

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## FORORD

Denne masteoppgaven ble utført hos forskningsgruppa for Massespektrometri ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB). Oppgaven er den avsluttende delen av mastergradsprogrammet i teknologi - studieretning naturstoffkjemi på 300 studiepoeng, og er utført i perioden januar til mai 2011. Oppgaven er en organisk analytisk kjemi-oppgave og alt praktisk arbeid er utført ved IKBM.

En stor takk går til hovedveileder, førsteamanuensis Dag Ekeberg, for hjelp med utforming av oppgaven og for at han alltid har tatt seg tid til å besvare våre spørsmål. Han har vært uvurderlig med sine konstruktive tilbakemeldinger og sitt store engasjement i oppgaven. Medveileder Hanne Devle fortjener også en stor takk for all veiledning på laboratoriet og moralsk støtte. Og sist, men ikke minst, vil vi takke Carl Fredrik Næss-Andresen for sine intrikate spørsmål knyttet til oppgaven og for at han har tatt seg tid til å korrekturlese den.

Ås, mai 2011

---

Emilie Koht

---

Silje Nome

## SAMMENDRAG

En metode for syrekatalysert mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ble utviklet, hvor  $\text{BF}_3$  ble benyttet som katalysator. GC-MS ble brukt for kvalitativ og kvantitativ analyse av fettsyremetylestere (FAMES) oppnådd etter transesterifisering. Prosentvis utbytte av FAMES ble beregnet fra deres respektive arealer mot arealet til en internstandard.

Det ble observert at optimal effekt og reaksjonstid var 70 W i 7 minutter med  $\text{RSD} < 10\%$  for hver enkelt FAME. Dette tyder på god reproduserbarhet og presisjon. Utbytte varierte avhengig av FAME, slik at det gjennomsnittlige utbytte (%) av de benyttede FAMES (C16:1, C18:1, C18:2, C20:1, C20:4, C20:5, C22:1 og C22:6) var lik  $80\% \pm 12$  med  $\text{RSD}$  lik 16%.

Det ble undersøkt om syrekatalysatoren HCl og basekatalysatoren  $\text{CH}_3\text{ONa}$  var bedre egnet ved mikrobølgeassistert transesterifisering, sammenliknet med  $\text{BF}_3$ , med hensyn på reaksjonstid og utbytte av FAMES. HCl ga lavere gjennomsnittlig utbytte ved samtlige tidspunkt og hadde nesten dobbelt så høy verdi av  $\text{RSD}$  (30%). Dette vil si at  $\text{BF}_3$  ga bedre presisjon i resultatene og ble foretrukket fremfor HCl.  $\text{CH}_3\text{ONa}$  hadde en optimal reaksjonstid ved 20 sekunder hvor det gjennomsnittlige utbyttet av FAMES var  $80\% \pm 17$ . Siden  $\text{CH}_3\text{ONa}$  oppnår tilsvarende utbytte raskere enn  $\text{BF}_3$ , er den bedre egnet som katalysator ved mikrobølgeassistert transesterifisering.

Det ble i tillegg undersøkt om mikrobølgeassistert transesterifisering med  $\text{BF}_3$  ga høyere utbytte av FAMES og kortere reaksjonstid sammenliknet med en tradisjonell metode. Den tradisjonelle metoden innebar at triglyseridene ble transesterifisert ved romtemperatur ved å benytte basekatalysatoren  $\text{CH}_3\text{ONa}$ . Det gjennomsnittlige utbyttet av FAMES var  $80\% \pm 17$ . Sammenliknet med mikrobølgeassistert transesterifisering, var utbyttet likt, men standardavviket og  $\text{RSD}$  for mikrobølgemetoden var noe lavere. Siden mikrobølgemetoden totalt sett tok kortere tid er denne mer fordelaktig.

En forbedring av en metode for syrekatalysert mikrobølgeassistert metylering av par- og oddetalls frie fettsyrer fra C4:0 til C18:0 ble utført. Denne forbedringen innebar å benytte isbad etter metylering for å minimalisere tap av FAMES med kjedelengde  $< \text{C}10:0$ . I tillegg ble denne metoden sammenliknet med tradisjonell oppvarmingsmetode på vannbad. Til tross

## Sammendrag

for at isbad ble benyttet ved begge metodene ble det observert vedvarende tap av FAMES med kjedelengde C4:0-C9:0, noe som indikerer at det benyttede systemet ikke var tilstrekkelig tett.

Et studium av hydroksyfettsyremetylestere (OH-FAMES) stabilitet på GC-MS ble også utført. Dette for å undersøke om disse kan detekteres og kvantifiseres ved bruk av GC-MS. Alle analyserte OH-FAMES ble detektert, med unntak av 12-OH-FAMES. Kvantifisering kunne ikke utføres på grunn av brede og usymmetriske topper med lav intensitet.

## ABSTRACT

A method for acid catalysed microwave transesterification of triglycerides was developed with  $\text{BF}_3$  as catalyst. GC-MS was used for quantitative and qualitative analysis of fatty acid methyl esters (FAMES) obtained after transesterification. The yield in per cent of FAMES was calculated from their corresponding chromatogram areas against the area of an internal standard.

It was noticed that the optimal power and reaction time was 70 W and 7 minutes with RSD < 10% for each FAME. This indicates good reproducibility and precision. The yield varied according to FAME, so that the average yield (%) of the employed FAMES (C16:1, C18:1, C18:2, C20:1, C20:4, C20:5, C22:1 and C22:6) was  $80\% \pm 12$  with RSD equal 16%.

It was investigated if the acid catalyst HCl and the base catalyst  $\text{CH}_3\text{ONa}$  could be more suitable at microwave assisted transesterification than  $\text{BF}_3$  in respect of reaction time and yield of FAMES. HCl obtained a lower average yield at all the points of time and with almost twice as high a value of RSD (30%). This means that  $\text{BF}_3$  obtained better precision of the results and was therefore preferred rather than HCl.  $\text{CH}_3\text{ONa}$  obtained an optimal reaction time in 20 seconds with an average yield of FAMES equalling  $80\% \pm 17$ . Since  $\text{CH}_3\text{ONa}$  obtains a similar yield more rapidly than  $\text{BF}_3$  it is therefore more suitable as a catalyst in microwave assisted transesterification.

In addition, it was investigated if microwave assisted transesterification with  $\text{BF}_3$  could result in higher yield of FAMES and shorter reaction time compared to a traditional method. The traditional method involved the transesterification of triglycerides at room temperature with a base catalyst,  $\text{CH}_3\text{ONa}$ . The average yield of FAMES obtained was  $80\% \pm 17$ . Compared with microwave assisted transesterification the yield was similar but the standard deviation and RSD for the microwave method was somewhat lower. Since the microwave method is overall shorter in duration, it is more beneficial.

An improvement of a method for acid catalysed microwave assisted methylation of even and odd numbered free fatty acids from C4:0 to C18:0 was performed. This improvement involved the use of ice baths after the methylation reaction to minimize loss of FAMES with chain length < C10:0. In addition, this method was compared with conventional heating

## Abstract

methods by water baths. Even though ice baths was employed in both methods, continued loss of FAMES with chain length C4:0-C9:0 was observed, indicating that the employed system was insufficiently closed.

A study of hydroxy fatty acid methyl esters' (OH-FAMES) stability on GC-MS was performed to investigate if these compounds can be detected and quantified with GC-MS. All OH-FAMES analyzed was also detected, with the exception of 12-OH-FAMES. Quantification could not be performed because of wide and unsymmetrical peaks with low intensities.

## INNHold

FORORD.....	i
SAMMENDRAG.....	ii
ABSTRACT.....	iv
1. INNLEDNING.....	1
1.1 HENSIKT.....	1
1.1.1 Mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider.....	1
1.1.2 Mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer.....	1
1.1.3 Stabilitetsstudier av hydroksyfettsyremetylestere.....	2
1.2 TEORI.....	2
1.2.1 Lipider.....	2
1.2.2 Fettsyrer.....	2
1.2.3 Triacylglyserol.....	6
1.2.4 Hydroksyfettsyrer.....	7
1.2.5 Nomenklatur.....	8
1.2.6 Fettsyreanalyse.....	9
1.2.7 Mikrobølger.....	13
1.2.8 Gasskromatografi.....	18
1.2.9 Massespektrometri.....	22
1.2.3 GC-MS.....	25
1.3 FORVENTEDE RESULTATER.....	26
1.3.1 Mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider.....	26
1.3.2 Mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer.....	26
1.3.3 Stabilitetsstudie av OH-FAMES på GC-MS.....	26
2. MATERIALER OG METODER.....	28
2.1 MIKROBØLGEASSISTERT DERIVATISERING, METODEUTVIKLING.....	28
2.1.1 Transesterifisering av triglyserider.....	28



## Innhold

2.1.2 Metylering av frie fettsyrer .....	34
2.2 STABILITETSSTUDIE AV OH-FAMES PÅ GC-MS.....	36
2.3 INSTRUMENTERING VED GASSKROMATOGRAFI-MASSESPEKTROMETRI (GC-MS) ANALYSE .....	37
2.3.1 Gasskromatograf (GC).....	37
2.3.2 Massespekrometer.....	39
3. RESULTATER OG DISKUSJON.....	40
3.1 MIKROBØLGEASSISTERT TRANSESTERIFISERING AV TRIGLYSERIDER .....	40
3.2 MIKROBØLGEASSISTERT METYLERING AV FRIE FETTSYRER .....	54
3.3 STABILITETSSTUDIER AV OH-FAMES PÅ GC-MS.....	61
4. KONKLUSJON .....	67
5. VIDERE ARBEID .....	69
REFERANSER .....	70
VEDLEGG .....	75

# 1. INNLEDNING

## 1.1 HENSIKT

Dette arbeidet er tredelt hvor hensikten har vært å utvikle en metode for mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider (**1.1.1**), forbedre en metode for mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer (**1.1.2**) samt å undersøke stabiliteten til hydroksyfettsyremetylestere på GC-MS (**1.1.3**).

### 1.1.1 Mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider

Triglyserider kan transesterifiseres til fettsyremetylestere (FAMEs) i kokende vannbad (Morrison & Smith, 1964) eller ved oppvarming under reflux med egnet syrekatalysator (Eder, 1995), eventuelt ved bruk av natriummetanolat ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ ) ved romtemperatur (Marinetti, 1966). Hensikten med dette arbeidet har vært å undersøke om mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider, med bortrifluorid ( $\text{BF}_3$ ) som katalysator, kan resultere i kortere reaksjonstid, samt høyere utbytte av FAMEs sammenliknet med de foregående metodene. Ulik mikrobølgeeffekt har blitt benyttet for å undersøke om dette har noen betydning for utbyttet av FAMEs og eventuelt hvilken effekt som er fordelaktig for en rask og effektiv transesterifisering.

På grunnlag av tidligere arbeid (Morrison & Smith, 1964) ble  $\text{BF}_3$  benyttet som katalysator ved transesterifisering. Valg av egnet katalysator er avgjørende, og det er viktig at det oppnås nøyaktige og kvantitative resultater, og at man unngår dekomponering og uønskede biprodukter (Christie, 1993). Det var derfor ønskelig å sammenlikne reaksjonstid og utbytte av FAMEs ved bruk av katalysatorene  $\text{HCl}$  og  $\text{CH}_3\text{ONa}$  med  $\text{BF}_3$ .

Det har også blitt undersøkt om fettsyreposisjon i et triglyserid har betydning for utbyttet ved mikrobølgeassistert transesterifisering.

### 1.1.2 Mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer

Rafdal (2011) har hatt utfordringer med metylering av kortkjedete frie fettsyrer da disse fordampes og utbyttet blir utilfredsstillende lavt. Dette skyldes at flyktigheten øker med avtagende kjedelengde for FAMEs. Relativt høy temperatur i reaksjonsblandingen ( $\geq 45^\circ\text{C}$ ) etter metylering øker også muligheten for økt tap via fordampning. Hensikten med dette

## Innledning

arbeidet har derfor vært å undersøke om tap av kortkjedete FAMES kan minimaliseres ved å benytte isbad etter metylering i mikrobølgeovn.

For å undersøke om tap av kortkjedete FAMES kun forekommer som en følge av oppvarming med mikrobølger, ble det i tillegg utført metylering på vannbad. Hensikten med dette har vært å studere om tilsvarende tap forekom.

### **1.1.3 Stabilitetsstudier av hydroksyfettsyremetylestere**

Dersom frie fettsyrer skal analyseres på en gasskromatograf (GC), blir disse ofte derivatisert til mer flyktige FAMES (Eder, 1995; Zu *et al.*, 2009; Pomeranz & Meloan, 1994; Nielsen, 2010). Derimot er det lite arbeid som er utført med tanke på om dette også gjelder for hydroksylgruppen i hydroksyfettsyremetylestere (OH-FAMES). Hensikten med dette arbeidet har vært å se på stabiliteten av OH-FAMES på GC-MS.

## **1.2 TEORI**

### **1.2.1 Lipider**

Lipider er en viktig bestanddel i mange typer biologisk materiale (Eijsink *et al.*, 2007) og spiller en betydelig rolle i forhold til helse, kost og ernæring (Damodaran *et al.*, 2008). En rekke forbindelser kan klassifiseres som lipider, dette gjelder blant annet fettsyrer, triacylglyserol, fosfolipider, sphingolipider, steroler, voks, karotenoider, fettløselige vitaminer, samt fettsyrederivater (Damodaran *et al.*, 2008). Disse forbindelsene er lite eller ikke løselig i vann, men løselig i organiske løsningsmiddel (Hart *et al.*, 2007).

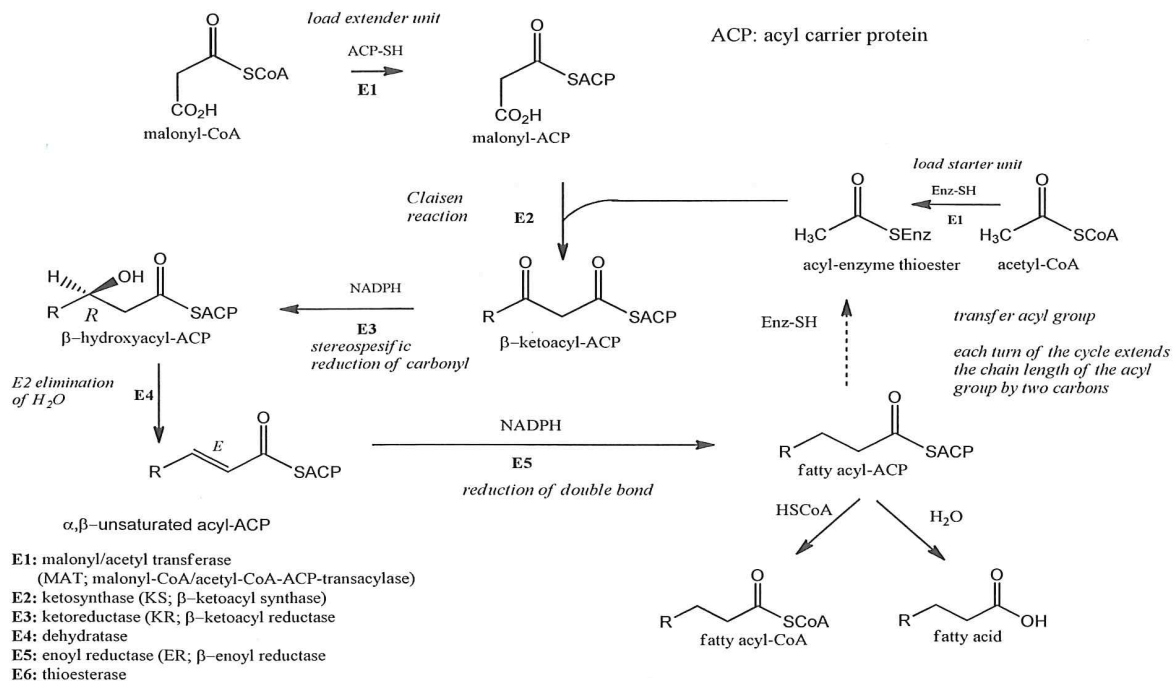
Klassifisering av lipider er utfordrende ettersom disse kan ha svært ulik kjemisk struktur og fysikalske kjemiske egenskaper. Vanligvis kategoriseres de på bakgrunn av deres fysikalske egenskaper ved romtemperatur (fast/flytende), polaritet (polar/upolar), essensiell/ikke essensiell (livsnødvendighet) eller struktur (enkel/kompleks). Klassifisering basert på struktur er ofte å foretrekke (Akoh & Min, 2002).

### **1.2.2 Fettsyrer**

De enkleste lipidene klassifiseres som fettsyrer (Mathews *et al.*, 2000). Disse består av en hydrofob alkylkjede, med en terminal, hydrofil syregruppe.

## Innledning

Hovedsakelig består de naturlig forekommende fettsyrene av rette karbonkjeder uten forgreininger, med mellom 14 til 24 karbon og med et partall antall karbonatomer (Damodaran *et al.*, 2008). Sistnevnte som følge av biosyntesen av fettsyrer i cytosol, hvor det forekommer forlenging av karbonkjeden med to karbon per syklus. Acetyl-CoA er vanligvis startenheten og resulterer derfor i en partalls karbonkjede av fettsyrer (Mathews *et al.*, 2000).



**Figur 1.1:** Biosyntese av fettsyrer, hvor acetyl-CoA er startenhet, som resulterer i forlenging av hydrokarbonkjeden med to karbon per syklus (Dewick, 2009).

Fettsyrer med odde antall karbon i den alifatiske kjeden, har gjerne et annet utgangsstoff enn acetyl-CoA, for eksempel propionsyre. Oddetalls karbonkjeder kan også oppstå ved tap av et karbon fra en partalls karbonkjede (Dewick, 2009).

Fettsyrenes fysiske egenskaper avhenger av kjedelengde, grad av umettethet og eventuelle sidegrupper.

### Mettede fettsyrer

Fettsyrer med maksimalt antall hydrogenatomer på karbonkjeden klassifiseres som mettede. Disse har gjerne en rett og utstrakt struktur, hvor det forekommer hydrofobe samt Van der Waals interaksjoner mellom hydrokarbonkjedene. Dette åpner for pakking i krystallinsk

struktur. Fettsyrene i mettet fett kan dermed pakkes svært tett, og mer energi må tilføres for å bryte bindingene mellom hydrokarbonkjedene. Dette resulterer i økt smeltepunkt for lipider med høyt innhold av mettede fettsyrer (Damodaran *et al.*, 2008).

### ***Umettede fettsyrer***

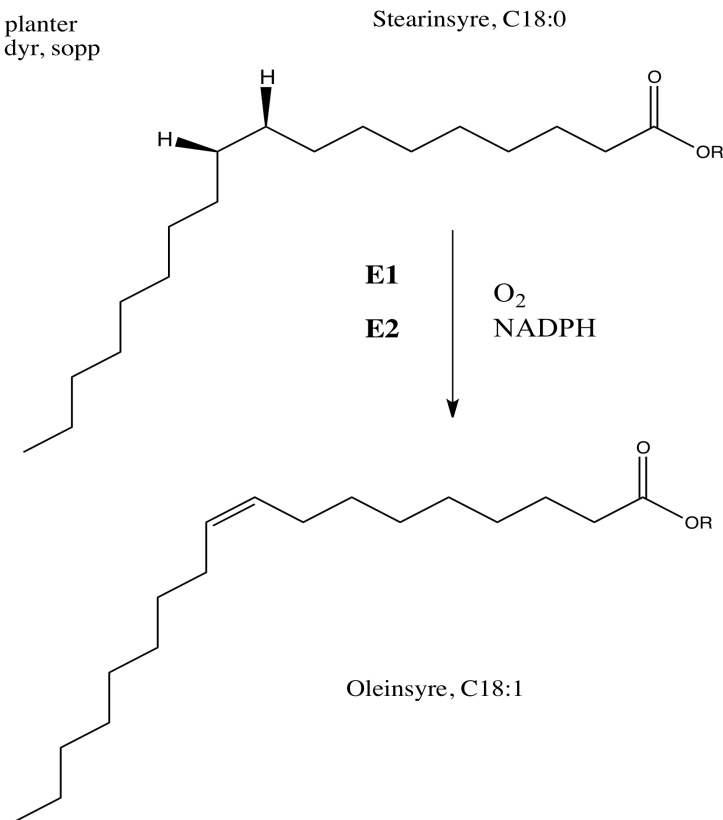
Fettsyrer som inneholder en eller flere dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden refereres til som henholdsvis enumettede eller flerumettede. Dobbeltbindingen(e) resulterer i en ”knekk” i karbonkjeden slik at det ikke blir like tett og kompakt pakking mellom de umettede fettsyrene, som hos de mettede. Dette gir svakere interaksjoner mellom karbonkjedene og resulterer i lavere smeltepunkt i fett som inneholder umettede fettsyrer. Hos flerumettede fettsyrer blir vanligvis dobbeltbindingene separert av en metylen-del, slik at dobbeltbindingene foreligger ukonjugert (Damodaran *et al.*, 2008).

Normalt foreligger dobbeltbindinger i fettsyrer med *cis*-konfigurasjon. Ved *cis*-konfigurasjon er karbonatomene på den alifatiske kjeden på samme side av dobbeltbindingen, mens ved *trans*-konfigurasjon er karbonatomene på motsatt side (Damodaran *et al.*, 2008). Fettsyrer med *trans*-form forekommer naturlig i blant annet meieriprodukter og kjøtt fra drøvtyggere, men i svært lave konsentrasjoner. *Trans*-geometri kan i tillegg finnes i industrielt produserte matvarer som inneholder delvis herdete marine og vegetabiliske oljer (Dewick, 2009). Umettet fett med *trans*-konfigurasjon har en mer utstrakt struktur enn tilsvarende fettsyre med *cis*-geometri, noe som gir *trans*-fett liknende egenskaper som mettet fett (Damodaran *et al.*, 2008).

I de fleste organismer dannes de umettede fettsyrene som følge av dehydrogenering av den korresponderende alifatiske hydrokarbonkjeden, eventuelt med videre dehydrogenering i påfølgende steg. De fleste eukaryotiske organismer har et enzym, som introduserer en *cis* dobbeltbinding hos mettede fettsyrer mellom karbon 9 og 10. Dette er en enzymkatalysert prosess, som krever O<sub>2</sub> og NADPH (figur 1.2) (Dewick, 2009).

## Innledning

R = ACP i planter  
R = CoA i dyr, sopp

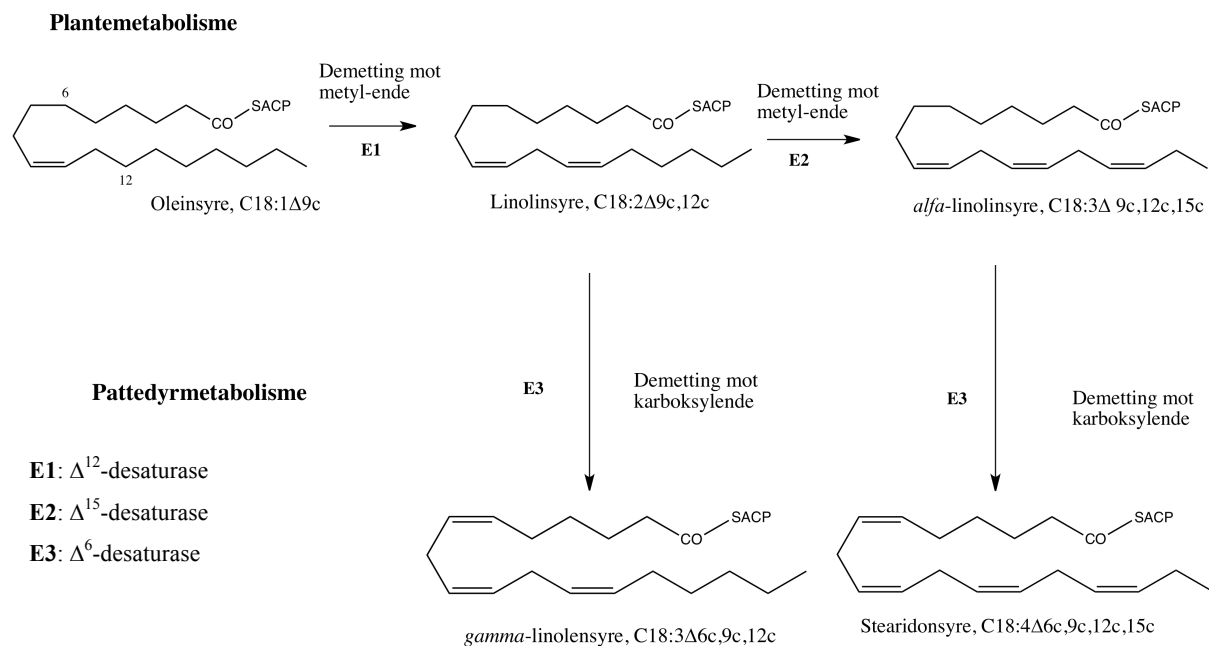


E1: steaoryl-ACP  $\Delta^9$ -desaturase, for planter  
E2: steaoryl-CoA  $\Delta^9$ -desaturase, for dyr, sopp

**Figur 1.2:** Oksidativ dehydrogenering av stearinsyre, C18:0, for dannelse av oleinsyre, C18:1.

Retningen for videre dehydrogenering på fettsyrens hydrokarbonkjede avhenger av type organisme. Planter har  $\Delta^{12}$ - og  $\Delta^{15}$ -desaturaser og tenderer derfor til å introdusere nye dobbeltbindinger mellom eksisterende dobbeltbindinger og metylterminalen. Pattedyr mangler derimot disse enzymene og introduserer derfor nye dobbeltbindinger i retning karboksylsyreenden (figur 1.3) (Dewick, 2009).

## Innledning



**Figur 1.3:** Planter innfører dobbeltbindinger i retning metyl-enden, mens pattedyr introduserer dobbeltbindinger i retning mot karboksylsyrergruppen.

### Essensielle fettsyrer

Ettersom pattedyr mangler enzymene Δ<sup>12</sup>- og Δ<sup>15</sup>-desaturase kan de ikke syntetisere linolsyre eller α-linolsyre. Disse er essensielle fettsyrer fordi de er livsnødvendige lipidkomponenter som pattedyr må få tilført gjennom kosten (Mathews *et al.*, 2000). De essensielle fettsyrene er viktige bestanddeler i cellemembraner og er i tillegg forløpere til de flerumettede ω-6 og ω-3-fettsyrene, som igjen leder til dannelsen av prostaglandiner, leukotriener og tromboxaner. De sistnevnte forbindelsene er metabolitter som regulerer viktige biologiske funksjoner (Dewick, 2009). ω-6 og ω-3-fettsyrer med mer en 18 karbonatomer i den alifatiske kjeden er enten tilført direkte gjennom kosten eller via derivater av linolsyre og α-linolsyre (Akoh & Min, 2002).

### 1.2.3 Triacylglyserol

Til tross for at fettsyrer spiller en viktig rolle i metabolismen er frie, ikke-esterifiserte, fettsyrer uvanlig og lite ønsket i levende celler. Dette fordi frie fettsyrer er cytotoxiske på grunn av deres evne til å ødelegge cellemembranen (Damodaran *et al.*, 2008). Isteden er de fleste fettsyrene bestanddeler i mer komplekse lipider (Mathews *et al.*, 2000), og over 99% av fettsyrene som er funnet i planter og dyr er esterifisert med den treverdige alkoholen glyserol.

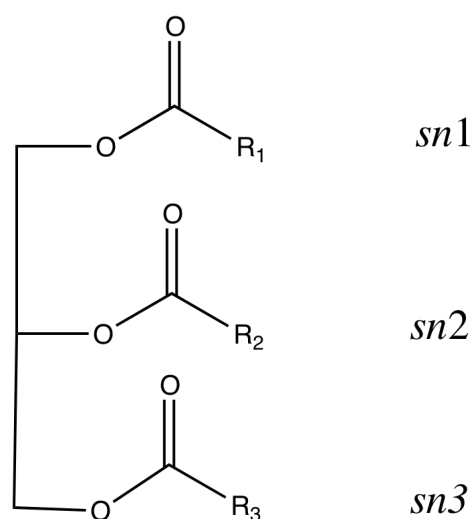
## Innledning

Når fettsyrer esterifiseres med glyserol, senkes overflateaktiviteten, noe som igjen senker deres cytotoksiske egenskaper (Damodaran *et al.*, 2008).

En, to eller tre fettsyrer kan bli bundet til glyserolmolekylet via esterbindinger, og acylglyseroler kan dermed eksistere som mono-, di-, eller triester (Damodaran *et al.*, 2008). I næringsmidler vil konsentrasjonen av triacylglyseroler, også kalt triglyserider, være høyest (Akoh & Min, 2002).

Enkle triglyserider består av tre identiske fettsyrer, mens sammensatte eller heterogene triglyserider inneholder to eller tre ulike fettsyrer. Type og andel av de forskjellige fettsyrene er med på å gi triglyserider deres fysiske egenskaper (figur 1.4) (Dewick, 2009).

Hos sammensatte triglyserider er det sentrale karbonatomet kiralt. Ved stereospesifikk nummerering (*sn*) kan derfor de tre karbonatomene på glyserolenheten skilles fra hverandre. Dersom triglyseridet fremstilles ved Fischer projeksjon, blir karbonatomene nummerert 1 til 3 fra topp til bunn (figur 1.4) (Akoh & Min, 2002).



**Figur 1.4:** En skjematisk presentasjon av triglyserider som viser den stereospesifikke nummereringen (*sn*) av et triglyserider.  $R_1$ ,  $R_2$  og  $R_3$  representerer de alifatiske kjedene til fettsyrene.

### 1.2.4 Hydroksyfettsyrer

Mettede og umettede fettsyrer som har en eller flere hydroksylgrupper på alkylkjeden defineres som hydroksyfettsyrer (Akoh & Min, 2002). Disse er et resultat av biosyntesen av fettsyrer og fettsyreoksidasjon. Hydroksyfettsyrer er allment utbredt i naturen, og det er påvist



hydroksyfettsyrer i en rekke biologiske materialer, hovedsakelig ved svært lave konsentrasjoner. Disse er blant annet viktige lipidbestanddeler i bakterier, sopp, planter, dyr og næringsmidler (Murakami *et al.*, 1992; Jantzen *et al.*, 1993; Dembitsky *et al.*, 1993; Bohn *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1969; Hirono, 1979; Jenske & Vetter., 2009; Chance *et al.*, 1998). Etersom konsentrasjonen av hydroksyfettsyrer i biologisk materiale ofte er lav, er det viktig at analysemetoden som benyttes for å kvantifisere disse er sensitiv (Jenske & Vetter., 2008).

### 1.2.5 Nomenklatur

#### *Fettsyrer*

Fettsyrer kan navnesettes på ulike måter; trivialnavn, systematiske navn (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) eller numeriske navn.

Mange av trivialnavnene har opprinnelse fra kilden hvor fettsyren vanligvis, eller tradisjonelt sett, er isolert fra, men trivialnavnene gir liten eller ingen informasjon om fettsyrens oppbygging.

De systematiske navnene gir derimot en detaljert beskrivelse av fettsyrenes struktur. Navnet avledes fra den korresponderende hydrokarbonkjeden på bakgrunn av antall karbon, og får endelsen *-syre*. Fettsyrer som inneholder dobbeltbindinger i karbonkjeden betegnes med endelsen *-ensyre*, hvorpå forstavelsen *di-*, *tri-*, *tetra osv* legges på ved henholdsvis to, tre, fire eller flere dobbeltbindinger. Det oppgis også om dobbeltbindingen har *cis-* eller *trans-*konfigurasjon, henholdsvis med forkortelsen ”*c*” eller ”*t*” (Akoh & Min, 2002; Damodaran *et al.*, 2008).

Karbonatomet på karboksylgruppa nummereres 1. Eventuelle dobbeltbindingers posisjon betegnes med symbolet  $\Delta$ , som tilsvarer avstanden mellom dobbeltbindingen og karboksylkarbonet (Dewick, 2009). Sifferet som betegner dobbeltbindingens posisjon plasseres før fettsyrenavnet (Akoh & Min, 2002).

Det numeriske systemet er praktisk ved at det forkorter fettsyrenes navn. Her angis antall karbonatomer i kjeden (X), etterfulgt av et kolon og antall dobbeltbindinger (Y), før plasseringen (Z) til eventuelle dobbeltbindinger angis; X:Y  $\Delta$ Z. Alternativt til symbolet  $\Delta$ , kan dobbeltbindinger betegnes med  $\omega$ , som sier noe om avstanden mellom dobbeltbindingen og metyl-enden; X:Y $\omega$ Z (Damodaran *et al.*, 2008). Ekvivalent kan  $\omega$  erstattes med *n-*; X:Yn-Z.

## Innledning

Ved numerisk navnsetting forutsettes det at umettede fettsyrer har *cis*-konfigurasjon, og dersom fettsyrene er flerumettede, er dobbeltbindingen separert av en metylen-enhet (Akoh & Min, 2002)

### ***Hydroksyfetsyrer***

Ved systematisk navnsetting av hydroksyfetsyrer følges samme prinsipp som ved navnsetting av frie fettsyrer. I tillegg må hydroksylgruppen(e) nummereres, og lokaliseringen på karbonkjeden betegnes med symbolet  $\Delta$ . Stereoisomeri er mulig, ettersom karbonatomet med hydroksylgruppen er kiralt, derfor kan *R/S* systemet benyttes for å gjengi den eksakte strukturen til fettsyren. En fettsyre hvor hydroksylsubstituenten er plassert i  $\Delta 2$ ,  $\Delta 3$  eller  $\Delta 4$  posisjon kan også betegnes som henholdsvis en  $\alpha$ -,  $\beta$ - eller  $\gamma$ -hydroksyfetsyre.

Numerisk navnsetting kan ikke benyttes dersom fettsyrene har eventuelle sidegrupper, slik tilfellet er for hydroksyfetsyrene (Akoh & Min, 2002).

### ***Triglyserider***

Triglyserider blir gjerne navngitt ved å benytte trivialnavnene til fettsyrene. Eksempelvis vil et enkelt triglyserid som kun inneholder eicosansyre, arakidinsyre (Ad), kalles triarakidin, Ad-Ad-Ad, eller 20:0-20:0-20:0. Fettsyrene i sammensatte triglyserider får endelsen -oylsyre. Et triglyserid som inneholder arakidin-, palmitin- og oleinsyre vil da hete arakidoyl-palmitoyl-oleoyl-glyserol. Dersom den stereospesifikke posisjonen til fettsyren er kjent, vil *sn*- legges til, og det nevnte triglyseridet vil da få navnet 1-arakidoyl-2-palmitoyl-3-oleoyl-*sn*-glyserol. Det numeriske navnet til dette triglyseridet vil være AdPO eller 20:0-16:0-18:1, med kjent stereokjemi tilsvarer dette *sn*-AdPO eller *sn*-20:0-16:0-18:1 (Damodaran *et al.*, 2008).

## **1.2.6 Fettsyreanalyse**

Lipidkomponenter i mat og biologisk materiale blir stort sett analysert på en GC, hvor både posisjon og fordeling av fettsyrer, samt fettsyrestabilitet kan bestemmes (Pomeranz og Meloan, 1994). Før analyse på GC blir fettsyrene vanligvis esterifisert til sine korresponderende FAMES (Eder, 1995; Zu *et al.*, 2009; Pomeranz & Meloan, 1994; Nielsen, 2010).

Ved analyse og separasjon av hydroksyfetsyrer på en GC er det ikke bestandig tilstrekkelig å esterifisere syregruppa. Sammenliknet med de korresponderende fettsyrene, uten en substituert OH-gruppe, vil det kreves høyere temperatur for å få hydroksyfetsyrer over i gassfase. Dette vil kunne resultere i økt retensjonstid og eventuelt dekomponering av analytt

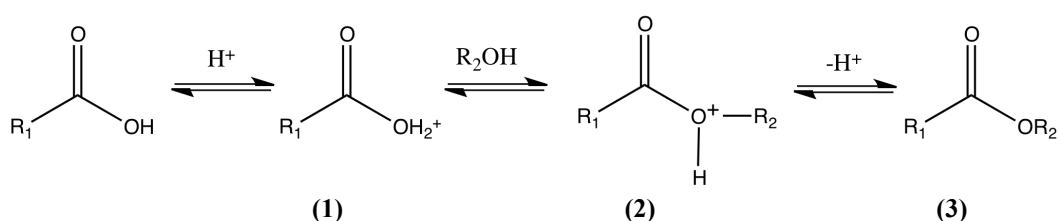
(Borch-Jensen, 1997). Ofte er det derfor nødvendig å derivatisere hydroksylgruppen(e) i tillegg. Derivatisering av hydroksyfettsyrer foregår dermed over to trinn; først dannelse av en ester, deretter en eter.

For at fettsyrene i triglyserider skal kunne analyseres på en GC, må fettsyrene først spaltes av glyserolenheten, før de omdannes til mindre polare alkylderivater (estere) med lavere kokepunkt, som for eksempel metylestere. Denne reaksjonen kalles transesterifisering. Direkte transesterifisering er ønskelig ettersom hydrolyse og esterifisering foregår i samme steg og kun en reagens er nødvendig (Eder, 1995).

### 1.2.6.1 Syrekatalysert esterifisering og transesterifisering

Frie fettsyrer og triglyserider kan henholdsvis bli esterifisert og transesterifisert til sine korresponderende metylestere dersom de varmes opp i overskudd av vannfri metanol med en egnet syrekatalysator tilstede (figur 1.5) (Christie, 1993).

Innledningsvis protoneres fettsyren for dannelse av et oksoniumion (1), som igjen reagerer med en alifatisk alkohol, som for eksempel metanol. Deretter dannes intermediet (2), som til slutt taper et proton og omdannes til en metylester. Alle stegene i denne prosessen er reversible, men ved overskudd av metanol vil likevekten forskyves til høyre slik at metylestere dannes. Vann må ikke være tilstede i løsningen, ettersom vann er en sterkere elektron donor enn metanol, og vil føre til at reaksjonen ikke går fullstendig (Christie, 1993).

