



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Institutt for kjemi, bioteknologi og
matvitenskap

Masteroppgave 2014
30 stp

Metodeutvikling for fastfase- ekstraksjon av mono-, di- og triacylglyseroler

Method Developement for Solid Phase
Extraction of Mono-, Di-, and Triacylglycerols

Torstein Ommedal Sælebakke



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	I
Forord	III
Sammendrag	IV
Abstract.....	VI
Forkortelser	VIII
1. Introduksjon	1
1.1 Lipider	1
1.1.1 Fettsyrer	2
1.1.2 Acylglyseroler	4
1.1.3 Lipider og helse	6
1.1.4 Lipider i kumelk.....	7
1.2 Hensikt	8
2. SPE teori.....	9
2.1 Prinsipper	10
2.2 Automatisert SPE	12
2.3 SPE adsorbenter	13
2.4 Adsorbent mekanismer.....	15
2.5 Metodeutvikling	18
2.5.1 Silika	19
2.5.2 Aminopropyl.....	20
2.5.3 Diol	24
2.6 GC analyse av FAME	25
3. Eksperimentelt	32
3.1 Forbruksmateriell.....	32
3.2 Betingelser	34
3.3 Framgangsmåte	39
4. Metodeutvikling	44
5. Resultater og diskusjon	47
5.1 Teoretisk konsentrasjon og mengde lipider	48
5.2 Opparbeidelse av FAME standarder	50
5.3 Metodevalidering og kvalitetssikring	51
5.4 Sammenlikning av metoder	57

5.5 Samlede resultater	58
5.6 Utvikling av metoden	59
5.7 Feilkilder	60
5.8 Standard prosedyre	62
6. Konklusjon	63
7. Videre arbeid.....	64
8. Referanseliste	65

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskaplige universitet (NMBU). Oppgaven på 30 studiepoeng ble levert våren 2014 og inngikk i en mastergrad i teknologi innenfor kjemi- og bioteknologi. Oppgaven besto av metodeutvikling med fastfase- ekstraksjon og analyse av lipider med gasskromatografi og flammeioniserings- detektor.

Arbeidet ble utført i samarbeid med Roland Kallenborn og Dag Ekeberg. Jeg vil takke veilederne for deres støtte med utformingen av oppgaven, samt deres innsikt og kompetanse. Til slutt vil jeg takke alle de andre ansatte på laboratoriet for god råd, og venner og familie som støttet meg med arbeidet.

Sammendrag

Det ble utviklet en fastfase- ekstraksjons (SPE) metode med aminopropyl (NH₂) kolonner som separerte acylglyserol- standarder som finnes i melkefett. Det har blitt publisert mange artikler med SPE metoder som separerer lipid- klasser i ulike organiske prøver, men ingen av metodene separerte lipider fra kumelk. Separasjon av lipider er viktig for å kunne analysere fettsyre- sammensetninger i ulike lipid- fraksjoner (Ruiz et al. 2004). Det ble brukt en moderne GX-274 automatisert SPE robot fra Gilson Inc. (Middleton, USA) for å utføre separasjoner.

De vanligste mettede fettsyrene i kumelk var palmitinsyre (C16: 0), etterfulgt av myristinsyre (C14: 0) og stearinsyre (C18: 0) (Månsson 2008). I denne oppgaven ble acylglyserol- standardene tristearin (18:0- 18:0- 18:0), dipalmitin (16:0- 0- 16:0) og monomyristin (14:0- 0- 0) separert med SPE. Aminopropyl- adsorbenter dannet hydrogen- bindinger mellom det primære amidet på adsorbenten og polare grupper i analytten (Perona & Ruiz- Gutierrez 2003). NH₂- kolonner ble foretrukket framfor andre modifiserte silikafaser fordi de dannet mer selektive polare interaksjoner med nøytrale lipider.

Lipider ble oppløst i et felles løsningsmiddel og applisert på kolonnen, før de ble skilt fra kolonnen i en trinnvis elusjon av løsningsmidler med økende polaritet. Acylglyseroler ble derivatisert til fettsyremetylestere (FAME) og analysert med gasskromatografi og flammeioniserings- detektor (GC- FID) for å avgjøre separasjon og utbytte. Metodeutvikling besto av tre test- metoder hvor ulike løsningsmidler ble utprøvd. FAME standarder ble opparbeidet og responsen ble målt med GC- FID - som en kvantitativ referanse for å bestemme utbytte.

Arbeidet med metodeutvikling ble basert på tidligere metodikk utviklet av Kaluzny et al. (1985) og Pinkart et al. (1998). Heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v) ble brukt til oppløsning av lipider, mens blandinger av *n*- heksan, *n*- heptan, dietyleter, etylacetat, kloroform og metanol ble brukt til trinnvis elusjon. Målet var separasjon med utbytte av FAME høyere enn 70 %, residualt standardavvik (RSD) lavere enn 10 % og minimal krysskontaminasjon.

Utbytte og separasjon ble målt i tre metoder med små variasjoner i løsningsmidlene som ble nevnt ovenfor. Utbytte av FAME fra metode 1 var $73,0 \pm 11,6$ %, metode 2 var $75,3 \pm 5,4$ % og metode 3 var $80,6 \pm 12,5$ %. Samlet utbytte av FAME fra triacylglyseroler (TAG) var $80,6 \pm 7,8$ %, diacylglyseroler (DAG) var $81,7 \pm 7,6$ % og monoacylglyseroler (MAG) var $66,6 \pm 8,7$ %. Samlet utbytte for alle FAME var $76,3 \pm 10,5$ %, og total kryss- kontaminasjon var 0,6 %. Tapet

av analytt med fastfase- ekstraksjon var en systematisk feilkilde. Egenskapene til aminopropyl- kolonner ble påvirket av luftfuktighet, og derfor bør de kanskje tørkes før bruk.

Abstract

A Solid Phase Extraction (SPE) method was developed with aminopropyl (NH₂) columns that separated acylglycerol- standards common in bovine milk. Numerous scientific papers have been published with SPE methods that separate lipid- classes from different organic samples, but none of the methods separated lipids from bovine milk. The separation of lipid classes is important for the analysis of fatty acid compositions in different lipid fractions (Ruiz et al. 2004). Separations were carried out with a modern GX- 274 automatic SPE robot (Middleton, USA)

The most common saturated fatty acids in bovine milk were palmitic acid (C16: 0), followed by myristic acid (C14: 0) and stearic acid (C18: 0) (Månsson 2008). In this thesis, the acylglycerol- standards tristearin (18:0- 18:0- 18:0), dipalmitin (16:0- 0- 16:0) and monomyristin (14:0- 0- 0) were separated with SPE. Aminopropyl- sorbents formed hydrogen bonds between the primary amide of the sorbent and the polar group in the analyte (Perona & Ruiz- Gutierrez 2003). NH₂ sorbents were favored over other modified silica- phases because they provided the most selective polar interaction with neutral lipids.

Lipids were dissolved in a common solvent and applied to an aminopropyl column, before they were separated from the column in a stepwise elution of solvents with increasing polarity. Acylglycerols were derivatized to fatty acid methyl esters (FAME) and analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC- FID) to determine separation and recovery. Method development consisted of three test- methods where different solvents were tested. FAME standards were prepared and their response was measured with GC- FID – as a quantitative reference to determine recovery.

The work with method development was based on previous methodology developed by Kaluzny et al. (1985) and Pinkart et al. (1998). Hexane: chloroform: methanol 95:3:2 (v/ v) was used to dissolve lipids, whilst mixtures of *n*- hexane, *n*- heptane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform, and methanol were used for stepwise elution. The goal was to achieve a recovery of FAME higher than 70%, residual standard deviation (RSD) lower than 10 %, and minimal cross- contamination.

Recovery and separation were measured in three methods with small variations in the solvents mentioned above. Recovery of FAME from method 1 was 73.0 ± 11.6 %, method 2 was 75.3 ± 5.4 %, and method 3 was 80.6 ± 12.5 %. Collected recovery of FAME from triacylglycerols (TAG) was 80.6 ± 7.8 %, diacylglycerols (DAG) was 81.7 ± 7.6 %, and monoacylglycerols (MAG) was 66.6 ± 8.7 %. Total recovery of all FAME was 76.3 ± 10.5 %, and total cross-

contamination was 0.6 %. Loss of analyte with SPE was a systematic source of error. The properties of aminopropyl columns were affected by humidity, and they may need to be dried before use.

Forkortelser

α	alfa
C	kolesterol
°C	celsius
C ₂	etyl
C ₈	oktyl
C ₁₈	oktadecyl
CE	kolesterolester
CN	cyanopropyl
DAG	diacylglyserol
EI	elektron- ionisering
FAME	fettsyremetylester
FFA	frie fettsyrer
FID	flammeioniserings- detektor
g	gram
GC	gasskromatografi
GC- FID	gasskromatografi med flammeioniserings- detektor
GC- MS	gasskromatografi med massespektrometri- detektor
HPLC	væskekromatografi (high- performance)
i.d.	indre diameter
IUPAC	Internasjonalt forbund for ren og anvendt kjemi
kPa	kilopascal
LC- MS	væskekromatografi med massespektrometri detektor

LLE	væske- væske ekstraksjon
LOD	nedre deteksjonsgrense
M	mol per liter
MAG	monoacylglyserol
min	minutt
mg	milligram
mL	milliliter
mm	millimeter
mol	$6,0221415 \cdot 10^{23}$ partikler
MS	massespektrometri
MTBE	metyl-tert-butyleter
MUFA	enumettede fettsyrer
mV	millivolt
m/ z	masse- til- ladnings forhold
NaOMe	natrium- metanolat
<i>n</i> - heksan	normal- heksan
<i>n</i> - heptan	normal- heptan
NH ₂	aminopropyl
NL	nøytrale lipider
OC	direkte injeksjon
OH	diol
p. a.	pro analysi
Ph	fenyl
PHA	polyhydroksyalkanoater

PhL	fosfolipider
PL	polare lipider
PUFA	flerumettede fettsyrer
PTV	”Programmed temperature vaporizer”
RPM	omdreininger per minutt
RRF	relativ responsfaktor
RSD	relativt standardavvik
SD	standardavvik
SFA	mettede fettsyrer
Si	silika
SIM	selektert ione overvåkning
<i>sn</i>	stereokjemisk nummer
S/ N	signal- til- støy forhold
SPE	fastfase- ekstraksjon
S/ SL	split/ splitless
TAG	triacylglyserol
TIC	total ione telling
TLC	tynnsjikt-kromatografi
µg	mikrogram
µL	mikroliter
v/ v	volum/ volum
WCOT	veggbelagt kapillærkolonne
w/ w	vekt /vekt
%	prosent

1. Introduksjon

1.1 Lipider

Ingen eksakt definisjon av lipider eksisterer (Akoh & Min 2002). Christie og Han (1982) definerer lipider som ”en stor variasjon av naturlige produkter som inkluderer fettsyrer og deres derivater, steroider, terpener, kartenoider og gallesyre, som har til felles at de er løselige i organiske løsningsmidler som dietyleter, heksan, benzen, kloroform og metanol.”

