6	40,3			
7	Fettsyrer (FAME) tilsatt i forsøk (g)	2,88	0,362	0,983	0,503			
8	Totalvekt NIF- løsning (g)	88,2	88,2	88,2	88,2			
9	Innveid til analyse (g)	0,422	0,422	0,422	0,422			
10	FAME analysert (mg)	11,1	1,53	4,17	1,56			
11	Total FAME i NIF (mg)	2308	318	871	325			
12	Total FAME i NIF (g)	2,31	0,318	0,871	0,325	13,8 %	37,7 %	14,1 %
13	% FAME I NIF	80,2 %	88,0 %	88,6 %	64,6 %			
14	Totalvekt IF-løsning (g)	108,9	108,9	108,9	108,9			
15	Innveid til analyse (g)	0,419	0,419	0,419	0,419			
16	FAME analysert (mg)	1,07	0,0530	0,110	0,466			
17	Total FAME i IF (mg)	278	13,8	28,6	121			
18	Total FAME i IF (g)	0,278	0,0138	0,0286	0,121	4,95 %	10,3 %	43,6 %
19	% FAME I IF	9,68 %	3,81 %	2,90 %	24,1 %			
20	Massebalanse	89,9 %	91,8 %	91,5 %	88,7 %			