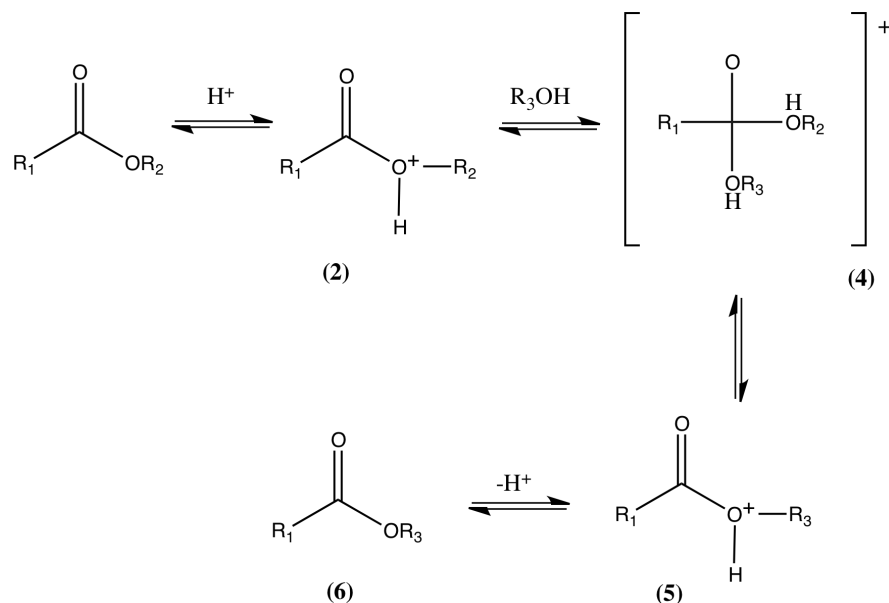


**Figur 1.5:** Generell reaksjonslikning for syrekatalysert esterifisering av frie fettsyrer.

Ved transesterifisering av triglyserider (figur 1.6) protoneres esteren (2) og reagerer med en alkohol, som for eksempel metanol. Dette fører til dannelsen av et intermediat (4), som videre dissosierer via mellomproduktet (5) til en metylester (6). Også her er alle stegene reversible, men ved overskudd av metanol vil likevekten forskyves mot høyre. Under reaksjonen bør ikke vann være tilstede ettersom hydrolyse vil kunne forekomme og et intermediat tilsvarende

## Innledning

(4) (hvor  $R'' = H$ ) vil dannes før videre dissosiasjon igjen vil resultere i en fri fettsyre (Christie, 1993).



**Figur 1.6:** Generell reaksjonslikning for syrekatalysert transesterifisering av lipider.

Valg av syre er avgjørende. Det er viktig at man oppnår nøyaktige og kvantitative resultater, og unngår dekomponering og uønskede biprodukter (Christie, 1993).

Vanlige reagenser benyttet for syrekatalysert metylering er HCl-metanol og  $BF_3$ -metanol. Disse er egnet både ved esterifisering av frie fettsyrer, samt transesterifisering av triglyserider (Eder, 1995).

### **Bortrifluorid-metanol**

Bortrifluorid ( $BF_3$ ) er mye brukt som katalysator ved esterifisering og transesterifisering av frie fettsyrer og triglyserider (Sigma-Aldrich, 1998). Det er vist at  $BF_3$ -metanol (10-14% w/v) kan esterifisering og transesterifisere de fleste lipidklasser, men metyleringen bør foregå under oppvarming (Morrison & Smith, 1964).

Tap av holdbarhet er observert dersom reagens ikke oppbevares kaldt. Ved bruk av gammel eller oppkonsentrert  $BF_3$ -metanol er det meldt om biprodukter og/eller tap av lange flerumettede fettsyrer (Lough, 1964; Christie, 1982).

### **Hydrogenklorid-metanol**

## Innledning

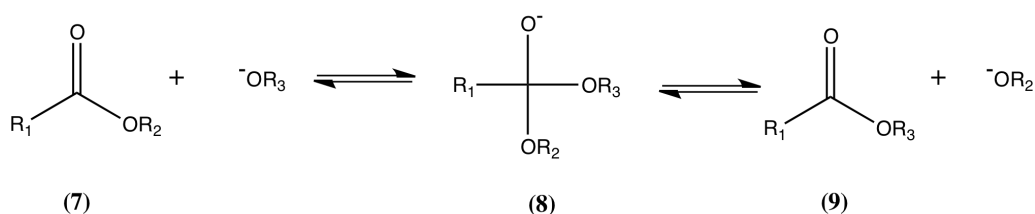
Hydrogenklorid (HCl) i vannfri metanol er en effektiv katalysator ved esterifisering av frie fettsyrer og transesterifisering av triglyserider for dannelse av FAMES, men reaksjonen bør foregå under oppvarming. HCl benyttes som katalysator under andre forhold og syrekonsentrasjoner sammenliknet med  $\text{BF}_3$ , og reaksjonstiden er noe annerledes (Eder, 1995).

Reagensen er holdbar i omtrent to uker ved romtemperatur, lenger dersom den holdes avkjølt (Christie, 1993).

### 1.2.6.2 Basekatalysert transesterifisering

I overskudd av vannfri metanol og med en egnet base tilstede, vil triglyserider kunne transesterifiseres til sine korresponderende metylestere (figur 1.7). Basisk transesterifisering kan foregå svært raskt, selv ved romtemperatur. Dette reduserer risikoen for dekomponering av lange flerumettede fettsyrer (Eder, 1995).

Estere som er tilstede med en base, som for eksempel et alkoholanion (7) (figur 1.7), vil danne et anionisk intermediat (8) som kan dissosiere tilbake til den opprinnelige esteren (7) eller danne en ny ester (9). Ved å tilsette overskudd av en alkohol, som alkoholanionet er et derivat av (7), vil likevekten forskyves mot høyre (9) (Christie, 1993).

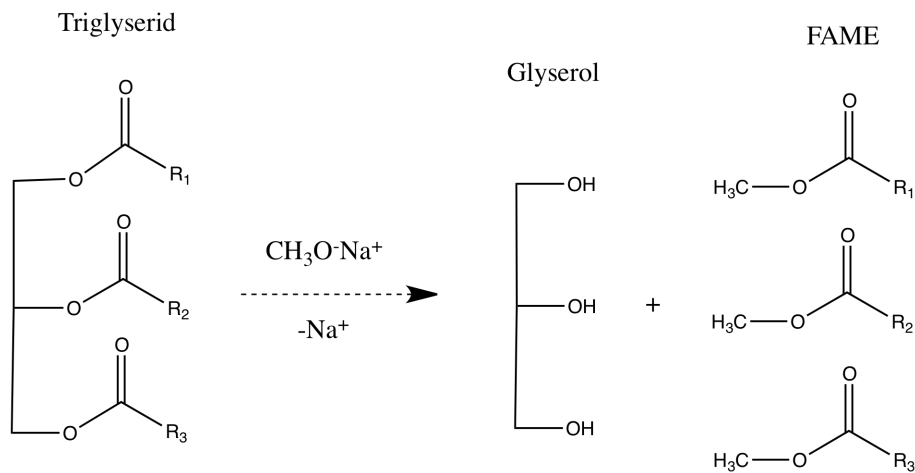


**Figur 1.7:** Generell reaksjonslikning for basisk transesterifisering av lipider.

En uesterifisert fettsyre vil omdannes til et karboksylion,  $-\text{COO}^-$ , i en basisk løsning og vil derfor ikke utsettes for nukleofilt angrep fra en base på grunn av sin negative ladning. Basisk esterifisering er derfor lite egnet for esterifisering av frie fettsyrer (Christie, 1993).

### **Natriummetanolat, $\text{CH}_3\text{ONa}$**

$\text{CH}_3\text{ONa}$  i vannfri metanol kan transesterifisere triglyserider (figur 1.8) (Christie, 1993).



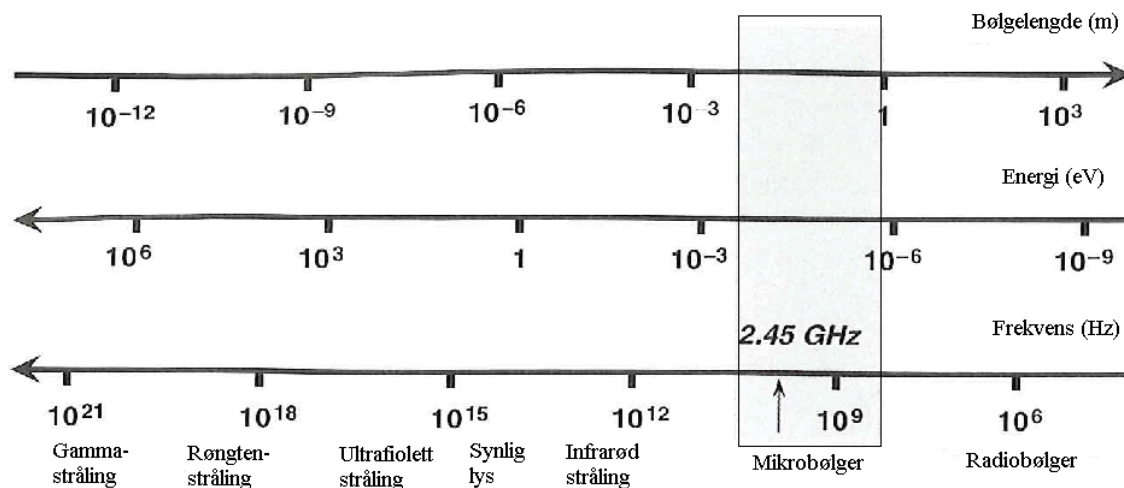
**Figur 1.8:** Transesterifisering med  $\text{CH}_3\text{O}^- \text{Na}^+$  vannfri metanol av triglyserider.

$\text{CH}_3\text{ONa}$  kan defineres som en basisk katalysator, men også som reaktant fordi den deltar og forbrukes i reaksjonen (figur 1.8). Etersom litteraturen (Christie, 1993; Eder, 1995) omtaler transesterifisering av triglyserider med  $\text{CH}_3\text{ONa}$  i metanol som en basekatalysert metylering, vil denne betegnelsene benyttes videre.

Det er viktig med et vannfritt miljø for å unngå hydrolyse av triglyserider og dermed dannelse av frie fettsyrer. Dersom  $\text{CH}_3\text{ONa}$  løsningen oppbevares kjølig, har den en holdbarhet på flere måneder.

### 1.2.7 Mikrobølger

Mikrobølger er elektromagnetiske bølger, med bølgelengder fra 1mm til 1m, noe som i frekvens tilsvarer området mellom 0.3 og 300 GHz. Mikrobølger befinner seg derfor i det nedre området av det elektromagnetiske spekteret, i overgangen mellom infrarødstråling og radiobølger (figur 1.9) (Tipler, 2008).



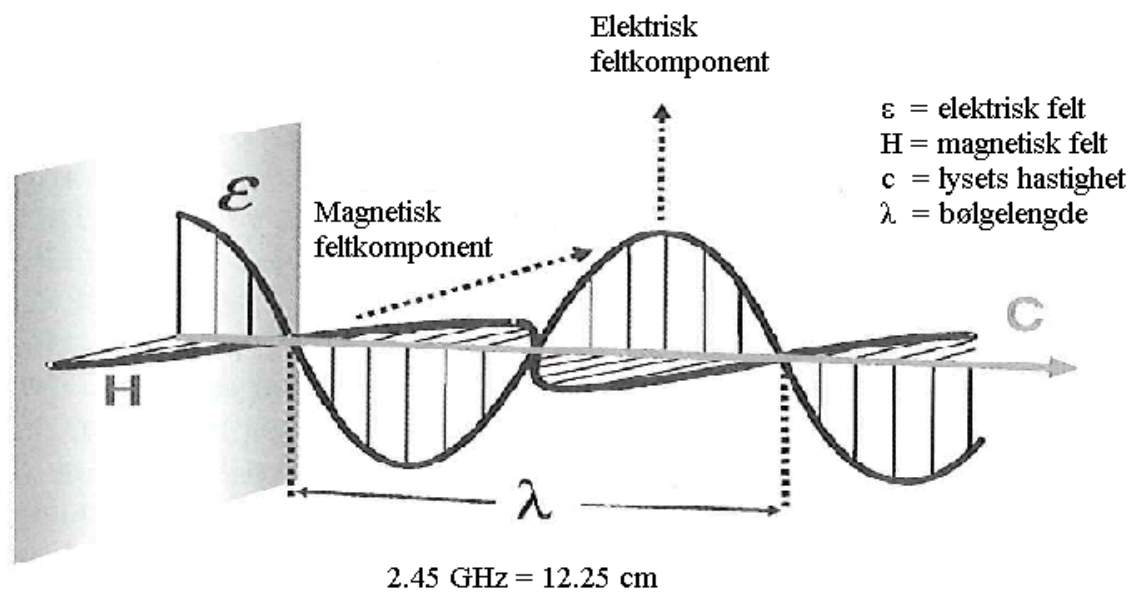
*Figur 1.9: Det elektromagnetiske spekteret (Kappe et al., 2009).*

Mikrobølger benyttes hovedsakelig til informasjons- og energioverføring (Kappe et al., 2009), men har vært benyttet innen organisk syntese allerede siden 1980-tallet (Lidström et al., 2001).

Tradisjonelt har oppvarming ved hjelp av ytre varmekilder (som for eksempel vannbad, oljebad og sandbad) blitt benyttet for å tilføre kjemiske reaksjoner energi. Oppvarming forgår da via konduksjon og konveksjon, og en temperaturgradient vil kunne oppstå som følge av at reaksjonsbeholderen blir varmere enn prøvematerialet. Ujevn, samt lokal oppvarming, kan føre til dekomponering av produkt, substrat eller reagens og dannelsen av biprodukter (Lidström et al., 2001).

Mikrobølgeoppvarming er et alternativ til tradisjonell oppvarming og omtales gjerne som dielektrisk oppvarming. Dielektrisk oppvarming avhenger av et gitt stoffs evne til å absorbere mikrobølgeenergi og omdanne denne til varme (Kappe et al., 2009). Ved å benytte en mikrobølgetransparent reaksjonsbeholder med ideell geometri, vil mikrobølgene kunne passere og i utgangspunktet kun varme opp løsningsmiddelet eller reagensen i beholderen. Ideelt vil mikrobølgene varme opp hele volumet samtidig, uten at det dannes noen temperaturgradient i prøven (Lidström et al., 2001).

Ettersom mikrobølger er elektromagnetisk stråling, består disse av et oscillerende elektrisk og magnetisk felt, som igjen står vinkelrett på hverandre (figur 1.10) (Tipler, 2001).



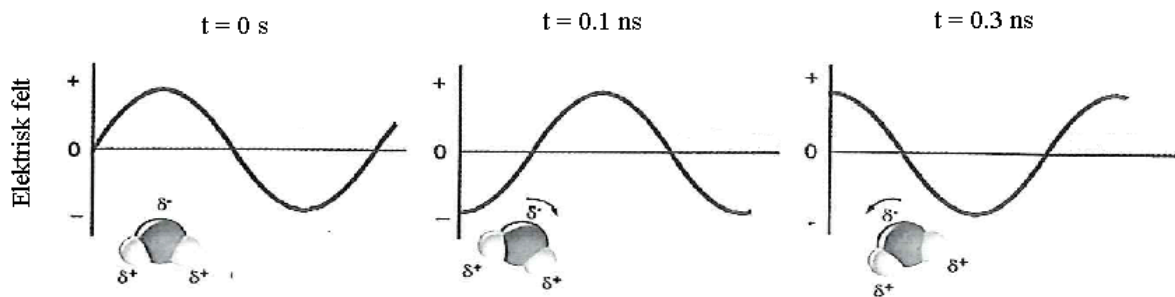
**Figur 1.10:** Elektrisk og magnetisk feltkomponent i mikrobølger (Kappe et al., 2009).

Det er den elektriske feltkomponenten som er ansvarlig for den dielektriske oppvarmingen, som foregår via to hovedmekanismer; dipolar polarisering og ionisk konduksjon (Lidström et al., 2001).

### **Dipolar polarisering**

Dipoler blir lett påvirket av ytre elektriske felt, og løsningsmiddel eller reagenser som besitter molekyler med dipolmoment vil omdanne mikrobølgeenergien til varme når de blir bestrålt med mikrobølger. Dipolene vil forsøke å orientere seg etter det elektriske feltet ved å svinge i takt med frekvensen (figur 1.11). Energi i form av varme tapes da gjennom molekylær friksjon og dielektrisk tap (Lidström et al., 2001). Dette betyr at gasser ikke kan varmes opp dersom de bestråles med mikrobølger fordi avstanden mellom de svingende molekylene er for stor (Kappe et al., 2009).

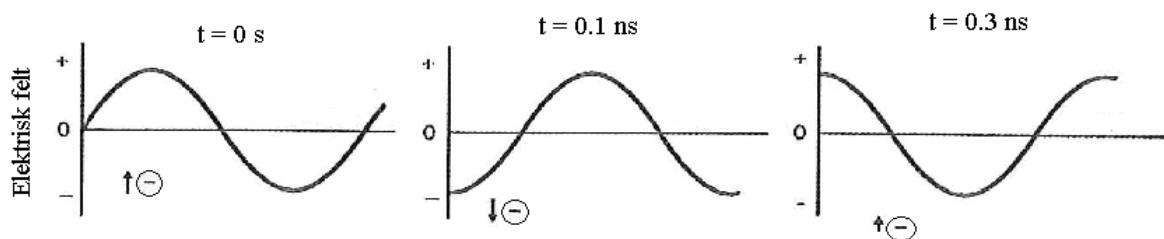




**Figur 1.11:** Dipoler vil forsøke å tilpasse seg et oscillerende elektrisk felt ved å svinge i takt med frekvensen (Kappe et al., 2009).

### Ionisk konduksjon

Ionisk konduksjon forekommer i prøveløsninger som inneholder ladde partikler og som utsettes for mikrobølger (Lidström et al., 2001). Mikrobølgene fører til at de ladde partiklene settes i bevegelse og oscillerer frem og tilbake (figur 1.12). Dette resulterer i kollisjoner mellom nærliggende atomer og molekyler. Disse kollisjonene fører til varmedannelse (Kappe et al., 2009).



**Figur 1.12:** Ladde molekyler i en løsning vil settes i bevegelse av et oscillerende elektrisk felt (Kappe et al., 2009).

### Dielektriske egenskaper

Som beskrevet i avsnitt 1.2.7.1 og 1.2.7.2 er det nødvendig at en løsning inneholder molekyler med dipolmoment og/eller ioner for at oppvarming ved hjelp av mikrobølger skal finne sted (Lidström et al., 2001). Molekylene evne til å absorbere mikrobølger og omdanne disse til varme avgjøres av deres dielektriske egenskaper. En løsnings evne til å omdanne

## Innledning

elektromagnetisk stråling til varme ved en gitt temperatur og frekvens beskrives ved hjelp av tapstangent,  $\tan \delta$ , hvor:

$$\tan \delta = \epsilon''/\epsilon' \quad [\text{Likning 1.1}]$$

Den dielektriske tapsfaktoren,  $\epsilon''$ , beskriver hvor effektivt den absorberte mikrobølgeenergien omdannes til varme, mens den dielektriske konstanten,  $\epsilon'$ , beskriver molekylenees evne til å bli polarisert i et gitt elektrisk felt. For rask absorpsjon og hurtig oppvarming kreves det at reaksjonsmaterialet har høy tapstangent, noe som er tilfellet for dielektriske forbindelser som polare løsningsmiddel. Til tross for at den dielektriske konstanten til etanol er lavere enn for vann, vil etanol omdanne absorberte mikrobølger om til varme mer effektivt. Dette fører til at etanol har høyere tapsfaktor enn vann.

Dersom mikrobølgene reflekteres av materialoverflaten, er tapstangent minimal og liten eller ingen varmedannelse oppstår. Dette er tilfellet for blant annet metaller (Kappe *et al.*, 2009).

### ***Penetreringsdybde***

Penetreringsdybden defineres som dybden hvor intensiteten til mikrobølgene inne i materialet er 37% sammenliknet med intensiteten ved overflaten av materialet (Nüchter *et al.*, 2004).

Ettersom mikrobølger taper energi i form av varme når de penetrerer et dielektrisk materiale, betyr dette at når det dielektriske tapet er høyt, vil mye varme produseres, og mikrobølgene kan penetrere en kortere distanse før energien er forbrukt (Potter & Hotchkiss, 1995).

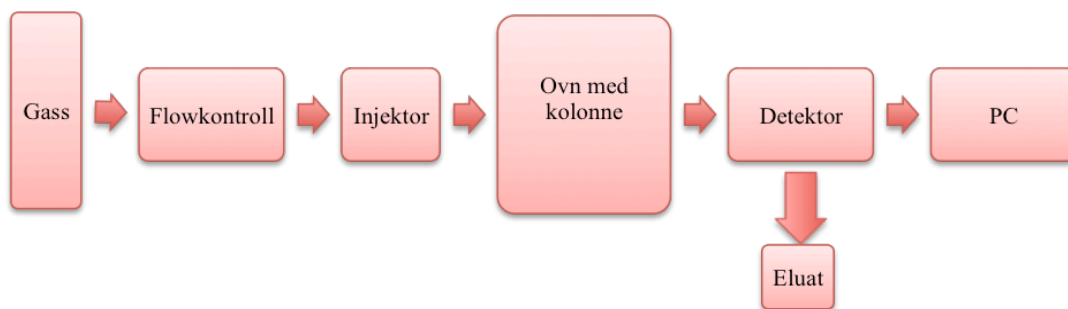
Forbindelser med høy tapstangent vil dermed ha kort penetreringsdybde sammenliknet med forbindelser med lav tapsfaktor. Samtidig er penetreringsdybden omvendt proporsjonal med frekvensen. Forbi penetreringsdybden vil mikrobølgeoppvarming være neglisjerbar og oppvarming vil hovedsakelig foregå via konveksjon og/eller konduksjon (Kappe *et al.*, 2009). Ved siden av de fysikalske egenskapene til reaksjonsmaterialet som skal varmes opp, må det derfor tas hensyn til både volum av reagens og geometrien til reaksjonsbeholderen, slik at jevn oppvarming oppnås (Galema, 1997). Upolare mikrobølgetransparente materialer har lav tapstangent og vil kunne benyttes som reaksjonsbeholdere på grunn av deres lange penetreringsdybde (Kappe *et al.*, 2009).

### 1.2.8 Gasskromatografi

Gasskromatografi (GC) ble først introdusert i 1952 av James og Martin og har etter dette utviklet seg til å bli en rask, sensitiv, nøyaktig og enkel analysemetode (Ahuja, 2003).

Prinsippet bak kromatografi er at man har en mobilfase som frakter prøve gjennom en kolonne, med en stillestående stasjonærfase. Prøvekomponentene separeres fra hverandre på bakgrunn av deres affinitet for den stasjonære fasen og oppnår dermed ulik bevegelseshastighet. I gasskromatografi benyttes en inert gass som mobilfase, mens den stasjonære fasen kan være en ikke-flyktig væske (immobilisert av et fast stoff eller bundet til innsiden av kolonnen) eller et fast stoff som omdannes til væske ved operasjonstemperaturen (Ahuja, 2003).

Figur 1.13 viser en skjematisk fremstilling av bestanddelene i en gasskromatograf (GC).



**Figur 1.13:** Et blokkdiagram av bestanddelene i en gasskromatograf.

Smale, symmetriske, høye og ikke-overlappende topper er ønskelig og indikerer god separasjon (Harris, 2007; Ahuja, 2003). Begrepene retensjonstid, båndspredning og oppløsningsevne er viktige med tanke på dette. Retensjonstiden beskriver tiden fra injeksjon av prøve til deteksjon. Med økende retensjonstid vil topphøyden avta, og ved analyse av fettsyreer vil økt kjedelengde resultere i økt retensjonstid. Bredden av toppen beskrives av båndspredning. Toppene blir bredere med økende retensjonstid og derfor vil en lengre kolonne føre til slike topper (Ahuja, 2003). Oppløsningsevne er synonymt med separasjon av komponenter i en prøve (Harris, 2007).

## Innledning

En spesifikk forbindelse skal ideelt sett ha likt areal og lik retensjonstid for hver analyse ved like betingelser, altså ved bruk av for eksempel lik kolonne, flowhastighet og mobilfase (Ahuja, 2003).

I praksis bedres en kromatografisk separasjon ved å minke tykkelsen til den stasjonære fasen, samt den indre diameteren i kolonnen, og ved å øke mobilfasehastigheten. På denne måten vil komponentene oppholde seg en kortere tid inne i kolonnen og det oppnås mindre spredning forårsaket av diffusjon (Ahuja, 2003). Kolonnetemperaturen kan også økes for å minske retensjonstiden og få skarpere topper. Disse parametrene forbedres dersom man har et varierende temperaturprogram (Harris, 2007).

Kromatogrammet er en grafisk illustrasjon av separasjonen og viser detektorrespons som en funksjon av retensjonstiden (Harris, 2007).

### ***Fordeler med gasskromatografi***

Gasskromatografi er en effektiv, pålitelig, relativt enkel og billig analysemetode.

Analysetiden er vanligvis kort og det oppnås meget god oppløsning. Lave konsentrasjoner kan detekteres, noe som gir mulighet for god nøyaktighet. Analysemetoden tar kun små prøvevolum som er fordelaktig dersom lite prøvemateriale er tilgjengelig (Ahuja, 2003).

### ***Ulemper med gasskromatografi***

Prøveforbindelsene, eller deres derivater, må være flyktige ved operasjonstemperaturen.

Enkelte analytter vil ikke, selv ved høye temperaturer, være flyktige og er derfor uegnet ved GC-analyser. Termisk ustabile forbindelser må derfor derivatiseres før analyse på en GC, eventuelt må andre analysemetoder vurderes (Ahuja, 2003).

### ***Kolonner***

Kolonnene benyttet i gasskromatografi kan deles inn i to kategorier; pakkede kolonner og kapillærkolonner. De pakkede kolonnene inneholder små partikler som enten er selve stasjonærfasen eller som er dekket med stasjonærfase. Den indre diameteren er gjerne 3-6 mm og sørger dermed for høy prøvekapasitet. Ulempen er at de ofte gir brede topper. (Harris, 2007).

Kapillærkolonner er de mest brukte kolonnene i dag. Her er innerveggen dekket med en stasjonærfase, ofte smeltet silikat, og kolonnen er beskyttet med en polyimidhinne.

Kapillærkolonner har lav prøvekapasitet og den indre diameteren er gjerne 0.1-0.5 mm. Dette

gir bedre oppløsning, kortere analysetid og høyere sensitivitet enn hos pakkede kolonner (Harris, 2007).

### ***Stasjonærfaser***

Stasjonærfase velges på bakgrunn av prinsippet om at ”likt løser likt”. Derfor velges upolare stasjonærfaser for upolare forbindelser og polare stasjonærfaser for polare forbindelser (Ahuja, 2003). Stasjonærfasene kan kategoriseres i tre hovedtyper; polare, middels polare og upolare (Eder, 1995).

Polare stasjonærfaser separerer FAMEs særdeles godt, men har lav termisk stabilitet i forhold til upolare. Dette resulterer i lengre retensjonstid (Shantha & Napolitano, 1992).

Stasjonærfasens polaritet påvirker retensjonstiden, og dette gjelder spesielt for flerumettede FAMEs. Generelt vil FAMEs med samme antall karbonatomer, men økt antall dobbeltbindinger gi lengre retensjonstid og bedre oppløsningsevne (Eder, 1995). Denne typen stasjonærfase er derfor godt egnet ved analyse av komplekse prøver (Christie, 1989).

Dobbeltbindingsisomere kan også separeres dersom man benytter en svært polar kapillærkolonne. Ifølge arbeidet gjort av Wolff (1992) vil forbindelser med *cis*-dobbeltbindinger har økt retensjonstid i forhold til forbindelser med *trans*-dobbeltbindinger.

Middels polare stasjonærfaser kombinerer fordelene av høy oppløsningsevne med relativt høy termisk stabilitet (Eder, 1995), og er godt egnet ved analyse av biologiske prøver som plasma (Ohta *et al.*, 1990), erythrocytt membraner (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1992) eller marine oljer (Welz *et al.*, 1990).

Upolare stasjonærfaser separerer hovedsakelig på bakgrunn av flyktighet (Harris, 2007). Dermed vil umettede FAMEs eluere før mettede FAMEs, det motsatte av det som observeres for polare stasjonærfaser. Ulempen med upolare kolonner er at noen viktige umettede FAMEs overlapper (Christie, 1989). Fordelen er høy termisk stabilitet, som gir et bredt spekter av operasjonstemperaturer, og kjemisk inerthet (Shantha & Napolitano, 1992). Denne typen stasjonærfase er spesielt fordelaktig ved analyse av høye molekylmasser (Eder, 1995) og kan brukes ved separering av FAMEs i for eksempel menneskemelk (Kuksis *et al.*, 1986).

I dag er de polare kolonnene foretrukket ved separasjon av komplekse fettsyreblandinger, spesielt når flerumettede fettsyrer eller *trans*-fettsyrer blir analysert (Mjøs, 2006).

### ***Injisering på kolonnen***

Injisering kan foregå i følgende moduser; splitt, uten splitt eller direkte på kolonnen. Injeksjon med splitt er foretrukket dersom konsentrasjonen av en gitt analytt utgjør  $> 0.1\%$  av prøven. Ved slik injeksjon blir kun en andel av prøven injisert direkte på kolonnen. Resten av prøvematerialet blir ført ut av GCen (Harris, 2007). Dermed forhindres overbelastning av stasjonærfase og kolonne (Ahuja, 2003) og degradering av kolonneytelsen unngås (Eder, 1995). En splitt tilsvarende 1:10 vil si at én del prøve injiseres mens ni føres ut av GCen. Injeksjon uten splitt foretrekkes ved sporanalyser.

Injeksjonstemperaturen bør være høy for å minke grad av fragmentering av prøven før injeksjon. I tillegg er det ønskelig at alle prøvemolekylene befinner seg på gassform ved injisering. Temperaturen bør derimot ikke være for høy, da prøven kan dekomponere (Harris, 2007).

### ***Detektor***

I kromatografi kan man benytte seg av ulike detektorer. FID er et eksempel på en mye brukt detektor ved analyse av FAMES (Eder, 1995). I en GC-MS tar man derimot i bruk et massespektrometer (MS) som detektor. Fordelen med denne er at man kan identifisere ukjente og få bekreftet kjente forbindelser i en prøve. Dette gjøres ved å søke i et referansebibliotek som inneholder massespektrene fra kjente stoffer. Dersom forbindelsen ikke er registrert her, kan spekteret tolkes. For å verifisere spektertolkningen kan spekteret til det antatte stoffet sammenliknes med et spekter av en ren forbindelse av samme sort (Harris, 2007). Spesifisiteten og sensitiviteten til en MS kan forsterkes ved bruk av "selective ion monitoring" (SIM) (Dodds *et al.*, 2005).

Massespekteret er sensitivt og gir både kvalitativ og kvantitativ informasjon. (Harris, 2007). En flammeionisasjonsdetektor (FID) vil kun gi informasjon om retensjonstid og instrumentrespons. Dersom man håndterer komplekse biologiske prøver vil denne detektoren være utilstrekkelig sammenliknet med en MS-detektor, spesielt for fettsyrer det eksisterer lite av i prøvematerialet. Dersom kontaminanter eller koeluerende forbindelser er tilstede, vil det være vanskelig å identifisere fettsyrer kun på bakgrunn av retensjonstid (Dodds *et al.*, 2005). Dette forverres dersom flerumettede fettsyrer er tilstede, noe som er vanlig i for eksempel marine lipider (Mjøs, 2006). Ved bruk av MS som detektor unngås slike problemer (Dodds *et al.*, 2005).

### 1.2.9 Massespektrometri

Et massespektrometer (MS) består av en ionekilde, en masseanalysator og en ionedetektor. Ionekilden er den første komponenten, og her går inngangsmolekylene over på ioneform via ionisering. Det finnes ulike ionisasjonsmetoder, for eksempel elektronionisasjon. Etter ioniseringen blir ionene akselerert inn i masseanalysatoren, med lik kinetisk energi, inn i et elektrisk og/eller magnetisk felt. Her separeres de ved avbøyning, med hensyn på masse og ladning. Avslutningsvis treffer ionene detektoren hvor det produseres en elektrisk strøm som blir amplifisert og detektert. Resultatet er et massespekter som viser detektorrespons mot masse over ladning ( $m/z$ ). Dette spekteret er spesifikt for hver forbindelse og omtales som ”forbindelsens fingeravtrykk” (Downard, 2004).

#### *Elektronionisasjon*

Elektronionisasjon er en mye brukt ioniseringsmetode fordi den resulterer i fragmentering av molekylioner (Harris, 2007). Et filament befinner seg på utsiden av ionekilden, med en potensialforskjell på 70eV. Filamentet (katode), produserer elektroner som går i spiralformede baner mot en anode i ionekilden. På denne måten vil prøvemolekylene som befinner seg inne i ionekilden, inngangsmolekylene, bombarderes med elektroner. Dette kan føre til at ett eller flere elektroner blir slått ut fra sine respektive orbital, slik at man ender opp med et radikalt kation. Siden dette ionet vil ha samme masse som inngangsmolekylet kalles det molekylionet,  $M^+$ :



I massespektrometri vil de fleste ionene være positivt ladde. Etter ioniseringen kan molekylionet danne fragmenter på grunn av høy resterende indre energi etter bombarderingen. Disse fragmentene kan være ioner, nøytrale eller radikale. Faktorer for dannelsen av slike fragmenter avhenger av styrken på bindingene som må brytes, stabiliteten av fragmenteringsproduktet og den indre energien til selve fragmentionene (Downard, 2004).

#### *Magnetisk sektor masseanalysator*

Etter at ionene er dannet, akselereres de ut av ionekilden, som har en spenningsdifferanse,  $V$ . Ved utgangen av ionekilden er den kinetiske energien,  $E_k$ , til ioner med masse,  $m$ , og ladning,  $z$ :

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = zeV \quad [\text{Likning 1.3}]$$

## Innledning

$v$  og  $e$  tilsvarer henholdsvis hastighet og elektronladning.

Ioner med samme ladning skal ideelt sett ha samme kinetiske energi når de forlater ionekilden.

Videre introduseres ionene for masseanalysatoren. Her separeres de på bakgrunn av masse og ladning (Downard, 2004).

Benyttes en magnetisk sektor som masseanalysator, har man en magnet over deler av ionenes bane. Dersom et magnetfelt,  $B$ , står vinkelrett på ionestrømmen, vil ioner med ladning,  $z$ , og hastighet,  $v$ , utsettes for en sentrifugalkraft, gitt ved  $zevB$ . Ioner, med masse  $m$ , vil bevege seg i en sirkulær bane med radius  $r$ , når sentrifugalkraften er lik sentripetalkraften:

$$zevB = \frac{mv^2}{r} \quad [\text{Likning 1.4}]$$

Radien til ionenes sirkulære bane i magnetfeltet er gitt ved:

$$r = \frac{mv}{zeB} \quad [\text{Likning 1.5}]$$

Har man ioner med en bestemt ladning,  $z$ , som beveger seg gjennom et konstant magnetfelt,  $B$ , vil ionebanens radius,  $r$ , kun avhenge av ionenes moment,  $mv$  (likning 1.5). Den magnetiske sektoren separerer dermed ioner med hensyn på deres moment og lettere ioner vil avbøyes mer enn tunge (Downard, 2004).

Tar man hensyn til den kinetiske energien ionene har ved utgangen av ionekilden leder likning 1.4 til:

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2 r^2}{2V} \quad [\text{Likning 1.6}]$$

Ved bestemte verdier av  $V$  og  $B$  vil kun ioner med korresponderende  $m/z$  passere det magnetiske feltet og nå detektoren. Dersom  $B$  og/eller  $V$  endres, vil også ionenes bane endres (Downard, 2004). Ved å skanne  $B$  eller  $V$  over tid kan suksessive observasjoner av ioner med ulik  $m/z$  utføres (de Hoffmann *et al.*, 1999). Ofte er det foretrukket å endre  $B$  fremfor  $V$ . Dette fordi lav akselerasjonsspenning kan føre til at færre ioner forlater ionekilden og når detektoren (Downard, 2004).



## Innledning

Dersom  $z = 1$  for alle ionene, vil den magnetiske sektoren separere disse på bakgrunn av masse, så fremt de har lik kinetisk energi (de Hoffmann *et al.*, 1999). I praksis vil ikke alle ioner med samme masse og ladning forlater ionekilden med lik kinetiske energi. Dette fordi ionene blir dannet ved ulike lokaliteter i ionekilden og til ulik tid. Dette resulterer i at ioner med samme masse kan få ulik hastighet og dermed forskjellig avbøyning,  $r$  (Downard, 2004).

Siden den magnetiske sektoren er moment-fokuserende vil dette igjen kunne føre til at ioner med samme masse, men ulik hastighet når detektoren til ulik tid. Dette gir bredere topper og dårligere oppløsning. Det er derfor vanlig å benytte dobbeltfokuserende instrument, hvor det er en elektrostatiske sektor i tillegg til en magnetisk sektor. Den elektrostatiske sektoren separerer ionene med hensyn på deres kinetiske energi (Downard, 2004).

En elektrostatiske sektor består av to kurvede plater med motsatt spenning ( $+E$  og  $-E$ ). Et ion med ladning,  $z$ , og hastighet,  $v$ , vil bevege seg gjennom det elektrostatiske feltet når den elektrostatiske kraften er lik sentripetal kraften:

$$zeE = \frac{mv^2}{r} \quad [\text{Likning 1.7}]$$

hvor  $E$  tilsvarer den elektrostatiske feltstyrken.

Ettersom den kinetiske energien til et ion er lik  $zeV$  vil ionebanens radius,  $r$ , bli:

$$r = \frac{2V}{E} \quad [\text{Likning 1.8}]$$

Ionenes avbøyning avhenger kun av akselerasjonsspenningen og styrken på det elektrostatiske feltet, ikke av ionenes masse eller ladning.

Sektorinstrumenter med normal geometri har den magnetiske sektoren foran den elektrostatiske i ioneretningen, kalt BE-geometri. Instrumenter med motsatt rekkefølge har omvendt geometri, kalt EB-geometri (Downard, 2004).

## **Spektertolking**

Hovedelementene i spektertolking er å finne riktig struktur på bakgrunn av masse/ladningsforholdet til molekylion og fragmenter. Funksjonelle grupper og isomere har karakteriske fragmenteringsmønstre som kan gjenkjennes i massespekteret. Vanligvis vil molekylion og fragmentioner ha en  $z$ -verdi lik 1 etter elektronionisasjon. I et slikt spekter vil

## Innledning

toppenes verdi på x-aksen gjenspeile den eksakte massen til et eventuelt molekylion og fragmentioner (Downard, 2004).