Store norske leksikon (2009) definerer lipider som ”en fellesbetegnelse for de egentlige fettstoffer (triacylglyseroler) og for de fettlignende stoffer, lipoider, hvis viktigste grupper er voks, fosfolipider, glykolipider, karotenoider og steroider. Lipider karakteriseres ved varierende løselighet i visse organiske løsemidler som eter, alkohol, benzen, og for det meste ved uløselighet i vann.”

Lipider betegnes ofte som fett eller olje – fett er fast og olje er flytende ved romtemperatur (Hart et al. 2003). Enkle lipider består av to komponenter og inkluderer triacylglyseroler og kolesterolistere. Komplekse lipider har tre eller flere komponenter og favner fosfolipider og glykolipider. Nøytrale lipider inkluderer fettsyrer, alkoholer, acylglyseroler og steroler, mens polare lipider omfatter fosfolipider og glykolipider (Akoh & Min 2002). Inndelingen er ganske vilkårlig siden korte fettsyrer er veldig polare; det bedre å klassifisere lipider basert på struktur.

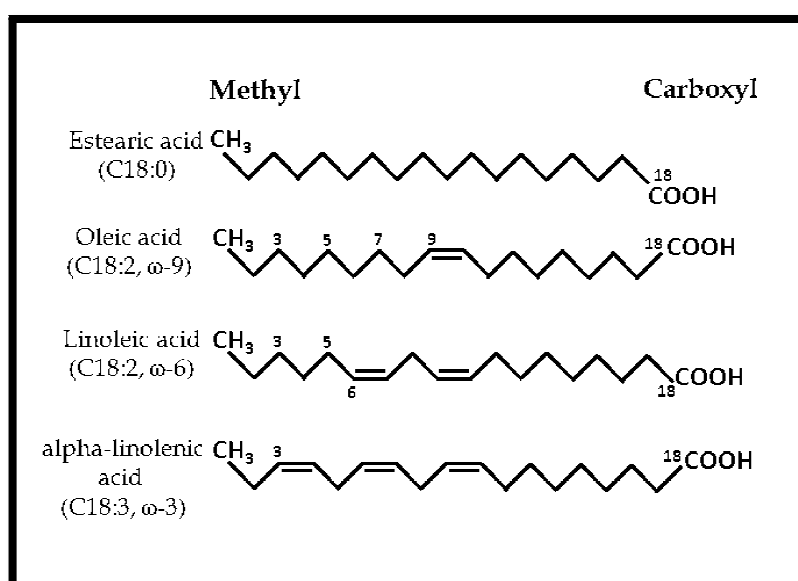
1.1.1 Fettsyrer

Fettsyrer består av en hydrofob alifatisk kjede og en hydrofil karboksylsyre (Mathews et al. 2005). De samler seg som misceller i vann og kan brukes som emulgatorer (blanding av to væsker som normalt ikke er blandbare). Fettsyrer er syntetisert i naturen via kondensasjon av malonyl-koenzym A-enheter ved en fettsyresyntetase kompleks (Dewick 2009).

Det finnes tre undergrupper av fettsyrer: mettede, enumettede og flerumettede (Akoh & Min 2002). Mettede fettsyrer (SFA) har ingen dobbeltbindinger, enumettede fettsyrer (MUFA) har en dobbeltbinding, mens flerumettede fettsyrer (PUFA) har flere dobbeltbindinger. Mettede fettsyrer er som regel faste ved romtemperatur, mens umettede er flytende.

Dobbeltbindinger i fettsyrer har vanligvis *cis* konfigurasjon, men kan omdannes til *trans* med ekstern påvirkning (Damodaran, Parkin et al. 2008). *Cis* dobbeltbindinger forårsaker mer sterisk hindring enn *trans* dobbeltbindinger, og gir lavere smeltepunkt. Fettsyrer med flere dobbeltbindinger har lavere smeltepunkt.

For å navngi fettsyrer kan enten deres funksjonelle IUPAC navn, tradisjonelle navn eller numerisk forkortelse brukes (Akoh & Min 2002). I det numeriske systemet angir det første tallet antall karbonatomer i fettsyren, mens det andre tallet angir antall dobbeltbindinger. Stearinsyre, med funksjonelt navn oktadekansyre, blir forkortet (C18:0). Figur 1.1 viser strukturen til noen vanlige mettede og umettede fettsyrer.



Figur 1.1 Strukturen til noen vanlige mettede og umettede fettsyrer (Valenzuela & Valenzuela 2013)

Umettede fettsyrer navngis med antall dobbeltbindinger og plasseringen til den første dobbeltbindingen (Akoh & Min 2002). Oljesyre har det funksjonelle navnet *cis*-9-oktadekensäure og den numeriske forkortelsen (C18: 1 ω 9). Hvis fettsyrer har flere dobbeltbindinger vil neste dobbeltbinding alltid befinne seg tre karbonatomer fra den første dobbeltbindingen.

Naturlige fettsyrer har et partall antall karbonatomer - det er sånn de produseres biologisk (Damodaran, Parkin et al. 2008). Myristinsyre, palmitinsyre og stearinsyre er de mest tallrike umettede fettsyrene i naturen. (C4: 0) til (C12: 0) fettsyrer er i hovedsak bare funnet i melkefett og animalsk vev, mens middels kjedelengde forbindelser forekommer i vegetabiliske oljer, slik som kokosnøttolje. I tabell 1.1 er en oversikt over mettede og umettede fettsyrer.

Tabell 1.1 Navn og struktur til mettede og umettede fettsyrer (Akoh & Min 2002) og (Bernatek 2009b).

IUPAC navn	Numerisk forkortelse	Trivielt navn
Butansyre	4: 0	Butylsyre
Heksansyre	6: 0	Kaprionsyre
Oktansyre	8: 0	Kaprylsyre
Dekansyre	10: 0	Kaprinsyre
Dodekansyre	12: 0	Laurinsyre
<i>c</i> -9-Dodekensäure	12: 1 ω 3	Laurolsyre
Tetradekansyre	14: 0	Myristinsyre
<i>c</i> -9-Tetradekensäure	14: 1 ω 5	Myristolsyre
Heksadekansyre	16: 0	Palmitinsyre
<i>c</i> -9-Heksadekensäure	16: 1 ω 7	Palmitolsyre
Oktadekansyre	18: 0	Stearinsyre
<i>c</i> -9-Oktadekensäure	18: 1 ω 9	Oljesyre
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Oktadekadiensyre	18: 2 ω 6	Linolsyre
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Oktadekatriensyre	18: 3 ω 3	α - Linolensyre
<i>c</i> -9-Eikosansyre	20: 0	Arakinsyre
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14- Eikosatetraensyre	20: 4 ω 6	Arakidonsyre
Dokosansyre	22: 0	Behensyre
Tetrakosansyre	24: 0	Lignoserinsyre

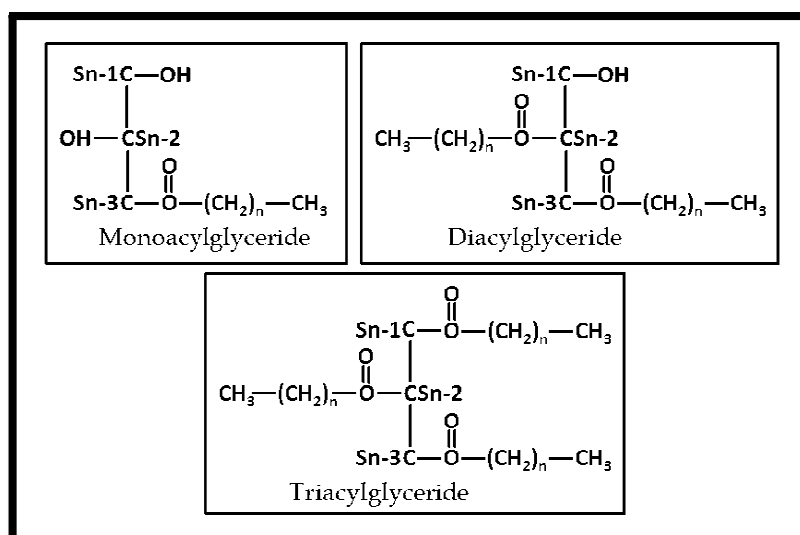
1.1.2 Acylglyseroler

Acylglyseroler er estere av den treverdige alkoholen glyserol med forskjellige fettsyrer (Bernatek 2009a). Acylglyseroler kan deles inn i tre grupper: monoacylglyseroler (MAG), diacylglyseroler (DAG) og triacylglyseroler (TAG) (Damodaran et al. 2008). TAG består av tre fettsyrer koblet til glyserol med en esterbinding. DAG har to fettsyrer, mens MAG har en fettsyre.

For å kunne identifisere acylglyseroler må fettsyrenes type og posisjonen spesifiseres, og da brukes prefikset 'sn-', (Perona and Ruiz-Gutierrez 2004). Fettsyrene i glyserol molekylet identifiseres og listes som *sn*-1, *sn*-2 eller *sn*-3 i riktig rekkefølge. Figur 1.2 viser strukturen til acylglyseroler.

Acylglyseroler klassifiseres som upolare fordi de polare gruppene og fettsyrene kobles sammen i en esterbinding (Perona and Ruiz-Gutierrez 2004). Acylglyseroler med umettede fettsyrer og korte karbonkjeder er mer polare. Acylglyseroler kan løses i organiske løsningsmidler, men ikke i vann.

Smelte- og størkningspunktet til acylglyseroler bestemmes av fettsyrenes kjedelengde, metningsgrad og isomeri (Perona and Ruiz-Gutierrez 2004). Vegetabiliske oljer er flytende fordi de har mange umettede fettsyrer med dobbeltbindinger i *cis* form. Animalsk fett er mer mettet og derfor fast ved romtemperatur (Hart 2003).



Figur 1.2 Strukturen til MAG, DAG og TAG som spesifiserer "sn - notasjon" (Valenzuela & Valenzuela 2013)

Triacylglyseroler

Triacylglyseroler (TAG) er den vanligste komponenten i fett og olje og kan fungere som energilager eller som transportør av fettsyrer i blodplasma (Perona & Ruiz-Gutierrez 2004).

Lengden på fettsyrenes hydrokarbon kjeder og dobbeltbindingenes plassering i TAG molekylet avgjør den tredimensjonale konfigurasjonen og de fysiske egenskapene til molekylet.

Fettlagrene til planter har TAG med fettsyrer på mellom 4 og 36 karbonatomer og opptil 6 dobbeltbindinger (Perona and Ruiz-Gutierrez 2004). Det store mangfoldet av fettsyrer som kan kobles til glyserolen betyr at det finnes et stort antall mulige molekyler med svært like fysiske egenskaper. Plasseringen av fettsyrer i TAG påvirker deres fysiske egenskaper.