Ved å finne molekylionet, kan man oppdrive en mulig summeformel. Dersom molekylionet ikke er synlig ved bruk av elektronionisasjon, kan elektronenergien over filamentet reduseres eller det kan tas i bruk kjemisk ionisering. Dersom man har en antagelse på hva m/z-verdien av molekylionet er, kan man finne ut om summeformelen inneholder nitrogen via nitrogenregelen. Nitrogenregelen forteller at dersom molekylionet har partallsverdi antyder dette null eller et like antall nitrogenatomer. Er molekylion-verdien et oddetall, gir dette et oddetalls antall nitrogenatomer.

Intensitetsfordelingen av enkelte isotoper kan benyttes til å finne antallet av gitte atomer i summeformelen og ved bruk av likningen for dobbeltbindingsekvivalenten kan antall dobbeltbindinger i strukturen bestemmes. For å benytte denne må elementsammensetningen være kjent.

$$DBE = (a + 1) - \left( \frac{b - d}{2} \right) \quad [\text{Likning 1.9}]$$

### 1.2.3 GC-MS

Denne kombinasjonen gir mulighet for å separere forbindelser i en prøve og deretter kvalitativt og kvantitativt bestemme forbindelsene. Etter frigjøring fra GC-kolonnen går de separerte analyttene gjennom en interface som kobler GCen og MSen for å minimere nivået av bæregass og dermed senker trykket. Dette er nødvendig fordi en GC opererer ved høyt trykk, mens en MS opererer i vakuum. Det er derfor vanlig å benytte kapillærkolonner ved en slik kobling fordi disse separerer analytter ved lave konsentrasjoner og dermed minimeres mengden bæregass i GCen. Gode pumpesystemer er også viktig ved en slik kobling (Downard, 2004).

## 1.3 FORVENTEDE RESULTATER

### 1.3.1 Mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider

Ved bruk av konvensjonelle metoder (Morrison & Smith, 1964) har syrekatalysert transesterifisering av triglyserider for dannelse av FAMEs blitt utført på 25 minutter, med ~ 100% utbytte. Majewski *et al.* (2009) har oppnådd dette på 20 minutter ved bruk av mikrobølger. Det ble derfor forventet en optimal reaksjonstid på 20 minutter eller mindre, med et tilsvarende utbytte, uten dekomponering eller dannelse av biprodukter ved mikrobølgeassistert transesterifisering. Etersom tidligere studier rapporterer om fullstendig transesterifisering av triglyserider, ble det derfor ikke forventet at fettsyrenes posisjon hadde betydning for utbytte av FAMEs.

Tidligere arbeid gjort med sphingomyelin (Devle *et al.*, 2011) og frie fettsyrer (Rafdal, 2011) har vist at den optimale effekten for mikrobølgeassistert derivatisering av disse er 70 W. For triglyserider ble det da forventet at en tilsvarende effekt ville være best egnet.

Triglyserider kan transesterifiseres fullstendig med HCl som katalysator ved oppvarming under reflux i ~ 2 timer (Eder, 1995). Siden reaksjonstiden oppnådd av Morrison og Smith (1964) ved bruk av  $\text{BF}_3$  er 4 ganger lavere, ble det forventet en lengre optimal reaksjonstid ved bruk av HCl ved tilsvarende konsentrasjon som  $\text{BF}_3$ . Det ble derfor forventet et lavere utbytte ved samme tidspunkt ved mikrobølgeassistert transesterifisering.

Marinetti (1966) har oppnådd fullstendig transesterifisering av triglyserider ved romtemperatur på 5 minutter ved bruk av  $\text{CH}_3\text{ONa}$  som katalysator. Det ble derfor forventet at reaksjonstiden kunne reduseres ned til sekunder, med tilsvarende utbytte uten dannelse av biprodukter, ved bruk av  $\text{CH}_3\text{ONa}$  som katalysator ved mikrobølgeassistert transesterifisering.

### 1.3.2 Mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer

Det ble tatt i bruk isbad under prøveopparbeidingen slik at temperaturen på prøvene holdt seg på 0 °C. Det ble da forventet å minimalisere fordamping av kortkjedete FAMEs og dermed kunne detektere og kvantifisere FAMEs med kjedelengde < C10.

### 1.3.3 Stabilitetsstudie av OH-FAMEs på GC-MS

Det er utført arbeid med hydroksyfettsyrer tidligere hvor disse har blitt omdannet til de korresponderende metylesterne, uten eller med derivatisering av hydroksylgruppen på alkylkjeden. Derivatisering har blitt gjort for å senke polariteten og øke flyktigheten til analytt før analyse på GC (Jenske & Vetter, 2008; Chance, D. L. *et al.*, 1998). På bakgrunn av dette

## Innledning

ble det forventet at OH-FAMES vil kunne bli analysert på GC-MS, men at kvantifisering kunne være utfordrende. Dette fordi lang retensjonstid og høye temperaturer i en GC kan føre til termisk dekomponering dersom OH-gruppen på alkylkjeden ikke derivatiseres (Borch-Jensen, 1997).

## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 MIKROBØLGEASSISTERT DERIVATISERING, METODEUTVIKLING

#### 2.1.1 Transesterifisering av triglyserider

##### 2.1.1.1 Tillaging av stamløsninger

Fire stamløsninger ble tillagd av triglyseridstandardene vist i tabell 2.1. Standardene inneholdt enkle triglyserider med flerumettede fettsyrer. Heksan ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) ble benyttet som løsningsmiddel og en konsentrasjon på 10.0 mg/mL ble oppnådd i hver stamløsning. For kvantifisering ble det tillagd en stamløsning med internstandard (IS), nonadekansyre metylester, C19:0ME-IS (Larodan AB, Malmö, Sverige), med en konsentrasjon lik 4.0 mg/mL. Denne ble benyttet gjennom hele arbeidet. Stamløsningene ble oppbevart ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### 2.1.1.2 Triglyserider med flerumettede fettsyrer

40  $\mu\text{L}$  ble tatt ut enkeltvis av de fire stamløsningene beskrevet i avsnitt **2.1.1.1** og tilsatt det samme mikrobølgerøret (Biotage Initiator vessel, 0.5-2.0 mL) sammen med 100  $\mu\text{L}$  C19:0ME-IS. Stamløsningene var romtempererte før uttak, og mikrobølgerørene var av borsilikat, som har lav tapstangent og absorberer mikrobølger i liten grad (Kappe *et al.*, 2009). Løsningsmiddelet, her heksan, ble fordampet under  $\text{N}_2$ -gass ved romtemperatur i et avtrekksskap. Videre ble 2.0 mL av en romtemperert løsning bestående av 25%  $\text{BF}_3$ -metanol-løsning (10%  $\text{BF}_3$ -MeOH, Fluka Analytical, Sveits), 20% toluen (anhydrous 99,8%, Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland) og 55% metanol (Chromasolv<sup>®</sup>, Sigma Aldrich) tilsatt.  $\text{BF}_3$ , fungerte som katalysator under derivatiseringen. Toluen ble benyttet fordi transesterifisering av triglyserider som inneholder middels- eller langkjedede fettsyrer må tilsettes et organisk løsningsmiddel for at triglyseridene skal løses i  $\text{BF}_3$ -metanol (Morrison & Smith 1964; Christie, 1972).

En magnetrører ble benyttet i mikrobølgerøret, som ble lukket med en ”cap” bestående av aluminium med teflon septum. På denne måten ble det oppnådd et lukket og tett system. Mikrobølgerøret ble deretter plassert i en Biotage Initiator Microwave Synthesizer (Biotage AB, Uppsala, Sweden) som var innstilt med følgende parametre: -Temperature: Off, -Fixed

## Materialer og metoder

hold time (FHT): Off, -Cooling: On, -Pre-stirring: 15 sec, -Absorption level: High, -Vial type: 0.5-2.0 mL. Prøven ble avkjølt i mikrobølgeovnen til 45 °C før prøveuttak.

Tid og effekt varierte med de ulike forsøkene.

Mikrobølgeraksjonen ble stanset etter forskjellige tidsintervall, og 250 µL av reaksjonsblandingen ble overført til et reagensglass før mikrobølgeraksjonen ble startet igjen. Totalt ble fire slike uttak gjort på mikrobølgeovn per reaksjonsblanding. De 250 µL ble ekstrahert to ganger med 750 µL heksan. Heksanfasen ble overført til en 1.5 mL GC-vial og dampet bort med N<sub>2</sub>-gass ved romtemperatur. Prøvene ble tilslutt reløst i 500 µL heksan. Konsentrasjonen av C19:0ME-IS var 0.1 mg/mL før analyse på GC-MS, som beskrevet i avsnitt 2.3.

**Tabell 2.1.** Triglyseridstandardene benyttet i arbeidet med mikrobølgeassistert transesterifisering av enkle triglyserider med flerumettede fettsyrer (> 99 %, alle fra Nu-Check Prep, Inc, Elysian, USA). Rangert etter retensjonstid av FAMES.

Triglyserid (Summeformel)	IUPAC navn	Fettsyrekjede	Fettsyrekjede	Fettsyrekjede
		Trivialnavn	IUPAC navn	Forkortelse
<b>Trilinolein</b> (C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantriolester av <i>alle cis</i> -9,12- oktadekadiensyre	Linolsyre	<i>alle cis</i> -9,12- oktadekadiensyre	C18:2cΔ9,12
<b>Triarakidonin</b> (C <sub>63</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantriolester av <i>alle cis</i> -5,8,11,14- eicosatetraensyre	Arakidonsyre	<i>alle cis</i> -5,8,11,14- eicosatetraensyre	C20:4cΔ5,8,11,14
<b>Triekosapentaenoin</b> (C <sub>63</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantriolester av 5,8,11,14,17- eicosapentaensyre	EPA	<i>alle cis</i> - 5,8,11,14,17- eikosapentaensyre	C20:5cΔ5,8,11,14,17
<b>Tridokosahexaenoin</b> (C <sub>69</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantriolester av <i>alle cis</i> - 4,7,10,13,16,19- docosaheksaensyre	DHA	<i>alle cis</i> - 4,7,10,13,16,19- docosaheksaensyre	C22:6cΔ4,7,10,13,16, ,19

Konsentrasjon av FAMEs ble funnet basert på integrering av topper i ”total ion current” (TIC) - kromatogrammet. Utregning av utbytte ble utført ved hjelp av formlene:

$$[FAME] = \frac{A_{FAME} \cdot [IS]}{A_{IS} \cdot RRF} \quad [\text{Likning 2.1}]$$

$$\% \text{Utbytte} = \frac{[FAME]}{\text{Teoretisk utbytte av FAME}} \cdot 100\% \quad [\text{Likning 2.2}]$$

[FAME] og [IS] tilsvarer konsentrasjonen av henholdsvis FAME og internstandard, mens  $A_{FAME}$  og  $A_{IS}$  er deres respektive toppareal.

RRF er relativ responsfaktor for hver FAME. Denne beskriver forholdet mellom detektorresponsen til en gitt FAME og en referanse FAME, vanligvis internstandarden (Eder, 1995).

### 2.1.1.3 Triglyserider med enumettede fettsyrer

En stamløsning ble tillagd basert på GLC-referansestandard 53A, tabell 2.2, med en konsentrasjon lik 2.0 mg/mL. 200  $\mu$ L av denne ble overført til et mikrobølgerør og tilsatt en tilsvarende konsentrasjon med C19:0ME-IS. Ellers ble prosedyren beskrevet under avsnitt

2.1.1.2 fulgt.

**Tabell 2.2.** Triglyserider i GLC-referansestandard 53A benyttet i arbeidet med mikrobølgeassistert transesterifisering av enkle triglyserider med enumettede fettsyrer. Rangert etter retensjonstid av FAMES.

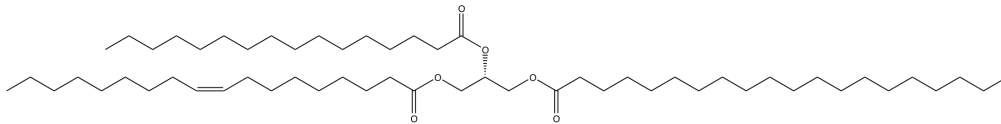
Triglyserid (Summeformel)	IUPAC navn	Fettsyrekjede Trivialnavn	Fettsyrekjede IUPAC navn	Fettsyrekjede Forkortelse	Mengde (%)*
<b>Tripalmitolein</b> (C <sub>51</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantrirolester av <i>cis</i> -9- heksadekaen syre	Palmitolensyre	<i>cis</i> -9- heksadekaen syre	C16:1cΔ9	25
<b>Triolein</b> (C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantrirolester av <i>cis</i> -9- oktadekaen syre	Oljesyre	<i>cis</i> -9- oktadekaen syre	C18:1cΔ9	25
<b>Tri-11- eicosenoin</b> (C <sub>63</sub> H <sub>116</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantrirolester av <i>cis</i> -11- eicosaen syre	EEA	<i>cis</i> -11-eicosaen syre	C20:1cΔ11	25
<b>Trierucin</b> (C <sub>69</sub> H <sub>128</sub> O <sub>6</sub> )	1,2,3- propantrirolester av <i>cis</i> -13- docosaen syre	Erusinsyre	<i>cis</i> -13- docosaen syre	C22:1cΔ13	25

\* Vektprosent av det individuelle triglyseridet i GLC-referansestandard 53A (Nu-Check Prep, Inc, Elysian, USA)

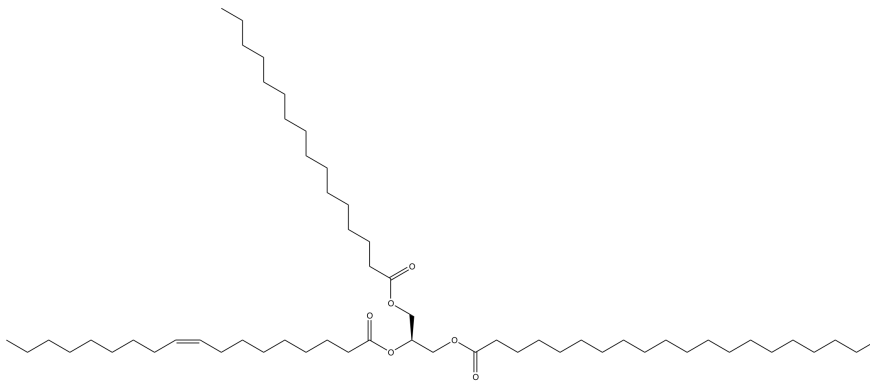


#### 2.1.1.4 Betydning av fettsyrsers posisjon i et triglyserid ved mikrobølgeassistert transesterifisering

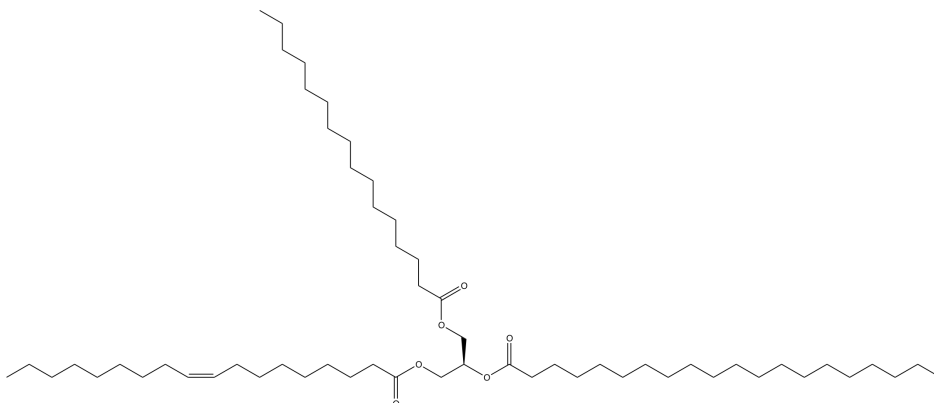
I denne delen av arbeidet ble det benyttet tre sammensatte triglyserider; *sn*-AdPO, *sn*-PAdO og *sn*-AdOP, hvor posisjonen til de ulike fettsyrene var kjent. Figur 2.1, 2.2 og 2.3 viser strukturformelen til disse.



**Figur 2.1:** Strukturformel til *sn*-AdPO.



**Figur 2.2:** Strukturformel til *sn*-AdOP.



**Figur 2.2:** Strukturformel til *sn*-PAdO.

Hvert triglyserid inneholdt tre ulike fettsyrer vist i tabell 2.3. De tre fettsyrene var representert i alle de sammensatte triglyseridene, men i ulike posisjoner.

**Tabell 2.3.** Fettsyrekjedene i de sammensatte triglyseridene (Larodan AB, Malmö, Sverige) benyttet i studiet av fettsyrrers posisjon i et triglyserid. Rangert etter retensjonstid av FAMES.

IUPAC navn	Trivialnavn (trivialnavn forkortelse)	Forkortelse
Heksadekansyre	Palmitinsyre (P)	C16:0
<i>cis</i> -9-oktadekaensyre	Oljesyre (O)	C18:1cΔ9
Eicosansyre	Arakidinsyre (Ad)	C20:0

En stamløsning ble lagd av hvert triglyserid, med en konsentrasjon lik 4.0 mg/mL. 100 µL ble tatt ut fra hver stamløsning og overført til et mikrobølgerør sammen med 100 µL C19:0ME-IS. Resterende steg før GC-MS analyse ble utført på samme måte som i avsnitt 2.1.1.2, med unntak av at effekten på mikrobølgeovnen ble satt til 70 W. Analyse på GC-MS ble utført som beskrevet i avsnitt 2.3.

#### 2.1.1.5 Transesterifisering ved romtemperatur med CH<sub>3</sub>ONa som katalysator - tradisjonell metode.

Denne metoden er hentet fra laboratoriekurset i kromatografi (KJM310) ved IKBM, UMB benyttet høsten 2010 (Devle & Ekeberg, 2010).

40 µL fra hver av triglyserid-stamløsningene, beskrevet i tabell 2.1, ble tilsatt et sentrifugerør sammen med 200 µL fra stamløsningen av GLC-referansestandard 53A og 100 µL C19:0ME-IS. Løsningen i røret ble dampet inn med N<sub>2</sub>-gass og tilsatt 2.0 mL heksan. CH<sub>3</sub>ONa ble tillagd ved å veie opp 5.0 mg metallisk natrium (Na). Dette ble overført til en 5 mL erlenmeyer-kolbe med 1.0 mL metanol og ristet inntil all natrium ble løst. NaOCH<sub>3</sub>-metanolløsningen ble tilsatt sentrifugerøret med triglyseridene. Røret ble plassert på et ristebord (Edmund Bühler, Germany) og ristet i totalt 10 minutter med 400 bevegelser i minuttet. Deretter ble reaksjonsblandingen sentrifugert i 10 minutter ved 7000 rpm på en Heraeus Christ medifuge (Osterode, Tyskland). 250 µL av heksanfasen ble overført til en GC-vial og dampet inn med N<sub>2</sub>-gass. Prøven ble reløst i 500 µL heksan før analyse på GC-MS, se avsnitt 2.3.

### **2.1.1.6 HCl som katalysator ved mikrobølgeassistert transesterifisering**

40 µL av stamløsningene fra triglyseridene i tabell 2.1 ble overført til et mikrobølgerør. Til dette ble 200 µL fra stamløsningen av GLC-referansestandard 53A, tabell 2.3, og 100 µL C19:0ME-IS tilsatt. Ellers ble prosedyren beskrevet under avsnitt **2.1.1.2** fulgt, med unntak av at BF<sub>3</sub>-metanol-toluenløsningen ble erstattet med en HCl-metanol-toluenløsning. Denne løsningen bestod av 25% HCl-metanol-løsning (~1.25 M, Fluka Analytical, Sveits), 20% toluen og 55% metanol. Det ble også utført en fortykning av HCl-MeOH i denne løsningen slik at konsentrasjonen av HCl tilsvarte konsentrasjonen av BF<sub>3</sub> i den ordinære BF<sub>3</sub>-MeOH-toluenløsningen, altså 10%. Ved mikrobølgeassistert transesterifisering ble 70 W benyttet.

### **2.1.1.7 CH<sub>3</sub>ONa som katalysator ved mikrobølgeassistert transesterifisering**

40 µL fra hver av triglyserid-stamløsningene, beskrevet i tabell 2.1, ble overført til et mikrobølgerør. Til det dette ble 200 µL fra stamløsningen av GLC-referansestandard 53A, tabell 2.2, og 100 µL C19:0ME-IS tilsatt. Løsningsmiddelet ble dampet inn under N<sub>2</sub>-gass ved romtemperatur. Dette røret ble deretter tilsatt 100 µL CH<sub>3</sub>ONa i metanol, tillagd som i avsnitt **2.1.1.5**, sammen med heksan til et totalvolum på 2.0 mL. Røret ble cappet før transesterifisering ble utført på mikrobølgeovn. Ellers ble prosedyren beskrevet under avsnitt **2.1.1.2** fulgt, med unntak av at effekten ble satt lik 70 W.

Samme forsøk ble utført for *sn*-AdPO benyttet i avsnitt **2.1.1.4**. Kun ett triglyserid ble valgt da alle de sammensatte triglyseridene inneholdt like fettsyrer. 100 µL *sn*-AdPO ble tatt ut av stamløsningen og tilsatt et mikrobølgerør, sammen med 100 µL C19:0ME-IS.

Løsningsmiddelet ble dampet inn under N<sub>2</sub>-gass og 100 µL NaOCH<sub>3</sub>-løsning ble tilsatt sammen med heksan til et totalvolum på 2.0 mL. Mikrobølgerøret ble cappet og ellers ble prosedyren beskrevet under avsnitt **2.1.1.2** fulgt, med unntak av at effekten ble satt lik 70 W.

## **2.1.2 Metylering av frie fettsyrer**

### **2.1.2.1 Mikrobølgeassistert metylering av frie mettede fettsyrer**

En stamløsning av GLC-referansestandard 412, se tabell 2.4, ble tillagd med en konsentrasjon lik 5.0 mg/mL for C4:0-C7:0, og 3.0 mg/mL for de resterende fettsyrene. En stamløsning av undekansyre etylester, C11:0EE (Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland), ble tillagd for å kvantifisere alle par- og oddetalls mettede fettsyrer fra C4:0 – C13:0. Stamløsningen av denne hadde en konsentrasjon lik 5.0 mg/mL. For kvantifisering av resterende fettsyrene ble C19:0ME-IS tatt i bruk.

## Materialer og metoder

50  $\mu\text{L}$  fra stamløsning av C19:0ME-IS ble overført til et mikrobølgeør. Til det samme røret ble 40  $\mu\text{L}$  av C11:0EE-IS og samme volum av GLC-referansestandard 412 tilsatt. Videre ble metoden beskrevet i avsnitt **2.1.1.2** fulgt, med unntak av at kun  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$  ble benyttet som derivatiseringsreagens, og at før hvert prøveuttak etter metylering på mikrobølgeovn, ble prøven avkjølt i 5 minutter på isbad. Sistnevnte ble gjort for å forhindre at kortkjedete FAMES ( $> \text{C}10$ ) skulle fordampe. I den videre opparbeidingen ble prøvene holdt kjølig ved hjelp av isbad. Konsentrasjon av C19:0ME-IS var lik 0.03 mg/mL mens konsentrasjonen av C11:0EE-IS var 0.05 mg/mL før analyse på GC-MS.

**Tabell 2.4.** Fettsyrer i GLC-referansestandard 412 (NuCheck Prep Inc, Elysian, USA) benyttet ved mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer.

IUPAC navn	Trivialnavn	Forkortelse	Mengde (%)
Butansyre	Smørsyre	C4:0	10,53
Pentansyre	Valerinsyre	C5:0	10,53
Heksansyre	Kaprinsyre	C6:0	10,53
Heptansyre	-	C7:0	10,53
Oktansyre	Kaprylsyre	C8:0	5,26
Nonansyre	Pelargonsyre	C9:0	5,26
Dekansyre	Kaprinsyre	C10:0	5,26
Undekansyre	Hendekansyre	C11:0	5,26
Dodekansyre	Laurinsyre	C12:0	5,26
Tridekansyre	-	C13:0	5,26
Tetradekansyre	Myristinsyre	C14:0	5,26
Pentadekansyre	-	C15:0	5,26
Heksadekansyre	Palmitinsyre	C16:0	5,26
Heptadekansyre	Margarinsyre	C17:0	5,26
Oktadekansyre	Stearinsyre	C18:0	5,26

### **2.1.2.2 Metylering av frie mettede fettsyrer på vannbad ved 90 °C**

50 µL fra stamløsning av C19:0ME-IS ble overført til et mikrobølgerør. Til det samme røret ble 40 µL av C11:0EE-IS og samme volum av GLC-referansstandard 412 tilsatt. Heksan ble dampet inn under N<sub>2</sub>-gass ved romtemperatur. Videre ble 2.0 mL BF<sub>3</sub>-MeOH tilsatt. Røret ble cappet, for å få et lukket og tett system, og satt på vannbad ved 90 °C i 2 minutter. Etter metylering på vannbad ble rørene satt til avkjøling på isbad i 5 minutter. 250 µL av reaksjonsblandingen ble overført til et reagensglass og ekstrahert to ganger med 750 µL heksan. Heksanfasen ble overført til en 1.5 mL GC-vial og dampet inn med N<sub>2</sub>-gass. Prøvene ble tilslutt reløst i 500 µL heksan. Konsentrasjon av C19:0ME-IS var lik 0.03 mg/mL mens konsentrasjonen av C11:0EE-IS var 0.05 mg/mL før analyse på GC-MS, utført som i avsnitt 2.3.

### **2.1.2.3 Mikrobølgeassistert metylering av frie mettede fettsyrer ved 90 °C**

50 µL fra stamløsning av C19:0ME-IS ble overført til et mikrobølgerør. Til det samme røret ble 40 µL av C11:0EE-IS og samme volum av GLC-referansstandard 412 tilsatt. Heksan ble dampet inn under N<sub>2</sub>-gass og 2.0 mL BF<sub>3</sub>-MeOH-løsning ble tilsatt det samme røret. Røret ble cappet, og metylering på mikrobølgeovnen ble utført med følgende parametre: -Time: 2 min, -Temperature: 90 °C, -Power: Off, -Fixed hold time (FHT): Off, -Cooling: On, -Pre-stirring: 15 sec, -Absorption level: High, -Vial type: 0.5-2.0 mL. Etter metylering på mikrobølgeovnen ble rørene satt til avkjøling på et isbad i 5 minutter. 250 µL av reaksjonsblandingen ble overført til et reagensglass og ekstrahert to ganger med 750 µL heksan. Heksanfasen ble overført til en 1.5 mL GC-vial og dampet bort med N<sub>2</sub>-gass. Prøvene ble tilslutt reløst i 500 µL heksan. Konsentrasjon av C19:0ME-IS var lik 0.03 mg/mL mens konsentrasjonen av C11:0EE-IS var 0.05 mg/mL før analyse på GC-MS, utført som i avsnitt 2.3.

## **2.2 STABILITETSSTUDIE AV OH-FAMES PÅ GC-MS**

De seks OH-FAMESene i tabell 2.5 ble enkeltvist løst i kloroform (Chromasolv®, Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland) for å lage stamløsninger med en konsentrasjon lik 2.0 mg/mL. Kloroform ble benyttet som løsningsmiddel fordi frie fettsyrer løses bedre i kloroform enn heksan (Hart *et al.*, 2007).

**Tabell 2.5.** *OH-FAMES (Larodan AB, Malmö, Sverige) benyttet til stabilitetsstudier på GC-MS.*

IUPAC navn	Forkortelse
Metyl-2-hydroksy-tetradekanoat	2-OH-C14:0ME*
Metyl-2-hydroksy-heksadekanoat	2-OH-C16:0ME*
Metyl-2-hydroksy-oktadekanoat	2-OH-C18:0ME*
Metyl-3-hydroksy-oktadekanoat	3-OH-C18:0ME*
Metyl-12-hydroksy-oktadekanoat	12-OH-C18:0ME*
Metyl- <i>trans</i> -12-hydroksy-9-oktadekanoat	12-OH-C18:1ME*

\*ME er en forkortelse av metyl.

25 µL av de seks stamprøvene ble overført til hver sin GC-vial og dampet inn under N<sub>2</sub>-gass. Prøvene ble reløst i 500 µL heksan, slik at konsentrasjonen ble lik 0.1 mg/mL. Prøvene ble analysert på GC-MS ved parametrene beskrevet i avsnitt 2.3.

Prøvene ble analysert tre ganger på GC-MS hvor elektronenergien var henholdsvis 70 eV, 50 eV og 30 eV.

## 2.3 INSTRUMENTERING VED GASSKROMATOGRAFI- MASSESPEKTROMETRI (GC-MS) ANALYSE

Alle opparbeidede prøver ble identifisert og kvantifisert på GC-MS. Det ble tatt i bruk en Autospec Ultima GC-MS (Micromass Ltd. Manchester, England) til dette formålet.

### 2.3.1 Gasskromatograf (GC)

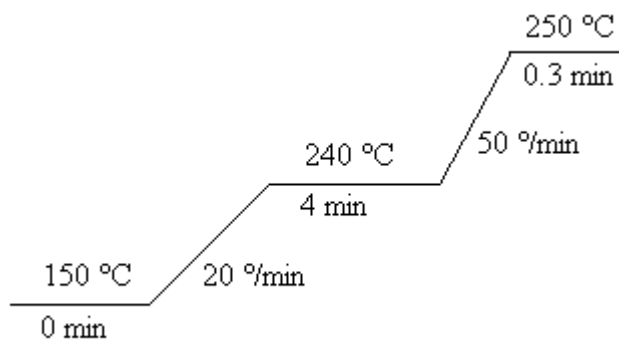
Gasskromatografen som ble benyttet i GC-MS kombinasjonen var en Agilent 6890 Series gasskromatograf (Agilent Technology, Wilmington, DE, USA). Denne var utstyrt med en CTC PAL Auto sampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Sveits). Kolonnen var en polar 50 m CP-Sil 88 kapillærkolonne med en indre diameter på 0.25 mm og 0.20 µm filmtykkelse (Varian, Middelburgh, Nederland). Helium (99.9999%, Yara, Rjukan, Norge) ble benyttet som bæregass ved et konstant trykk på 95kPa.

## Materialer og metoder

Injeksjonstemperaturen var satt til 250 °C. Injeksjonene ble utført med et splitt-forhold på 1:10 og injeksjonsvolumet var 1 µL. Heksan og metanol ble tatt i bruk for å vaske injektorsprøyten før og etter hver injeksjon. Purge flow var 10 mL/min og purge time var 2 minutter.

### *Temperaturprogram for triglyserider*

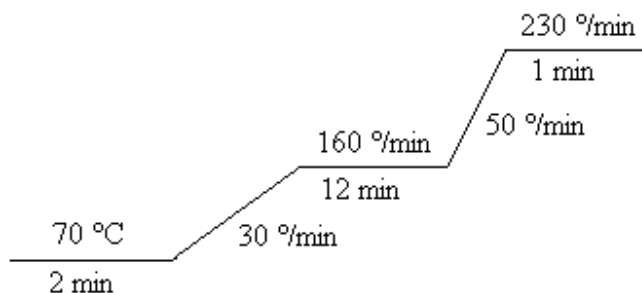
GC-ovnen ble kjørt med et temperaturprogram, se figur 2.1, som hadde en initial temperatur på 150 °C. Den totale analysetiden var 9.00 minutter.



**Figur 2.1:** Temperaturprogram benyttet ved analyse på GC-MS for triglyserider.

### *Temperaturprogram for frie fettsyrer*

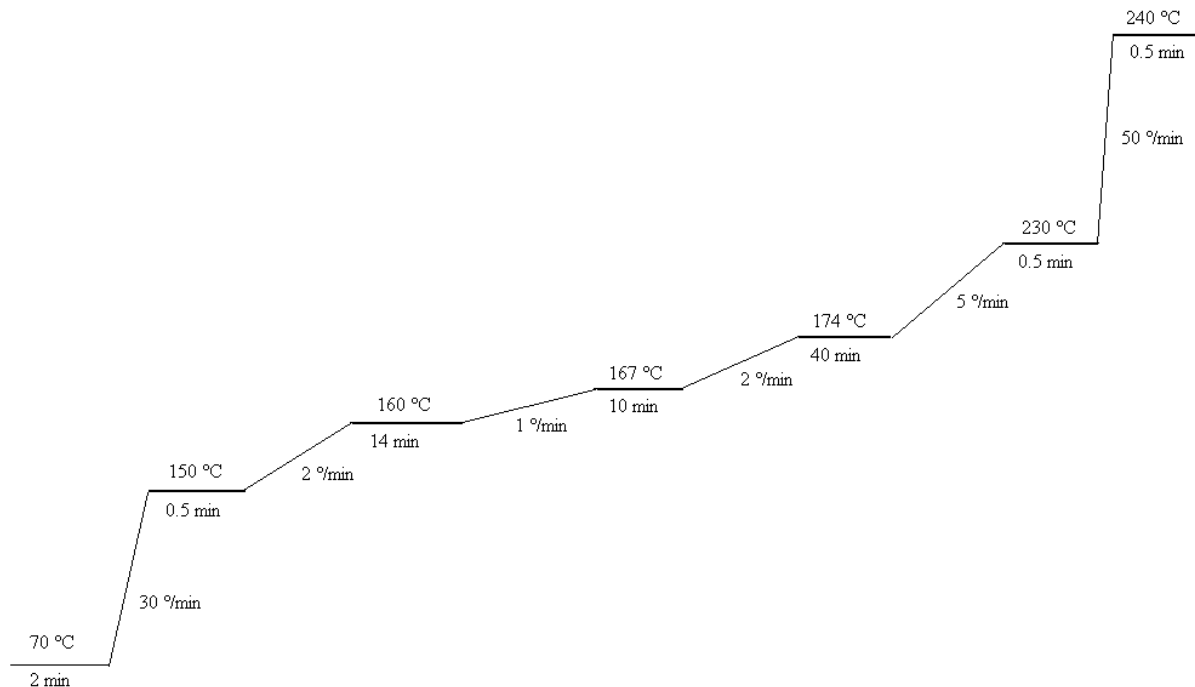
GC-ovnen ble kjørt med et temperaturprogram, se figur 2.2, som hadde en initial temperatur på 70 °C. Den totale analysetiden var 19.40 minutter.



**Figur 2.2:** Temperaturprogram benyttet ved analyse på GC-MS for frie fettsyrer.

### **Temperaturprogram for OH-FAMEs**

GC-ovnen ble kjørt med et temperaturprogram, se figur 2.3, som hadde en initial temperatur på 70 °C. Den totale analysesiden var 97 minutter.



**Figur 2.3:** Temperaturprogram benyttet ved analyse på GC-MS for OH-FAMEs.

### **2.3.2 Massespektrometer**

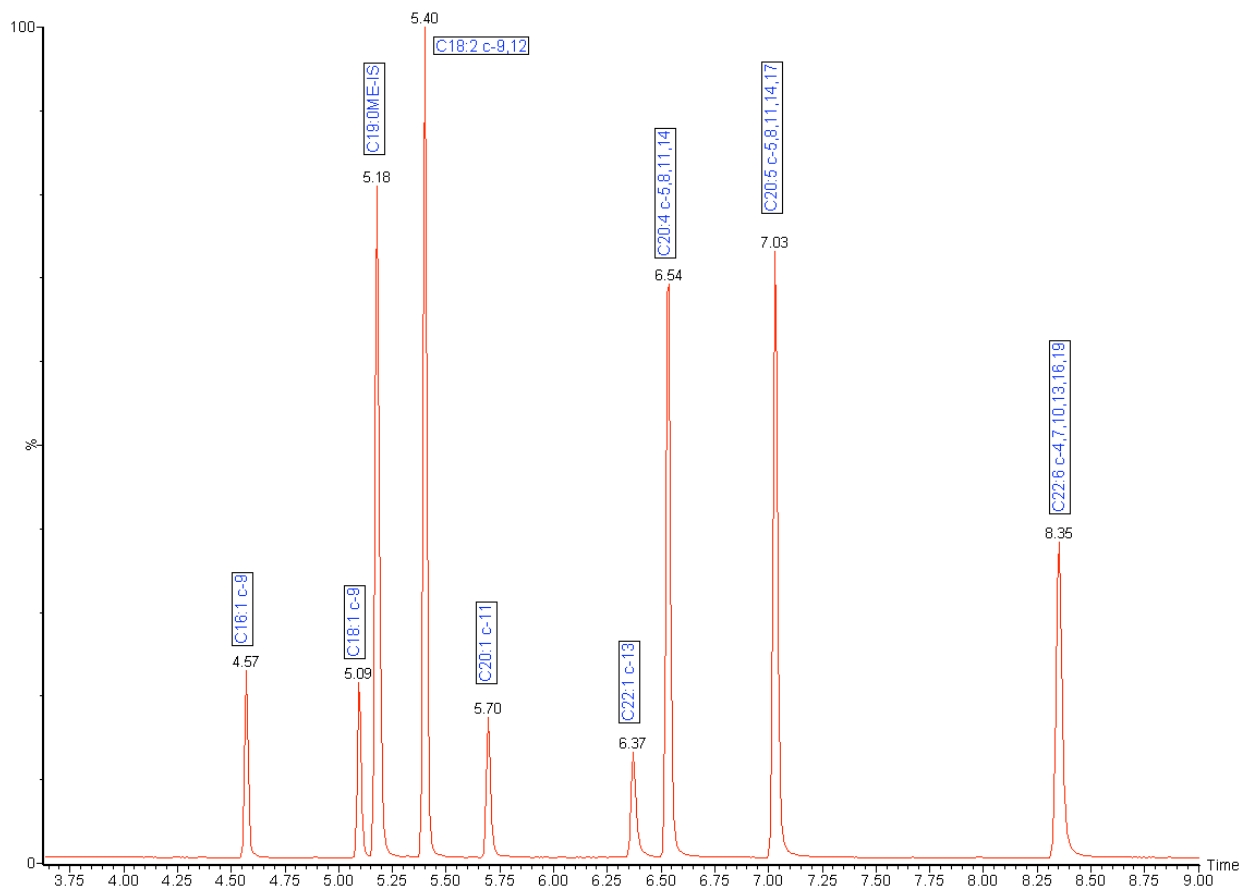
Massespektrometret var utstyrt med en elektronioniseringskilde (EI) som produserte 70 eV elektroner i masseområdet  $m/z$  40-600. Prøvene og internstandard(e) ble identifisert ved hjelp av referansebiblioteket NIST 08 (Gaithersburg, MD, USA), og programvaren benyttet var MassLynx versjon 4.0. (Waters, Milford, MA, USA). Scanningstiden var 0.5 s og interscan forsinkelsestiden var 0.2 s. Massespektrometret hadde EBE-geometri med en oppløsning på 2000. Ionekildetemperaturen var satt til 250 °C, og overføringslinjen ble holdt ved 250 °C.



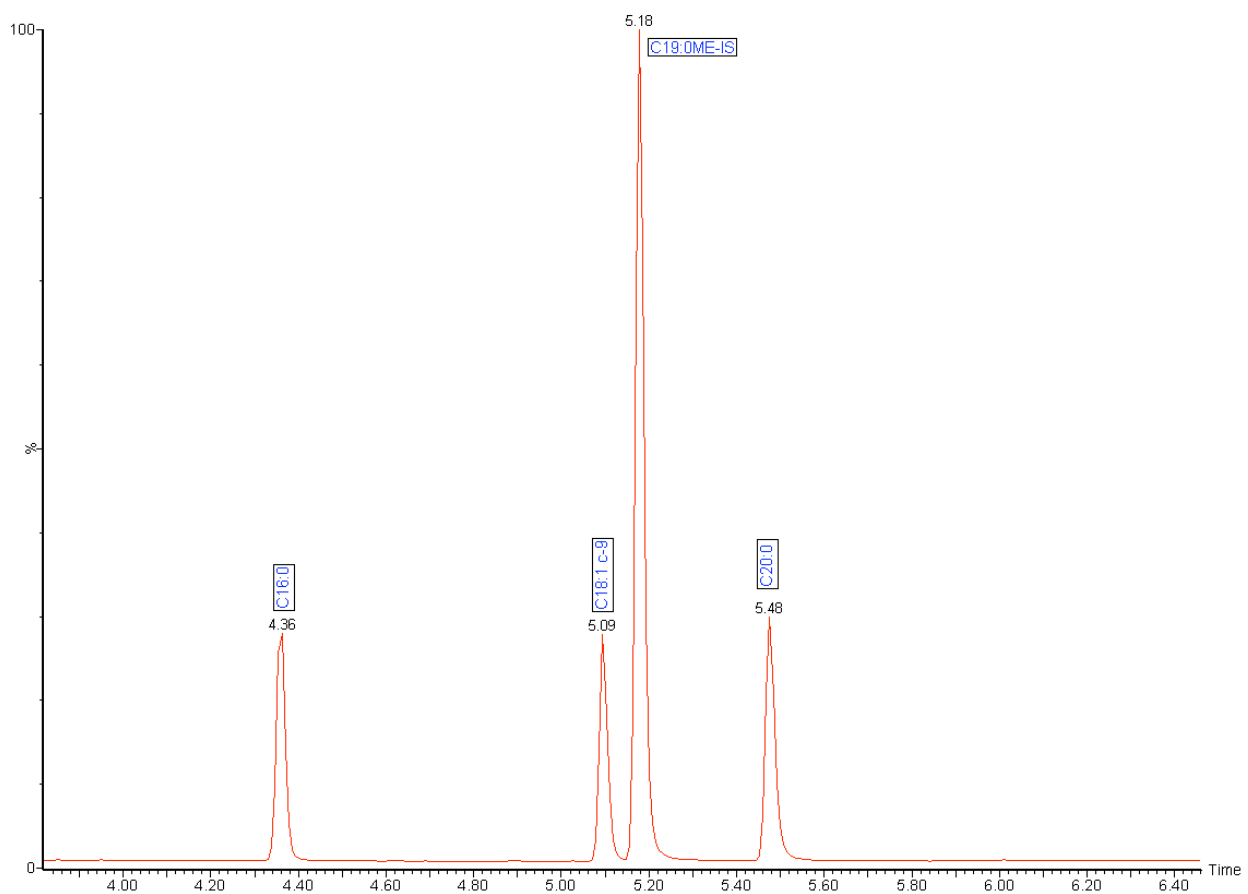
### 3. RESULTATER OG DISKUSJON

#### 3.1 MIKROBØLGEASSISTERT TRANSESTERIFISERING AV TRIGLYSERIDER

FAMEs fra triglyserider ble analysert på GC-MS etter mikrobølgeassistert transesterifisering, hvor  $\text{BF}_3$  ble benyttet som katalysator. Kromatogrammene fra disse analysene er vist i figur 3.1 som presenterer enumettede og flerumettede FAMEs fra enkle triglyserider og figur 3.2 som presenterer mettede og enumettede FAMEs fra sammensatte triglyserider.



**Figur 3.1:** TIC av FAMEs fra triglyserid med flerumettede og enumettede fettsyrer. Konsentrasjonen av enumettede FAMEs er 1:4 i forhold til flerumettede FAMEs og internstandard C19:0ME-IS.



**Figur 3.2:** TIC av *sn-AdPO*\* etter metylering ved bruk av mikrobølger og  $BF_3$ -metanol i 20 minutter ved 70 W. Konsentrasjonen av FAMES fra *sn-AdPO* er 1:3 i forhold til internstandarden C19:0ME-IS.

\*Kromatogrammene til *sn-PAdO* og *sn-AdOP* er nesten identiske med kromatogrammet til *sn-AdPO* og vil derfor ikke bli presentert.

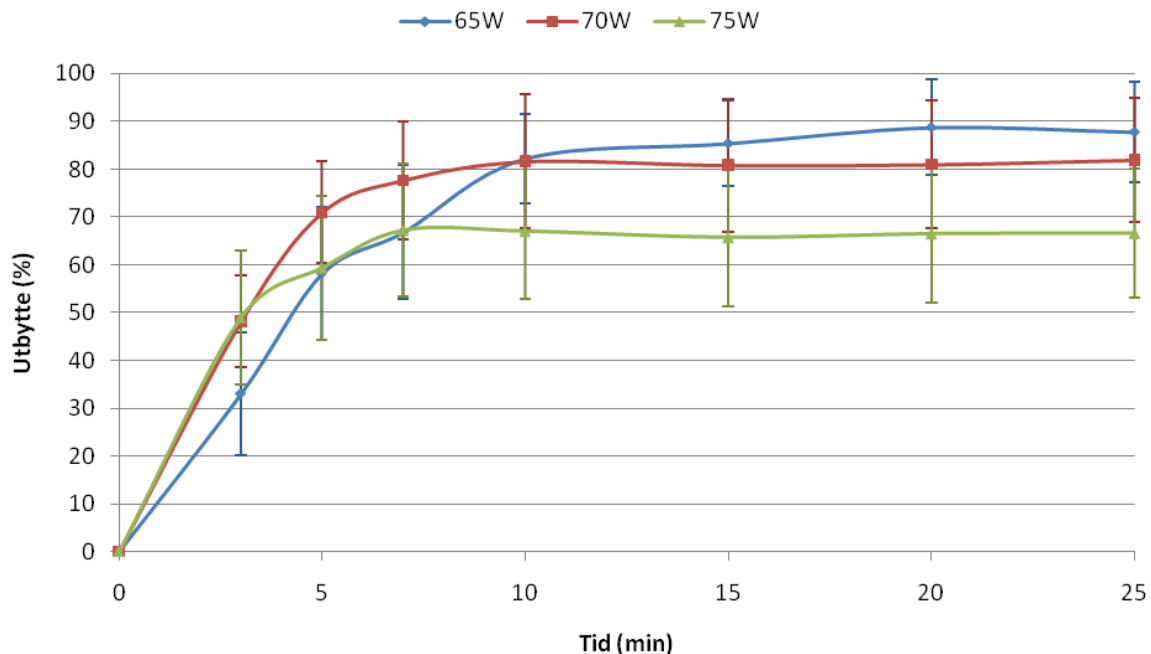
Kromatogrammene er tilnærmet like uavhengig av effekt og transesterifiseringsmetode. Flere kromatogram vil derfor ikke presenteres.

I figur 3.1 og 3.2 er toppene smale, høye og symmetriske, samt de er alle grunnlinjeseparert. Toppene i kromatogrammene representerer kun triglyseridenes respektive FAMES, og som forventet ble ingen dekomponeringsprodukter detektert. Dette vil si at triglyserider som inneholder mettede og umettede fettsyrer med kjedelengde fra 16 til 22 karbon vil kunne identifiseres og kvantifiseres på GC-MS etter mikrobølgeassistert transesterifisering.

Ulike effekter (65, 70 og 75 W) ble benyttet for å finne den optimale ved transesterifisering av triglyserider. Resultatet av dette er presentert i figur 3.3 hvor kurvene representerer

## Resultater og diskusjon

gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av FAMEs fra de enkle triglyseridene oppnådd etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 65, 70 og 75 W.



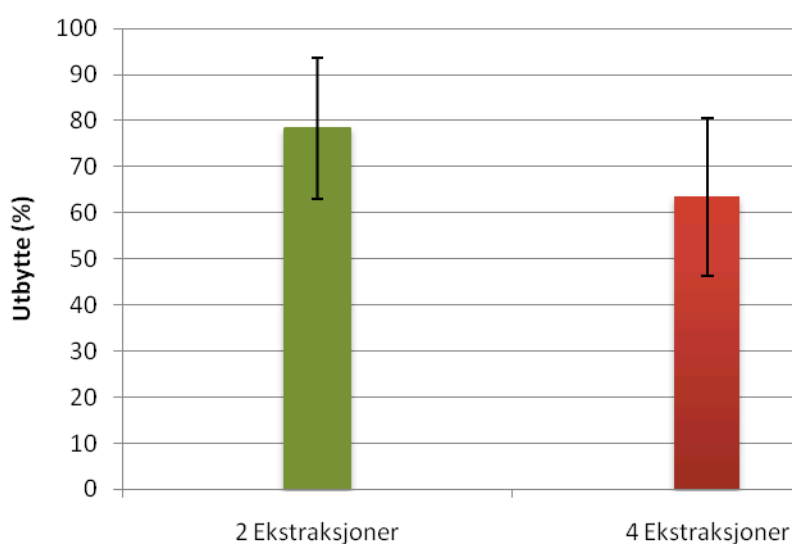
**Figur 3.3:** Gjennomsnittlig utbytte (%) av metylesterne til C16:1, C18:1, C18:2, C20:1, C20:4, C20:5, C22:1 og C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W, 70 W og 75 W. n = 5.

Gjennomsnittlig maksimalt utbytte oppnådd ved 65, 70 og 75 W er henholdsvis  $89\% \pm 10$ ,  $80\% \pm 14$  og  $70\% \pm 14$ . Dette viser at effekt påvirker reaksjonshastigheten og produktdannelse. Det ble observert dårligere utbytte med økende effekt ved dette forsøket, noe som kan tyde på at man bør vurdere å gjenta et tilsvarende eksperiment ved lavere effekt enn 65 W.

Det var forventet og ønskelig med ca. 100% utbytte av FAMEs, men dette ble ikke oppnådd ved de benyttede effektene. En mulig årsak til dette kan være at triglyseridene ikke transesterifiseres fullstendig slik at det dannes mono- og diglyserider som ikke detekteres på GC-MS. Eventuelt kan det forekomme dekomponering under transesterifisering på mikrobølgeovn. Da det ikke ble oppdaget dekomponeringsprodukter i kromatogrammene (figur 3.1 og 3.2), tyder dette på at mulige dekomponeringsprodukter ikke kan detekteres på GC-MS. Ved alle de benyttede effektene flater kurven ut etter et gitt tidspunkt (figur 3.3), og det kan derfor antas at eventuell dekomponering ikke forekommer etter dette.

En annen forklaring på at det ikke observeres 100% utbytte kan ha sammenheng med ekstraksjonsprosedyren. Det er mulig at to ekstraksjoner ikke er tilstrekkelig for å overføre alle mol FAMEs til organisk fase. Det ble derfor forsøkt å øke antall ekstraksjoner, fra to til fire, for å observere om dette kunne føre til et høyere utbytte (McCabe *et al.*, 2005). Det totale ekstraksjonsvolumet forble uendret ved to og fire ekstraksjoner.

Stolpediagrammene i figur 3.4 representerer gjennomsnittlig utbytte av FAMEs hvor det etter mikrobølgeassistert transesterifisering er utført to og fire ekstraksjoner.



**Figur 3.4:** Gjennomsnittlig utbytte (%) av metylesterne til C18:2, C20:4, C20:5 og C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W i 7 min. Det ble utført henholdsvis to og fire ekstraksjoner etter transesterifisering.  $n = 5$ .

Gjennomsnittlig utbytte ved to og fire ekstraksjoner var  $80\% \pm 15$  og  $60\% \pm 17$ . På grunn av overlappende standardavvik vil ikke utbyttet øke ved fire ekstraksjoner, og fire ekstraksjoner er derfor ikke å foretrekke da det er mer tidkrevende.

Fordi økende antall ekstraksjoner ikke øker utbyttet kan det antas at 100% utbytte ikke oppnås på grunn av ufullstendig transesterifisering på mikrobølgeovn eller dekomponering.

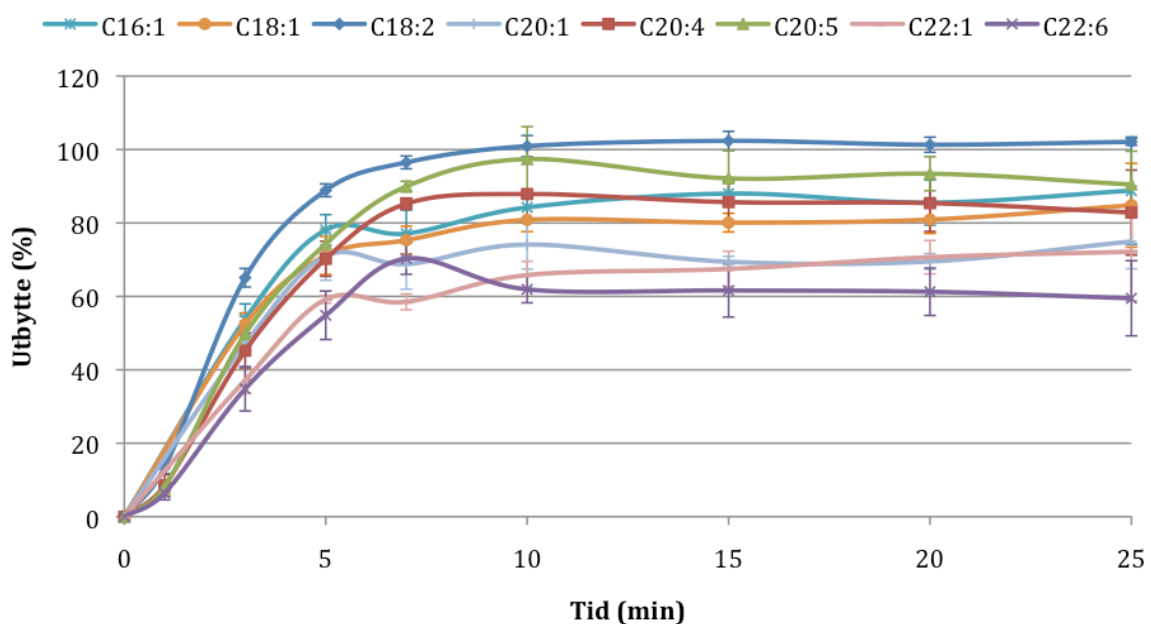
I figur 3.3 oppnås en jevn sigmoid kurve ved 70 W hvor utbyttet øker eksponentielt for deretter å flate ut. Denne formen er mer ideell enn hva som er observert for 65 og 75 W.

Kurven som representerer transesterifisering ved 70 W har det høyeste stigningstallet frem til

## Resultater og diskusjon

7 minutter. Fra og med dette tidspunktet stabiliseres utbytte av FAMEs ved  $\sim 80\%$ . Kurven ved 75 W har like høyt stigningstall som 70 W, men kun frem til 5 minutter, hvor utbytte av FAMEs stabiliseres 10% lavere ( $\sim 70\%$ ). Kurven som representerer 65 W har derimot lavere stigningstall enn de to foregående, og etter 10 minutter flater den ut med et utbytte ved  $\sim 85\%$ . Optimal reaksjonstid etter transesterifisering ved bruk av  $\text{BF}_3$  som katalysator vil derfor være ved 70 W og 7 minutter ( $80\% \pm 12$ ). Som forventet er optimal reaksjonstid ved 70 W og oppnådd innen 20 minutter. På bakgrunn av dette og resultater fra tidligere arbeid (Rafdal, 2011; Devle *et al.*, 2011) benyttes kun 70 W videre ved mikrobølgeassistert transesterifisering.

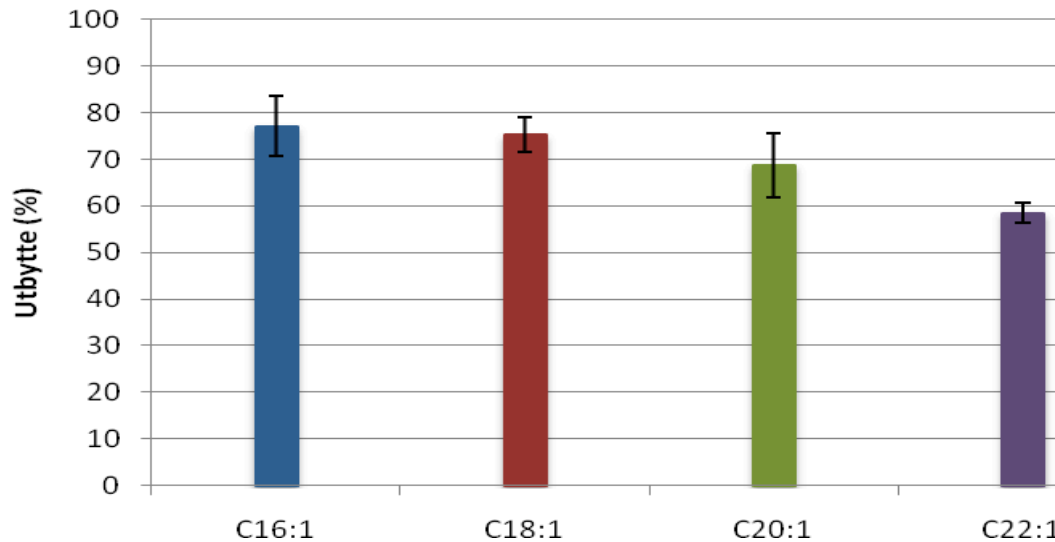
Figur 3.3 viser at standardavviket er noe høyt, med RSD fra 15 til 20%. Dette kommer av at ulike FAMEs gir ulikt utbytte etter transesterifisering på mikrobølgeovn, se figur 3.5.



**Figur 3.5:** Utbytte i prosent av metylesterne til C16:1, C18:1, C18:2, C20:1, C20:4, C20:5, C22:1 og C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.  $n = 5$ .

Standardavviket er lavt for hver enkelt FAME med  $\text{RSD} < 10\%$  (figur 3.5), noe som tilsier god presisjon. Differansen mellom de FAMEs som har høyest og lavest utbytte ved et gitt tidspunkt er  $\sim 40\%$ . Det var ikke forventet at utbyttet til de ulike FAMEsene skulle variere slik på bakgrunn av tidligere arbeid (Morrison & Smith, 1964).

Ettersom utbyttene varierer er det interessant å undersøke om dette avhenger av fettsyrenes kjedelengde og grad av umettethet. Figur 3.6 fremstiller utbyttet av de enumettede FAMEsene etter optimal reaksjonstid ved 70 W.

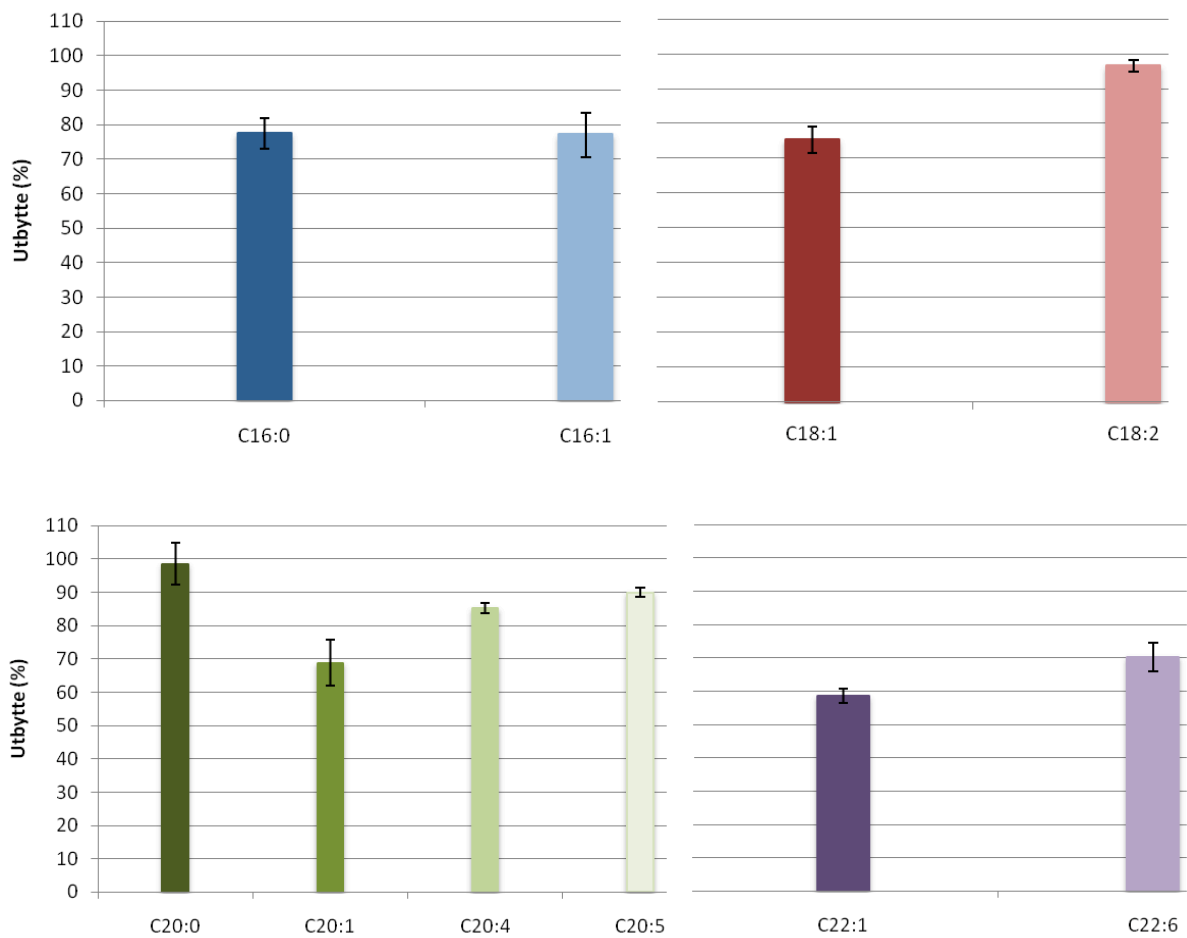


**Figur 3.6:** Utbytte i prosent av enumettede FAMEs med ulik kjedelengde etter transesterifisering på mikrobølgeovn i 7 minutter ved 70 W.  $n = 5$ .

C20:1 ( $69\% \pm 6.8$ ) har høyere utbytte enn C22:1 ( $59\% \pm 2.1$ ), med ikke-overlappende standardavvik. Derimot har C16:1 ( $77\% \pm 6.4$ ), C18:1 ( $75\% \pm 3.8$ ) og C20:1 overlappende standardavvik og indikerer at kjedelengde ikke har betydning for utbyttet ved optimal reaksjonstid.

Figur 3.7 sammenlikner utbyttet ved optimal reaksjonstid for FAMEs med lik kjedelengde og ulik grad av umettethet etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W.

## Resultater og diskusjon

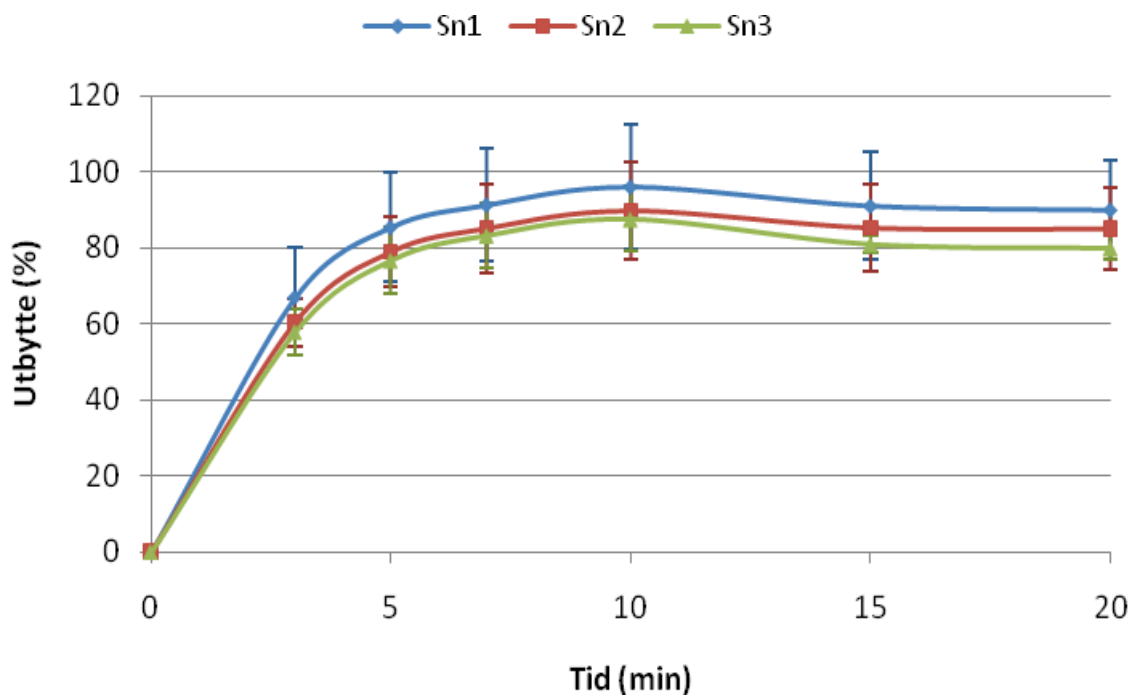


**Figur 3.7:** Utbytte (%) av FAMES med lik kjedelengde, men ulikt antall dobbeltbindinger etter transesterifisering på mikrobølgeovn i 7 minutter ved 70W.  $n = 5$ .

C16:0 ( $77\% \pm 4.5$ ) og C16:1 ( $77\% \pm 6.4$ ) har tilnærmet likt utbytte og overlappende standardavvik. Derimot har C18:2 ( $96\% \pm 1.7$ ) høyere utbytte og ikke-overlappende standardavvik sammenliknet med C18:1 ( $75\% \pm 3.8$ ). Dette er også tilfellet når henholdsvis C22:6 ( $70\% \pm 4.3$ ) og C22:1 ( $59\% \pm 2.1$ ) sammenliknes. Utbyttet øker med økende grad av umettethet også når C20:1 ( $69\% \pm 6.8$ ), C20:4 ( $85\% \pm 1.5$ ) og C20:5 ( $90\% \pm 1.4$ ) sammenliknes, da disse har ikke-overlappende standardavvik. Dersom C20:2 og C20:3 hadde blitt transesterifisert på tilsvarende måte kan det være at denne observerte trenden ikke hadde vært like tydelig. I tillegg har C20:0 ( $99\% \pm 6.2$ ) høyere utbytte enn C20:1, C20:4 og C20:5. Dermed indikerer figur 3.7 at utbyttet ikke avhenger av antall dobbeltbindinger dersom man sammenlikner FAMES med lik kjedelengde.

Tre ulike sammensatte triglyserider (*sn*-AdPO, *sn*-PAdO, *sn*-AdOP), som inneholdt tre like fettsyrer, ble transesterifisert på mikrobølgeovn for å undersøke om fettsyreposisjon påvirker

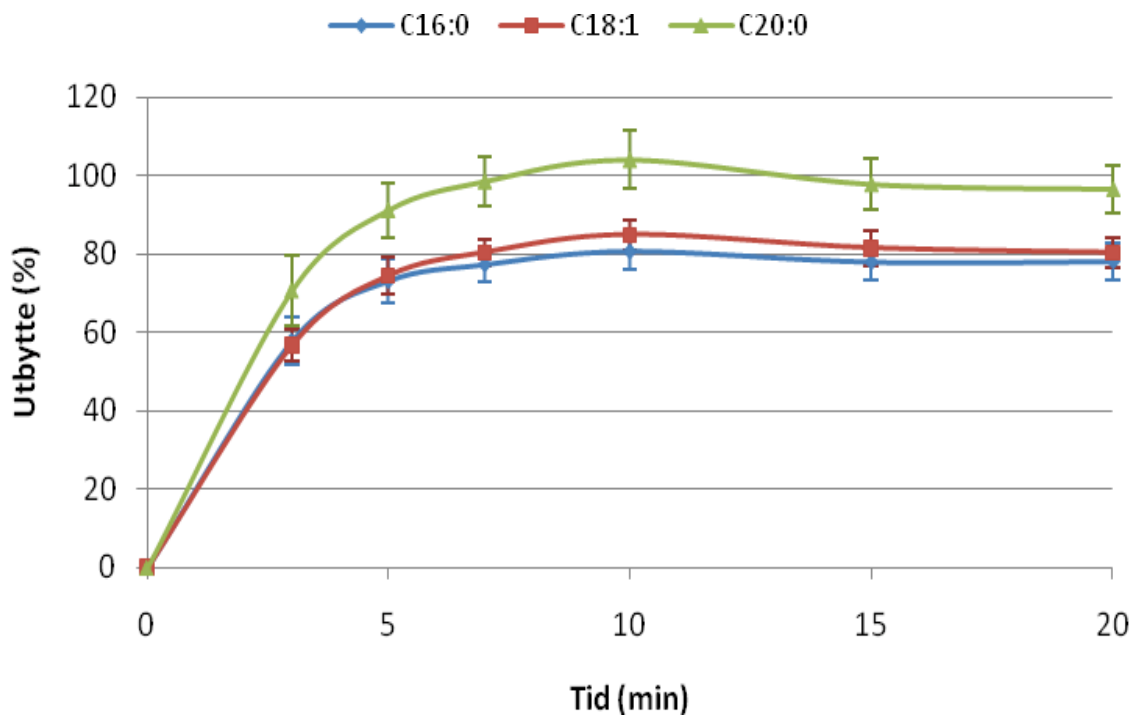
utbyttet. Figur 3.8 viser gjennomsnittlig utbytte av FAMEs i samme posisjon hos de tre sammensatte triglyseridene.



**Figur 3.8:** Sammenlikning av gjennomsnittlig utbytte (%) av FAMEs fra samme posisjon fra tre sammensatte triglyserider (*sn-AdPO*, *sn-PAdO*, *sn-AdOP*) etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.  $n = 5$ .

Kurvene, som representerer utbytte av FAMEs fra ulike fettsyreposisjoner, har overlappende standardavvik ved alle tidspunkt. Etter optimal reaksjonstid, 7 minutter, er det gjennomsnittlige utbyttet i posisjon *sn1*, *sn2* og *sn3* henholdsvis  $90\% \pm 15$ ,  $90\% \pm 12$  og  $83\% \pm 8.5$ . Som forventet tyder dette på at fettsyreposisjon ikke har betydning for utbyttet, men som observert i figur 3.5 er det type FAME som påvirker utbyttet, se figur 3.9.



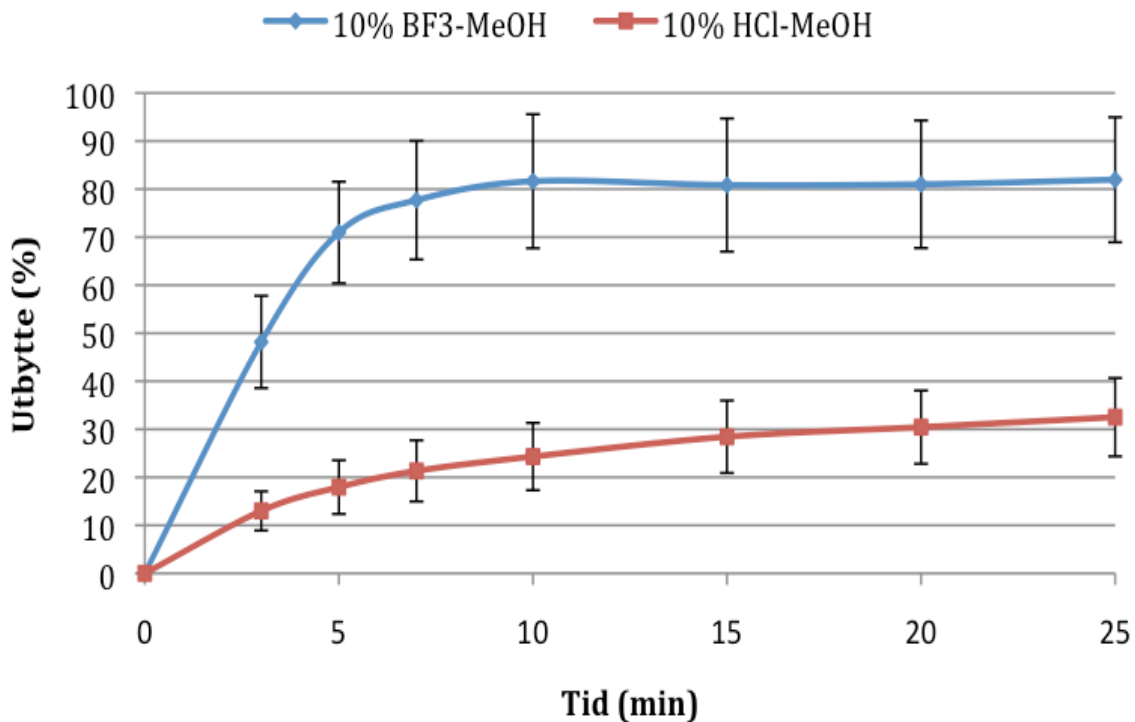


**Figur 3.9:** Gjennomsnittlig utbytte (%) av FAMES fra *sn-AdPO*, *sn-PAdO* og *sn-AdOP* etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.  $n = 5$ .

C20:0 har ved samtlige tidspunkt høyere utbytte og ikke-overlappende standardavvik, sammenliknet med C16:0 og C18:1. C16:1 ( $77\% \pm 4.5$ ), C18:1 ( $80\% \pm 3.4$ ) og C20:0 ( $99\% \pm 6.2$ ) har ved optimal reaksjonstid (7 minutter) lave standardavvik med RSD < 7%.

For å undersøke om en identisk fettsyre i et sammensatt og enkelt triglyserid ga tilsvarende utbytte etter mikrobølgeassistert transesterifisering, ble utbytte av C18:1 fra et sammensatt og enkelt triglyserid sammenliknet. Disse ga et tilnærmet likt utbytte på henholdsvis  $85\% \pm 3.9$  og  $81\% \pm 3.2$  (figur 3.9 og 3.5) og har overlappende standardavvik. Dette indikerer at utbytte av FAMES er uavhengig av om man har sammensatte eller enkle triglyserider. For å fastslå dette, burde mikrobølgeassistert transesterifisering utføres på flere sammensatte og enkle triglyserider med like fettsyrekjeder.

Det ble undersøkt om HCl var en bedre egnet katalysator enn  $\text{BF}_3$  med hensyn på reaksjonstid og utbytte av FAMES. HCl i metanol ble derfor benyttet ved tilsvarende konsentrasjon som  $\text{BF}_3$  i metanol (10%) ved mikrobølgeassistert transesterifisering slik at gjennomsnittlig utbytte av FAMES kunne bli sammenliknet (figur 3.10).



**Figur 3.10:** Gjennomsnittlig utbytte (%) av alle metylesterne til C16:1, C18:1, C18:2, C20:1, C20:4, C20:5, C22:1 og C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved bruk av 10% BF<sub>3</sub> og 10% HCl i metanol ved lik effekt, 70 W. n = 5.

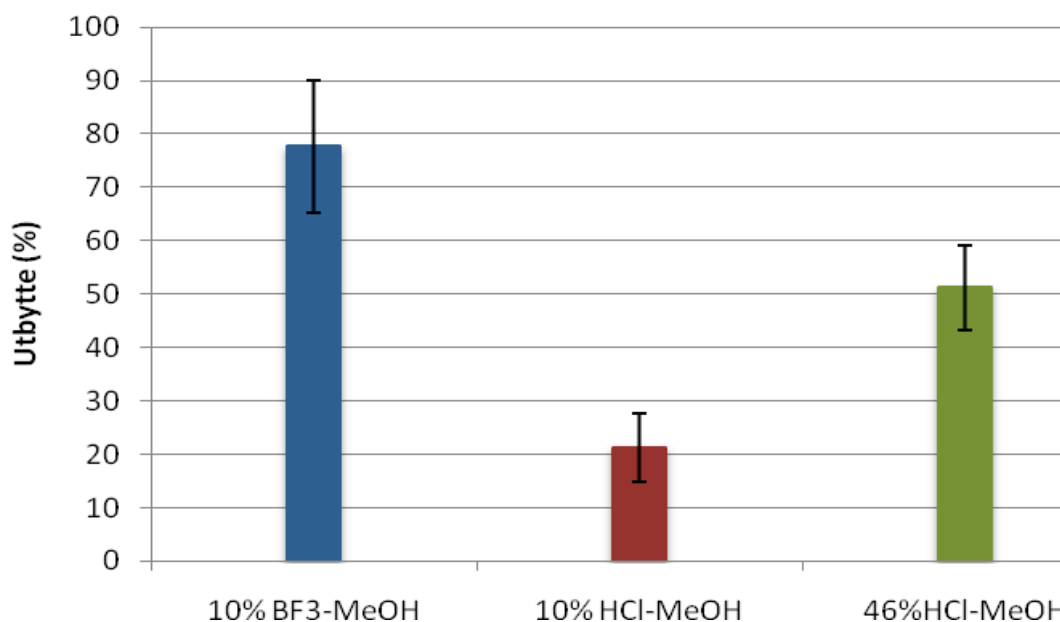
Kurven som representerer HCl stiger frem til 25 minutter og når ikke et synlig toppunkt.

Transesterifisering med HCl er ikke utført etter dette tidspunktet, da det ved bruk av BF<sub>3</sub> som katalysator oppnås optimal reaksjonstid ved 7 minutter.

Etter 7 minutter er det gjennomsnittlige utbytte av FAMES ved bruk av BF<sub>3</sub> og HCl henholdsvis 80% ± 12 og 21% ± 6.4. Ved bruk av BF<sub>3</sub> er standardavviket ~ 2 ganger høyere sammenliknet med HCl, men ettersom utbytte er ~ 4 ganger høyere, blir RSD halvparten så lav for BF<sub>3</sub> (RSD = 16%). Dette tyder på at metoden hvor BF<sub>3</sub> benyttes som katalysator, gir høyere utbytte og bedre presisjon, sammenliknet med HCl. HCl gir også vesentlig lavere utbytte ved samtlige tidspunkt. Dette kan forklares ved at HCl er mindre elektronegativ enn BF<sub>3</sub> og vil bidra mindre til ladningsforskyvelsen i triglyseridet, slik at transesterifiseringen vil foregå langsommere (Hart *et al.*, 2007).