Symmetriske TAG, som finnes mest i vegetabiliske oljer, smelter ved lavere temperatur enn asymmetriske TAG oljer (Perona and Ruiz-Gutierrez 2004). Acylglyserol strukturen i vegetabiliske oljer følger et bestemt mønster. SFA og lange MUFA er tilfeldig plassert i posisjon 1 og 3, mens PUFA er tilfeldig plassert i posisjon 2. I animalsk fett er ofte SFA i *sn*-1 posisjon, selv om oljesyre (18:1 ω 9) også kan innta denne posisjonen (Perona and Ruiz-Gutierrez 2004). PUFAs og lange SFA kjeder finnes hovedsakelig i midterste posisjon.

TAG som lagres i celler under huden heter adipose (Bernatek 2009a). Animalsk adipose og melkefett inneholder mest mettede, og noen umettede fettsyrer. Adipose fra saltvannsfisk (tran) og sjødyr inneholder mer av de umettede fettsyrene (10–13 %) (Bernatek 2009a). Oljer fra plantefrø og frukt har rundt 30–60 % flerumettede fettsyrer, og inneholder mye linolsyre. Organer og muskelceller består hovedsakelig av fosfolipider med umettede fettsyrer som bygger opp cellemembraner (Bernatek 2009a).

1.1.3 Lipider og helse

Inntak av fettsyrer påvirker kolesterolnivået i blodplasma, som er direkte relatert til hjerte- og karsykdommer (Perona and Ruiz-Gutierrez 2004). Inntak av en- og flerumettede fettsyrer er sunnere enn mettede fettsyrer. Fettsyrer som linolsyre og andre PUFA har unike egenskaper, og det er viktig å få i seg disse fettsyrene i et variert kosthold for å unngå sykdommer og underernæring (Seppänen-Laakso et al. 2002). Inntak av mettede fettsyrer og *trans* fettsyrer gir høyere kolesterolverdier i blodet, åreforkalkning og høyere risiko for hjerte- og karsykdommer.

Oljer fra fisk, sjødyr og planter tilfører organismer flerumettede, essensielle fettsyrer (Bernatek 2009a). Essensielle fettsyrer er flerumettede fettsyrer som dyr ikke klarer å produsere på egen hånd. De to viktigste essensielle fettsyrene er linolsyre og linolensyre (Bernatek 2009a). Disse fettsyrene bygger opp cellemembraner, påvirker kolesterolnivået og bidrar i syntesen av prostaglandiner.

Trans fettsyrer stammer hovedsakelig fra industrielt hydrogenerte produkter som margarin, samt melkeprodukter og kjøtt (Mozaffarian 2008). Bakterier i magen på kuer, sauer og geiter biohydrogenerer en andel av umettede fettsyrer som dyrene spiser. Resultatet er at ca. 5 % av fettsyrene i melkeprodukter og kjøtt fra disse dyrene er naturlige *trans* fettsyrer (Mozaffarian 2008). Margarin inneholder enda mer *trans* fettsyrer, og medfører høyere risiko for hjerte- og karsykdommer.

1.1.4 Lipider i kumelk

Naturlig kumelk består av omtrent 87 % vann, 4,6 % laktose, 3,4 % protein, 4,2 % fett, 0,8 % mineraler og 0,1 % vitaminer (Månsson 2008). Lipidene i kumelk eksisterer som globuler i en olje- vann emulsjon. Melkefett består hovedsakelig av TAG (ca. 98 %), mens andre fraksjoner er DAG (< 2 %), kolesterol (< 0,5 %), fosfolipider (ca. 1 %), FFA (ca. 0,1 %) og MAG (< 0,1 %). Sammensetning av melk varierer stadig, og er avhengig av avling, matinntak og sesong (Månsson 2008).

Fettsyrene i melk er ikke tilfeldig esterifisert til de tre posisjonene på TAG molekylet (Månsson 2008). Kortkjede- fettsyrer som butylsyre og kaprionsyre er nesten bare esterifisert på *sn*-3. Mellomkjede- fettsyrer, (C8: 0) – (C16: 0), er vanligvis esterifisert på *sn*-1 og *sn*-2 (Månsson 2008). Stearinsyre (C18: 0) er ofte i posisjon *sn*-1, mens oljesyre (C18: 1) har preferanse for posisjon *sn*-1 og *sn*-3.

Melkefett TAG er syntetisert fra mer enn 400 forskjellige fettsyrer; det er den mest komplekse blandingen av naturlig fett som eksisterer (Månsson 2008). Mesteparten av fettsyrene finnes kun i spormengder, og kun 15 fettsyrer utgjør hver mer enn 1 % av den totale mengden.

Sammensetningen av svensk melk ble målt til 69,4 % mettede fettsyrer og 30,6 % umettede fettsyrer (Lindmark-Månsson & Åkesson 2001).

Den viktigste fettsyren fra et kvantitativt synspunkt er palmitinsyre (C16: 0), som utgjør ca. 30 % (w/ w) av total mengde fettsyrer (Månsson 2008). Myristinsyre (C14: 0) og stearinsyre (C16: 0) utgjør 11 og 12 % (w/ w). Av mettede fettsyrer er 10,9 % kortkjede- fettsyrer, (C4: 0) – (C10: 0). Butylsyre og kaprionsyre utgjør 4,4 og 2,4 % (w/ w).

Omtrent 25 % av fettsyrer i melk er MUFA hvor oljesyre (C18: 1) utgjør 23,8 % (w/ w) av den totale mengden fettsyrer i svensk melk (Månsson 2008). PUFA utgjør 2,3 % (w/ w); de vanligste fettsyrene er linolsyre (18: 2 ω 6) og α - linolensyre (C18: 3 ω 3), som utgjør 1,6 % og 0,7 % (w/ w). Omtrent 2,7 % av fettsyrene i melk har *trans* dobbeltbindinger.

Melkefett fra kuer er en viktig komponent i matprodukter fordi den tilfører tekstur og struktur til maten (Simoneau & German 1996). Plastisiteten i melkefett gir en fast tekstur; dette er fordi noen triglyserider krystalliserer, mens andre er flytende ved romtemperatur. Denne uvanlige egenskapen er unik til dyre- og melkefett.

1.2 Hensikt

Det skal utvikles en fastfase- ekstraksjons (SPE) metode med aminopropyl (NH₂) kolonner som separerer acylglyserol- standarder som finnes i melkefett. Det er publisert mange artikler med SPE metoder som separerer lipid- klasser i ulike organiske prøver, men ingen av metodene separerer lipid- klasser i melkefett. Separasjon av lipider er viktig for å kunne analysere fettsyre- sammensetninger i ulike lipid- fraksjoner (Ruiz et al. 2004).

Aminopropyl- kolonner danner hydrogen- bindinger mellom det primære amidet på adsorbenten og polare grupper i analytten (Perona & Ruiz- Gutierrez 2003). De foretrekkes framfor andre modifiserte silikafaser, som diol, fordi de gir mer selektive polare interaksjoner når nøytrale lipider skal separeres.

I denne oppgaven skal acylglyserol- standardene tristearin (18:0- 18:0- 18:0), dipalmitin (16:0- 0- 16:0) og monomyristin (14:0- 0- 0) separeres med SPE. Acylglyserol- standardene er esterifisert til myristinsyre (C14: 0), palmitinsyre (C16: 0) og stearinsyre (C18: 0). Etter separasjon derivatiseres acylglyserol- standarder til flyktige FAME og analyseres med GC- FID for å avgjøre separasjon og utbytte. Målet er å ha utbytte av FAME høyere enn 70 %, RSD lavere enn 10 % og minimal kryss- kontaminasjon.

Sammensetningen av svensk melk ble målt til 69,4 % mettede fettsyrer og 30,6 % umettede fettsyrer (Lindmark- Månssen og Åkesson 2001). De vanligste mettede fettsyrene i kumelk er palmitinsyre (C16: 0), etterfulgt av myristinsyre (C14: 0) og stearinsyre (C18: 0) (Månsson 2008). Acylglyserol- standardene som separeres med SPE i denne oppgaven er kun esterifiserte til mettede fettsyrer; det finnes ingen tidligere artikler som separerer disse lipidene med SPE. Tidligere artikler separerer kun acylglyseroler med mettede og umettede fettsyrer, eller andre lipidklasser.

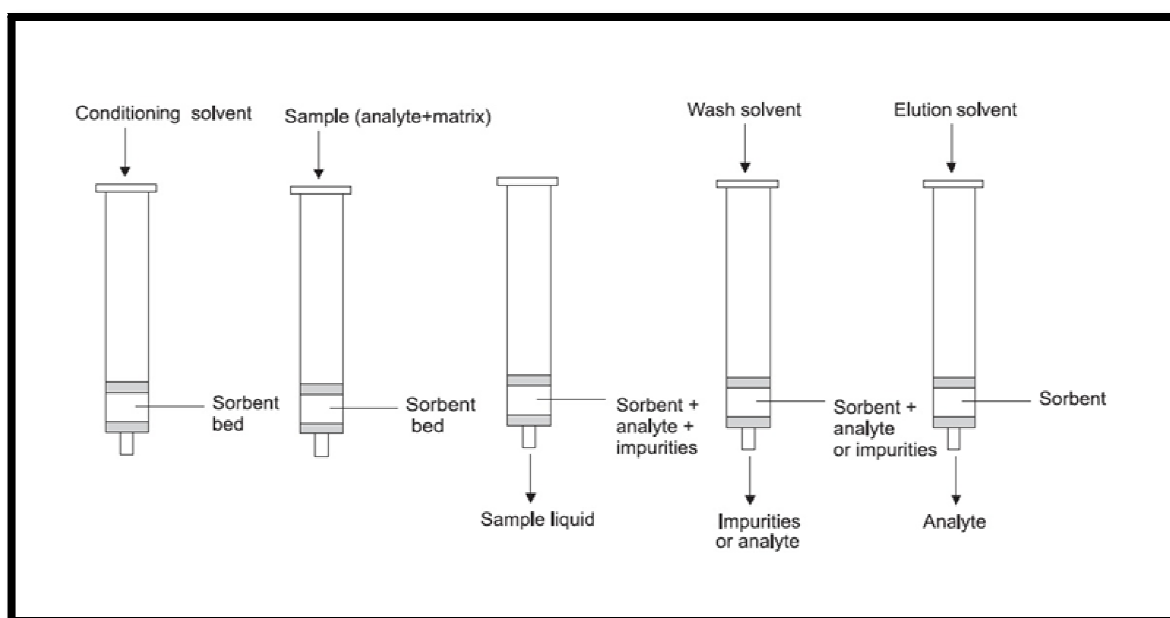
2. SPE teori

Fastfase- ekstraksjon (SPE) er en ekstraksjonsmetode som bruker en fastfase og en væskefase til å isolere en, eller en type, analytt fra et løsningsmiddel (Chemicool Periodic Table 2014). SPE brukes til å rense en prøve før en kromatografisk- eller analytisk metode kvantifiserer mengden av analytt i prøven. SPE var opprinnelig tenkt som en erstatning til væske- væske ekstraksjon (LLE) (Poole 2003). LLE er krevende og vanskelig å automatisere - det dannes lett emulsjoner og bruker mye løsningsmidler. SPE metoder er lettere å automatisere, men egenskapene til SPE adsorbenter er mindre reproducerbare enn løsningsmidlene som brukes i LLE.

I 1978 ble kommersielle Sep- Pak patroner (Waters Corporation, Milford, USA) introdusert som praktiske, tørrpakte, silika- baserte SPE kolonner. Salget av SPE kolonner gikk trått fram til midten på 90- tallet (Hennion 1999). I de siste 15- 20 årene har SPE blitt stadig mer populært, med forbedringer innenfor automasjon, introduksjon av nye faser, og standardisering av formater. Det har vært mye fokus på å redusere bruk av organiske løsningsmidler i laboratorier. Fordeler med SPE er raske og enkle separasjoner, mindre bruk av løsningsmidler, lavere brukskostnader og økt selektivitet (Hennion 1999). En ulempe med SPE er at det er vanskelig å overvåke separasjoner.

2.1 Prinsipper

En typisk SPE separasjon har fire steg: (a) kondisjonering, (b) prøve- applisering, (c) rensing og (d) elusjon (Hennion 1999), se figur 2.1. Kondisjonering av adsorbent partikler fjerner urenheter i kolonnen og bløtlegger overflate silanol grupper samt andre kjemiske grupper. Når prøven appliseres skal analytten være løst i et løsningsmiddel som kun har svake bindinger til adsorbenten (Hennion 1999). Lipider blir som regel ekstrahert med kloroform (eller andre organiske løsningsmidler) før de appliseres på kolonnen; noen prøver (som blodplasma) kan tilsettes direkte på en SPE kolonnen. Etter at prøven appliseres må den elueres trinnvis fra kolonnen - for å separere, rense eller ekstrahere analytter i prøven (Hennion 1999).



Figur 2.1 Trinnene i en typisk SPE separasjon (Żwir-Ferenc & Biziuk 2006).

Væske- strømningshastigheten i SPE kolonner er 0,2 - 1,5 mL/ sekund; den lave strømnings- hastigheten skyldes at SPE kolonner har liten kapasitet (Poole et al. 2000). Kolonner tørkes gjerne i 1- 5 minutter mellom hvert separasjons- trinn slik at løsningsmidler siver ut av adsorbenten. Hvis kolonnen tørkes for lenge kan analytt fordampe eller sette seg fast i adsorbenten (Poole et al. 2000). Elusjons- løsningsmidler skal danne sterke bindinger med analytt, og de bør de være flyktige og blandbare med andre løsningsmidler.

Kolonne konstruksjon

Kommersielt tilgjengelige SPE kolonner pakkes med en ensartet tetthet som gir reproducerbare separasjoner (Christie 1992). Når pakningsmaterialer kjøpes i store mengder vil kvaliteten forringes av luftfuktighet, mens SPE kolonner i vakuumslette pakninger ikke forandrer egenskaper.

Vanlige SPE kolonner er sprøyteformede og har adsorbent partikler med diameter på 40- 60 μm (Hennion 1999). Den store partikkel- og porestørrelsen skaper god gjennomstrømning som optimeres med vakuum og trykk. SPE kolonner er pakket med 100 – 1000 mg adsorbent, og patronstørrelser er 1 - 7 mL.

Adsorbenten holdes på plass av porøse fritter innenfor kolonnen (Hennion 1999). I enden på kolonnen er en spiss som kan kobles til en oppsamlingsbeholder. Flere prøver kan håndteres samtidig ved å bruke vakuum manifold eller automatiserte løsninger. Det finnes også andre SPE formater, som disker og kolonner som kan brukes til større prøvemengder.

Materialene som brukes til å produsere SPE kolonner inneholder myknere som ftalater (Christie 1992). Selv om kolonne- platen består av høykvalitets polypropylen eller polyetylen, inneholder de fortsatt forurensende stoffer (Hennion 1999). Disse stoffene fjernes når kolonner kondisjoneres med upolare løsningsmidler. Glass kolonner, eller fluorpolymerbelagte kolonner, kan brukes hvis forurensing av prøvene er et problem.

2.2 Automatisert SPE

Automatisert væske- og prøvebehandling kombineres med SPE teknologi for å produsere automatiserte løsninger som kan behandle flere prøver samtidig på en effektiv måte (Harrison & Walker 1998). Automatiserte roboter tar seg av applisering av løsningsmidler og prøver, kondisjonering, eluering og vasking av SPE kolonner.

Automatisert SPE ble først populært sent på nittitallet når 96- brønns automatisert SPE format ble introdusert (Rossi and Zhang 2000). Til å begynne med var målet å behandle flere hundre prøver samtidig, men etter hvert erstattet automatisert SPE vanlig prøvebehandling og metodeutvikling - med færre prøver. Trykk, strømningshastighet og løsningsmiddel- sammensetning samstemmes og standardiseres.

En fordel med automatisert SPE er at det krever mindre tid og innsats (Rossi & Zhang 2000). Flere prøver kan kjøres samtidig med parallell prøve behandling. Automatisert SPE har høy presisjon og nøyaktighet så lenge innstillingene er riktig. Typiske volumer for biologiske SPE prøver er 1- 10 mL, og automasjon optimaliseres med standardiserte kolonne størrelser (Hennion 1999). Miljøkjemiske prøver er vanligvis på 100 – 200 mL, og med disse prøvene kan SPE kobles direkte til væskekromatografi med online SPE.

Online automatisert SPE integrerer SPE med HPLC (Rossi and Zhang 2000). Prøver appliseres på SPE kolonner hvor de separeres, før de injiseres direkte på en HPLC kolonne med detektor. Elusjonsmidlene er begrenset fordi de må være kompatible med HPLC og SPE, noe som gjør denne løsningen noe kronglete. Eksempler på online SPE løsninger er Prospekt fra Spark Holland, OSP-2 fra Merck og ASPEC XL fra Gilson (Hennion 1999).

Offline automatisert SPE er mest vanlig - hvor SPE ikke kobles til andre analytiske instrumenter (Hennion 1999). Offline SPE gir større risiko for prøve kontaminasjon og tap av analytt gjennom fordampning, men det har flere applikasjoner og større valgmuligheter enn online SPE. SPE utføres sekvensielt på flere kolonner samtidig med roboter som ASPEC fra Gilson, Microlab fra Hamilton, AutoTrace og RapidTrace fra Zymark (Hennion 1999). Etter separasjon med offline SPE kan prøvene derivatiseres og analyseres manuelt.

2.3 SPE adsorbenter

Metodeutvikling er en utfordring med SPE og valg av adsorbent er viktig (Hennion 1999). Silika og modifiserte silikafaser er de vanligste SPE adsorbentene (Fontanals et al. 2005). Silika og silikabaserte adsorbenter har frie silanolgrupper på overflaten.

Silika har polare egenskaper, og overflatesilanol danner sekundære polare bindinger (Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino 2000). SPE adsorbenter er vanligvis lagd av større silikapartikler enn de som brukes i stasjonærfasen på HPLC (Christie 1992). Silikapartiklene er ca. 40 pm i diameter med porestørrelser på 60 Ångstrøm. Partiklene har en uregelmessig form som gir god væskestrømning.

Kapasiteten til en kolonne er definert som massen av analytt som kan festes på adsorbenten under optimale forhold (Hennion 1999). Kapasitet varierer som regel fra 1 - 5 prosent av adsorbent masse. Hvis kolonnen har en masse på 500 mg, vil det være mulig å feste så mye som 10 mg analytt på kolonnen.

De vanligste kolonnene for separasjon av lipider med upolar mekanisme er reversfase oktadecyl (C_{18}), oktyl (C_8) og etyl (C_2) (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). Polar mekanisme brukes med normalfase cyanopropyl (CN), aminopropyl (NH_2), diol (OH) og silika (Si) kolonner, se tabell 2.1.

Med reversfase kolonner dannes det upolar hydrofob interaksjon (van der Waals vekselvirkninger) mellom C-H gruppen på analytten og C-H gruppen på adsorbenten (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). Med normalfase kolonner oppstår det polar interaksjon (hydrogen- bindinger, pi – pi interaksjon, dipol – dipol interaksjon og induert dipol interaksjon).

Ionebindings faser som kvarternære aminer, benzensulfonsyre eller propylsulfonsyre kan brukes hvis analytten er ionisert med positiv eller negativ ladning (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). Christie (1989b) var den første som brukte benzensulfonsyre SPE kolonner for å separere TAG og FAME.

Tabell 2.1 Egenskaper til SPE adsorbenter som brukes i lipid separasjon (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000)

	Separasjonsmåte	Fase	Egenskaper
Normalfase silika	Normalfase	Si (silika) -Si-OH	Adsorbenten er polar og matriksen upolar; upolare stoffers retensjon er avhengig av eluent.
Modifisert silika fase (kjemisk bundet)	Normal- eller reversfase	NH ₂ (aminopropyl) -Si-(CH ₂) ₃ NH ₂	Moderat polaritet, alternativ til silika
		CN (cyanopropyl) -Si-(CH ₂) ₃ CN	
		OH (diol) -Si-(CH ₂)OCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	
	Reversfase	C ₁₈ (oktadecyl) -Si-C ₁₈ H ₃₇	Sterkt hydrofobisk og adsorberer analytt fra vandige løsninger
		C ₈ (oktyl) -Si-C ₈ H ₁₇	Moderat hydrofobisk med mindre retensjon enn C ₁₈
		C ₂ (etyl) -Si-C ₂ H ₅	Lite hydrofobisk
		Ph (fenyl) -Si-Ph	
	Ionebindings fase	Kvanternære aminer -Si-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	Sterkt anionisk som ekstraherer molekyler med negativ ladning i vandige/ ikke-vandig løsning
		Propylbensulfonat -Si-(CH ₂) ₃ C ₆ H ₄ -SO ₃ ⁻	Sterkt kationisk som ekstraherer positivt ladede basiske stoffer
		Propylsulfonat -Si-(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻	

2.4 Adsorbent mekanismer

Analytt påføres SPE adsorbenten med *frontal* kromatografi og utskilles fra adsorbenten med *fortrengnings* kromatografi (Hennion 1999). Modusene er velkjente - SPE er en enkel kromatografisk prosess hvor adsorbenten er stasjonærfasen. Mobilfasen er løsningsmiddelet som ekstraherer og utskiller analytten. Vandige løsningsmidler brukes i reversfase- ioniserings kromatografi, mens organiske løsningsmidler brukes i normalfase- adsorpsjons kromatografi.

Når prøven appliseres til kolonnen vil forbindelser enten passere gjennom eller binde seg (Christie 1992). Tiltrekning mellom kolonnen og analytt skaper *retensjon* - analytt fester seg på kolonnen mens løsningsmiddelet passerer gjennom. Retensjon er avhengig av analytt, løsningsmiddel og adsorbent. Mekanismen hvor analytt skilles fra en kolonne heter *elusjon* (Christie 1992).

Analytt skal danne så sterke bindinger til adsorbenten at den kun fjernes med et elusjonsmiddel (Hennion 1999). Analytt elueres med lavest mulig volum av løsningsmiddel slik at konsentrasjon av analytt maksimeres. Med sterk retensjon av analytt på adsorbenten kan flere selektive ekstraksjoner kjøres uten uønsket elusjon.