Ved å øke konsentrasjonen av HCl i metanol til 46% ble det undersøkt om det kunne oppnås en optimal reaksjonstid og utbytte tilsvarende som for BF<sub>3</sub>.

Figur 3.11 sammenlikner utbytte av FAMEs etter transesterifisering i 7 minutter ved bruk av  $\text{BF}_3$  og  $\text{HCl}$  som katalysator.

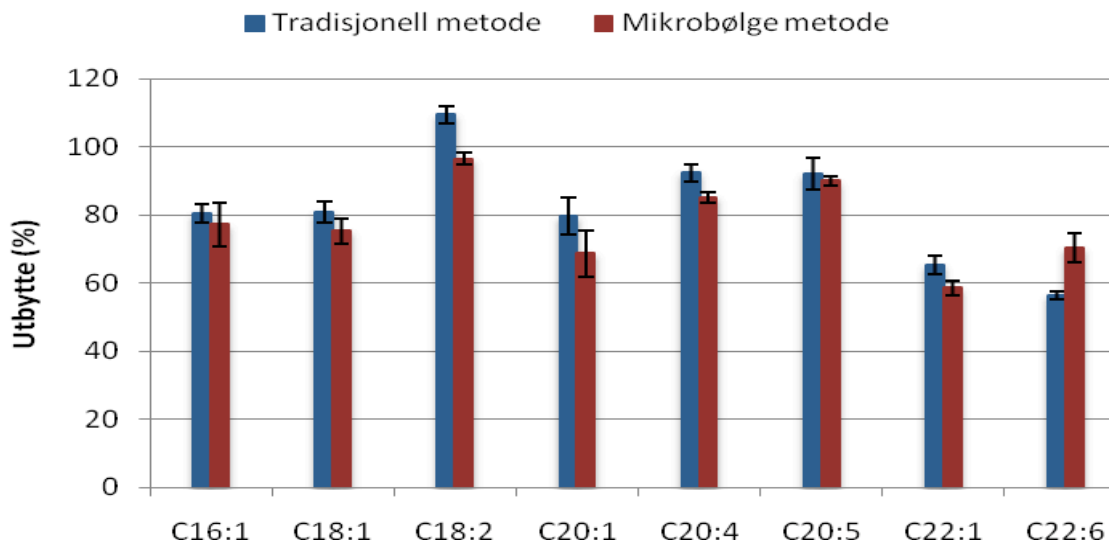


**Figur 3.11:** Gjennomsnittlig utbytte (%) av metylesterne til C16:1, C18:1, C18:2, C20:1, C20:4, C20:5, C22:1 og C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W i 7 minutter.  $\text{HCl}$  og  $\text{BF}_3$  ble benyttet som katalysatorer.  $n = 5$ .

Ved å øke konsentrasjonen av  $\text{HCl}$  i metanol fra 10 til 46%, øker det gjennomsnittlige utbytte av FAMEs med 30% (fra 21% ± 6.4 til 51% ± 7.9). Likevel gir 46%  $\text{HCl}$  lavere gjennomsnittlig utbytte sammenliknet med 10%  $\text{BF}_3$  (80% ± 12). Det kan derfor være nødvendig å øke konsentrasjonen av  $\text{HCl}$  i metanol ytterligere for å oppnå tilsvarende optimal reaksjonstid som for  $\text{BF}_3$ . Standardavvikene er ikke-overlappende og dermed vil 10%  $\text{BF}_3$  i metanol anbefales fremfor 10 - 46%  $\text{HCl}$  i metanol ved mikrobølgeassistert transesterifisering.

Videre ble det undersøkt om  $\text{BF}_3$ -katalysert mikrobølgeassistert transesterifisering ga høyere utbytte av FAMEs og lavere reaksjonstid sammenliknet med en tradisjonell metode benyttet på laboratoriekurset i kromatografi (KJM310) ved IKBM, UMB, høsten 2010. Triglyseridene med enumettede og flerumettede fettsyrer ble derfor transesterifisert ved romtemperatur ved å benytte  $\text{CH}_3\text{ONa}$  som katalysator.

Figur 3.12 sammenlikner utbytte av FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering med  $\text{BF}_3$  som katalysator og transesterifisering ved tradisjonell metode. Ved mikrobølgeassistert transesterifisering er utbyttet ved optimal reaksjonstid, 7 minutter, ved 70 W benyttet.



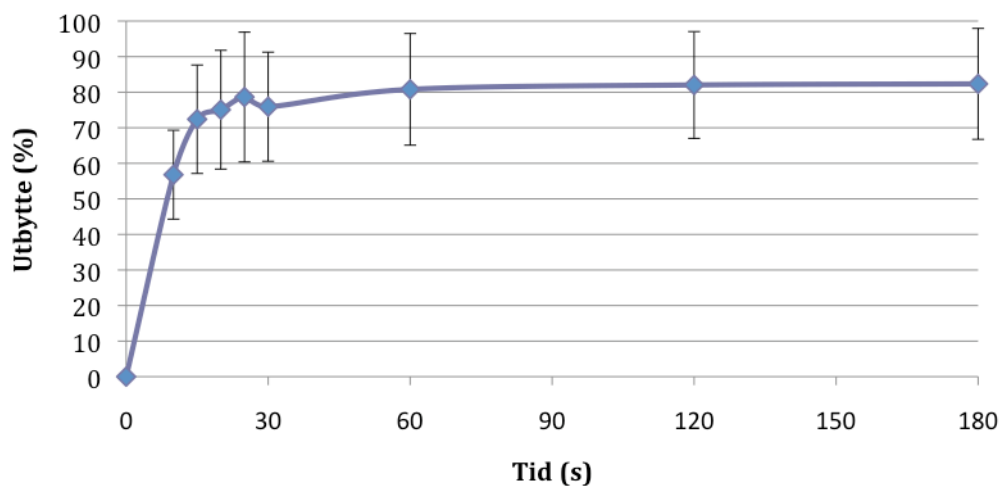
**Figur 3.12:** Utbytte (%) av FAMEs etter transesterifisering ved mikrobølge metode i 7 minutter ved 70 W og tradisjonell metode.  $n = 5$ .

I figur 3.12 observeres det at utbytte avhenger av FAME også ved transesterifisering med tradisjonell metode. Ved denne metoden gir FAMEs av C18:2, C20:4 og C22:1 høyere utbytte, uten overlappende standardavvik, sammenliknet med mikrobølge metoden. Det motsatte observeres for C22:6. Utbyttene til de resterende FAMEs har overlappende standardavvik ved sammenlikning av metodene. I begge metodene er RSD for hver enkelt FAME mindre enn 10%, noe som tilsier god presisjon. Dersom gjennomsnittlig utbytte av alle FAMEs beregnes er utbyttet oppnådd ved tradisjonell og mikrobølge metode henholdsvis  $80\% \pm 17$  (vedlegg, tabell 56) og  $80\% \pm 12$ . Det gjennomsnittlige utbyttet av alle FAMEs er likt, men standardavviket og RSD er noe lavere for mikrobølge metoden. For tradisjonell metode er transesterifisering utført på 10 minutter, men i tillegg sentrifugeres prøvene i 10 minutter. Ettersom optimal reaksjonstid for mikrobølgeassistert transesterifisering er 7 minutter, vil det ta lengre tid (13 minutter) å utføre den tradisjonelle metoden. Da mikrobølge metoden tar kortere tid, med tilsvarende utbytte, vil den være foretrukket fremfor den tradisjonelle metoden hentet fra laboratoriekurset i kromatografi (KJM310) ved IKBM, UMB.

## Resultater og diskusjon

Syre- og basekatalysert mikrobølgeassistert transesterifisering er også sammenliknet for å undersøke om basekatalysatoren  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ville gi lavere reaksjonstid og høyere utbytte av FAMEs sammenliknet med syrekatalysatoren,  $\text{BF}_3$ .

Kurven i figur 3.13 representerer utbytte av alle FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W med  $\text{CH}_3\text{ONa}$  som katalysator.



**Figur 3.13:** Gjennomsnittlig utbytte (%) av metylesterne til C16:0, C16:1, C18:1\*, C18:2, C20:0, C20:1, C20:4, C20:5, C22:1 og C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.  $n = 5$ .

\* Utbytte av C18:1 er gjennomsnittlig utbytte oppnådd fra et enkelt og et sammensatt triglyserid, som begge inneholder denne fettsyren.

Kurven (figur 3.13) har høyt stigningstall frem til 20 sekunder, hvor utbytte av FAMEs stabiliseres ved  $\sim 80\%$ . Ved dette tidspunktet flater kurven ut, noe som indikerer at det ikke dannes flere FAMEs via transesterifisering. Optimal reaksjonstid ved bruk av  $\text{CH}_3\text{ONa}$  vil derfor være 20 sekunder ( $80\% \pm 17$ ). Som forventet er optimal reaksjonstid oppnådd under minuttet, men det oppnås ikke 100% utbytte. Dette kan igjen antas å være et resultat av ufullstendig transesterifisering eller dekomponering, noe som kan komme av at metoden ikke er optimalisert etter effekt. Grafen er ikke en jevn sigmoid kurve og har derfor ikke en ideell form. Dette kan muligens oppnås ved optimalisering av metoden.

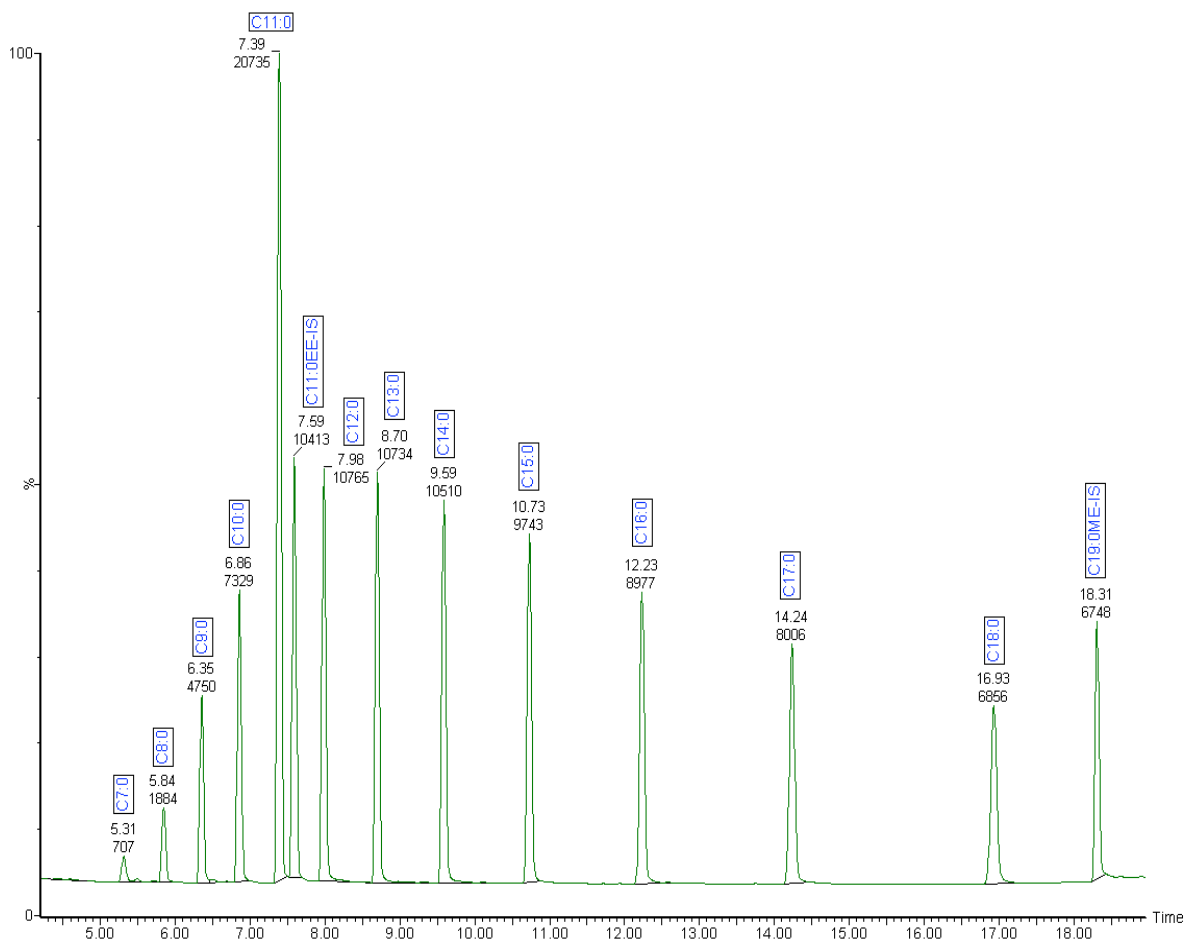
Gjennomsnittlig utbytte etter optimal reaksjonstid ved bruk av  $\text{BF}_3$  og  $\text{CH}_3\text{ONa}$  er  $80\% \pm 14$  og  $80\% \pm 17$ . Det gjennomsnittlige utbyttet er likt for begge katalysatorene ved optimal

## Resultater og diskusjon

reaksjonstid. Ved bruk av  $\text{CH}_3\text{ONa}$  er den optimale reaksjonstiden kun 20 sekunder noe som er ~20 ganger raskere enn ved bruk av  $\text{BF}_3$ . Likevel er standardavvik og RSD noe høyt. Dette kommer av at utbytte avhenger av FAME også ved bruk av  $\text{CH}_3\text{ONa}$  som katalysator og at metoden ikke er optimalisert slik som den er ved bruk av  $\text{BF}_3$ . Na er billigere sammenliknet med  $\text{BF}_3$  og  $\text{HCl}$ , men en ulempe er at  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ikke metylerer frie fettsyrer eller transesterifiserer sphingolipider. Biologiske prøver som inneholder betydelig mengder av dette må derfor bli behandlet med en annen reagens (Christie, 1993).

### 3.2 MIKROBØLGEASSISTERT METYLERING AV FRIE FETTSYRER

Etter mikrobølgeassistert metylering av par- og oddetalls frie fettsyrer fra C4:0 til C18:0, ble de korresponderende FAMEsene analysert på GC-MS.  $\text{BF}_3$  ble benyttet som katalysator, og for å minimalisere fordamping av kortkjedete FAMEs ble isbad benyttet under prøveopparbeidningen. Kromatogrammet fra disse analysene er vist i figur 3.14.



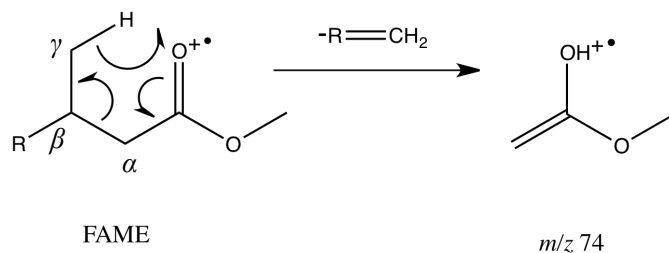
**Figur 3.14:** TIC-kromatogram av par- og oddetalls FAMEs fra C7:0 til C18:0, med areal og retensjonstid, etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W. C19:0ME-IS er internstandard.

Kromatogrammene er tilnærmet like og flere kromatogram vil derfor ikke presenteres.

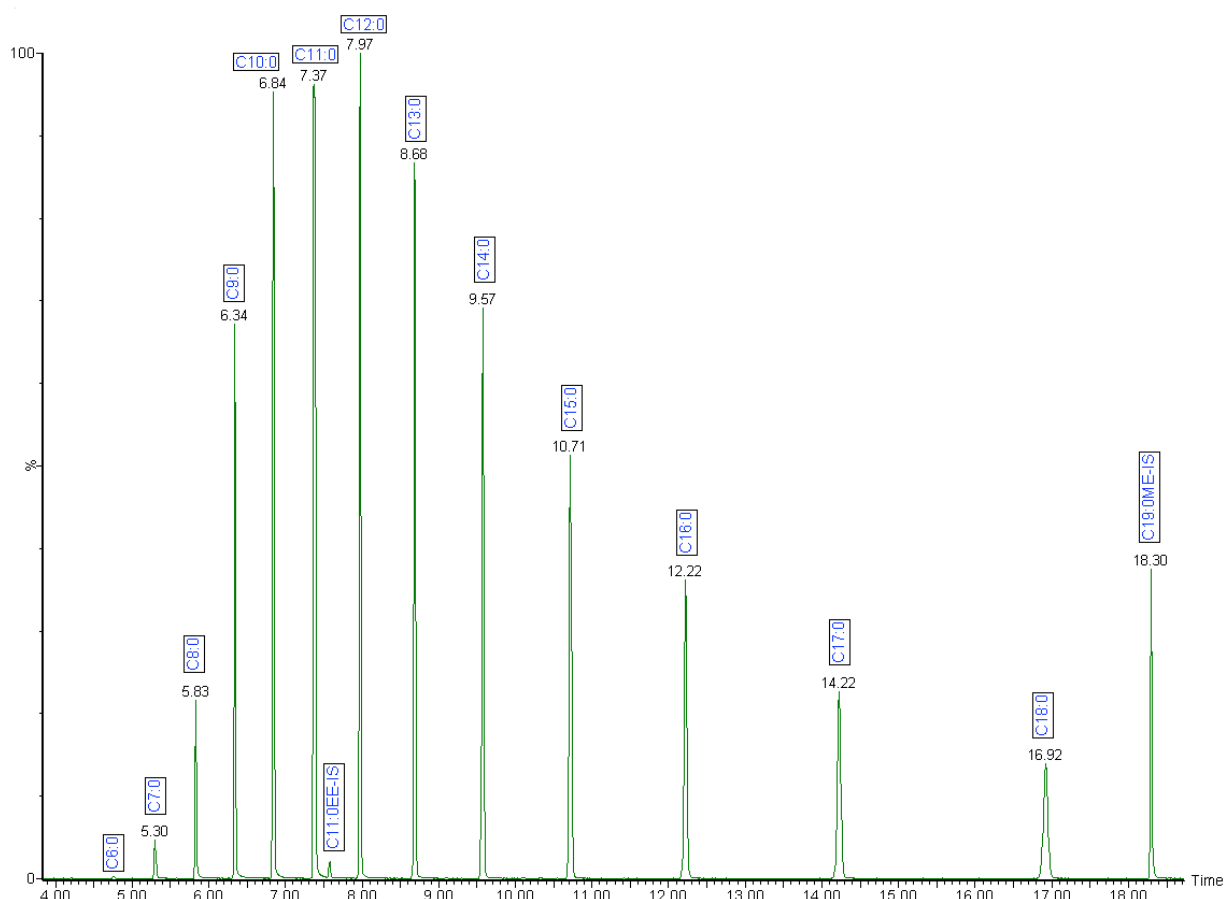
I TIC-kromatogrammet (figur 3.14) ble ikke C7:0-C9:0 detektert ved alle parallellene og det ble ikke detektert FAMEs under C7:0. Det antas derfor at disse forbindelsene fordampes under metylering da flyktighet øker med avtagende kjedelengde. Dette fører til at FAMEs med kjedelengde < C10 ikke kan kvantifiseres.

## Resultater og diskusjon

”Base peak” i MS-spekterne til metylesterne av de frie fettsyrene er et ion ved  $m/z$  74. Dette ionet er et resultat av McLafferty omleiringen om esteren og ble benyttet for å oppnå et RIC-kromatogram (figur 3.16) av de respektive FAMEs. Mekanismen for denne omleiringen er vist i figur 3.15.



**3.15:** McLafferty omleiring av forbindelser med et hydrogenatom i  $\gamma$ -posisjon til karbonyl. For FAMEs fører denne omleiringen til fragmentionet  $m/z$  74.



**Figur 3.16:** RIC-kromatogram av FAMEs etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W. Ionet ved  $m/z$  74 ble benyttet for å oppnå kromatogrammet.

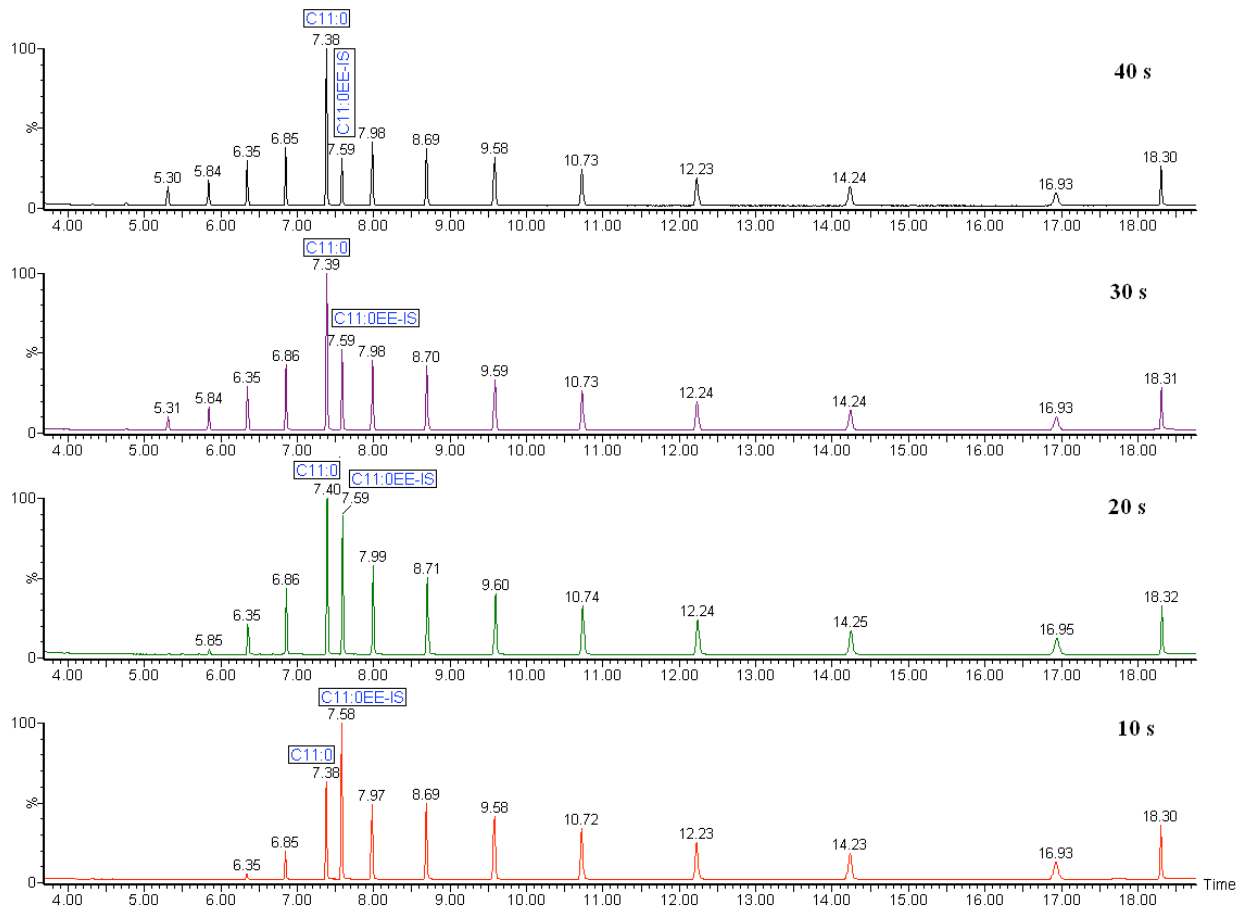


I RIC-kromatogrammet (figur 3.16) tydeliggjøres forbindelser som har  $m/z$  74 i sine respektive MS-spekter. På denne måten kan forbindelser som finnes ved lave konsentrasjoner og som ikke detekteres i TIC-kromatogrammet, detekteres i RIC. I dette kromatogrammet gir derfor C6:0 et lite signal etter  $\sim 4.8$  minutter, og denne toppen vises ikke i TIC-kromatogrammet. FAMEs av C4:0 og C5:0 ble verken detektert i TIC- eller RIC-kromatogrammet.

Etter mikrobølgeassistert metylering ble isbad benyttet for å holde prøvene ved lav temperatur,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ettersom det fremdeles forekommer tap av metylestere med kjedelengde  $< \text{C}10$ , har ikke avkjøling etter metyleringen minsket tapet av kortkjedete FAMEs signifikant. Ideelt sett skal reaksjonen ha foregått i et lukket og tett system. Dersom dette ikke har vært tilfelle kan det antas at fordampning av FAMEs har forekommet under selve metylering som følge av høy temperatur.

Figur 3.14 viser at toppen som representerer FAMEs av C11:0 er vesentlig høyere enn de andre toppene i kromatogrammet og gir et usannsynlig høyt utbytte ( $\sim 300\%$  utbytte). Samtidig observeres det at utbyttet av C11:0 øker med økt reaksjonstid. Dette illustreres i figur 3.17.

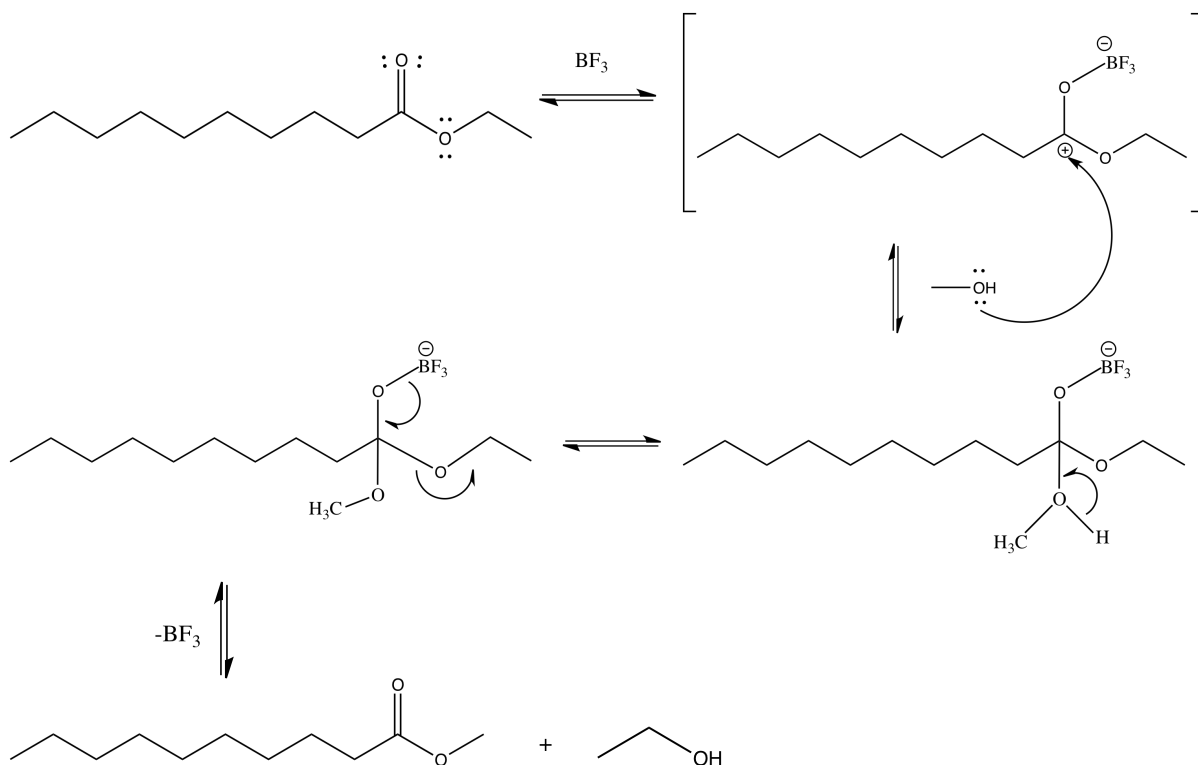
## Resultater og diskusjon



**Figur 3.17:** TIC av frie fettsyrer etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W. Intensiteten av toppen til metylesteren av C11:0 øker med tiden, mens C11:0EE-IS minker.

Av figur 3.17 observeres det at ved økende reaksjonstid forekommer det en økning av FAMEn til C11:0, samtidig som C11:0EE-IS synker. Årsaken til dette er at C11:0EE-IS omestres til metylesteren av C11:0 (figur 3.18) under metyleringen.

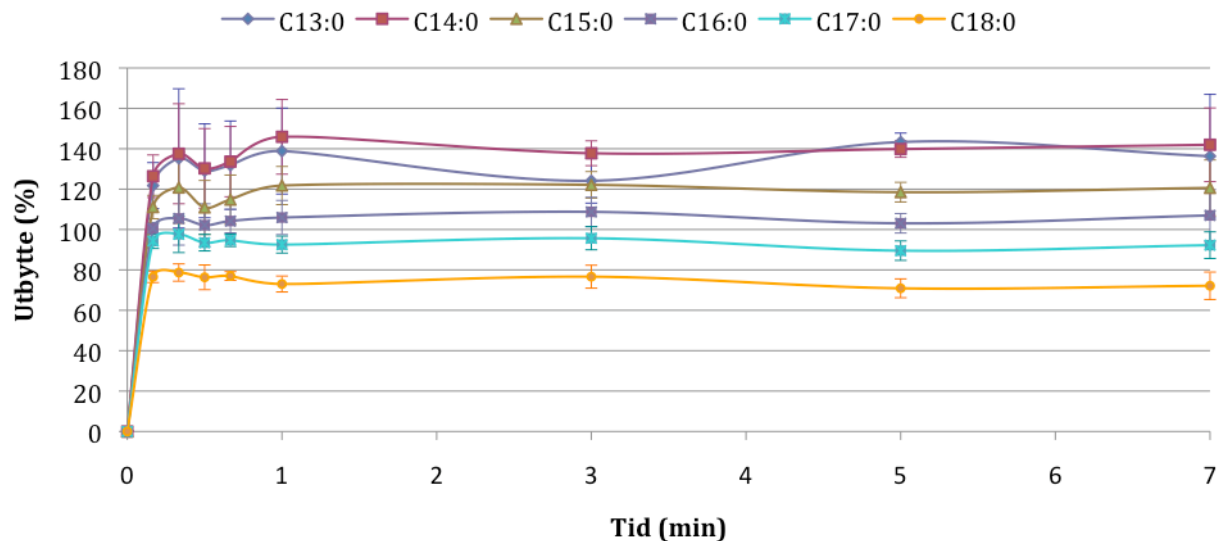
## Resultater og diskusjon



**Figur 3.18:** Reaksjonsmekanisme ved omestring av C11:0EE til C11:0ME i BF<sub>3</sub>-MeOH. BF<sub>3</sub> er en sterk Lewis syre og vil interagere med en sterk Lewis base som i dette tilfellet er karbonyloksygenet.

På grunn av denne omestringen ble resultatene for C11:0 ikke benyttet videre, og C11:0EE-IS kunne ikke brukes for å kvantifisere par- og oddetalls mettede fettsyrer fra C4:0 – C13:0. C19:0ME-IS måtte derfor benyttet for kvantifisering av alle fettsyrene i standarden.

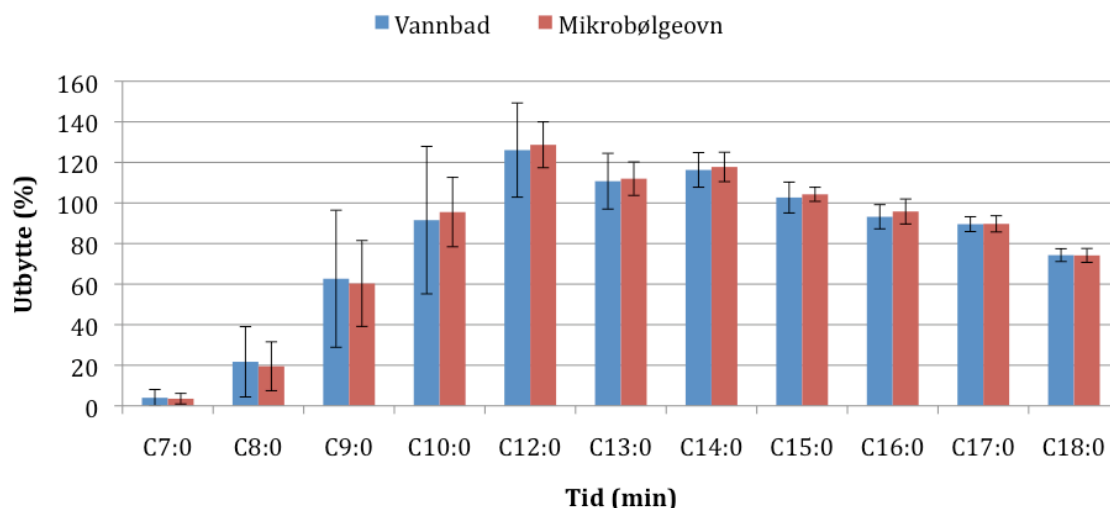
På grunn av store variasjoner i resultatene oppnådd etter mikrobølgeassistert metylering av de frie fettsyrene med kjedelengde < 13 karbon ble ikke disse presentert, se vedlegg, tabell **69-74**. Eksempelvis varierte utbyttet av C8:0ME, ved samme tidspunkt, fra å være ikke-detektert til å oppnå et utbytte på 48% (vedlegg, tabell **70**). I figur 3.19 fremkommer kun de FAMEs av fettsyrer det var mulig å kvantifisere; C13:0-C18:0.



**Figur 3.19:** Utbytte (%) av metylestere av C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 og C18:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Utbyttet av FAMES til C13:0 og C14:0 er høyere enn 120% ved samtlige tidspunkt (figur 3.19). En eventuell forklaring på dette kan være at mengde (%) oppgitt for hver fettsyre i GLC-referansestandard 412 ikke var korrekt. Da Rafdal (2011) har rapport om tilsvarende utfordringer ved å benytte samme referansestandard, men med ulik "batch", indikerer dette at riktig mengde (%) er oppgitt. Dette tyder på at det er svakheter ved metoden og at denne må optimaliseres.

For å undersøke om tap av kortkjedete FAMES kun forekommer som en følge av oppvarming med mikrobølger, ble det i tillegg utført metylering på vannbad. Dette ble gjort ved at frie fettsyrer ble metylert på vannbad og ved bruk av mikrobølger ved 90 °C i 2 minutter (figur 3.20). Også her ble isbad benyttet under prøveopparbeidingen.



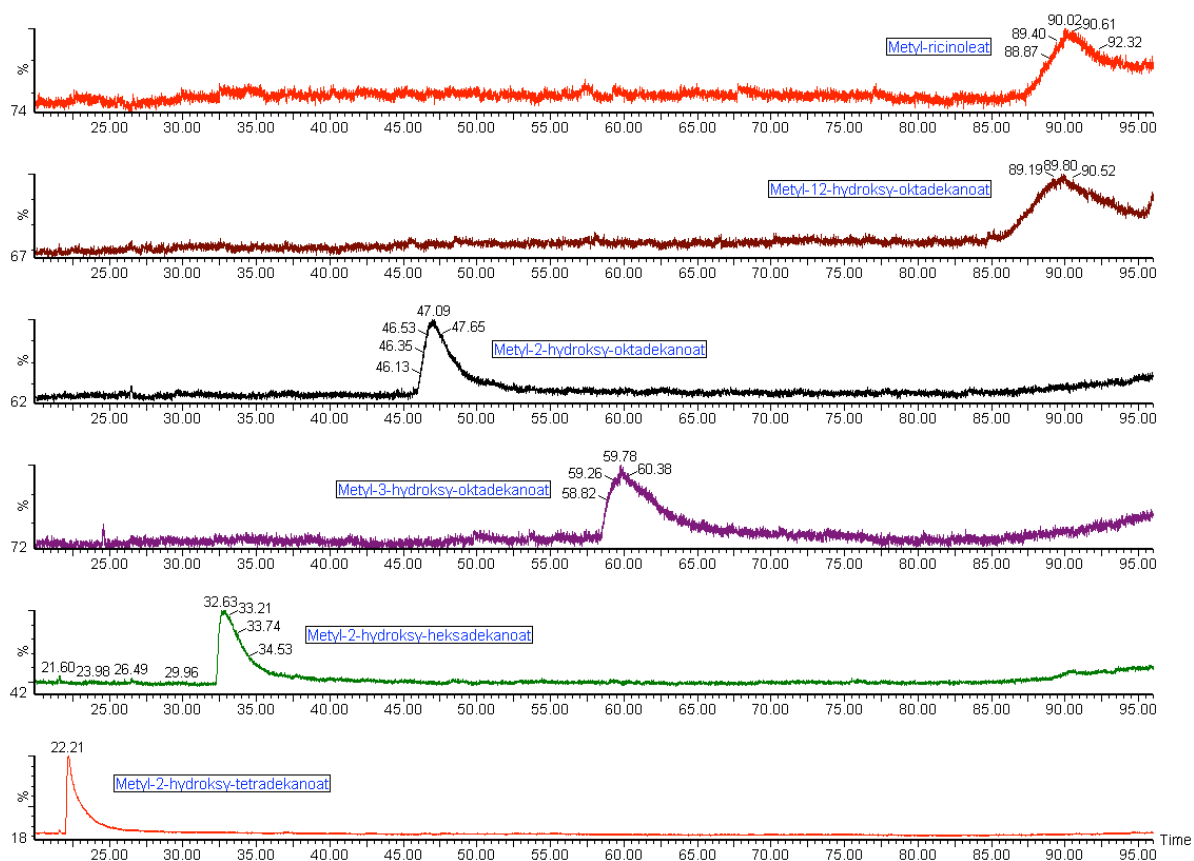
**Figur 3.20:** Utbytte (%) av metylesterne til alle par- og oddetalls mettede frie fettsyrer med kjedelengde fra C7:0 til C18:0 etter metylering i 2 minutter ved 90 °C på vannbad og mikrobølgeovn.

Ved å sammenlikne de to metodene har hver enkelt FAME overlappende standardavvik. For eksempel har C16:0 etter metylering på vannbad og i mikrobølgeovn et utbytte på henholdsvis  $93\% \pm 6.0$  og  $96\% \pm 6.2$ . Dette er en trend som observeres hos alle FAMEsene. Metylering på mikrobølgeovn resulterer i  $RSD > 10\%$  for fettsyrer fra C7:0 til C10:0. For de resterende FAMEs er  $RSD < 10\%$ . Mikrobølgeassistert metylering ved 90 °C i 2 minutter er derfor en lite egnet metode for fettsyrer med kjedelengde  $< 11$  karbon. Tilsvarende metode på vannbad er derimot lite egnet for fettsyrer med kjedelengde  $< 13$  karbon fordi disse har  $RSD > 10\%$ . Ved å sammenlikne bruk av vannbad og mikrobølgeovn for metylering av fettsyrer med kjedelengde  $\geq 14$  karbon, er gjennomsnittlige utbyttet av alle FAMEs henholdsvis  $100\% \pm 15$  og  $100\% \pm 16$ . Dette vil si at de to metodene er likeverdige ved lik temperatur og reaksjonstid.