Selektivitet skapes ved sekvensiell endring av polariteten til løsningsmiddelet (Kaluzny et al. 1985). Det finnes en unik binding mellom isolerte stoffer og den funksjonelle gruppen i fastfasen. Stoffer med ulik struktur danner ulike bindinger til fastfasen, mens andre stoffer har små ulikheter som kan utnyttes. Med variasjon i løsningsmiddel polaritet på fastfasen kan stoffer isoleres selektivt.

Løsningsmiddel egenskaper

Polaritetsindeksen kan brukes til å regne ut den samlede polariteten i et løsningsmiddel. Mens heksan har veldig lav polaritet, har vann høyest polaritet, som vist i tabell 2.2. Polaritetsindeksen gir en generell tilnærming til polaritet som ikke forklarer interaksjonen som oppstår mellom molekyler.

Tabell 2.2 Polaritets indeks til organiske og vandige løsningsmidler (LSU Macromolecular Studies Group 2014).

Løsningsmiddel	Polaritets indeks
Pentan	0,0
Heptan	0,1
Heksan	0,1
Iso-oktan	0,1
Cycloheksan	0,2
Toluen	2,4
Etyleter	2,8
Diklorometan	3,1
Isopropanol	3,9
Kloroform	4,1
Etylacetat	4,4
Aceton	5,1
Metanol	5,1
Pyridin	5,3
Acetonitril	5,8
Vann	10,2

Flyktigheten til løsningsmidler er avhengig av både damptrykk, kokepunkt og tetthet, se tabell 2.3. Damptrykk er det trykket som gass utøver når et stoff i flytende form er i likevekt med sin egen gass. Løsningsmidler som brukes med SPE skal være så flyktige som mulig - da kan løsningsmidlene dampes inn med nitrogen raskt og uten tap av analytt.

Tabell 2.3 Tetthet, damptrykk og kokepunkt til organiske løsningsmidler (Science Stuff 2013).

Løsningsmiddel	Tetthet (g/ ml) i væskefase	Damptrykk ved 20 °C (kPa)	Kokepunkt (°C)
Heptan	0,680	5,3	98,5
Metanol	0,792	13,0	64,7
Heksan	0,655	17,6	68,5
Kloroform	1,483	21,1	61,2
Diklorometan	1,325	47,0	39,9
Dietyleter	0,713	58,3	34,6
Etylacetat	0,897	60,8	77,1

2.5 Metodeutvikling

De første kromatografiske analysemetodene brukt i analysen av TAG var væske- væske kromatografi og papir kromatografi (Perona & Ruiz-Gutierrez 2004). Introduksjonen av HPLC og ulike fase adsorbenter fornyet interessen for separasjonen av TAG. De første separasjonene ble utført av Pei et al. (1975) med reversfase kolonner og mellomlange karbonkjeder, og kiseltsyre ble brukt på lange karbonkjeder. I 1977 ble naturlige TAG separert med HPLC av Plattner et al. (1977) og WADA et al. (1977). De fant ut at elusjon av TAG på reversfasekolonner skjer i rekkefølge av minkende polaritet, som påvirkes av metningsgrad, molekylær konfigurasjon og molekylvekt.

SPE har lenge vært brukt for separasjon av lipidklasser i biologiske stoffer, men det er fortsatt uvanlig i analysen av oljer og matfett (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). De vanligste fraksjoneringene i oljer og matfett er separasjoner til NL og PL. Fraksjoneringer av stoffer med økende polaritet eller isolering av spesifikke stoffer er mindre dokumentert.

SPE artikler om behandling av matfett og oljer gir ofte dårlige beskrivelser av trinnene som utføres for lipid separasjon og utvikling av metoder (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). Selv om metoder presenteres og valideres er de vanskelige å repetere fordi det mangler detaljerte beskrivelser. Informasjon om valg av adsorbent, kondisjonering av fasen, applisert prøvemengde og volum, gjennomstrømning og produsent kommenteres ikke (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). Hvis metoden som brukes er god bør logikken bak diskuteres. Disse detaljene er viktige og medvirkende i en SPE metode.

Mye av litteraturen om SPE metoder er dårlig utviklet og tar lite hensyn til kjemien som ligger bak (Hennion 1999). Mange metoder er basert på empiriske og tidkrevende prosesser som er utviklet med prøving og feiling. Prøveopparbeidelse er lite prioritert innenfor analytisk kjemi, og gis til mindre trent kjemikere. Litteraturen om SPE metoder er også dårlig, noe som gjør metodeutvikling mer krevende.

2.5.1 Silika

Det mest brukte pakningsmaterialet for enkle separasjoner av upolare og polare fraksjoner i spiselige oljer er silikagel (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). De fleste analytiske metodene er basert på en velkjent og standardisert IUPAC metode hvor 1 g av olje separeres med 20 g silikagel, 150 mL petroleumeter- dietyleter (87: 13, v/ v) og 150 mL dietyleter (Hopia et al. 1992). Metoden er i utgangspunktet treg og bruker mye løsningsmiddel, men med SPE blir metoden enkel og rask, og bruker mindre løsningsmiddel. Prøver og reagenser kan reduseres med en faktor på 10.

Metoden til Hopia et al. (1992) er vanskelig å standardisere fordi silika patroner fra forskjellige leverandører har ulike egenskaper (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). Den vanligste forskjellen er vanninnhold, som påvirker kolonnens effektivitet. I slike tilfeller kan det være nyttig å tørke kolonnen og kontrollere vanninnholdet i løsningsmidlene. Hvis det brukes en internstandard i prøven og den polare fraksjonen kvantifiseres med HPLC vil en slik SPE metode valideres og kvalitetsikres – og den vil foretrekkes framfor den offisielle metoden (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000).

Nøytrale lipider (NL), inkludert CE, TAG, FFA og kolesterol (C) er blitt separert på silika (Si) kolonner med kloroform og etansyre (Hamilton & Comai 1988). NL- separasjon av CE og TAG var mest krevende. Ulike kombinasjoner av *n*- heksan og polare løsningsmidler ble testet, og kloroform ble erstattet med MTBE. MTBE og dietyleter fungerte bedre enn etylacetat, kloroform og diklorometan (Hamilton & Comai 1988). MTBE ble foretrukket framfor dietyleter; dietyleter er mindre stabilt enn MTBE og inneholder forstyrrende stabilisatorer.

Silika (Si) og florisil (magnesium silikat) kolonner kan brukes for å rense upolare fraksjoner (TAG) i olivenolje, men florisil kolonner fungerer dårlig på komplekse TAG som melkefett og fiskeolje (Ruiz-Gutierrez and Perez-Camino 2000). Analytten av interesse passerer gjennom kolonnen, mens uønskede organiske stoffer adsorberer på silikaen og kastes; slike metoder renser prøver for uønskede stoffer (Supelco 1998).

2.5.2 Aminopropyl

Alkylsilika- baserte stasjonærfaser, enkle og modifiserte, har ulike bruksområder i lipid- analyse (Perona & Ruiz- Gutierrez 2003). Aminopropyl (NH_2) kolonner foretrekkes framfor andre modifiserte silikafaser når isomerer og komplekse blandinger av lipidklasser skal separeres - fordi de gir mer selektiv polare interaksjon (Perona & Ruiz-Gutierrez 2003). Polar interaksjon oppstår mellom analytt og NH_2 gruppen på adsorbent overflaten (normalfase interaksjon). Dette inkluderer hydrogen- bindinger, pi – pi interaksjon, dipol – dipol interaksjon og induisert dipol interaksjon. NH_2 har også vært brukt i reversfase separasjoner med vandige løsningsmidler (Supelco 1998).

Trinnvis separasjon av lipidklasser

En enkel metode for rask separasjon av nøytrale og polare lipid klasser med NH₂ kolonner ble utviklet av Kaluzny et al. (1985), se tabell 2.4. SPE metoden separerer nøytrale lipider (NL) i storfe fettvev med løsningsmidler av økende polaritet. Kaluzny et al. sammenlikner SPE metoden deres med en standardisert TLC metode (Perona and Ruiz-Gutierrez 2003).

Tabell 2.4 Kaluzny et al. (1985) metoden for trinnvis separasjon av lipidklasser med løsningsmidler av økende polaritet.

	Totale lipider		Nøytrale lipider*	
	Fraksjon	Løsningsmiddel	Fraksjon	Løsningsmiddel
Aktivering		Kloroform		Heksan
Prøve		Kloroform		Heksan
Fraksjon 1	NL*	Kloroform: isopropanol (2:1)	TAG	Heksan: diklorometan: etylacetat (89:10:1)
Fraksjon 2	FFA	Etansyre: dietyleter (98:2)	C	Heksan: etylacetat (95: 5)
Fraksjon 3	PL	Metanol	DAG	Heksan: etylacetat (85: 15)
Fraksjon 4			MAG	Kloroform: metanol (2:1)

*Nøytrale lipider blir først separert fra totale lipider og deretter fraksjonert videre på en ny kolonne.

Kaluzny et al. (1985) fikk problemer med å skille kolesterol og DAG - begge har en hydroksylgruppe som danner samme hydrogen binding med NH₂ gruppen. Kaluzny et al. brukte ulike mengder etylacetat i *n*- heksan for å skille stoffene. De rapporterte et utbytte av lipid standarder på mer enn 95 % med bare 2 % kontaminasjon. SPE metoden deres var et historisk gjennombrudd - den separerte hele 10 lipidklasser med samme kolonne. Separasjon av lipider er viktig for å innhente pålitelig informasjon om fettsyre sammensetninger i hver fraksjon.

Kim og Salem (1990) noterte at Kaluzny et al. (1985) ikke hadde skilt polare fosfolipider fra andre lipider. De utviklet en metode som separerte sure fosfolipider fra nøytrale fosfolipider i rotteblod, og gjorde en fettsyreanalyse av fraksjonene. Kim og Salem fikk tap av flerumettede fettsyrer i elusjon av polare fosfolipider med sure løsningsmidler.

Agren et al. (1992) separerte CE, TAG, FFA og PhL og analyserte fettsyrene fra hver lipidfraksjon. Når Agren et al. brukte nye NH₂ kolonner observerte de at kloroform eluerte TAG og CE i samme fraksjon; med to år gamle NH₂ kolonner oppsto det retensjon av TAG. Når kloroform ble byttet ut med MTBE klarte Agren et al. å separere CE og TAG på nye kolonner.

Agren et al. (1992) påviste kontaminasjon av mettede og enumettede fettsyrer fra plastkolonner når de brukte etansyre, et surt løsningsmiddel. Russell og Werne (2007) meldte at produkter laget av høytetthetspolyetylen frigjør betydelige nivåer av kortkjede (C16) og (C18) fettsyrer under elusjon, mens glass og fluorpolymerbelagt høytetthetspolyetylen ga lite forurensning. Det må utvises forsiktighet når kortkjede- fettsyrer analyseres med høytetthetspolyetylen- kolonner.

Pinkart et al. (1998) modifiserte metoden til Kaluzny et al. (1985) for å separere mikrobielle lipider - som er mindre polare enn lipider i fettvev, se tabell 2.5. Mens Kaluzny et al. separerer lipider med flerumettede fettsyrer, separerer Pinkart et al. enumettede og mettede bakterielle lipider. Lipidene ble løst i heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v). Minimalt volum (150 µL) ble brukt for å applisere prøven. De fleste lipidene ga utbytte på over 90 %, men unntak av steroler.

Tabell 2.5 Pinkart et al. (1998) metoden for trinnvis separasjon av lipidklasser med løsningsmidler av økende polaritet.

	Totale lipider		Nøytrale lipider*	
	Fraksjon	Løsningsmiddel	Fraksjon	Løsningsmiddel
Aktivering		Heksan		Heksan
Prøve		Heksan: kloroform: metanol (95: 3: 2)		Heksan
Fraksjon 1	NL*	Kloroform	TAG	Heksan: diklorometan: kloroform (88:10:2)
Fraksjon 2	PHA	Aceton	Sterol	Heksan: etylacetat (95: 5)
Fraksjon 3	PL	Metanol: kloroform (6: 1)	DG	Heksan: etylacetat (85: 15)
Fraksjon 4			MG	Kloroform: metanol (2:1)

*Nøytrale lipider blir først separert fra totale lipider og deretter fraksjonert videre på en ny kolonne.

Ruiz et al. (2004) sammenliknet metodene til Kaluzny et al. (1985) og Pinkart et al. (1998) i separasjonen av muskel lipid klasser. Den mest brukte metoden for separasjon av lipidklasser blant forskere er beskrevet av Kaluzny et al., men Pinkart et al. sine modifikasjoner er bedre når PL skilles fra andre lipider i muskelvev.

Giacometti et al. (2002) analyserte fettsyrer i PL, TAG, DAG og MAG fra matoljer og biologisk vev. De sammenliknet NH₂, Nexus (polymerisk) og C₁₈ kolonner og bygde på metodikken til Pinkart (1998). Giacometti et al. fikk dårlig gjenfinning av (C14:0) FAME i PL, TAG, DAG, MAG når *n*- heksan ble brukt til lipid- oppløsning.

Selektiv ekstraksjon

Burdge et al. (2000) noterte at metoden til Agren et al. (1992) bare var testet på standarder og ikke på biologiske prøver. Når Burdge et al. testet metoden til Agren et al. fikk de lavt utbytte, høyt standardavvik (SD) og dårlig reproduserbarhet. Burdge et al. utviklet en alternativ metode for å ekstrahere TAG, FFA og CE i blodplasma, og analyserte fettsyrene fra hver fraksjon med GC-FID og GC-MS. De skilte og vasket hovedfraksjonene først, før de ekstraherte spesifikke lipidklasser på en ny NH₂ kolonne. GC-FID ble brukt til analyse, og GC-MS til å bekrefte resultatene.

Burdge et al. (2000) oppdaget små topper med forurensning i prøvene, som ble identifisert med GC-MS som de lange hydrokarbon kjedene dodekan og ftalat. GC-MS analyse viste at disse stammet fra *n*-heksan som ble brukt til lipid oppløsning. Utbytte var på ca. 75 – 85 %, som følge av ufullstendig separasjon av prøven. Burdge et al. noterte at selektiv retensjon er et problem med FFA og CE - de er sammensatt av svært ulike fettsyrer som elueres i forskjellige fraksjoner. I TAG er fettsyrene jevnt fordelt mellom molekylene – de er lettere å eluere i samme fraksjon.

Bodennec et al. (2000) noterte at Kim og Salem (1990) hadde separert polare fosfolipider, men ikke polare sfingolipider. Bodennec et al. (2000) utarbeidet en metode for selektiv ekstraksjon av sfingolipider fra fiskegjeller. De brukte elusjonsteknikken til Kaluzny et al. (1985) med heksan: etylacetat 85: 15 (v/ v) for elusjon av NL og kloroform: metanol 2:1 (v/ v) for elusjon av fosfolipider. Rizov og Doulis (2001) ekstraherte glycolipider og NL i plantevev ved å kombinere NH₂ og Si kolonner. Dybvik et al. (2008) brukte NH₂ kolonner til separasjon av marine lipider.

2.5.3 Diol

Pérez-Camino et al. (1996) separerte diglyserid isomerer i matolje og noterte at aminopropyl (NH_2) kolonner kan gi stor grad av isomerisering ved at fettsyrer bytter posisjon i molekylet. Silika (Si) kolonner ga noe isomerisering, mens diol (OH) kolonner var de eneste som ikke forårsaket noe isomerisering. Pacheco et al. (1998) foretok en lignende studie og kunne bekrefte funnene til Pérez-Camino et al.. Ruiz-Gutiérrez og Pérez-Camino (2000) noterte at selv om OH kolonner ikke forårsaker isomerisering, så er NH_2 kolonner bedre til å separere PL når isomerisering ikke er problematisk.

2.6 GC analyse av FAME

Gasskromatografi (GC) har vært den foretrukne metoden for fettsyre- analyse de siste 50 årene (Seppanen- Laakso 2002). Dagens GC metoder med høykvalitets kapillærkolonner (WCOT) tillater følsomme og reproduserbare fettsyre- analyser. Et kjennetegn med SPE metoder er tap av analytt som gir systematiske feil når utbytte måles (Seppanen- Laakso 2002). GC analyse gir veldig god reproduserbarhet med RSD < 1 %, mens SPE har mye dårligere reproduserbarhet. Derfor kan GC brukes sammen med SPE for å måle reproduserbarheten til SPE metoder.

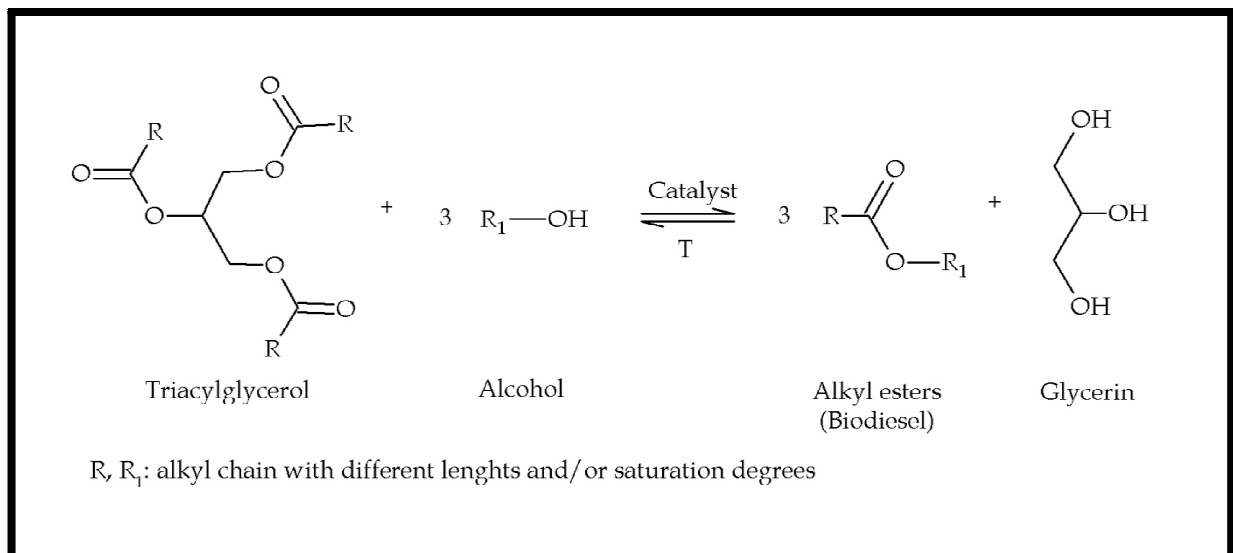
Før i tiden ble det brukt flere ulike pakkematerialer og faser med ulik polaritet i analyse med gasskromatografi (Seppanen- Laakso 2002). På 80- tallet ble glass og deretter sammensmeltet-silika kapillærkolonner introdusert med ulike væskefaser. Termiske detektorer ble erstattet av flammeionasjons- detektor (FID) og WCOT kapillærkolonner ble introdusert. Instrumentene ble over tid mer følsomme, nøyaktig og presise (Seppanen- Laakso 2002). Split/ splitless (S/ SL), direkte (OC) og ”programmed temperature vaporizer” (PTV) injektorer ble forbedret og automatisert – reproduserbarheten i GC- analyser økte.

Fettsyremetyler (FAME) analyse med GC består av lipid esterifisering og injeksjon, separasjon, identifisering og kvantifisering av FAME (Eder 1995). Lipid esterifisering kan utføres med flere reagenser, enten med syre katalyserte eller base katalyserte reaksjoner. FAMEs kan identifiseres utefra deres retensjonstid og kvantifiseres basert på toppareal.

Omestring

For at fettsyrer koblet til lipider skal analyseres med gaskromatografi må fettsyrene splittes og konverteres til alkylestere (FAME) med lavere smeltepunkt og høyere flyktighet (Eder 1995). Forsåpning med natriumhydroksid og metylering med syrer var tidligere brukt, men det tok lang tid. Direkte omestring av lipider til FAME er raskere fordi hydrolyse og esterifisering skjer samtidig med samme reagens (Eder 1995), se figur 2.2. Den største feilkilden med direkte omestring er at reaksjonen er ufullstendig, særlig med NL som har dårlig løselighet i omestringsløsningsmidler. FAMEs ekstraheres med *n*-heksan etter omestring.

Syrekatalysert omestring med bortrifluorid i metanol ved høy temperatur i to timer og ekstraksjon av FAME med *n*-heksan er meget effektivt (Eder 1995). Den høye temperaturen kan gi dekomposisjon av PUFA. Basekatalysert omestring med natrium- metanolat i metanol utføres ved romtemperatur, og medfører ikke dekomposisjon av PUFA. Derivatisering med natrium- metanolat er en hurtig metode for omestring av acylglyseroler - reaksjonen tar kun 2-5 minutter (Seppanen- Laakso 2002). Frie fettsyrer som ikke stammer fra acylglyseroler vil ikke metyleres. Løsningsmidler må ikke inneholde vann siden det gir forsåpning.