Verken ved mikrobølge metoden eller vannbadmetoden detekteres FAMEs av C4:0-C6:0 og det oppnås et lavt utbytte av FAMEs av C7:0-C9:0. Dette bekrefter at systemet ikke er tilstrekkelig tett og at 90 °C er en for høy temperatur da den fører til fordampning. Ved en lavere temperatur kan det antas at en mindre andel av de kortkjedete FAMEsene vil fordampe, men til gjengjeld vil reaksjonstiden for alle FAMEs bli lengre.

### 3.3 STABILITETSSTUDIER AV OH-FAMES PÅ GC-MS

Stabiliteten til seks ulike OH-FAMES på GC-MS har blitt studert for å undersøke om identifisering og kvantifisering er mulig uten å derivatisere OH-gruppen på alkylkjeden. Figur 3.21 viser kromatogrammene til hver av de seks OH-FAMESene etter analyse på GC-MS.



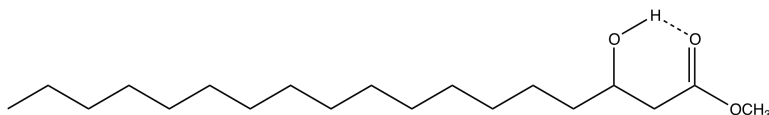
**Figur 3.21:** TIC-kromatogram av OH-FAMES (2-OH-C14:0ME, 2-OH-C16:0ME, 3-OH-C18:0ME, 2-OH-C18:0ME, 12-OH-C18:0ME og 2-OH-C18:1ME) etter analyse på GC-MS.

Det kan sees av kromatogrammene i figur 3.21 at samtlige topper er brede som følge av at forbindelsene eluerer over flere minutter og lang retensjonstid fører til brede topper. I tillegg er toppene usymmetriske på grunn av haledannelse, noe som kan komme av at analytt vil interagere forskjellig med de ulike aktive setene i kolonnen. MS-spektre fra halen indikerer en kombinasjon av analytt og dekomponeringsprodukter. Årsaken til dannelse av dekomponeringsprodukter kan være lang retensjonstid og for høy temperatur i GCen.

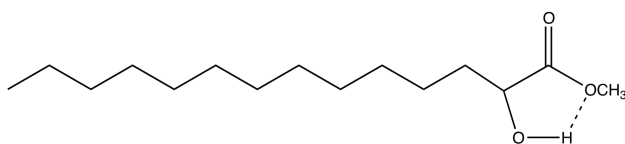
OH-FAMEs med lik kjedelengde, men ulik plassering av OH-gruppen på alkylkjeden, kan ut fra figur 3.21 separeres ettersom disse har ulik retensjonstid. Posisjonen til OH-gruppen påvirker altså retensjonstiden. For isomere hydroksyfettsyrer øker retensjonstiden desto lengre vekk fra syre-enden OH-gruppen er plassert (figur 3.21). For hydroksyfettsyrer hvor OH-gruppen har lik plassering på alkylkjeden observeres det at økt kjedelengde resulterer i økt retensjonstid.

Toppene som skal representere 12-OH-C18:0ME og 12-OH-C18:1ME overlapper (figur 3.21), noe som kan tyde på at OH-FAMEs med lik kjedelengde og ulik grad av umettethet ikke vil kunne separeres. Dette vil si at metoden bør optimaliseres, eksempelvis ved å derivatisere OH-gruppen på alkylkjeden (Jenske & Vetter, 2008; Chance, D. L. *et al.*, 1998) eller ved å endre temperaturprogram.

Alle toppene i figur 3.21, representerer sine respektive OH-FAMEs med unntak av 12-OH-C18:0ME og 2-OH-C18:1ME. Disse viser dekomponeringsprodukter ved elektronenergier lik 70 og 50 eV. MS-spektre viser at det har blitt innført en dobbeltbinding i posisjon Δ11 på alkylkjeden, via tap av vann. Molekylionet til de resterende forbindelsene vises i deres respektive MS-spektre, og det kan antas at 2- og 3-OH-FAMEs er mer stabile grunnet intramolekylære interaksjoner (figur 3.22).



Metyl-3-hydroksy-oktadekanoat

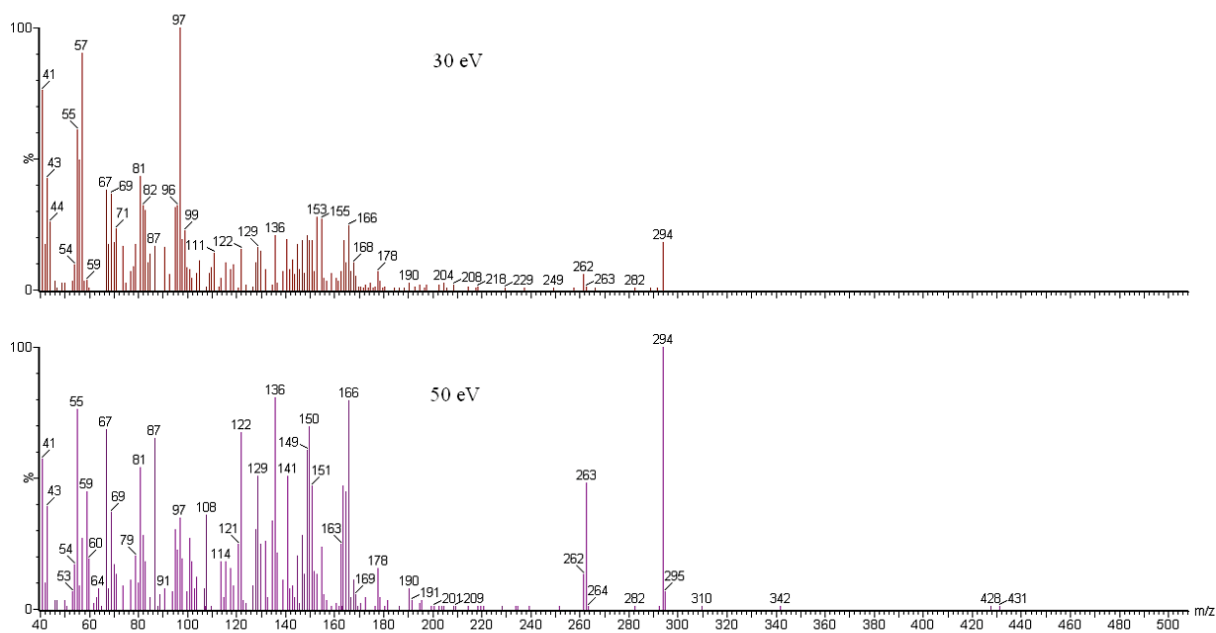


Metyl-2-hydroksy-tetradekanoat

**Figur 3.22:** Intramolekylære interaksjoner i 2- og 3-OH-FAMEs, her representert ved 3-OH-C18:0ME og 2-OH-C14:0ME.

## Resultater og diskusjon

Resultat av søk i referansebiblioteket (figur 3.22) viser at metyl-ricinoleat eliminerer vann når benyttet elektronenergi er lik 50 og 70 eV. Derimot vil resultat av tilsvarende søk ved 30 eV gi 12-OH-C18:1ME (figur 3.23). En mulig årsak til dette kan være at 50 og 70 eV er for intense elektronenergier, slik at vann spaltes av via en kombinasjon av termisk og EI-indusert dekomponering.



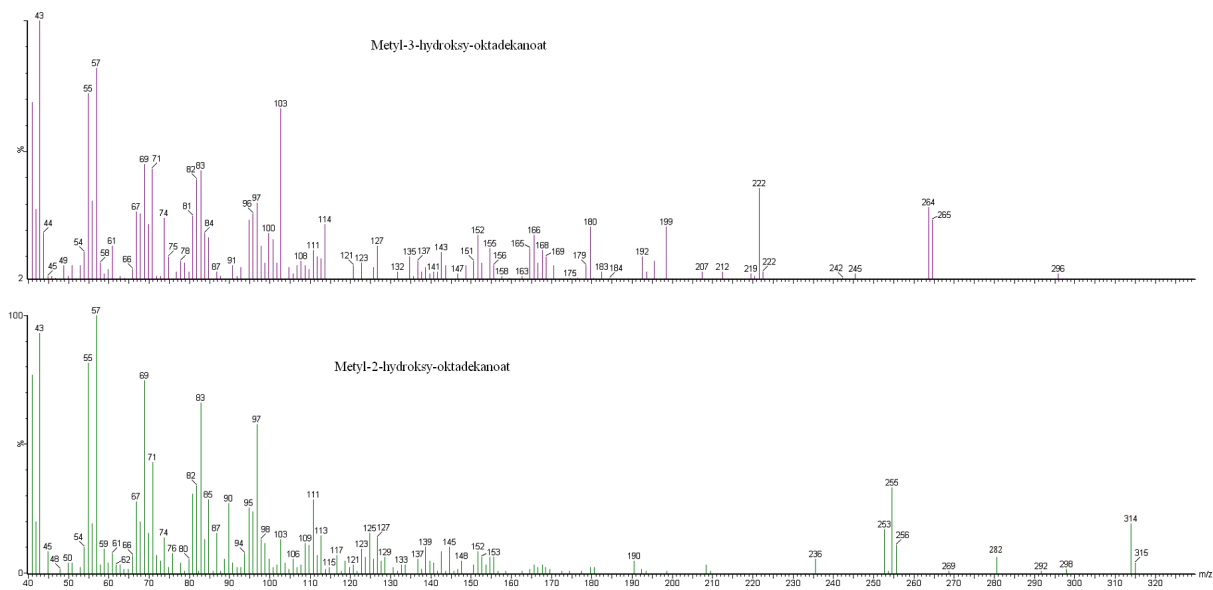
**Figur 3.23:** MS-spektre oppnådd etter analyse av 12-OH-C18:1ME ved 30 og 50 eV\*. Ved 30 eV gir referansebiblioteksøket 12-OH-C18:1ME som første forslag, mens ved 50 eV gir det samme søket den korresponderende forbindelsen hvor vann er eliminert.

\*MS-spekteret oppnådd ved 70 eV er ikke presentert da det er tilnærmet identisk med kromatogrammet oppnådd ved 50 eV.

Figur 3.24 sammenlikner MS-spektrene til 3-OH-C18:0ME og 2-OH-C18:0ME oppnådd etter analyse på GC-MS. Til tross for at disse er isomere, viser deres respektive MS-spekter ulike fragmenteringsmønstre.



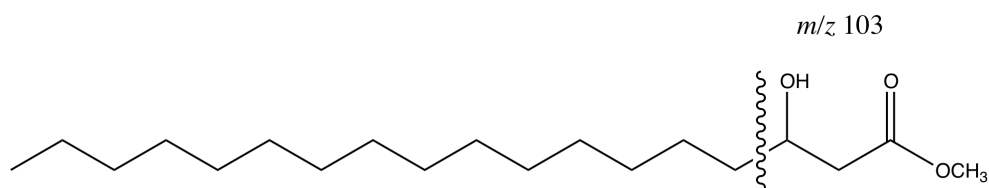
## Resultater og diskusjon



**Figur 3.24:** MS-spektre til henholdsvis 3-OH-C18:0ME og 2-OH-C18:0ME. Elektronenergi benyttet er 70 eV.

Det er kun i MS-spekteret til 2-OH-C18:0ME at molekylionet ( $m/z$  314) gir signal (figur 3.24).

I MS-spekteret til 3-OH-C18:0ME er det et tydelig signal ved  $m/z$  103. Dette signalet har ca. fem ganger så høy intensitet sammenliknet med signalet ved  $m/z$  103 hos 2-OH-C18:0ME. Fragmentet vist i figur 3.25 gir dette signalet.



**Figur 3.25:**  $m/z$  103 er fragmentet som er opphavet til "base peak" i MS-spekter av 3-OH-C18:0ME.

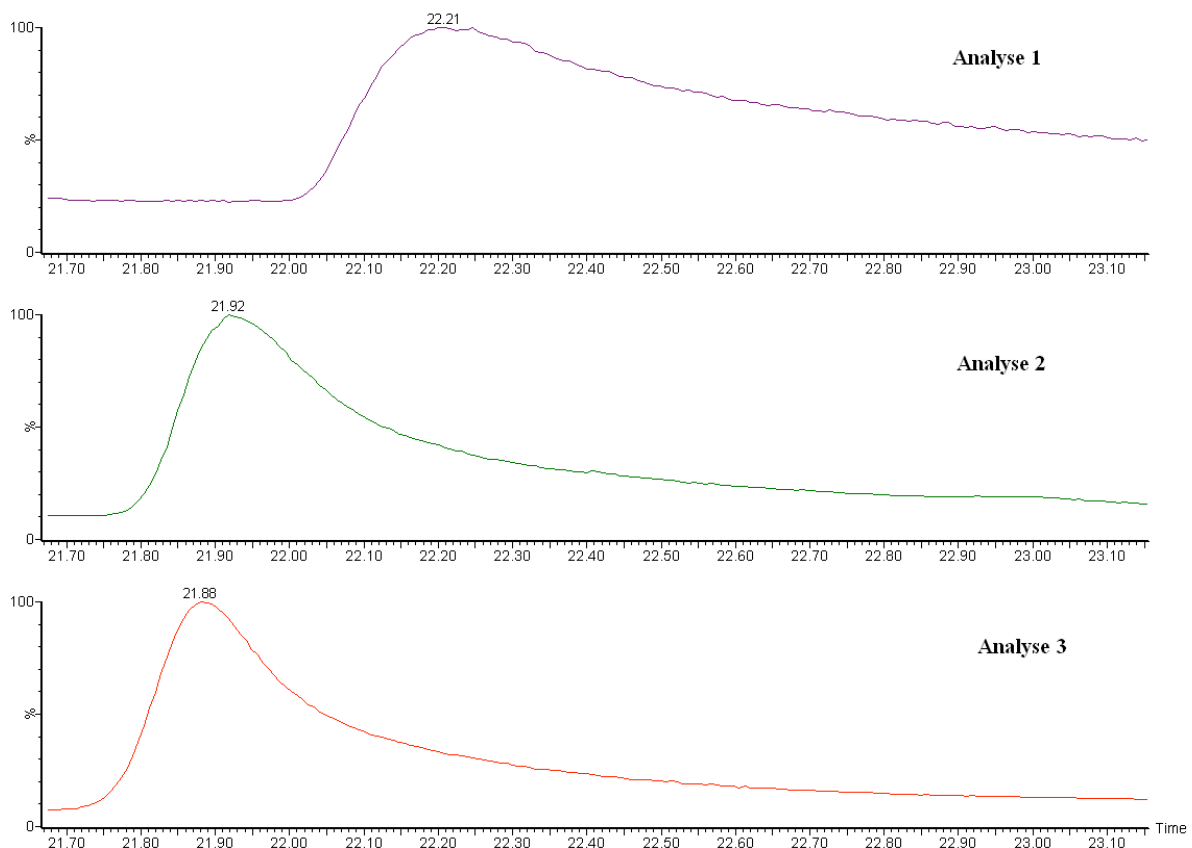
Denne fragmenteringen er forventet ettersom  $m/z$  103 vanligvis er "base peak" i spektrene av 3-OH-C18:0ME fra referansebiblioteket.

Figur 3.24 viser at vannavspaltning og tap av metanol er karakteristisk for henholdsvis 3-OH-C18:0ME og 2-OH-C18:0ME. I figur 3.23 synliggjøres dette av signalet ved  $m/z$  296 og  $m/z$  282. I tillegg observeres det tap av en metoksygruppe ( $-\Delta 31$  amu) i spekteret til 3-OH-

## Resultater og diskusjon

C18:0ME, mens 2-OH-C18:0ME spalter av den metylerte syregruppen ( $-\Delta 59\text{amu}$ ). De ulike fragmenteringsmønstrene gjør at 2-OH-C18:0ME og 3-OH-C18:0ME kan separeres fra hverandre ved spektertolkning.

Retensjonstiden til de ulike OH-FAMEsene er studert nærmere. Figur 3.26 viser en forstørret versjon av kromatogrammet etter tre ulike analyser av 2-OH-C14:0ME ved tilnærmet like betingelser.



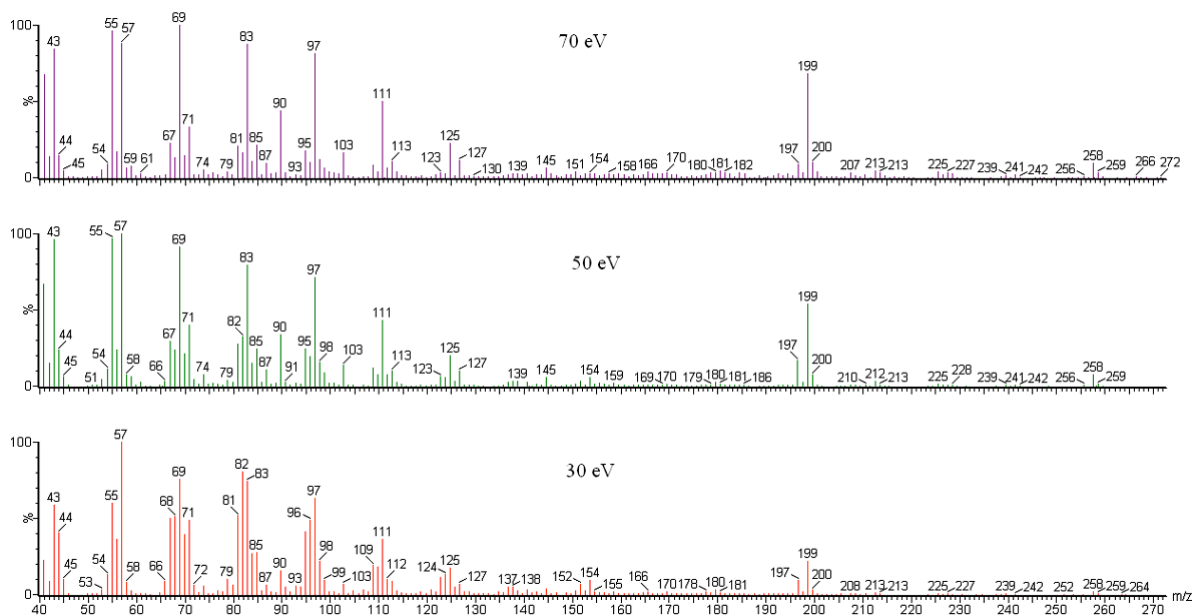
**Figur 3.26:** 2-OH-C14:0ME får ulik retensjonstid etter tre analyser på GC-MS ved tilnærmet like betingelser.

Figur 3.26 viser at retensjonstiden er ulik for samme forbindelse. I utgangspunktet er betingelsene like, fordi prøvene ble analysert samme dag med likt temperaturprogram. Elektronenergien benyttet ved de tre analysene skal ikke ha betydning for de ulike retensjonstidene. En mulig forklaring på dette kan være at eventuelle dekomponeringsprodukter fra første analyse (figur 3.26) interagerer med enkelte av de aktive setene i kolonnen, slik at disse blir deaktivert. Færre aktive seter fører til at en forbindelse

## Resultater og diskusjon

elueres raskere ved neste injeksjon og minimerer haledannelse. De aktive setene vil forbli deaktivert inntil eventuell rensing ("baking") av kolonne.

Figur 3.27 viser MS-spektrene til 2-OH-C14:0ME ved elektronenergi lik 30, 50 og 70 eV.



**Figur 3.27:** MS-spektre av 2-OH-C14:0ME ved elektronenergi lik 30, 50 og 70 eV.

Sammenliknes signaler fra fragmention med lik  $m/z$  verdi i figur 3.27, er det generelt ingen betydelig forskjell i intensitet ved ulike eV, med unntak av signalet ved  $m/z$  199. Dette signalet har tre ganger høyere intensitet ved 70 eV i forhold til 30 eV. Økende eV skal ideelt sett resultere i økende fragmentering (Downard, 2004).

Det var forventet en økende intensitet av molekylion ved minkende elektronenergi (Downard, 2004), men det motsatte observeres. Intensiteten av molekylionet ( $m/z$  258) er høyest ved 70 eV og figur 3.27 viser at intensiteten til molekylionet ved 70 eV er ca. 8 ganger høyere enn ved 30 eV. For en relativ sikker identifisering vil derfor elektronenergien 70 eV foretrekkes.

## 4. KONKLUSJON

Optimal effekt og reaksjonstid for mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider, med  $\text{BF}_3$  som katalysator, var ved 70 W i 7 minutter. For hver enkelt FAME var standardavviket lavt, med  $\text{RSD} < 10\%$ , noe som tilsier god presisjon. Utbyttet varierte avhengig av FAME slik at standardavviket til det gjennomsnittlige utbytte for de benyttede FAMEs ble noe høyt, med  $\text{RSD} > 10\%$ . Det ble ikke observert noen sammenheng i utbytte av FAMEs og grad av umettethet eller kjedelengde. Det ble heller ikke observert at fettsyreposisjon i triglyserid hadde betydning ved transesterifiseringen med tanke på utbyttet.

HCl som katalysator, sammenliknet med  $\text{BF}_3$ , førte til langsommere reaksjonshastighet og ga lavere utbytte ved samtlige tidspunkt. Ved syrekatalysert mikrobølgeassistert transesterifisering vil dermed  $\text{BF}_3$  som katalysator være å foretrekke.

Derimot ga mikrobølgeassistert transesterifisering, ved bruk av  $\text{BF}_3$  som katalysator, tilnærmet likt utbytte av FAMEs som transesterifisering ved bruk av  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ved romtemperatur. Likevel foretrekkes mikrobølge-metoden da den totalt sett tar kortere tid. Dersom  $\text{CH}_3\text{ONa}$  benyttes som katalysator ved mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W er optimal reaksjonstid (20 sekunder) oppnådd raskere enn ved bruk av  $\text{BF}_3$  (7 minutter). Da det ved disse reaksjonstidene ble oppnådd likt utbytte, kan det konkluderes med at  $\text{CH}_3\text{ONa}$  er en bedre egnet katalysator enn  $\text{BF}_3$ . Det må tas i betraktning at mikrobølge-metoden med  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ikke er optimalisert med hensyn til effekt og at  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ikke kan metylere frie fettsyrer eller transesterifiserer sphingolipider.

Ved mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer ble det observert tap av FAMEs med kjedelengde  $< \text{C}10$ . Dette til tross for at isbad ble benyttet. Det ble derfor antatt at fordamping av FAMEs foregikk inne i mikrobølgeovnen som følge av at systemet ikke var tilstrekkelig tett.

Basert på resultatene fra stabilitetsstudier av OH-FAMEs var det ikke hensiktsmessig å senke elektronenergien, ettersom signal for molekylion allerede ble oppnådd ved 70 eV. I tillegg var intensiteten til fragmentionene tilnærmet lik ved de benyttede elektronenergiene. Dette tyder på en relativt sikker identifisering av OH-FAMEs ved 70 eV.

2- og 3-OH-FAMEs ble detektert og det vil dermed antas at disse kan detekteres ved analyse av komplekse biologiske prøver. Ved kvantifisering bør derimot OH-gruppen på alkylkjeden

## Konklusjon

derivatiseres før analyse på GC-MS. 12-OH-FAMEs dekomponerte i GC-MSen, og derivatisering kan derfor være nødvendig for deteksjon.

## 5. VIDERE ARBEID

I dette arbeidet er det kun benyttet triglyseridstandarder ved mikrobølgeassistert transesterifisering. Metodens robusthet kan derfor undersøkes i biologiske matrikser, for eksempel i kumelk. Triglyseridstandardene inneholdt kun fettsyrer med kjedelengde  $> C16$ , derfor burde metoden verifiseres for triglyserider bestående av fettsyrer med alkylkjede  $< C16$ .

Ved mikrobølgeassistert transesterifisering med  $BF_3$  ble det observert dårligere utbytte med økende effekt. Man bør derfor vurdere å gjenta et tilsvarende eksperiment ved lavere effekt enn 65 W.

Mikrobølgeassistert transesterifisering med  $CH_3ONa$  som katalysator er ikke optimalisert. Det bør derfor undersøkes hvilken effekt som er optimal for å oppnå en jevn sigmoid kurve og eventuelt høyere utbytte og lavere standardavvik, samt reaksjonshastighet.

Ved mikrobølgeassistert metylering var deteksjon av frie fettsyrer med alkylkjede  $< C10$  utfordrende på grunn av tap av korresponderende FAMES som følge av høy temperatur og at systemet benyttet i mikrobølgeovnen ikke var tilstrekkelig tett. Det kan derfor undersøkes om fordamping kan minimaliseres ved å sette temperaturen konstant og  $< 90\text{ °C}$  ved mikrobølgeassistert metylering. I tillegg er det mulig at denne metoden kan forbedres ved å derivatisere de kortkjedete fettsyrene om til butylestere, dette fordi butylestere har høyere kokepunkt sammenliknet med de korresponderende metylestere (Eder, 1995).

I stabilitetsstudiene av OH-FAMES ble det observert brede, lave og usymmetriske topper med lang retensjonstid. Her kan de kromatografiske parameterne optimaliseres slik at smalere topper med høyere intensitet kommer tidligere ut og gir bedre signal til støy forhold, samt mindre dekomponering. Dette for å oppnå sikrere identifisering. Eventuelt kan OH-gruppen på alkylkjeden derivatiseres.

## REFERANSER

- Ahuja, S. (2003). *Chromatography and separation series*. Separation science and technology, b 4. San Diego: Academic Press. 250 s.
- Akoh, C. C. & Min, D. B. (2002). *Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology*. 2.utg. New York: Marcel Dekker. 1040 s.
- Azcan, N. & Danisman, A. (2008). Microwave assisted transesterification of rapeseed oil. *Fuel*, 87: s. 1781-1788.
- Bohn, M., Heinz, E. & Lthje, S. (2001). Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387: s 35-40.
- Borch-Jensen, C., Jensen, B., Mathiasen, Kim. & Mollerup, J. (1997). Analysis of seed oil from *ricinus communis* and *dimorphoteca pluvialis* by gas and supercritical fluid chromatography. *Journal of the American oil chemists' society*. 74: s. 277-284.
- Chance, D. L., Gerhardt, K. O. & Mawhinney, T. P. (1998). Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of hydroxyl fatty acids as their methyl esters tert.-butyldimethylsilyl ethers. *Journal of Chromatography A*, 793: s. 91-98.
- Christie, W. W. (1972). The preparation of alkyl esters from fatty acids and lipids. *Topics in Lipid Chemistry*, Edited by Gunstone FD. London: Logos Press. 3: s 171-197.
- Christie, W.W. (1982). *Lipid Analysis*. 2.utg. Oxford: Pergamon Press. 207 s.
- Christie W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids*. Ayr: The Oily Press.
- Christie, W. W. (1993). Preperation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in Lipid Methodology*, 2: s 69-111.
- Damodaran, S., Parkin K., L. & Fennema, O., R. (2008). *Fennema's food chemistry*. 4. utg. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 1144 s.
- Dembitsky, V. M., Rezanka, T. & Shubina, E. E. (1993). Unusual hydroxy fatty acids from some higher fungi. *Phytochemistry*, 34: s 1057-1059.

- Devle, H. & Ekeberg, D. (2010). *Laboratory compendium in chromatography KJM310, labhefte*. Ås: Universitetet for miljø og biovitenskap. 34 s.
- Devle, H., Naess-Andresen, C.F., Stenstrøm, Y. & Ekeberg, D. (2011). *Microwave synthesis of fatty acid methyl esters from sphingomyelin for gas chromatography mass spectrometry*. Ås: Universitetet for miljø og biovitenskap. 11 s.
- Devle, H, Rukke, E. O., Naess-Andresen, C.F. & Ekeberg, D. (2009). A GC-magnetic sector MS method for identification and quantification of fatty acids in ewe milk by different acquisition modes. *Journal of separation science*, 32: s. 1-8.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products*. 3.utg. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd. 539 s.
- Dodds, E. D., McCoy, M. R., Rea, L. D. & Kennish, J. M. (2005). Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids*, 40: s 419-428.
- Downard, K. (2004). *Mass spectrometry. A foundation course*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 210 s.
- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B*, 671: s. 113-131.
- Eijsink, V., Gulbrandsen, T. D., Kokkim, E. H. & Bunæs, A.C. (2009) *KJB210 Anvendt og eksperimentell biokjemi, laboratoriekurs*. Ås: Universitetet for Miljø og Biovitenskap. 132 s.
- Freedman, B., Pryde, E. H. & Mounts, T. L. (1984). Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61 (10): s 1638-1643.
- Galema, S.A. (1997). Microwave chemistry. *Chemical Society Reviews*, 26: s. 233-238.
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative chemical analysis*. 7. utg., New York: W. H. Freeman and Company. 663 s.
- Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J. & Hadad, C. M. (2007). *Organic chemistry. A short course*. 12. utg. Boston: Houghton Mifflin Company. 577 s.



- Hartman, L. (1965). Esterification rates of fatty acids with methanol. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 42: s 664.
- Hirono, H. (1979). Lipids of myelin, white matter and gray matter in a case of generalized deficiency of cytochrome  $b_5$  reductase in congenital methemoglobinemia with mental retardation *Lipids*, 15: s 272-275.
- de Hoffmann, E. & Stroobant, V. (1999). *Mass Spectrometry. Principles and applications*. 2.utg. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd. 407 s.
- Jenske, R. & Vetter, W. (2008). Gas chromatography/electron capture negative ion mass spectrometry for the quantitative determination of 2- og 3-hydroxy fatty acids in bovine milk fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: s. 5500-5505.
- Jenske, R., & Vetter, W. (2009). Concentrations of medium-chain-2-and 3-hydroxy fatty acids in foodstuffs. *Food Chemistry*, 114: s 1122-1129.
- Kappe, C.O., Dallinger, D. & Murphree, S.S. (2009). *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols*. Weinheim: WILEY-VCH. 310 s.
- Kuksis, A., Marai, L., Myher, J. J., Cerbulis, J. & Farrell, H. M. (1986). Comparative study of the molecular species of chloropropanediol diesters and triacylglycerols in milk fat. *Lipids*, 21: s. 183-190.
- Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B. & Westman, J. (2001). Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron Letter*, 57: s. 9225–9283.
- Lough, A.K. (1964). The production of methoxy-substituted fatty acids as artifacts during the esterification of unsaturated fatty acids with methanol containing boron trifluoride. *Biochemical Journal*. **90**: s. 4C-5C.
- Majewski, M.W., Pollack, S.A. & Curtis-Palmer, V.A. (2009). Diphenylammonium salt catalysts for microwave assisted triglyceride transesterification of corn and soybean oil for biodiesel production. *Tetrahedron Letter*, 50: s. 5175-5177.
- Marinetti, G.V. (1966). Low temperature partial alcoholysis of triglycerides. *Journal of Lipid Research*, 7: s. 786-788.

## Referanser

- Mathews, C. K., van Holde, K. E. & Ahern, K. G. (2000). *Biochemistry*. 3. utg. San Francisco: Addison-Wesley Publishing Company. 1186 s.
- Metcalfe, L. D & Schmitz, A.A. (1961). The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 33: s. 363-364.
- McCabe, W.L., Smith, J.C. & Harriott, P. (2005). *Unit Operations of Chemical Engineering*. 7. utg. New York: McGraw-Hill. 1140 s.
- Mjøs, S. A. (2006). *Interpretation of chromatographic and mass spectrometric data from analyses of fatty acid methyl esters*. Bergen: Universitetet i Bergen. 318 s.
- Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5: s. 600-608.
- Murakami, N., Shirahashi, H., Nagatsu, A. & Sakakibara, J. (1992). Two unsaturated 9R-hydroxy fatty acids from the cyanobacterium *Anabaena flos.aquae f. flos-aquae*. *Lipids*, 27: s. 776–778.
- Nielsen, S. S. (2010). *Food Analysis*. 4.utg. New York: Springer. 587 s.
- Nüchter, M., Ondruschka, B., Bonrat, W. & Gum, A. (2004). Microwave assisted synthesis – a critical technology overview. *Green Chemistry*, 6: s. 128-141.
- Pomeranz, Y. & Meloan, C. E. (1994). *Food analysis: Theory and practice*. 3. utg. Chapman & Hall, New York. 778 s.
- Potter, N.N. & Hotchkiss, J.H. (1995). *Food science*. 5 utg. New York: Chapman Hall. 593s.
- Rafdal, S. (2011). *Mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer, analysert med GC-MS*. Masteroppgave. Ås: Universitetet for miljø- og biovitenskap, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. 93 s.
- Shantha, N. C. & Napolitano, G. E. (1992). Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography A*, 624: s. 37-51.
- Sigma-Aldrich. Tilgjengelig fra:  
[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Aldrich/General\\_Information/bf3\\_methanol.Par.0001.File.tmp/bf3\\_methanol.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Aldrich/General_Information/bf3_methanol.Par.0001.File.tmp/bf3_methanol.pdf) (lest 14.04.11).

## Referanser

- Smith, C. R. & Wolff, I. A. (1969). Characterization of naturally occurring  $\alpha$ -hydroxylinolenic acid. *Lipids*, 4: s 9-14.
- Tipler, P.A. (2008). *Physics for scientists and engineers with modern physics*. 6.utg. New York: W.H.Freeman and Company. 1412 s.
- Vetti, J. I. (2009). *Bestemmelse og sammenligning av fettsyreprofiler i melk fra ulike typer pattedyr og i ulike typer morsmelkerstatning, ved bruk av GC-MS*. Masteroppgave. Ås: Universitetet for miljø- og biovitenskap, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. 129 s.
- Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F. & Chemat, F. (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction, an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A*, 1174: s. 138-144.
- Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F. & Chemat, F. (2008). Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *Journal of Chromatography A*, 1196-1197: s. 57-64.
- Welz, W., Sattler, W., Leis, H. J. & Malle, E. (1990). Rapid analysis of non-esterified fatty acids as methyl esters from different biological specimens by gas chromatography after one-step esterification. *Journal of Chromatography B*, 526: s. 319-329.
- Wolff, R. L. (1992). Resolution of linolenic acid geometrical isomers by gas-liquid chromatography on a capillary column coated with a 100% cyanopropyl polysiloxane film (CP<sup>TM</sup>Sil 88). *Journal of Chromatographic Science*, 30: s. 17-22.
- Zu, Y., Zhang, S., Fu, Y., Liu, W., Liu, Z., Luo, M. & Efferth, T. (2009). Rapid microwave transesterification for the preparation of fatty acid methyl esters from the oil of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge). *European Food Research Technology*, 229: s. 43-49.

## VEDLEGG

Dataene i tabell 1-20 ble benyttet til å lage figur 3.5.

Tabell 1-8 viser beregnet utbytte (%) av FAMES etter at enkle triglyserider med enumettede og flerumettede fettsyrer ble transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W ved ulike tidsintervall.  $\text{BF}_3$  ble benyttet som katalysator.

**Tabell 1:** Beregnet utbytte (%) av metylester til C16:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)			
	5 min	7 min	10 min	15 min
P1	67,89714	73,21433	75,32807	80,86429
P2	65,90939	71,04978	76,84319	78,17815
P3	62,37035	66,28735	70,18977	76,82799
P4	57,78102	69,82995	75,34029	79,45046
P5	61,83971	69,53851	74,31411	72,79686
Gj.snitt	63,15952	69,98398	74,40309	77,62355
Std.avvik	3,91471	2,52281	2,5223	3,08535
RSD	6,19813	3,60484	3,39005	3,97475

**Tabell 2:** Beregnet utbytte (%) av metylester til C18:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)			
	5 min	7 min	10 min	15 min
P1	66,0355	72,67123	75,80568	78,5776
P2	62,61105	70,76008	75,93749	78,51569
P3	61,2823	67,97112	72,67546	77,08174
P4	56,49974	67,62698	74,28243	78,80857
P5	61,85663	67,55386	75,19028	74,01146
Gj.snitt	61,65704	69,31665	74,77827	77,39901
Std.avvik	3,42268	2,29726	1,34506	2,0124
RSD	5,55116	3,31415	1,79874	2,60004

**Tabell 3:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C18:2 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	10,48079	47,67773	73,92768	83,0498	92,2827	91,97953	93,18182	94,1467
P2	10,39283	56,0929	84,10835	85,55498	98,31761	98,0924	94,37587	97,6594
P3	7,29067	50,27858	79,33343	88,47247	99,48711	103,0717	101,5008	98,9808
P4	6,57565	50,17358	76,06372	95,15349	94,33457	97,18913	98,58871	98,1135
P5	6,22669	50,25394	78,7663	91,73984	98,82029	97,78923	99,38677	99,4531
Gj.snitt	8,19333	50,89534	78,43989	88,79411	96,64845	97,62442	97,40680	97,6707
Std.avvi	2,08384	3,10968	3,84196	4,814341	3,16128	3,93616	3,50412	2,09212
RSD	25,43343	6,10994	4,89796	5,421915	3,27091	4,03195	3,59741	2,14202

**Tabell 4:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)			
	5 min	7 min	10 min	15 min
P1	68,72905	74,59379	81,9838	81,76208
P2	65,04451	75,40909	78,84083	84,76976
P3	64,627	71,9824	75,77212	79,96162
P4	62,9618	69,87857	77,50743	82,18445
P5	63,82049	73,23433	78,40541	78,68862
Gj.snitt	65,03657	73,01964	78,50192	81,47331
Std.avvik	2,212789	2,1895	2,27423	2,31816
RSD	3,40238	2,99851	2,89704	2,8453

**Tabell 5:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:4 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	5,37097	32,35826	43,65729	57,1377	83,0429	88,2697	94,0297	79,9545
P2	7,019444	34,07271	56,60112	59,0360	92,4695	95,0904	93,5128	93,9588
P3	6,50614	29,26822	45,75264	61,7176	97,2115	98,2415	91,8254	95,5208
P4	3,42617	28,09234	42,22278	55,2342	86,4436	92,4078	82,0466	77,9213
P5	2,8496	24,67237	42,22155	55,5492	87,4064	94,7780	84,9573	91,0069
Gj.snitt	5,03446	29,69278	46,09107	57,7349	89,3148	93,7575	89,2744	87,6725
Std.avv	1,84252	3,68221	6,05053	2,68995	5,55727	3,70343	5,43053	8,16829
RSD	36,59803	12,40103	13,12734	4,65905	6,22211	3,95001	6,08296	9,31682

**Tabell 6:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:5 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	5,99219	31,7511	48,4304	58,5015	91,0803	95,0884	98,3932	91,1082
P2	7,84437	36,0381	61,0720	64,4556	99,4695	95,0904	93,5128	93,9588
P3	6,67735	30,0283	57,6437	70,6433	95,8530	100,555	95,5828	97,4818
P4	4,61574	28,3869	53,3302	67,9329	88,0005	94,6717	86,7438	79,4400
P5	3,01506	30,2043	51,5140	63,9494	93,3872	97,4989	93,4860	100,604
Gj.snitt	5,62894	31,2817	54,3981	65,0965	93,5581	96,5809	93,5437	92,5187
Std.avv	1,87071	2,91358	5,00368	4,58346	4,39507	2,48652	4,29877	8,14143
RSD	33,23373	9,31396	9,19825	7,04101	4,69769	2,57455	4,59546	8,79977

**Tabell 7:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C22:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)			
	5 min	7 min	10 min	15 min
P1	71,56203	78,90033	78,76431	84,79384
P2	66,97229	69,31697	78,33739	83,33467
P3	62,97852	70,77918	73,91095	82,05382
P4	57,44014	68,014007	76,00414	83,66172
P5	61,36551	66,25315	78,69495	69,62995
Gj.snitt	64,063698	70,6527274	77,142348	80,6948
Std.avvik	5,40866	4,90261	2,13348	6,26202
RSD	8,44262	6,93902	2,76564	7,760126

**Tabell 8:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 65 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	4,01026	21,6046	29,39147	35,64396	72,99336	77,0417	80,2152	71,606
P2	5,40313	26,82284	46,16754	49,46487	77,60322	79,8793	78,0511	76,352
P3	3,10016	21,1382	31,74592	38,68912	76,3368	82,7544	76,3797	77,743
P4	1,89923	15,62704	27,48756	38,79417	67,44239	73,4326	66,8308	62,085
P5	1,99645	15,91331	26,84362	36,64996	71,07098	75,6199	71,4790	77,947
Gj.snitt	3,281846	20,22119	32,32722	39,84841	73,08935	77,7456	74,5911	73,147
Std.avv	1,46861	4,63682	7,96874	5,54164	4,08938	3,64887	5,40159	6,6929
RSD	44,74964	22,93051	24,65024	13,90680	5,59504	4,69335	7,24159	9,1499

Tabell 9-16 viser beregnet utbytte (%) av FAMEs etter at enkle triglyserider med enumettede og flerumettede fettsyrer ble transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W ved ulike tidsintervall. BF<sub>3</sub> ble benyttet som katalysator.