Figur 2.2 Reaksjonsligning for syre- eller basekatalysert direkte omestring (Feltet et al. 2011)

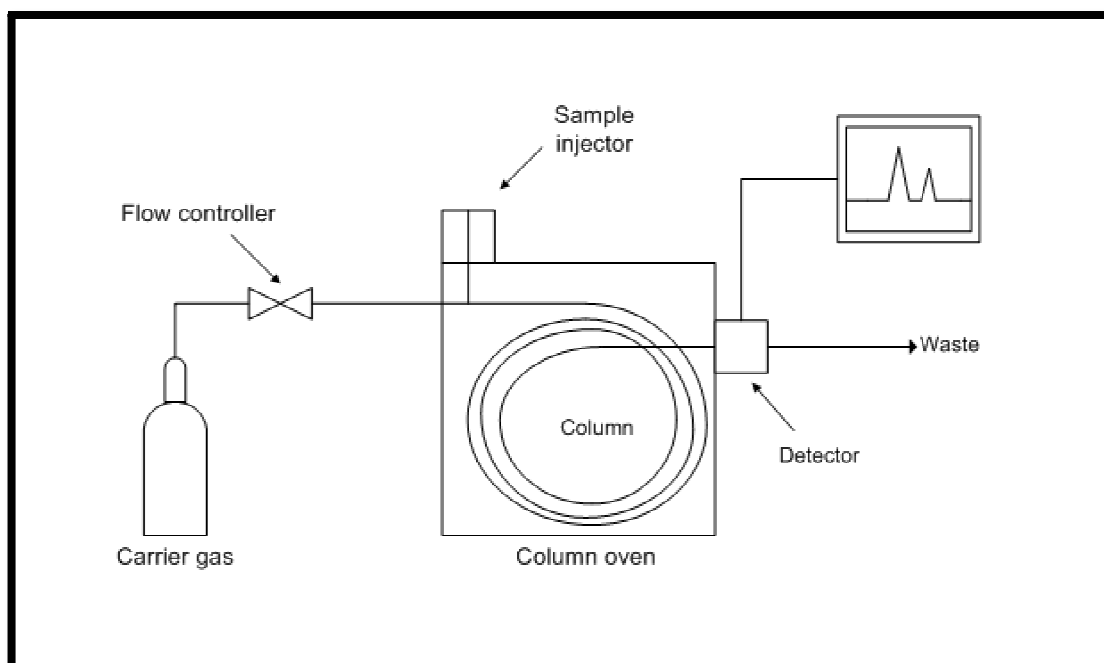
Instrumentelt

Gasskromatografi involverer separasjon av komponenter i en damp tilstand mellom en mobil gassfase og en stasjonær ikke- flyktig væskefase som fordeles på en inert kolonne (Akoh & Min 2002). En prøve injiseres i gassfase (prøven må ha en viss flyktighet) og ledes til en kolonne. Deretter blir analytt separert, detektert og konvertert til et elektrisk signal som gir gaussiske topper (Christie 1989a).

En gasskromatograf har tre vesentlige komponenter (Miller 2005), se figur 2.3:

1. Et innløp hvor prøven injiseres
2. Kolonnen (i en ovn) som inneholder den stasjonære væskefasen og den mobile gassfasen
3. En detektor.

Analytt transporteres gjennom kolonnen i gassfase og blandes med en gass mobilfase kalt bæregass (Harris 2007). Stasjonærfasen i kolonnen er en ikke-flyktig væske som er bundet til innsiden av kolonnen, og analytt adsorberes på denne fasen. Flyktig væske injiseres gjennom et septum inn i et oppvarmet kammer hvor den raskt omdannes til gass.



Figur 2.3 Fysiske komponenter til en gasskromatograf (Zhao 2012)

Injeksjon

Det mest kritiske steget i FAME analyse er injeksjon av prøven (Eder 1995). Automatisk S/ SL injeksjon med oppvarmet injeksjonskammer er mest vanlig. Med split modus injiseres kun en liten andel av prøven på kolonnen, mens med splitless modus injiseres hele prøven (Seppanen-Laakso 2002).

Kapillærkolonner har veldig lav kapasitet og derfor må selv små prøvemengder kjøres i split modus - split injeksjon brukes hvis analytt utgjør mer enn 0,01 % av prøven (Eder 1995). Split injektoren varmer opp prøven og blander den med bæregass – løsningsmiddelet fordamper og prøven injiseres på kolonnen. Prøver med høy konsentrasjon av FAME injiseres uten at stasjonærfasen overbelastes (Eder 1995). Typisk split ratio er mellom 1:10 og 1:100 med temperatur på 250- 300 °C.

Splitless injeksjon brukes når spormengder av stoff skal analyseres, og er tidsinnstilt med splitless tid (Seppanen- Laakso 2002). Splitless tid kan være 0,2 minutter, slik at injektoren stenges etter 12 sekunder. Det hindrer at kolonnen overbelastes - splitless tid er avhengig av konsentrasjonen i prøven. Direkte injeksjon (OC) og PTV kan brukes dersom injektoren påvirker prøvesammensetningen, og kan oppnå svært høy presisjon og nøyaktighet med veldig små prøvemengder (Eder 1995).

Kolonner

De fleste analyser med gasskromatografi bruker lange, smale, veggbelagte kapillærkolonner (WCOT) lagd av sammensmeltet silika (Harris 2007). Kolonnene har et belegg av polyamid for støtte og beskyttelse mot atmosfærisk fuktighet. Åpne kapillærkolonner gir høyere oppløsning, kortere analysetid og høyere følsomhet enn tettpakkede kolonner, men har mindre prøve kapasitet.

Temperaturen i en kolonne økes under en separasjon for å øke damptrykket til løsningsmiddelet og senke retensjonstiden til stoffene som blir eluert sist (Harris 2007). Helium som bæregass gir høy resolusjon fordi analytt sprer seg raskere enn med for eksempel nitrogen. Urenheter i gassen kan degradere kvaliteten på stasjonærfasen - gassen bør ha høy kvalitet.

Lengden på veggbelagte kolonner (WCOT) er viktig i forhold til resolusjon og retensjonstid (Eder 1995). Lange kolonner kan gi bedre resolusjon, men dette må veies opp mot tiden det tar å analysere prøven. Typisk kolonnelengde er på 25- 50 meter. Det er vanligvis en 0,25 µm tykk film av stasjonærfase på den indre veggen av kolonnen (Harris 2007). Indre diameter (i.d.) på kolonnen er som regel 0,1- 0,3 mm. Kolonnene er relativt smale, med høyt bæregass trykk og små injiserte prøvemengder.

Det finnes tre typer stasjonærfaser i veggbelagte kapillærkolonner (WCOT): polar, polar og veldig polar (Eder 1995). Veldig polare stasjonærfaser kan være lagd av cyanoetylsilikon og cyanopropylsilikon, som gir god separasjon av PUFA og har meget høy resolusjon. Polare stasjonærfase kan være lagd av polyetylenglykol og kan separere polare FAME; de har høy resolusjon og termisk stabilitet (Eder 1995). Upolare stasjonærfase kan være lagd av metylsilikon og brukes på mettede FAME; disse gir dårlig resolusjon, men har veldig god termisk stabilitet.

Detektor

Analyse av FAME med GC- FID er blant de vanligste analysene innenfor lipid forskning (Dodds et al. 2005). GC- FID gir et bredt spekter av lineær respons, høy presisjon og meget lav LOD. De største tapene forekommer som regel med omestring og injeksjon. Kvantifisering av FAME med GC- FID er utbredt, men deteksjon med MS er bedre for kvalitativ analyse av FAME (Dodds et al. 2005). Kvantitativ analyse av FAME med GC- MS gir høyere følsomheten og selektivitet.

Responser til FID er stort sett det samme for (C14: 0)- (C18: 0) FAME, mens lengre og umettede FAME kan gi ulik respons med FID detektor (Seppanen- Laakso 2002). Eluert stoff brennes i en blanding av hydrogen og luft (Harris 2007). Nøyaktigheten til GC- FID systemet kan bestemmes ved å bruke fettsyreblandinger med kjente konsentrasjoner - gitt at detektoren er kalibrert og responsen er reproducerbar (Seppanen- Laakso 2002). Ulempen med FID er at responsen er ukritisk til hvilket stoff som analyseres.

Med GC- MS er det ikke bare mulig å detektere stoffene, det er mulig å identifisere dem (Harris 2007). MS- detektoren fragmenterer molekylene med elektroner og danner mindre ioner. Ionene blir tiltrukket av et magnetisk eller elektrostatisk felt og separert basert på deres masseladningsforhold (m/z) (Harris 2007).

Det er kritisk at responsen til GC- MS detektoren kalibreres, fordi responsen er ikke lineær (Dodds et al. 2005). Kalibrering av responsen til en MS detektor er krevende arbeid - følsomheten og selektiviteten blir meget høy. Fordeler med MS er:

1. Identiteten til analytt kan bekreftes med spektre samt retensjonstid;
2. Topper kan skilles fra bakgrunnsstøy eller sammenfallende topper hvis det finnes unike ioner.

Den enkleste metoden for FAME kvantifisering med EI- MS utføres ved å overvåke rekkevidden av m/z verdier til analyttens fragmenter og bestemme mengden ved integrasjon av toppene i et TIC kromatogram (Dodds et al. 2005). Hvis identiteten og retensjonstiden til en bestemt analytt etableres, kan følsomheten og spesifisiteten økes med SIM, hvor toppareal til unike topper måles uavhengig av støy eller andre topper (Dodds et al. 2005). Signal- til - støy forholdet (S/N) blir bedre med MS fordi responsen kun stammer fra analytten.

Identifisering og kvantifisering

Den enkleste måten å identifisere FAME med GC- FID er å se på retensjonstiden (Eder 1995). Retensjonstiden kan sammenliknes med standarder, eller standarder kan sammenliknes med hverandre. Det finnes også matematiske verdier som kan regnes ut basert på lengden og antall dobbeltbindinger i FAME. Selv om disse parameterne gir gode indikasjoner, er det kun MS detektor som bekrefter identiteten til FAME (Eder 1995).

Mengden av FAME kan regnes ut ved å bruke relativ respons faktor (RRF), hvor detektor respons (toppareal og topphøyde til FAME) fra prøver og standarder sammenliknes (Eder 1995).

Toppareal og topphøyde regnes ut med elektronisk digital integrasjon, og er nøyaktig så lenge toppene er symmetriske (Eder 1995). Selv om de fleste FID detektorer har god linearitet, bør dette sjekkes ved å bruke ulike konsentrasjoner av standarder.