**Tabell 9:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C16:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	54,6999	82,16205	83,11703	89,12423	79,9784	88,68165	85,4283	70,00412
<b>P2</b>	56,6892	74,82774	72,54752	82,9222	78,8633	86,60698	79,2687	86,89377
<b>P3</b>	51,4747	75,67208	68,42782	84,79137	86,3957	92,916	79,6285	84,95355
<b>P4</b>	48,0091	83,08256	78,87211	80,57397	85,7966	85,23481	90,7891	101,2610
<b>P5</b>	58,2715	74,82215	82,53758	86,61906	87,2952	86,54324	92,5779	100,9031
<b>Gj.snitt</b>	53,8289	78,11331	77,10041	84,80616	83,6658	87,99653	85,5385	88,80312
<b>Std.avvi</b>	4,12581	4,14343	6,41958	3,29368	3,9315	3,01416	6,15165	12,97572
<b>RSD</b>	7,66468	5,30438	8,32626	3,88377	4,69904	3,42531	7,19167	14,61178

**Tabell 10:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C18:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	53,57708	77,77585	81,4793	85,79409	76,76402	79,9183	82,91768	73,63333
<b>P2</b>	56,90653	71,85738	75,1874	83,43228	79,44397	77,5431	75,82065	80,355
<b>P3</b>	52,30352	70,37946	75,2416	83,34053	79,61714	84,0167	78,79976	80,11085
<b>P4</b>	49,15762	72,34664	71,2837	77,9246	79,30406	78,2635	81,41435	95,42724
<b>P5</b>	50,01807	63,37084	73,3727	77,99819	84,78631	80,7142	85,68539	94,54219
<b>Gj.snitt</b>	52,39256	71,14603	75,313	81,69793	79,9831	80,0912	80,92756	84,81372
<b>Std.avvi</b>	3,07774	5,17067	3,80935	3,55003	2,92912	2,53284	3,78954	9,67327
<b>RSD</b>	5,87439	7,26768	5,05802	4,34531	3,662171	3,16245	4,68264	11,40530

**Tabell 11:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C18:2 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	12,70283	63,0595	89,4583	98,21446	99,28633	99,46842	98,6585	101,1471
<b>P2</b>	12,16162	64,2599	86,9419	94,73464	97,68476	100,9311	100,793	101,6512
<b>P3</b>	15,20778	67,9001	90,2739	96,54635	103,7254	104,0383	103,335	103,3643
<b>P4</b>	-	-	-	-	102,985	104,9939	102,473	102,212
<b>Gj.snitt</b>	13,35741	65,0732	88,8914	96,49848	100,9203	102,3579	101,315	102,0937
<b>Std.avv</b>	1,62516	2,52072	1,73683	1,7404	2,90231	2,59213	2,06171	0,95223
<b>RSD</b>	12,16669	3,87366	1,95388	1,80356	2,87584	2,53241	2,03495	0,9327

**Tabell 12:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	41,83376	74,6245	79,65284	78,52594	66,7974	70,55388	71,0009	64,1897
<b>P2</b>	56,79097	76,254	61,24991	84,85135	71,2920	68,4161	67,0118	72,0207
<b>P3</b>	43,9659	73,33488	68,52339	83,52382	70,1567	71,3122	68,1201	75,2482
<b>P4</b>	43,24007	70,88145	69,02907	69,5117	68,5101	67,69564	69,1302	83,4311
<b>P5</b>	49,5712	59,70683	65,43291	69,0842	78,7448	69,08737	72,2777	79,8884
<b>Gj.snitt</b>	47,08038	70,96033	68,77762	77,0994	71,1002	69,41303	69,5081	74,9556
<b>Std.avvi</b>	6,17403	6,59043	6,8237	7,50362	4,59864	1,49647	2,13309	7,42918
<b>RSD</b>	13,113812	9,287483	9,921402	9,732403	6,46783	2,1559	3,06883	9,91143

**Tabell 13:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:4 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	6,50767	41,84908	65,1775	83,45108	88,7926	78,35506	73,9166	65,54981
<b>P2</b>	7,04753	45,4274	70,87406	86,07656	87,3213	85,42863	87,9074	87,7158
<b>P3</b>	11,8382	51,34629	74,63228	86,17879	87,6672	86,7204	89,8467	90,17425
<b>P4</b>	-	-	-	-	87,7444	92,1898	89,9016	87,86789
<b>Gj.snitt</b>	8,464466	46,20759	70,22794	85,23547	87,8814	85,67347	85,3931	82,82693
<b>Std.avv</b>	2,93418	4,79643	4,76039	1,54618	0,63473	5,69145	7,70698	11,57287
<b>RSD</b>	34,66469	10,38018	6,77848	1,81401	0,72225	6,64318	9,0253	13,97235

**Tabell 14:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:5 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	7,16854	44,7754	70,02511	91,29828	110,033	81,20625	86,4517	76,94233
<b>P2</b>	6,74191	50,5025	74,72205	88,42981	95,9260	93,08094	96,1055	94,93421
<b>P3</b>	10,3046	54,1255	78,18843	90,06141	89,4422	95,84909	95,4927	96,25135
<b>P4</b>	-	-	-	-	94,0708	98,42279	95,5619	93,75476
<b>Gj.snitt</b>	8,07169	49,8011	74,31186	89,92983	97,368	92,13976	93,4029	90,47066
<b>Std.avv</b>	1,9455	4,71434	4,09709	1,43875	8,87266	7,6084	4,64226	9,07636
<b>RSD</b>	24,1028	9,46632	5,51337	1,59986	9,1125	8,25745	4,97014	10,03237



**Tabell 15:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C22:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	31,54176	57,6496	58,46175	65,10592	61,3226	64,9795	73,6325	58,5320
<b>P2</b>	39,85572	59,4635	57,81516	68,11229	65,0354	60,3419	63,2580	69,7699
<b>P3</b>	40,16924	60,5530	59,39731	70,9966	63,8279	72,5854	70,1696	69,5917
<b>P4</b>	37,87265	58,9431	55,52691	59,91004	69,2786	69,9646	71,3096	82,2160
<b>P5</b>	36,47177	59,3423	61,3711	70,20356	64,1936	69,4612	74,9459	80,7104
<b>Gj.snitt</b>	37,18222	59,1903	58,51444	66,86568	64,7316	67,4665	70,6631	72,1640
<b>Std.avvi</b>	3,49522	1,04757	2,14226	4,5066	2,89372	4,83137	4,54579	9,64706
<b>RSD</b>	9,40023	1,76983	3,66107	6,73978	4,47033	7,16113	6,43304	13,3682

**Tabell 16:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1 min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	5,09199	29,3549	48,8984	65,3897	56,5290	51,15392	51,68407	44,27532
<b>P2</b>	5,64074	33,81676	53,70718	73,21994	64,6111	62,68593	63,16259	63,25457
<b>P3</b>	8,47252	41,26282	61,95034	72,2451	62,9430	64,92807	65,41258	66,51604
<b>P4</b>	-	-	-	-	63,5540	67,64336	64,77755	63,86089
<b>Gj.snitt</b>	6,40175	34,81149	54,85197	70,28491	61,9093	61,60282	61,25919	59,4767
<b>Std.av</b>	1,81421	6,01596	6,60085	4,26731	3,65245	7,25484	6,4533	10,23275
<b>RSD</b>	28,33923	17,28153	12,03393	6,07144	5,89968	11,77679	10,53442	17,20463

Tabell 17-20 viser beregnet utbytte (%) av FAMEs etter at enkle triglyserider med flerumettede fettsyrer ble transesterifisering på mikrobølgeovn ved 75 W\* ved ulike tidsintervall. BF<sub>3</sub> ble benyttet som katalysator.

\*De enumettede fettsyrene er ikke transesterifisert på mikrobølgeovn ved 75 W.

**Tabell 17:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C18:2 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 75 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	13,80373	63,79646	80,34622	83,15149	89,12426	87,8052	84,88429	86,89758
<b>P2</b>	15,91939	62,94112	77,01671	84,80911	86,81261	87,8109	88,79322	88,46718
<b>P3</b>	15,65812	56,47496	75,62021	83,20909	86,1077	83,3082	83,18884	81,84866
<b>P4</b>	13,57172	65,08984	79,53944	83,64556	79,61694	81,2878	80,57066	78,59368
<b>P5</b>	13,86735	62,56623	77,46078	84,48864	79,56433	74,1062	77,10775	74,35169
<b>Gj.snitt</b>	14,56406	62,17372	77,99667	83,86077	84,24516	82,8637	82,90895	82,03175
<b>Std.avvi</b>	1,12718	3,33001	1,92325	0,75294	4,393091	5,66278	4,40813	5,82941
<b>RSD</b>	7,739462	5,35598	2,46581	0,89784	5,21465	6,83385	5,316833	7,10629

**Tabell 18:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:4 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 75 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	8,36949	40,55344	57,9935	61,4536	60,21	65,27411	62,7427	62,45908
<b>P2</b>	7,9213	44,24291	55,4020	67,5117	63,95159	63,78657	65,2410	69,71052
<b>P3</b>	7,66955	35,94788	52,7680	62,4396	63,88432	66,71481	62,2840	67,79515
<b>P4</b>	7,80907	38,80719	58,2702	62,7328	67,57479	65,25445	70,6037	64,43871
<b>P5</b>	7,79158	40,7735	55,4741	61,6011	64,71272	57,59134	59,2574	59,49461
<b>Gj.snitt</b>	7,9122	40,06498	55,9815	63,1478	64,06668	63,72425	64,0258	64,77961
<b>Std.avvi</b>	0,27077	3,03019	2,24755	2,49898	2,62891	3,58132	4,24745	4,08778
<b>RSD</b>	3,42216	7,56319	4,01481	3,95735	4,1034	5,62003	6,63396	6,31029

**Tabell 19:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:5 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 75 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	8,10704	43,48109	61,74568	67,8697	68,1483	66,5992	67,9178	69,03526
<b>P2</b>	8,67632	48,174	60,40501	80,0428	69,76576	70,0162	73,0699	75,54744
<b>P3</b>	8,90999	41,93687	61,01132	67,3999	74,40127	71,0098	69,4819	72,16422
<b>P4</b>	7,99174	45,99371	61,49515	70,0912	70,18637	69,8220	72,2075	70,14667
<b>P5</b>	9,13376	45,30049	63,42732	69,8688	65,70164	63,0826	70,2899	63,96663
<b>Gj.snitt</b>	8,56377	44,97723	61,61689	71,0545	69,64066	68,106	70,5934	70,17204
<b>Std.avvi</b>	0,49831	2,38952	1,13407	5,16291	3,19061	3,2608	2,07514	4,26215
<b>RSD</b>	5,81887	5,31274	1,84051	7,26612	4,58153	4,78783	2,93956	6,07386

**Tabell 20:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 75 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	1min	3 min	5 min	7min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	4,57353	28,3425	41,3188	50,8904	51,8964	50,65813	53,9341	52,25523
<b>P2</b>	8,19004	29,5195	41,9194	50,5689	53,5420	54,47154	50,5110	56,04871
<b>P3</b>	5,29126	25,2323	39,3049	47,0201	50,9811	46,45435	44,9617	48,27154
<b>P4</b>	5,41133	28,7071	43,1112	49,9802	49,7588	47,7512	46,9245	48,51729
<b>P5</b>	5,43428	31,3412	42,9884	54,8337	43,9626	40,80061	45,0243	41,47789
<b>Gj.snitt</b>	5,78009	28,6285	41,7285	50,6587	50,0282	48,02716	48,2711	49,31413
<b>Std.avv</b>	1,39267	2,22344	1,54736	2,79251	3,66092	5,07998	3,88569	5,41141
<b>RSD</b>	24,09434	7,76651	3,70816	5,51240	7,31771	10,57731	8,04971	10,97333

Tabell 21-23 ble benyttet til å lage figur 3.3 som viser gjennomsnittlig utbytte (%) av enumettede og flerumettede FAMEs ved gitte tidsintervall etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 65, 70 og 75 W. Verdiene er hentet fra tabell 1-20.

**Tabell 21:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av FAMEs fra enumettede og flerumettede fettsyrer ved 65 W.

FAMEs av	Utbytte(%)						
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>C16:1</b>		63,15952	69,98398	74,4031	77,62355		
<b>C18:1</b>		61,65704	69,31665	74,77827	77,39901		
<b>C18:2</b>	50,89535	78,4399	88,79411	96,64846	97,6244	97,40681	97,67075
<b>C20:1</b>		65,03657	73,03964	78,50192	81,47331		
<b>C20:4</b>	29,69278	46,09108	57,73498	89,31484	93,75752	89,2744	87,67251
<b>C20:5</b>	31,2818	54,39814	65,09658	93,55814	96,58096	93,54376	92,51874
<b>C22:1</b>		64,0637	70,65273	77,14235	80,6948		
<b>C22:6</b>	20,2212	32,32722	39,84842	73,08935	77,7456	74,59118	73,14715
<b>Gj.snitt</b>	33,02278	58,14665	66,80839	82,17955	85,36239	88,70404	87,75229
<b>Std.avvik</b>	12,87671	13,92727	13,96656	9,460567	8,983503	9,97763	10,55796
<b>RSD</b>	38,99342	23,95197	20,90538	11,51207	10,52396	11,24822	12,03155

**Tabell 22:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av FAMEs fra enumettede og flerumettede fettsyrer ved 70 W.

FAMEs av	Utbytte(%)						
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>C16:1</b>	53,82891	78,11332	77,10041	84,23602	87,99654	85,53853	88,80312
<b>C18:1</b>	52,39256	71,14603	75,313	80,84052	80,09121	80,92757	84,81372
<b>C18:2</b>	65,07322	88,89141	96,49848	100,92038	102,35797	101,31509	102,09371
<b>C20:1</b>	47,08038	70,96033	68,77762	74,09982	69,41304	69,50818	74,95567
<b>C20:4</b>	45,20759	70,22795	85,23548	87,88152	85,67347	85,39312	82,82694
<b>C20:5</b>	49,80117	74,31186	89,92983	97,36805	92,13977	93,40296	90,47066
<b>C22:1</b>	37,18223	59,19035	58,51445	65,79868	67,46657	70,66316	72,16402
<b>C22:6</b>	34,81149	54,85197	70,28491	61,90933	61,60282	61,2592	59,47671
<b>Gj.snitt</b>	48,17219	70,96165	77,70677	81,63179	80,84267	81,00098	81,95057
<b>Std.avvik</b>	9,61678	10,5729	12,3547	13,95165	13,86331	13,28291	13,00572
<b>RSD</b>	19,96334	14,89946	15,89913	17,09096	17,14851	16,39846	15,8702

**Tabell 23:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av FAMEs fra flerumettede fettsyrer ved 75 W.

FAMEs av	Utbytte(%)						
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>C18:2</b>	62,17372	77,99667	83,86078	84,24517	82,86371	82,90895	82,03176
<b>C20:4</b>	40,06498	55,98159	63,1478	64,06668	63,72426	64,02582	64,77961
<b>C20:5</b>	44,97723	61,6169	71,05452	69,65067	68,106	70,59345	70,17204
<b>C22:6</b>	28,62857	41,72859	50,65871	50,02822	48,02717	48,27116	49,34141
<b>Gj.snitt</b>	43,96113	59,33094	67,18045	66,99769	65,68029	66,44985	66,58121
<b>Std.avvik</b>	13,94033	14,99662	13,93404	14,15471	14,33658	14,42697	13,56552
<b>RSD</b>	31,71058	25,27623	20,74120	21,12717	21,82783	21,71106	20,3744

Tabell 24-27 viser gjennomsnittlig utbytte av flerumettede FAMEs hvor det er utført fire ekstraksjoner etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W.

**Tabell 24:** Utbytte (%) av FAME til C18:2 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W og hvor fire ekstraksjoner ble utført.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	56,01986	77,9829	82,8750	88,56562	89,2537	92,7378	92,2864	92,1002
<b>P2</b>	64,7418	75,8344	83,7180	86,91617	91,3684	88,8859	88,1294	89,8538
<b>P3</b>	62,83199	78,61301	86,1860	89,24338	90,6776	88,0585	88,2940	86,8229
<b>P4</b>	57,66314	77,55734	85,0829	89,655	86,2387	89,0329	85,8376	86,9726
<b>Gj.snitt</b>	60,31419	77,49691	84,4655	88,59504	89,3846	89,6788	88,6368	88,9374
<b>Std.avv</b>	4,13974	1,19016	1,46398	1,206	2,27455	2,08396	2,67894	2,52817
<b>RSD</b>	6,86363	1,53575	1,73323	1,36125	2,54468	2,32381	3,02238	2,84263

**Tabell 25:** Utbytte (%) av FAME til C20:4 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W og hvor fire ekstraksjoner ble utført.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	28,2864	47,8881	60,3892	61,0457	67,1996	71,4187	68,3075	70,17437
<b>P2</b>	34,1682	51,8410	63,0507	64,4593	69,1155	69,6666	71,4734	72,04871
<b>P3</b>	36,1222	51,1018	62,3554	64,8954	67,1375	71,9459	69,4279	73,28983
<b>P4</b>	39,6414	52,6487	60,6747	68,1538	66,2503	68,2281	69,4243	68,27184
<b>Gj.snitt</b>	35,9992	49,6458	62,0874	70,0882	67,4257	70,3148	69,6583	70,94618
<b>Std.avv</b>	34,8435	50,6251	61,7115	65,7285	1,20709	1,69840	1,31999	2,19515
<b>RSD</b>	4,16659	1,88749	1,13719	3,50439	1,79025	2,41542	1,89495	3,09411

**Tabell 26:** Utbytte (%) av FAME til C20:5 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W og hvor fire ekstraksjoner ble utført.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	32,8315	50,8222	61,2472	74,8697	75,22352	80,32765	76,9604	80,00792
<b>P2</b>	35,8596	58,8221	69,1064	74,5224	78,08834	78,53159	77,9887	78,02904
<b>P3</b>	44,0230	59,6745	69,3217	76,7084	78,92253	79,57994	77,1586	79,27406
<b>P4</b>	43,5830	60,5776	70,2590	75,6492	76,94048	76,66369	73,9029	74,94267
<b>Gj.snitt</b>	38,1097	55,0082	67,7737	75,8213	77,29371	78,77571	76,5026	78,06342
<b>Std.avv</b>	38,8814	56,9809	67,5416	75,5142	1,60156	1,58908	1,7895	2,2351
<b>RSD</b>	4,87004	4,0436	3,62888	0,85698	2,07204	2,01722	2,33913	2,86318

**Tabell 27:** Utbytte (%) av FAME til C22:6 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W og hvor fire ekstraksjoner ble utført.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	13,3991	28,65432	33,11204	39,52627	48,3473	50,0013	49,0193	50,43672
P2	20,0200	30,45118	38,16888	46,27047	49,0297	49,8977	50,51651	49,76975
P3	20,1313	29,45802	35,1938	44,27555	48,7155	51,1622	51,3184	51,70012
P4	23,8284	33,64487	43,56484	46,39099	49,6617	52,7217	51,20885	51,28205
Gj.snitt	20,8522	30,14379	43,01281	47,6749	48,9386	50,9457	50,51576	50,79716
Std.avvi	19,6462	30,47043	38,61047	44,82763	0,55697	1,31547	1,05893	0,86332
RSD	3,81924	1,90443	4,63756	3,20320	1,13809	2,58209	2,096245	1,699544

Tabell 28 ble benyttet for å lage figur 3.4 som sammenlikner utbyttet av flerumettede FAMES etter at det ble utført henholdsvis to og fire ekstraksjoner etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. Verdiene er hentet fra tabell 11, 13, 14, 16 og 24-27.

**Tabell 28:** Utbytte (%) av metylestere til C18:2, C20:4, C20:5 og C22:6 etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W i 7min. Det ble utført henholdsvis to og fire ekstraksjoner etter transesterifisering.

FAME av	Utbytte (%)	
	2 Ekstraksjoner	4 Ekstraksjoner
C18:2	93,87861	82,64565
C20:4	77,4923	61,13087
C20:5	83,91776	68,26517
C22:6	57,74235	41,70315
Gj.snitt	78,25776	63,43621
Std.avvik	15,24811	17,02901
RSD	19,48447	26,84431

Tabell 29 ble benyttet til å lage figur 3.6 og sammenlikner utbytte av enumettede FAMES med ulik kjedelengde etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W i 7 minutter. Verdiene er hentet fra tabell 9, 10, 12 og 15.

**Tabell 29:** Utbytte (%) av enumettede FAMES etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W i 7 min.

FAME av	Utbytte(%)	Std.avvik
C16:1	77,10041	6,41958
C18:1	75,313	3,80935
C20:1	68,77762	6,82371
C22:1	58,51445	2,14226

Tabell 30 ble benyttet til å lage figur 3.7 og sammenlikner utbytte av FAMEs med lik kjedelengde og ulik grad av umettetethet etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W i 7 minutter. Verdiene er hentet fra tabell 9-16, 42, 43 og 44.

**Tabell 30:** Utbytte (%) av FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W i 7 min.

FAME av	Utbytte (%)	Std.avvik
C16:0	77,4568	4,53444
C16:1	77,10041	6,41958
C18:1	75,313	3,80935
C18:2	96,49848	1,7404
C20:0	98,5106	6,21491
C20:1	68,77762	6,82371
C20:4	85,23548	1,54177
C20:5	89,92983	1,43875
C22:1	58,51445	2,14226
C22:6	70,28491	4,26731

Tabell 30-38 viser beregnet utbytte (%) av FAMEs etter at sammensatte triglyserider med mettede og umettede fettsyrer ble transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W ved ulike tidsintervall. BF<sub>3</sub> ble benyttet som katalysator.

**Tabell 30:** Utbytte (%) av metylesteren til C16:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-AdPO ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	54,05222	70,92041	77,04436	80,86116	73,06815	76,20191
P2	55,10893	72,8677	75,0237	78,45799	77,12631	74,40678
P3	50,320172	63,57528	68,93361	70,79985	73,59084	73,14918
P4	54,31365	68,92282	73,439	78,30613	74,27584	72,63351
P5	55,58757	71,61939	75,49106	78,25075	72,13746	76,06773
Gj.snitt	53,87651	69,58112	73,98635	77,33518	74,03972	74,49182
Std.avvik	2,08063	3,64874	3,10328	3,81395	1,89386	1,63333
RSD	3,86185	5,24387	4,1944	4,93171	2,5579	2,19264

**Tabell 31:** Utbytte (%) av metylesteren til C18:1 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-AdPO ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	58,35505	74,78732	80,92623	85,91879	77,78131	76,11408
P2	56,30069	74,36678	78,08896	82,82688	79,37472	77,31388
P3	50,28789	66,34295	75,19478	75,08357	79,13587	78,07463
P4	55,0495	70,74145	76,71413	81,92248	80,28278	75,72587
P5	55,94571	72,08491	79,84571	82,23448	80,60773	81,23684
Gj.snitt	55,18777	71,66468	78,15396	81,59724	79,43648	77,69306
Std.avvik	2,99469	3,40595	2,31201	3,97264	1,10926	2,1915
RSD	5,42637	4,75262	2,95828	4,8686	1,39641	2,82072

**Tabell 32:** Utbytte (%) av metylesteren til C20:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-AdPO ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	63,01837	85,15963	85,45214	98,54188	88,45732	86,40555
P2	64,88805	91,02176	93,567	99,31142	94,28785	94,75929
P3	58,97321	81,62283	94,03944	93,04678	89,63813	89,88919
P4	65,85672	87,56832	92,70955	97,93471	93,08142	90,66394
P5	71,94913	88,47514	99,62566	98,33855	93,69938	92,344
Gj.snitt	64,9371	86,76954	93,07876	97,43467	91,83282	90,81239
Std.avvik	4,72404	3,56051	5,05779	2,50343	2,61156	3,09105
RSD	7,27479	4,10341	5,43388	2,56935	2,84381	3,40378

**Tabell 33:** Utbytte (%) av metylesteren til C16:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-AdOP ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	61,34084	85,84604	81,14586	89,56045	87,27809	86,07212
P2	67,44213	82,10868	85,87628	85,96954	81,51957	83,12171
P3	64,76859	74,74771	80,73444	82,03704	83,04259	83,63051
P4	67,15197	77,67752	81,58873	86,65535	83,42498	80,77963
P5	64,12887	77,73236	83,59141	85,9638	82,0107	83,99856
Gj.snitt	64,96648	79,62246	82,58734	86,03724	83,45519	83,52051
Std.avvik	2,48954	4,35984	2,14089	2,68359	2,2704	1,89887
RSD	3,83204	5,47564	2,59227	3,1191	2,72051	2,27354

**Tabell 34:** Utbytte (%) av metylesteren til C18:1 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-AdOP ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	57,57077	89,68186	82,71416	97,1621	84,3734	83,68901
P2	66,15398	82,10868	85,87628	85,96954	84,15389	83,08317
P3	62,197	74,94159	84,33609	83,87632	84,769	85,35282
P4	62,03969	76,23826	82,94183	89,20084	85,53116	86,09803
P5	58,76712	75,90693	85,43916	90,04506	86,27831	84,84239
Gj.snitt	61,34571	79,77546	84,26151	89,25078	85,02115	84,61308
Std.avvik	3,36248	6,21338	1,42616	5,07132	0,87691	1,22468
RSD	5,4812	7,78858	1,69254	5,68212	1,0314	1,44739

**Tabell 35:** Utbytte (%) av metylesteren til C20:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-AdOP ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	75,22388	100,66591	94,21293	113,40118	107,57384	107,364
P2	84,2147	97,24507	107,14797	108,1868	97,87673	98,63856
P3	81,53859	96,89009	106,67692	108,49415	100,88999	102,62538
P4	83,54492	102,51931	107,88044	114,22789	109,8733	103,70562
P5	80,13395	98,71084	110,52215	115,53438	108,04432	101,86002
Gj.snitt	80,93121	99,20624	105,28808	111,96888	104,85164	102,83872
Std.avvik	3,57739	2,37504	6,36716	3,40019	5,17602	3,15731
RSD	4,42029	2,39404	6,04737	3,03673	4,93652	3,07016

**Tabell 36:** Utbytte (%) av metylesteren til C16:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-PAdO ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	56,88225	76,679006	80,20251	84,30203	75,78547	76,87317
P2	52,25339	69,18226	76,59603	78,8107	76,25596	74,80609
P3	55,29107	68,98421	74,05755	77,46453	77,59128	77,16567
P4	55,23663	70,33072	74,74352	78,41779	78,03311	77,15896
P5	56,20715	67,70128	73,38396	76,33491	76,16536	77,18728
Gj.snitt	55,1741	70,5755	75,79671	79,06599	76,76624	76,63823
Std.avvik	1,77011	3,5372	2,73885	3,07916	0,98349	1,03232
RSD	3,20822	5,01194	3,61342	3,89442	1,28115	1,347



**Tabell 37:** Utbytte (%) av metylesteren til C18:1 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-PAdO ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	59,02772	76,58488	84,83655	90,09376	80,53795	79,19748
P2	51,11935	71,16007	78,99794	83,63407	79,76787	77,8195
P3	52,41578	71,44167	76,32987	83,31986	79,53265	79,2743
P4	53,23599	70,27478	77,89791	82,42854	81,20221	78,68264
P5	52,94443	69,4114	75,2905	79,38181	79,22645	78,4537
Gj.snitt	53,74865	71,77456	78,67055	83,77161	80,05343	78,68552
Std.avvik	3,06055	2,80453	3,72918	3,91365	0,80485	0,59424
RSD	5,69419	3,90741	4,74025	4,67181	1,00539	0,75521

**Tabell 38:** Utbytte (%) av metylesteren til C20:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sn-PAdO ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
P1	70,54182	89,27551	101,47815	104,85187	97,21754	97,71631
P2	61,13807	86,93814	94,8877	99,94259	96,78362	94,80285
P3	65,38332	85,21459	94,12975	104,72585	98,24112	97,38182
P4	66,47149	88,57738	98,80386	102,6585	96,93584	94,88267
P5	68,08606	87,96602	96,52527	101,00366	94,27456	95,27797
Gj.snitt	66,32415	87,59433	97,16495	102,63649	96,69054	96,01232
Std.avvik	3,4891	1,58309	3,00405	2,19073	1,46525	1,41927
RSD	5,26068	1,80729	3,0917	2,13445	1,5154	1,47822

De gjennomsnittlige beregnede utbyttene i tabell 39-41 ble benyttet til å lage figur 3.8 som sammenlikner utbytte av FAMEs fra samme posisjon i tre sammensatte triglyserider. Dataene er hentet fra tabell 30-38.

**Tabell 39:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av metylestere til fettsyrer i posisjon sn1 fra de tre sammensatte triglyseridene; sn-AdPO, sn-AdOP og sn-PAdO.

FAME fra	Utbytte (%) av metylestere i posisjon sn1					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
Sn-AdPO	64,9371	86,76954	93,07876	97,43467	91,83282	90,81239
Sn-AdOP	80,93121	99,20624	105,2881	111,9689	104,8516	102,8387
Sn-PAdO	55,1741	70,5755	75,79671	79,06599	76,76624	76,63823
Gj.snitt	67,01414	85,51709	91,38786	96,15652	91,15023	90,09645
Std.avvik	13,00357	14,3564	14,81823	16,48865	14,05514	13,11491
RSD	19,40421	16,78776	16,21466	17,14772	15,41975	14,55652

**Tabell 40:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av metylestere til fettsyrer i posisjon sn2 fra de tre sammensatte triglyseridene; sn-AdPO, sn-AdOP og sn-PAdO.

FAME fra	Utbytte (%) av metylestere i posisjon sn2					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
<b>Sn-AdPO</b>	53,87651	69,58112	73,98635	77,33518	74,03972	74,49182
<b>Sn-AdOP</b>	61,34571	79,77546	84,2615	89,25077	85,02115	84,61308
<b>Sn-PAdO</b>	66,32416	87,59433	97,16495	102,6365	96,69054	96,01232
<b>Gj.snitt</b>	60,51546	78,98364	85,1376	89,74082	85,25047	85,03907
<b>Std.avvik</b>	6,26522	9,03267	11,61411	12,65778	11,32715	10,76657
<b>RSD</b>	10,35309	11,43613	13,64157	14,10482	13,28691	12,66074

**Tabell 41:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av metylestere til fettsyrer i posisjon sn3 fra de tre sammensatte triglyseridene; sn-AdPO, sn-AdOP og sn-PAdO.

FAME fra	Utbytte (%) av metylestere i posisjon sn3					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
<b>Sn-AdPO</b>	55,18777	71,66468	78,15396	81,59724	79,43648	77,69306
<b>Sn-AdOP</b>	64,9371	86,76954	93,07876	97,43467	83,45519	83,52051
<b>Sn-PAdO</b>	53,74865	71,77456	78,67055	83,77161	80,05343	78,68552
<b>Gj.snitt</b>	57,95784	76,73626	83,30109	87,60117	80,9817	79,96636
<b>Std.avvik</b>	6,0869	8,68925	8,47165	8,58517	2,1642	3,11773
<b>RSD</b>	10,50228	11,32352	10,16991	9,8003	2,67246	3,8988

De gjennomsnittlige beregnede utbyttene fra tabell 42-44 ble benyttet til å lage figur 3.9 som sammenlikner utbytte av FAMEs fra tre sammensatte triglyserider. Dataene er hentet fra tabell 30-38.

**Tabell 42:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av C16:0 fra de tre sammensatte triglyseridene; sn-AdPO, sn-AdOP og sn-PAdO.

FAME fra	Utbytte (%) av metylestere til C16:0					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
<b>Sn-AdPO</b>	53,87651	69,58112	73,98635	77,33518	74,03972	74,49182
<b>Sn-AdOP</b>	64,96648	79,62246	82,58734	86,03724	83,45518	83,52051
<b>Sn-PAdO</b>	55,1741	70,5755	75,79671	79,06599	76,76624	76,63823
<b>Gj.snitt</b>	58,0057	73,25969	77,4568	80,8128	78,08705	78,21685
<b>Std.avvik</b>	6,06303	5,5327	4,53444	4,606525	4,8447	4,71682
<b>RSD</b>	10,45247	7,55218	5,85416	5,70023	6,20423	6,03043

**Tabell 43:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av C18:1 fra de tre sammensatte triglyseridene; sn-AdPO, sn-AdOP og sn-PAdO.

FAME fra	Utbytte (%) av metylestere til C18:1					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
<b>Sn-AdPO</b>	55,18777	71,66468	78,15396	81,59724	79,43648	77,69306
<b>Sn-AdOP</b>	61,34571	79,77546	84,2615	89,25077	85,02115	84,61308
<b>Sn-PAdO</b>	53,74865	71,77456	78,67055	83,77161	80,05343	78,68552
<b>Gj.snitt</b>	56,76071	74,4049	80,362	84,87321	81,50369	80,33055
<b>Std.avvik</b>	4,0354	4,65137	3,38693	3,94389	3,06179	3,74183
<b>RSD</b>	7,10949	6,25142	4,21459	4,64680	3,75663	4,65804

**Tabell 44:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av C20:0 fra de tre sammensatte triglyseridene; sn-AdPO, sn-AdOP og sn-PAdO.

FAME fra	Utbytte (%) av metylestere til C20:0					
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min
<b>Sn-AdPO</b>	64,9371	86,76954	93,07876	97,43467	91,83282	90,81239
<b>Sn-AdOP</b>	80,93121	99,20624	105,2881	111,9689	104,8516	102,8387
<b>Sn-PAdO</b>	66,32416	87,59433	97,16495	102,6365	96,69054	96,01232
<b>Gj.snitt</b>	70,73082	91,19004	98,5106	104,0134	97,79167	96,55448
<b>Std.avvik</b>	8,86098	6,95447	6,21491	7,36429	6,57889	6,03147
<b>RSD</b>	12,52774	7,62635	6,30887	7,08014	6,72745	6,2467

Tabell 45-52 viser beregnet utbytte (%) av FAMEs etter at enkle triglyserider med enumettede og flerumettede fettsyrer ble transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W ved ulike tidsintervall og hvor HCl ble benyttet som katalysator.

**Tabell 45:** Beregnet utbytte (%) av metylester til C16:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>P1</b>	15,92734	21,11762	25,00833	26,80733	25,03014	27,50707	30,37098	32,13892
<b>P2</b>	15,91027	18,60636	23,71254	25,90019	26,53083	30,328	35,17874	37,34371
<b>P3</b>	14,21247	19,74074	22,67657	23,93621	28,35533	33,24198	34,3584	38,48373
<b>P4</b>	14,5554	20,54971	22,37267	26,70102	26,55563	32,85996	32,9534	35,39538
<b>P5</b>	15,09437	21,20003	24,32937	25,83669	27,23239	32,47015	34,27918	36,36989
<b>Gj.snitt</b>	15,13997	20,24289	23,6199	25,83629	26,74086	31,28143	33,42814	35,94633
<b>Std.avvik</b>	0,7774	1,08464	1,10512	1,15164	1,20966	2,39287	1,88586	2,41715
<b>RSD</b>	5,13472	5,35814	4,67875	4,45744	4,52364	7,6495	5,64153	6,72432

**Tabell 46:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C18:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	14,02999	19,21079	22,88895	26,59685	22,39386	25,23961	26,68411	28,24782
P2	14,16837	17,41085	21,56751	23,23994	24,23024	28,42218	31,42479	32,97392
P3	13,73995	17,73185	20,65672	23,22427	25,88389	31,14455	33,33023	34,92002
P4	12,67274	18,14954	20,37351	23,8224	23,40143	28,06855	29,4365	30,78326
P5	13,10471	18,57955	21,31415	24,03648	24,72335	28,52978	30,81847	32,04368
Gj.snitt	13,54315	18,21652	21,36017	24,18399	24,12655	28,28093	30,33882	31,79374
Std.avvik	0,63571	0,70867	0,98115	1,39523	1,32129	2,09624	2,47634	2,49116
RSD	4,69393	3,89027	4,59336	5,76924	5,47648	7,41221	8,16228	7,83538

**Tabell 47:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C18:2 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	19,01605	26,12234	29,85961	38,50347	37,71655	44,98732	42,81858	46,88453
P2	19,56671	28,9674	33,55395	37,72896	37,1254	45,83717	49,02983	52,05335
P3	21,24326	30,97149	37,32188	40,45917	37,89073	43,40834	46,5298	48,42781
P4	20,78449	28,45697	30,65461	37,09054		40,14901	43,33988	46,89076
P5	20,33987	28,72077	35,76725	40,79575	39,36867	43,68107	47,06865	49,4578
Gj.snitt	20,19008	28,64779	33,43146	38,91558	38,02534	43,61258	45,75735	48,74285
Std.avvik	0,90165	1,72637	3,20450	1,64517	0,95357	2,17264	2,6223	2,14787
RSD	4,46581	6,02618	9,58528	4,22754	2,50773	4,98168	5,73088	4,40654

**Tabell 48:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	13,91777	17,83064	25,35519	26,99752	22,18372	25,90968	26,0148	27,06104
P2	14,50228	17,58008	22,05367	24,69255	24,64082	27,59134	30,24649	31,16037
P3	14,70493	18,25392	20,66418	23,71566	24,5163	30,39074	32,34047	33,43491
P4	11,71249	17,31557	20,77907	25,68089	22,04107	26,55589	27,01119	29,77493
P5	12,81781	18,67546	20,70936	24,16531	23,9956	27,30376	30,07693	31,66538
Gj.snitt	13,53106	17,93113	21,91229	25,05039	23,4755	27,55028	29,13798	30,61933
Std.avvik	1,25367	0,54094	2,010134	1,31166	1,26866	1,71836	2,58088	2,38164
RSD	9,2651	3,01677	9,17354	5,23607	5,4042	6,23718	8,8575	7,77823

**Tabell 49:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:4 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	10,49861	15,09764	19,6324	19,26151	22,99632	27,25198	25,69078	29,38917
P2	10,44172	16,60652	17,72614	20,20588	23,04591	26,67894	30,48516	33,37145
P3	11,36667	15,05366	19,86672	21,93502	22,20012	25,39016	28,48002	30,56768
P4	11,5278	15,75442	17,88411	21,11195		23,04404	26,24439	28,61375
P5	10,75413	16,1993	20,07447	23,5045	23,01259	27,13294	29,54305	29,7928
Gj.snitt	10,91779	15,74231	19,03677	21,20377	22,81374	25,89961	28,08868	30,34697
Std.avvik	0,50069	0,67928	1,13653	1,62824	0,40957	1,75864	2,0714	1,83199
RSD	4,58596	4,31499	5,97018	7,67902	1,7954	6,7902	7,3745	6,03681

**Tabell 50:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C20:5 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	9,14524	14,73059	19,33636	22,28962	23,66171	29,13151	27,33163	31,86857
P2	10,4814	18,13863	21,18093	22,18549	25,55962	31,62721	33,99086	36,96083
P3	12,25172	17,61881	22,35873	24,08006	24,44931	28,94366	31,17297	33,37398
P4	10,58521	16,81701	19,06587	22,46831		25,00142	30,23525	32,40107
P5	12,6784	18,52765	20,19189	25,94351	25,3333	30,34233	33,47267	34,88427
Gj.snitt	11,02839	17,16654	20,42676	23,3934	24,75099	29,00923	31,24068	33,89774
Std.avvik	1,43709	1,50484	1,35991	1,62078	0,86996	2,4856	2,68521	2,0608
RSD	13,03083	8,76611	6,65749	6,92837	3,51486	8,5683	8,59524	6,07947

**Tabell 51:** Beregnet ubytte (%) av metylester til C22:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	14,12663	19,19071	22,70201	27,61104	21,36355	23,29619	26,2664	26,16383
P2	13,69729	16,57339	21,33815	24,19283	21,79348	25,30981	29,00393	29,42289
P3	15,73656	17,67119	19,76904	20,61878	22,41292	28,37786	32,22772	31,71552
P4	11,88714	15,70274	18,439	22,21011	21,45576	24,63709	25,97403	29,90022
P5	13,18126	17,87276	21,15963	20,62502	22,12944	25,18554	29,78897	29,08794
Gj.snitt	13,72578	17,40216	20,68157	23,05156	21,83103	25,3613	28,65221	29,25808
Std.avvik	1,40373	1,32925	1,62816	2,94134	0,44397	1,86563	2,6012	2,0051
RSD	10,22696	7,63843	7,87253	12,75983	2,03364	7,35622	9,07853	6,85318

**Tabell 52:** Beregnet utbytte (%) av metylester til C22:1 etter transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

Parallell	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	10 min	15 min	20 min	25 min
P1	6,09805	6,93398	9,22238	10,69604	13,39211	16,58632	15,72506	18,11149
P2	5,6767	8,29121	10,02142	12,97318	14,3193	16,41703	21,0293	22,50252
P3	5,82595	9,256	10,65298	12,12218	13,4788	17,05743	17,88701	20,1487
P4	5,76215	8,13623	9,78486	11,31498		15,45307	16,2405	18,29737
P5	6,07715	8,75584	11,07988	14,24423	14,28742	17,04186	18,67735	18,42032
Gj.snitt	5,888	8,274652	10,1523	12,27012	13,86941	16,51114	17,91184	19,49608
Std.avvik	0,18989	0,86767	0,72938	1,39672	0,50250	0,65462	2,11427	1,86921
RSD	3,22506	10,48591	7,18438	11,3831	3,6231	3,96472	11,80376	9,58764

De gjennomsnittlige utbyttene fra tabell 22 og 53\*\* ble benyttet til å lage figur 3.10 som sammenlikner utbyttet av FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W hvor BF<sub>3</sub> og HCl er benyttet som katalysatorer.

\*\* Verdiene er hentet fra tabell 45-52.

**Tabell 53:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av FAMEs fra enumettede og flerumettede fettsyrer ved 70 W. HCl ble benyttet som katalysator ved tilsvarende konsentrasjon som BF<sub>3</sub>.

FAME av	Utbytte (%)							
	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	20 min	25 min	
C16:1	15,13997	20,24289	23,6199	26,28858	31,28143	32,42814	35,94633	
C18:1	13,54314	18,21652	21,36017	24,15527	28,28093	30,33882	31,79374	
C18:2	20,19008	28,64779	33,43146	38,51992	43,61258	45,75735	48,74285	
C20:1	13,53106	17,93113	21,91229	24,26294	27,55028	29,13798	30,61933	
C20:4	10,91779	15,74231	19,03677	21,91931	25,89961	28,08868	30,34697	
C20:5	11,02839	17,16654	20,42676	23,99677	29,00923	31,24068	33,89774	
C22:1	13,72578	17,40216	20,68157	22,44129	25,3613	28,65221	29,25808	
C22:6	5,888	8,27465	10,1523	12,98092	16,51114	17,91184	19,49608	
Gj.snitt	12,99553	17,953	21,32765	24,32063	28,43831	30,44446	32,51264	
Std.avvik	4,07403	5,59555	6,36357	7,00526	7,53707	7,6214	8,15863	
RSD	31,34944	31,1678	29,8372	28,8038	26,5032	25,0338	25,0937	

De beregnede utbyttene fra i tabell 22, 53 og 54 ble benyttet til å lage figur 3.11 som sammenlikner utbyttet av FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering ved 70 W hvor 10% BF<sub>3</sub>-MeOH, 10% HCl-MeOH og 46% HCl-MeOH er benyttet.

**Tabell 54:** Utbytte (%) av enumettede og flerumettede FAMEs etter transesterifisering av enkle triglyserider ved 70 W i 7 min, hvor 46% HCl i metanol ble benyttet.

Parallell	Utbytte (%)							
	C16:1	C18:1	C18:2	C20:1	C20:4	C20:5	C22:1	C22:6
P1	51,8585	50,7683	68,02618	53,7736	51,64585	56,03189	48,78033	90,62004
P2	45,2168	45,7938	64,48585	45,6579	47,9413	53,14275	44,94052	35,86183
P3	52,9559	49,6407	65,95912	49,4430	55,41213	54,99112	49,37164	40,58143
P4	52,4942	50,8193	68,81354	50,9736	49,67999	55,91491	47,66906	39,47165
Gj.snitt	50,6313	49,2555	66,82117	49,9620	51,16981	55,02016	47,69038	38,63830
Std.avv	3,63764	2,37108	1,96795	3,38359	3,20763	1,33538	1,96442	2,46769
RSD	7,18456	4,81376	2,94509	6,77232	6,26860	2,42707	4,11911	6,38665

De beregnede utbyttene i tabell 22 og 55 ble benyttet til å lage figur 3.12 som sammenlikner utbytte av FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering og etter transesterifisering med tradisjonell metode.

**Tabell 55:** Utbytte (%) av enumettede og flerumettede FAMEs etter transesterifisering av enkle triglyserider med tradisjonell metode.

Parallell	Utbytte (%)							
	C16:1	C18:1	C18:2	C20:1	C20:4	C20:5	C22:1	C22:6
P1	79,29345	77,57617	109,3237	71,7199	91,5929	95,37328	62,05451	55,08392
P2	77,92103	78,83229	105,8708	77,9619	92,04288	84,37225	62,78461	55,17146
P3	82,2146	85,31061	110,2678	80,5661	96,39355	95,50252	66,76405	57,80569
P4	78,93798	79,65987	113,0043	80,9156	93,14829	91,78306	68,34329	57,10513
P5	84,08398	82,95635	108,7794	86,916	89,51896	93,3886	66,69101	56,65677
Gj.snitt	80,49020	80,86705	109,4492	79,6159	92,53931	92,08394	65,32749	56,36459
Std.avvi	2,56569	3,18347	2,577731	5,49920	2,52441	4,57628	2,74757	1,20148
RSD	3,18758	3,93666	2,35515	6,90716	2,72794	4,969686	4,205848	2,131621

**Tabell 56:** Gjennomsnittlig beregnet utbytte (%) av enumettede og flerumettede FAMEs etter transesterifisering av enkle triglyserider med tradisjonell metode.

FAME av	Utbytte (%)
C16:1	80,49021
C18:1	80,86706
C18:2	109,44925
C20:1	79,61593
C20:4	92,53932
C20:5	92,08394
C22:1	65,32749
C22:6	56,36459
Gj.snitt	82,0922238
Std.avvik	16,5207663
RSD	20,1246422

Tabell 57-67 viser beregnet utbytte (%) av FAMEs etter at enkle og sammensatte triglyserider med mettede og umettede fettsyrer ble transesterifisering på mikrobølgeovn ved 70 W ved ulike tidsintervall og hvor  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ble benyttet som katalysator.

**Tabell 57:** Utbytte (%) av metylester til C16:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W.  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	59,9056	71,6585	68,6749	57,9519	67,4439	71,7307	70,3745	70,6143
P2	60,8873	61,1692	69,0477	61,191	68,7490	64,7066	76,3375	75,8080
P3	60,3956	55,6931	58,0359	52,8859	67,4904	69,8980	76,0345	72,5149
P4	55,8505	54,4544	50,2321	54,8996	70,3659	78,5503	70,1693	72,1105
P5	-	-	-	-	67,2003	77,1365	71,1464	70,7334
Gj.snitt	59,2597	60,7438	61,4977	56,7321	68,2499	72,4044	72,8124	72,3562
Std.avvi	2,30791	7,83961	9,08133	3,62953	1,32801	5,616	3,10295	2,10169
RSD	3,89456	12,906	14,7669	6,39766	1,9458	7,75642	4,26156	2,90463

**Tabell 58:** Utbytte (%) av metylester til C16:1 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W.  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	56,7340	73,3339	75,8571	84,4693	76,2216	81,1920	86,8069	82,7458
P2	53,7733	76,3207	79,9597	82,3649	79,6566	81,6692	83,9079	84,1407
P3	49,0629	70,7558	67,8481	80,5071	74,8160	82,7563	85,2042	86,5703
P4	54,1232	65,6058	80,6322	81,4438	78,8625	87,6108	87,9895	86,1217
P5	53,6490	74,6069	78,4005	83,9062	-	-	-	-
Gj.snitt	53,4685	72,1246	76,5395	82,5383	77,3892	83,3071	85,9771	84,8946
Std.avvi	2,76708	4,17132	5,19416	1,65479	2,25806	2,94287	1,79047	1,77946
RSD	5,17516	5,78349	6,78624	2,00487	2,91779	3,53255	2,0825	2,09608

**Tabell 59:** Utbytte (%) av metylester til C18:1 fra etter mikrobølgeassistert transesterifisering av enkle triglyserider ved 70 W.  $\text{CH}_3\text{ONa}$  ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	52,6233	70,1141	71,1575	77,3423	68,9098	75,7757	79,7859	80,3580
P2	53,7733	76,3207	79,9597	82,3649	77,3153	79,5932	78,9973	81,6229
P3	43,5167	65,3163	65,6337	76,8618	72,3153	81,0497	81,1852	83,3031
P4	48,6318	63,3765	74,7426	78,2319	75,8127	82,9439	83,8789	82,5352
P5	49,7267	73,9735	74,0461	80,0746	-	-	-	-
Gj.snitt	49,6544	69,8202	73,1079	78,9751	73,5883	79,8406	80,9618	81,9548
Std.avvi	4,01567	5,50905	5,24801	2,25745	3,75708	3,03739	2,14485	1,26684
RSD	8,08724	7,89034	7,17844	2,85843	5,10554	3,80432	2,64920	1,54578



**Tabell 60:** Utbytte (%) av metylester til C18:1 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av sammensatte triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	54,3470	66,4467	63,5947	45,5552	44,8058	56,2768	57,4342	65,3434
P2	56,9021	53,7823	60,8071	48,1577	61,4848	53,6488	69,0058	66,8075
P3	49,0718	43,4484	46,4007	39,7211	61,7091	62,8375	70,112	66,2493
P4	40,5856	37,8428	39,9920	44,8387	64,6406	66,4576	61,8600	66,9563
P5	-	-	-	-	63,4447	72,6243	61,4780	62,8093
Gj.snitt	50,2266	50,3800	52,6986	44,5682	59,2170	62,3690	63,9780	65,6331
Std.avvi	7,207	12,5822	11,3371	3,53207	8,15973	7,66918	5,39586	1,70055
RSD	14,3489	24,9747	21,5131	7,92508	13,7793	12,2964	8,43393	2,591

**Tabell 61:** Utbytte (%) av metylester til C18:2 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	78,3420	99,0099	102,806	109,142	100,332	106,337	106,568	108,850
P2	72,3992	103,005	105,008	106,824	105,675	109,572	107,001	108,695
P3	64,5539	92,7020	100,269	106,613	96,3522	106,449	105,884	110,058
P4	70,6640	95,0036	107,308	111,139	102,609	110,699	109,787	111,618
P5	74,7853	100,278	103,491	105,947	-	-	-	-
Gj.snitt	72,1489	98	103,776	107,933	101,242	108,264	107,310	109,805
Std.avvi	5,12971	4,1326	2,6131	2,1595	3,92688	2,20986	1,71395	1,35323
RSD	7,10989	4,21695	2,51801	2,00077	3,8787	2,04117	1,59719	1,23239

**Tabell 62:** Utbytte (%) av metylester til C20:0 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	73,3506	79,8388	80,5267	75,5356	64,3547	59,0098	72,3907	61,2711
P2	70,5425	73,9160	73,7200	80,4703	72,9407	73,6743	72,9175	68,8332
P3	70,5703	79,0199	76,6552	79,9994	63,5549	70,7393	72,5818	74,4285
P4	72,0823	72,0796	76,4494	75,7575	69,0755	76,0032	76,5084	78,6580
P5	-	-	-	-	70,1943	79,4621	75,4122	81,5403
Gj.snitt	71,6365	76,2136	76,8378	77,9407	68,0240	71,7778	73,9621	72,9462
Std.avvi	1,35037	3,80292	2,79957	2,65756	3,98204	7,81986	1,87432	8,09174
RSD	1,88503	4,98982	3,64348	3,40972	5,85388	10,8945	2,53416	11,0927

**Tabell 63:** Utbytte (%) av metylester til C20:1 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	51,2452	63,0546	61,2776	77,4183	61,8130	65,6775	76,7465	73,7608
P2	43,7148	64,9795	72,0093	75,606	73,9579	78,6288	77,1790	72,1971
P3	43,4922	63,3800	62,2875	76,7300	67,0862	75,2193	81,4255	75,5145
P4	46,9762	63,5864	68,0233	71,3434	61,8130	65,6775	76,7465	73,7608
P5	40,1940	71,0459	67,7352	78,8034	-	-	-	-
Gj.snitt	45,1245	65,2093	66,2666	75,9802	67,3843	74,3686	79,5349	75,1267
Std.avvi	4,17891	3,34448	4,44253	2,83903	4,99457	5,97845	3,027	2,9365
RSD	9,26083	5,12883	6,70402	3,73654	7,41206	8,03893	3,80584	3,90872

**Tabell 64:** Utbytte (%) av metylester til C20:4 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	71,1898	86,4602	87,9769	94,5213	89,6459	95,2486	94,7242	96,4207
P2	65,4414	89,9818	87,7075	91,7337	90,0406	90,8883	91,0994	95,1830
P3	60,2256	86,2061	74,3399	93,3495	87,6917	93,5177	88,6966	96,3486
P4	63,7461	74,3360	92,8752	93,3252	92,2026	99,2083	100,874	99,0641
P5	54,9488	88,3457	93,1706	98,9354	-	-	-	-
Gj.snitt	63,1103	85,0660	87,2140	94,3730	89,8952	94,7157	93,8487	96,7541
Std.avvi	6,04254	6,19068	7,65012	2,73626	1,8496	3,49054	5,29883	1,64115
RSD	9,57455	7,2775	8,77166	2,89941	2,05751	3,68528	5,64614	1,69621

**Tabell 65:** Utbytte (%) av metylester til C20:5 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	75,0723	91,3486	96,7044	101,341	95,3155	96,9031	101,210	102,732
P2	74,2012	100,907	100,281	101,645	103,483	103,326	102,482	104,969
P3	65,4240	92,3562	84,9229	103,239	96,3819	102,492	101,231	101,865
P4	72,1559	82,4808	103,142	105,216	100,915	107,419	108,499	104,804
P5	58,6474	95,7639	100,428	104,628	-	-	-	-
Gj.snitt	69,1001	92,5714	97,0959	103,214	99,0239	102,535	103,356	103,592
Std.avvi	6,9606	6,76462	7,1789	1,73081	3,83817	4,32853	3,4803	1,5369
RSD	10,0732	7,30747	7,39361	1,67691	3,876	4,22149	3,3673	1,4836

**Tabell 66:** Utbytte (%) av metylester til C22:1 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	36,7874	51,2805	53,5024	59,8829	52,1136	58,8527	63,8002	64,1518
P2	36,9101	56,0692	58,2188	59,8206	60,2784	65,5357	62,9144	67,6175
P3	31,3960	50,6486	44,7854	56,1083	59,0308	65,4759	64,3823	70,7546
P4	35,7486	46,7109	58,9026	59,7521	63,0902	72,7676	73,1899	69,3672
P5	29,9211	56,9770	58,7826	66,5932	-	-	-	-
Gj.snitt	34,1526	52,3372	54,8384	60,4314	58,6283	65,658	66,0717	67,9728
Std.avvi	3,26334	4,2154	6,0488	3,80108	4,66315	5,68352	4,78373	2,85243
RSD	9,55516	8,05434	11,0301	6,2899	7,95376	8,65624	7,24	4,19643

**Tabell 67:** Utbytte (%) av metylester til C22:6 etter mikrobølgeassistert transesterifisering av triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
P1	52,4687	59,9603	57,5721	61,0244	57,2447	58,6533	62,6931	62,4247
P2	56,1373	65,1065	63,6710	65,1884	65,9635	64,6637	66,2660	66,0148
P3	48,8946	62,5034	50,2679	60,7739	63,4768	64,6834	64,0261	67,9908
P4	52,1127	52,5265	63,8575	63,6121	68,6585	71,2270	70,8827	71,9450
P5	40,9261	62,538	63,0248	67,1395	-	-	-	-
Gj.snitt	50,1079	60,5269	59,6787	63,5477	63,8359	64,8068	65,967	67,0938
Std.avvi	5,73855	4,82832	5,86512	2,72296	4,87705	5,1355	3,59348	3,97089
RSD	11,4523	7,97714	9,82783	4,28491	7,63998	7,92431	5,4474	5,9184

Tabell 68 ble benyttet til å lage figur 3.13 som viser gjennomsnittlig utbytte av FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering hvor CH<sub>3</sub>ONa benyttes som katalysator. Verdiene er hentet fra tabell 57-67.

**Tabell 68:** Gjennomsnittlig utbytte (%) av FAMEs etter mikrobølgeassistert transesterifisering av mettede og umettede triglyserider ved 70 W. CH<sub>3</sub>ONa ble benyttet som katalysator.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	60 s	120 s	180 s
<b>C16:0</b>	59,2597	60,7438	61,4977	56,7321	68,2499	72,4044	72,8124	72,3562
<b>C16:1</b>	53,4685	72,1246	79,5395	82,5383	77,3892	83,3071	85,9771	84,8946
<b>C18:1*</b>	49,9087	61,1801	64,0371	63,6831	65,6043	70,1342	71,5264	72,8872
<b>C18:2</b>	72,1489	98	103,776	107,933	101,242	108,264	107,310	109,805
<b>C20:0</b>	71,6365	76,2136	76,8378	77,9407	68,0240	71,7778	73,9621	72,9462
<b>C20:1</b>	45,1245	65,2093	66,2666	75,9802	67,3843	74,3686	79,5349	75,1267
<b>C20:4</b>	63,1103	85,0660	87,2140	94,3730	89,8952	94,7157	93,8487	96,7541
<b>C20:5</b>	69,1001	92,5714	97,0959	103,214	99,0239	102,535	103,356	103,593
<b>C22:1</b>	34,1526	52,3372	54,8384	60,4314	58,6283	65,658	66,0717	67,9728
<b>C22:6</b>	50,1079	60,5269	59,6787	63,5477	63,8359	64,8068	65,967	67,0938
<b>Gj.snitt</b>	56,8018	72,3973	75,0782	78,6374	75,9277	80,7973	82,0367	82,3431
<b>Std.avvi</b>	12,4965	15,2542	16,6980	18,2430	15,3403	15,7011	15,0127	15,594
<b>RSD</b>	22,0002	21,0701	22,2408	23,1989	20,2039	19,4327	18,3000	18,9378

\*Utbytte av C18:1 er gjennomsnittlig utbytte oppnådd fra de enkle og sammensatte triglyseridene, som begge inneholder denne fettsyren.

Tabell 69-80 viser beregnet utbytte (%) av FAMEs etter mikrobølgeassistert metylering av odde- og parttalls frie fettsyrer fra C7:0 til C18:0 ved 70 W og ulike tidsintervall. BF<sub>3</sub> ble benyttet som katalysator. Dataene i tabell 75–80 ble benyttet til å lage figur 3.18 som viser utbyttet av FAMEs etter metylering av frie fettsyrer på mikrobølgeovn ved 70 W,

**Tabell 69:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C7:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
<b>P1</b>	i.d*	1,94489	18,91782	32,08337	-	i.d*	5,86751	i.d*
<b>P2</b>	17,02153	i.d*	i.d*	19,18751	i.d*	4,23589	i.d*	2,67458
<b>P3</b>	1,99051	i.d*	i.d*	21,97984	5,75305	i.d*	8,26012	1,26513
<b>P4</b>	27,82628	10,76304	3,31309	i.d*	i.d*	i.d*	i.d*	1,2325
<b>P5</b>	i.d*	i.d*	6,02255	4,84563	i.d*	i.d*	i.d*	i.d*
<b>Gj.snitt</b>	15,61277	-	4,66782	15,33766	-	-	-	1,72407
<b>Std.avvik</b>	12,97537	-	8,33803	9,193	-	-	-	0,82333
<b>RSD</b>	83,10739	-	178,628	59,93745	-	-	-	47,75487

\* ikke-detektert

**Tabell 70:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C8:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
P1	i.d*	10,4437	50,83129	66,10455	-	i.d*	30,12435	i.d*
P2	52,39203	3,15259	1,23005	51,25603	i.d*	i.d*	i.d*	29,2984
P3	15,31801	39,46566	11,45512	57,85635	42,20867	i.d*	48,42362	21,05798
P4	70,45805	29,73306	24,77383	17,80154	i.d*	i.d*	3,06844	15,06552
P5	6,59088	7,42196	30,85797	33,10364	i.d*	i.d*	i.d*	i.d*
Gj.snitt	36,18974	18,043394	23,82965	45,22442	-	-	27,20547	21,8073
Std.avvik	30,26854	15,715184	18,99505	19,56306	-	-	22,81804	7,145966
RSD	83,63844	87,096607	79,71184	43,25774	-	-	83,87299	32,76869

\* ikke-detektert

**Tabell 71:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C9:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
P1	10,82422	57,27061	98,10688	105,6853	-	1,63601	88,10164	i.d*
P2	103,889	29,91361	18,76899	98,28592	5,56926	i.d*	18,04465	102,2268
P3	34,85264	46,92058	58,37321	131,1763	124,8897	13,07146	115,9232	94,43589
P4	122,5047	127,0041	75,11084	17,80154	6,53835	i.d*	19,85229	71,06673
P5	32,84847	39,91195	82,4174	94,91896	2,48915	i.d*	3,27005	3,55006
Gj.snitt	67,5166	60,20417	66,55546	89,57359	34,8716	-	49,03837	67,81987
Std.avvik	54,04488	38,65418	30,2935	42,56194	60,03686	-	49,7662	44,84566
RSD	80,0468	64,205153	45,51617	47,51617	172,1655	-	101,4842	66,12467

\* ikke-detektert

**Tabell 72:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C10:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
P1	46,26586	119,01342	125,0291	121,9502	-	2,42081	131,7312	i.d*
P2	125,844	76,19427	62,41495	113,4249	43,44244	2,80378	67,65065	154,7161
P3	105,2462	93,47129	135,9111	177,7382	183,7198	59,53127	142,7017	152,8955
P4	147,2496	212,52247	98,38684	68,74623	41,9459	12,24944	75,27452	129,3644
P5	77,8229	87,00873	110,4358	129,2162	16,88129	43,95604	35,56436	21,09629
Gj.snitt	100,4857	117,64204	106,4356	122,2151	71,49736	24,19227	90,58448	114,5181
Std.avvik	39,70505	55,32793	28,43029	38,94897	75,80053	26,04586	45,26815	63,34233
RSD	39,51313	47,030748	26,71127	31,86919	106,0186	107,6619	49,97341	55,31208

\* ikke-detektert

**Tabell 73:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C11:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
<b>P1</b>	132,0692	246,42766	259,0395	308,2403	-	54,66113	579,0393	32,85306
<b>P2</b>	148,3881	137,72592	205,0668	258,3406	332,6923	105,3857	437,5951	632,9587
<b>P3</b>	209,8884	235,57721	446,0559	535,7906	625,3412	422,7346	526,7577	594,3157
<b>P4</b>	199,3576	493,17131	250,1291	243,0977	319,6709	224,5531	462,0775	569,7025
<b>P5</b>	128,2476	212,96478	254,1447	316,0456	192,9539	129,5828	332,6151	235,6102
<b>Gj.snitt</b>	163,5902	265,17338	282,8872	332,303	367,6645	187,3835	467,6169	413,088
<b>Std.avvik</b>	38,39468	134,33073	93,739	117,9815	182,9823	145,3027	93,63502	265,4203
<b>RSD</b>	23,47004	50,6577	33,13653	35,50419	49,76881	77,54298	20,02387	64,25271

**Tabell 74:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C12:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
<b>P1</b>	118,3123	145,32771	130,8586	141,9512	-	71,00074	187,6737	56,41965
<b>P2</b>	144,1205	122,47147	127,5733	127,8003	161,5696	86,40828	152,3076	206,639
<b>P3</b>	159,1064	136,82479	211,4522	199,5558	222,575	164,4056	174,9493	196,0084
<b>P4</b>	151,4877	247,91285	141,7557	135,9692	148,9061	111,8245	167,9106	182,9843
<b>P5</b>	129,742	147,77112	145,3182	156,2657	127,3259	101,9513	149,7776	113,7763
<b>Gj.snitt</b>	140,5538	160,06159	151,3916	152,3084	165,0941	107,1181	166,5237	151,1655
<b>Std.avvik</b>	16,49282	50,097287	34,37267	28,38515	40,8451	35,5811	15,83323	64,17819
<b>RSD</b>	11,73417	31,298757	22,70447	18,63663	24,74049	33,21671	9,508094	42,45557

**Tabell 75:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C13:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
<b>P1</b>	110,518	127,33078	121,5175	122,0989	-	113,1186	151,0698	94,48325
<b>P2</b>	122,4867	107,06819	114,6774	115,809	155,1143	116,6676	140,3473	162,9012
<b>P3</b>	137,1455	120,63849	170,0806	167,8906	176,9092	141,3782	141,9557	159,7405
<b>P4</b>	127,8729	195,23482	115,4924	116,4266	136,5396	122,1419	142,6293	151,0461
<b>P5</b>	110,9527	125,84851	123,5685	136,999	129,3172	127,3372	140,6121	113,3289
<b>Gj.snitt</b>	121,7951	135,22416	129,0673	131,8448	149,4701	124,1287	143,3228	136,3
<b>Std.avvik</b>	11,37742	34,485461	23,24151	21,88447	21,27673	11,053	4,43192	30,62205
<b>RSD</b>	9,34144	25,502441	18,00728	16,59866	14,23478	8,904468	3,092262	22,46666

**Tabell 76:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C14:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
<b>P1</b>	117,7301	131,16793	116,5242	125,5836	-	139,7998	145,0948	119,415
<b>P2</b>	125,3034	114,93374	121,8541	121,5687	158,2673	132,7338	134,2478	155,7931
<b>P3</b>	143,7543	128,98291	164,7039	163,2206	181,9363	145,9452	139,1859	160,0941
<b>P4</b>	126,9252	179,99714	120,0462	122,5154	141,4108	130,6357	138,4691	148,6232
<b>P5</b>	118,2507	132,54412	128,219	135,2903	144,3611	139,713	142,2121	125,859
<b>Gj.snitt</b>	126,3928	137,52517	130,2695	133,6357	156,4939	137,7655	139,8419	141,9569
<b>Std.avvik</b>	10,53836	24,761041	19,71167	17,4077	18,48573	6,1439	4,087174	18,2491
<b>RSD</b>	8,33779	18,004734	15,13146	13,02623	11,81243	4,45968	2,9227	12,85538

**Tabell 77:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C15:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
<b>P1</b>	106,7649	112,88647	95,47022	109,9839	-	127,2412	116,9412	107,2733
<b>P2</b>	111,6932	99,00747	106,8421	105,0024	129,7669	124,0373	114,6682	130,8822
<b>P3</b>	120,7451	131,78163	131,8378	134,0861	141,9126	125,5435	113,8598	133,743
<b>P4</b>	106,6187	144,7004	107,1428	105,7622	123,1684	110,7109	121,8772	126,9823
<b>P5</b>	109,7957	115,5921	113,4373	119,1542	120,817	123,1067	125,1705	104,1628
<b>Gj.snitt</b>	111,1235	120,79361	110,946	114,7978	128,9162	122,1279	118,5034	120,6087
<b>Std.avvik</b>	5,78691	17,723471	13,35554	12,16328	9,45626	6,57199	4,8617	13,84718
<b>RSD</b>	5,20763	14,672523	12,03787	10,5954	7,33522	5,38124	4,10258	11,48108

**Tabell 78:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C16:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
<b>P1</b>	98,58024	99,31663	90,52002	101,4942	-	114,0458	104,4747	94,51447
<b>P2</b>	99,90934	94,05603	99,08483	98,94898	113,8233	112,4386	99,96719	113,8048
<b>P3</b>	105,6659	99,74093	118,9106	112,8805	123,8327	113,9834	96,76438	124,2766
<b>P4</b>	99,81575	127,67683	97,98726	100,1857	103,3332	97,20695	104,9597	107,7103
<b>P5</b>	98,82275	106,55424	104,3015	107,4748	111,2568	106,0851	109,2357	94,61836
<b>Gj.snitt</b>	100,5588	105,46893	102,1608	104,1968	113,0615	108,752	103,0803	106,9849
<b>Std.avvik</b>	2,91481	13,184117	10,5774	5,85414	8,4557	7,23505	4,82047	12,79144
<b>RSD</b>	2,89862	12,500475	10,35367	5,61835	7,47885	6,65279	4,67642	11,9563

**Tabell 79:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C17:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
P1	90,45064	92,88337	89,32134	93,93387	-	100,9898	92,57729	87,12631
P2	97,58412	87,35401	96,67533	93,48938	102,8081	94,67342	85,51754	99,07672
P3	97,39764	95,27194	95,67871	95,19442	101,5342	98,47865	83,82085	98,36594
P4	90,24863	110,96355	88,77236	91,17114	95,13264	86,29662	90,36801	92,44182
P5	95,74107	101,78123	96,95601	99,54038	94,82884	97,91828	95,36598	84,3134
Gj.snitt	94,28442	97,65082	93,48075	94,66584	98,57595	95,67135	89,52993	92,26484
Std.avvik	3,66359	9,06506	4,07993	3,08923	4,18567	5,702	4,81511	6,58191
RSD	3,88568	9,28313	4,36446	3,2633	4,24614	5,96103	5,37821	7,13372

**Tabell 80:** Beregnet utbytte (%) av metylestere til C18:0 etter mikrobølgeassistert metylering ved 70 W.

Parallell	Utbytte (%)							
	10 s	20 s	30 s	40 s	60 s	180 s	300 s	420 s
P1	74,52967	74,7929	66,69367	76,95598	-	81,97349	68,90506	70,10124
P2	77,85936	73,50705	78,89285	76,85556	78,74278	79,18039	67,06894	73,9983
P3	80,82945	80,17208	80,39555	74,45865	82,2336	77,62805	67,52151	80,12871
P4	73,93611	82,81662	74,0074	76,25619	73,79146	67,02437	72,79571	74,66767
P5	75,64286	82,18668	81,64122	80,43085	74,4892	77,42202	78,18988	61,81516
Gj.snitt	76,55949	78,695066	76,32614	76,99145	77,31426	76,64566	70,89622	72,14222
Std.avvik	2,81801	4,28668	6,11472	2,16823	3,94257	5,67776	4,65851	6,79008
RSD	3,68081	5,44721	8,01131	2,8162	5,09941	7,4078	6,57089	9,41208

Tabell 81 og 82 viser utbytte av frie fettsyrer etter metylering på vannbad og ved bruk av mikrobølger ved 90 °C i 2 minutter. De beregnede utbyttene ble benyttet til å lage figur 3.19.

**Tabell 81:** Beregnet utbytte (%) av FAMES etter metylering på vannbad 90 °C i 2 minutter.

Parallell	Utbytte (%) av metylester til					
	C7:0	C8:0	C9:0	C10:0	C11:0	C12:0
P1	1,39774	18,14626	73,49657	110,62347	286,85654	146,51143
P2	9,84245	47,3758	100,1845	127,15392	305,6218	149,32711
P3	i.d*	0,99293	8,76599	31,46398	193,37725	92,9302
P4	1,10351	14,02893	57,66198	90,46209	247,03719	116,02309
P5	3,65025	28,04612	73,2003	98,05135	257,56474	125,64978
Gj.snitt	3,99849	21,71801	62,66186	91,55096	258,0915	126,08832
Std.avvik	4,05865	17,3188875	33,78668	36,34975	43,00281	23,22771
RSD	101,50466	79,74436	53,91905	39,70439	16,66185	18,42178

\* Ikke-detektert



## Vedlegg

(forts. tabell 81)

Parallell	Utbytte (%) av metylester til					
	C13:0	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0
<b>P1</b>	124,743	126,0489	114,2132	103,0596	95,17971	78,7469
<b>P2</b>	125,8629	125,2158	106,4847	94,48304	90,05602	72,77943
<b>P3</b>	95,42764	109,3451	96,27274	88,68246	88,65302	75,21519
<b>P4</b>	103,3388	110,0879	96,96935	89,20464	85,0203	70,18737
<b>P5</b>	104,3732	110,7935	99,52227	90,63365	88,9638	74,52726
<b>Gj.snitt</b>	110,7491	116,2982	102,6924	93,21268	89,57457	74,29123
<b>Std.avvik</b>	13,7347	8,5413	7,60139	5,95429	3,66105	3,15791
<b>RSD</b>	12,40164	7,34431	7,4021	6,38785	4,08715	4,25072

**Tabell 82:** Beregnet utbytte (%) av FAMEs etter mikrobølgeassistert metylering ved 90 °C i 2 minutter.

Parallell	Utbytte (%) av metylester til					
	C7:0	C8:0	C9:0	C10:0	C11:0	C12:0
<b>P1</b>	6,83306	35,97988	80,14846	96,17533	296,50743	122,85108
<b>P2</b>	2,30547	17,05852	60,31429	98,0151	356,51227	133,72716
<b>P3</b>	0,7968	6,03763	31,63756	71,35564	267,97905	118,72876
<b>P4</b>	1,93564	11,4981	48,38447	92,6115	284,14677	121,91499
<b>P5</b>	5,7112	27,00998	81,12384	119,40332	377,86321	146,2089
<b>Gj.snitt</b>	3,51643	19,51682	60,32172	95,51218	316,60175	128,68618
<b>Std.avvik</b>	2,60666	12,03341	21,16074	17,09856	47,87246	11,30824
<b>RSD</b>	74,12801	61,65659	35,07979	17,90198	15,12072	8,78745

(forts. tabell 82)

Parallell	Utbytte (%) av metylester til					
	C13:0	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0
<b>P1</b>	102,9577	108,6669	98,80723	85,44586	83,17721	68,34591
<b>P2</b>	118,2156	123,1288	106,3571	101,0492	89,88473	74,98232
<b>P3</b>	106,5833	113,4475	103,6693	95,94199	91,74884	74,22295
<b>P4</b>	109,405	116,9003	104,6027	96,90278	89,87844	76,03023
<b>P5</b>	122,7849	126,6874	107,9543	99,76	93,84375	77,18852
<b>Gj.snitt</b>	111,9893	117,7662	104,2781	95,81997	89,70659	74,15399
<b>Std.avvik</b>	8,25809	7,25504	3,47287	6,1579	3,99941	3,43341
<b>RSD</b>	7,374	6,16055	3,33039	6,42652	4,45832	4,63011