3. Eksperimentelt

3.1 Forbruksmateriell

Tabell 3.1 Materiell til behandling av løsningsmidler

Apparatur	Produkt	Leverandør
Ekstraksjonsrør	Disposable culture tubes	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Inndampnings- og risterør	Culture tubes with screw cap	Duran, Wertheim, Germany
Hetteglass med lokk	Autosampler Vials 11 mm, 1.5 ml, Alu Cap	VWR, Radnor, USA
Pasteurpipetter	150 mm	VWR, Radnor, USA
Beholder med lokk	100 ml og 250 ml	Pyrex, Tewksbury, USA
Erlenmeyer med kork	25 mL, 50 mL, 100 mL	Duran, Wertheim, Germany
Begerglass	20 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL	Duran, Wertheim, Germany
Plastpipetter	100 – 1000 µl	BIOHIT, Helsinki, Finland
Plastpipetter	Finnpipette 1-5 ml	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA

Tabell 3.2 Nøytrale lipid standarder

Analytt	Referansestoff	Bestillingsnr.	Molekylvekt	Produsent
Tristearin	Trioktadekanoin	33-1800-13	891,48 g/mol	Larodan AB, Limhamn, Sweden
Dipalmitin	Diheksadekanoin	32-1600-13	568,91 g/mol	Larodan AB, Limhamn, Sweden
Monomyristin	Monotetradekanoin	31-1400-13	302,45 g/mol	Larodan AB, Limhamn, Sweden

Tabell 3.3 SPE løsningsmidler

Løsningsmiddel	Kvalitet	Produsent	CAS-NR
<i>n</i> - Heksan	HPLC grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	110-54-3
Metanol	LC-MS grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	67-56-1
Kloroform	HPLC grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	67-66-3
Etyl acetat	Puriss p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	141-78-6
Dietyleter	Puriss p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	60-29-7
Isopropanol	Prima	Vinmonopolet, Oslo, Norge	67-63-0
<i>n</i> - Heptan	HPLC grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	142-82-5

Tabell 3.4 Øvrig apparatur

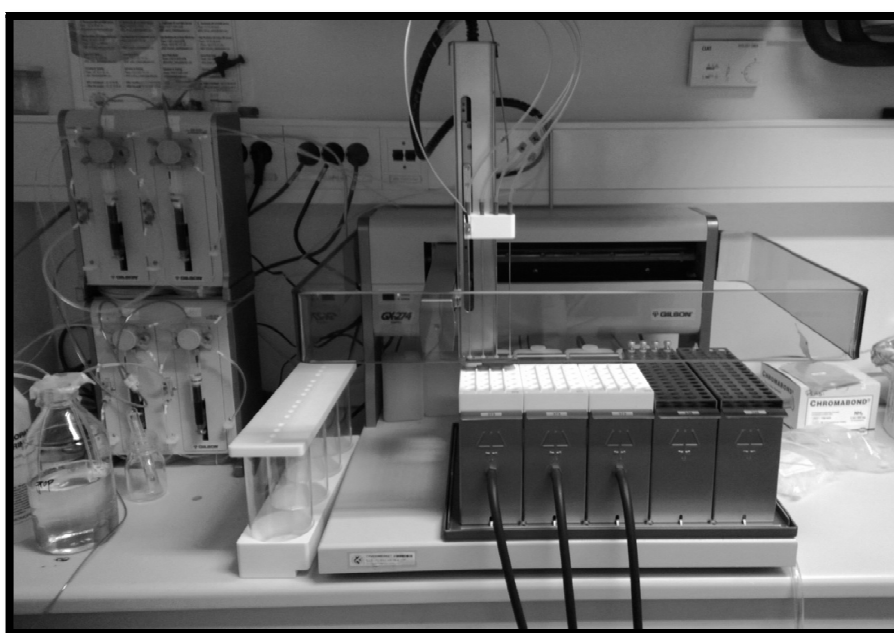
Apparatur	Produkt	Leverandør
Varmebad	Burgwedel	GFL, Burgwedel, Germany
Ultralyd bad med oppvarming	Transsonic 460/H	Elma, Wetzikon, Switzerland
Vekt	CP 224S	Sartorius, Göttingen, Germany
Nitrogen- inndampnings stativ	Pierce Reacti-VAP III	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Varmeblokk for reagensrør	DRI-BLOCK DB 3	Techne, Staffordshire, UK
Ristebord	PSU-10i	BIOSAN, Riga, Latvia
11mm Electronic Decapper	EDCB-11C	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA

3.2 Betingelser

Automatisert SPE

SPE roboten er av typen Gilson GX-274 ASPEC med Trilution LH programvare (Middleton, USA). Kolonnen er en Agilent Bond Elut 500 mg 3 ml, NH₂ (Santa Clara, USA).

Løsningsmiddel appliseres på kolonnen med en hastighet på 0,1 mL/ sekund. Et bilde av SPE roboten kan sees i figur 3.1.

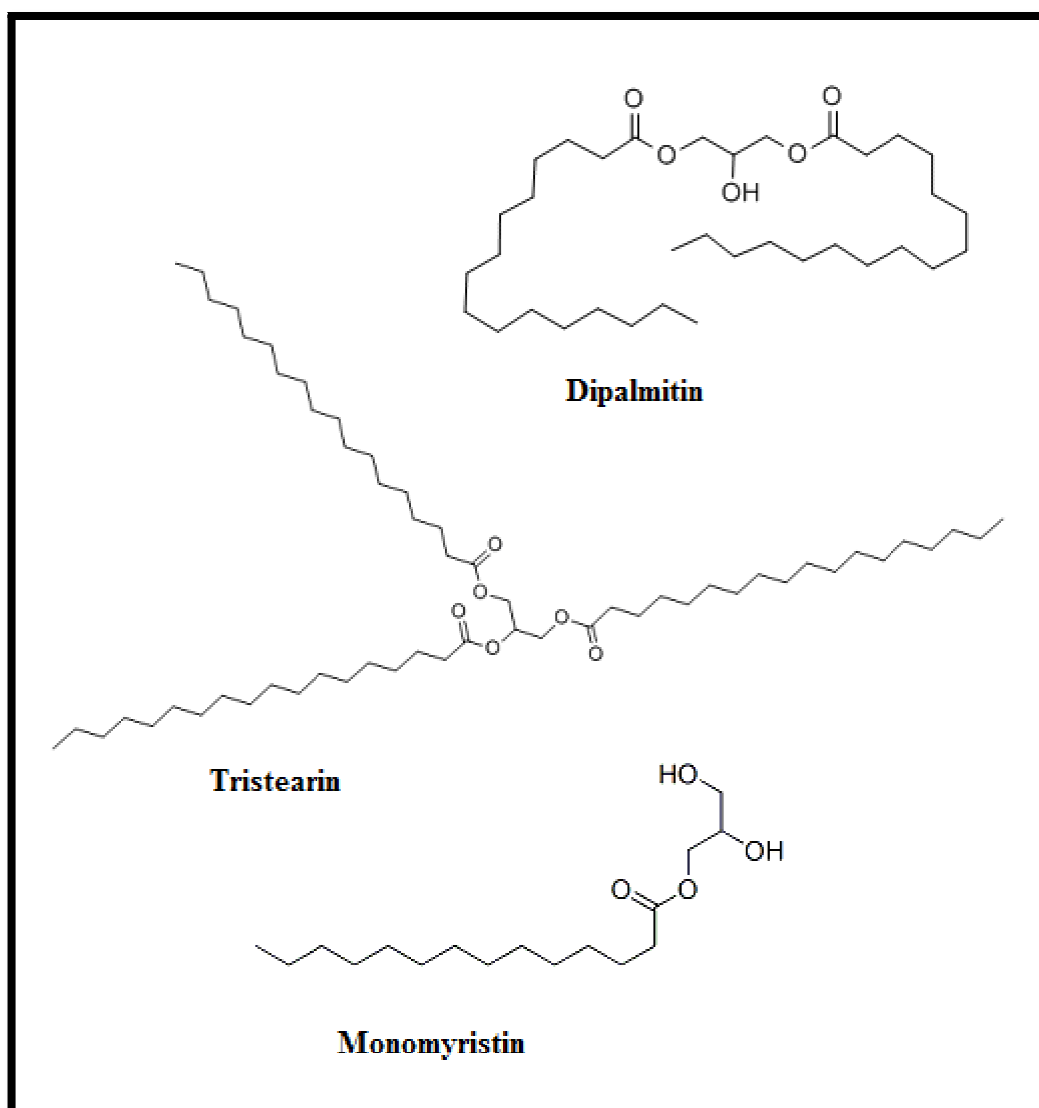


Figur 3.1 Gilson GX-274 automatisert SPE robot (Middleton, USA)

Acylglyserol- standarder

De tre lipid- standardene (se figur 3.2) som ekstraheres og separeres i en trinnvis elusjon med løsningsmidler av økende polaritet er:

- Tristearin (18:0- 18:0- 18:0)
- Dipalmitin (16:0- 0- 16:0)
- Monomyristin (14:0- 0- 0)



Figur 3.2 Strukturen til acylglyserol- standardene tristearin, dipalmitin og monomyristin (ChemicalBook 2008)

Nitrogen- inndampning

Nitrogen- inndampning av separerte acylglyserol klasser skjer med en svak strøm av nitrogengass (99,9999 %, AGA, Porsgrunn, Norge), hvor prøvene er plassert på en varmeblokk for reagensrør (med vann i bunn) som står på 45 °C.

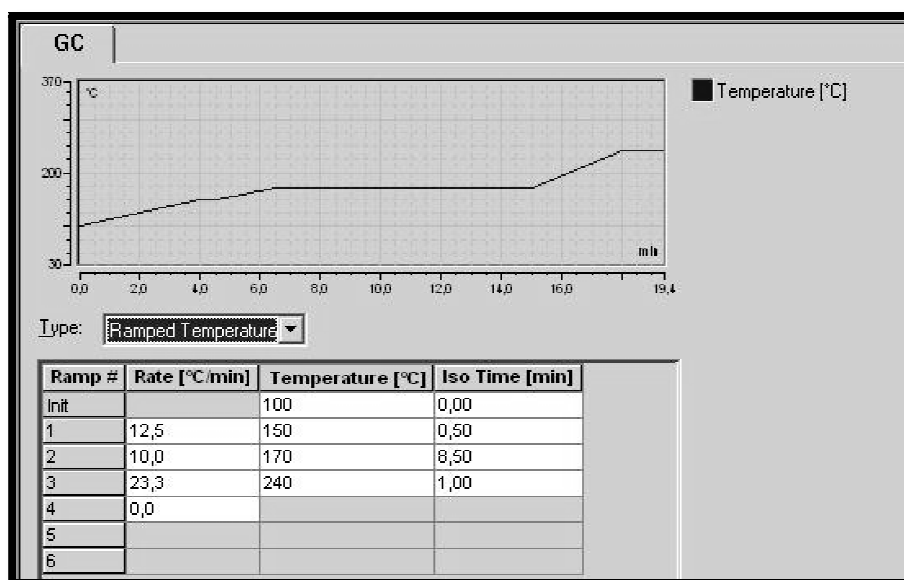
Omestring

Acylglyseroler reagerer med metanol i en omestring- reaksjon basekatalysert med natrium- metanolat. Acylglyseroler omdannes til FAME og glyserin – FAME er flyktig og kan analyseres med GC- FID (Feltet et al. 2011). Tristearin omestres til stearinsyre- metylester, dipalmitin omestres til palmitinsyre- metylester og monomyristin omestres til myristinsyre- metylester.

GC-FID

Gasskromatografen er av typen Finnigan Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) med flammeionisasjons- detektor. Kolonnen er en Agilent CP WAX 52CB (Santa Clara, USA), med polar polyetylenglykol stasjonærfase. Film tykkelsen er 0,25 μ m, innvendig diameter (i.d.) er 0,25 mm og lengden er 30 meter.

GC-FID har en S/ SL injektor (kjøres i split modus) med en temperatur på 280 °C (maks temperatur 400 °C) og en injeksjonsmengde på 1 μ L. Split flow er 10 mL/ min mens purge flow er 0,1 mL/ min. Bæregassen er helium (99,9999 %, AGA, Porsgrunn, Norge) med et trykk på 150 kPa. FID har en temperatur på 290 °C, luft flyt på 350 mL/min og hydrogen flyt på 35 mL/min.



Figur 3.3 Temperatur programmering fra analyse med GC-FID hentet fra Chromeleon Chromatography Data System, Dionex, Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)

Kolonnen er programmert med varierende temperatur, som vist i figur 3.3. Kolonnen har en starttemperatur på 100 °C, som økes til 150 °C. Så økes temperaturen til 170 °C - hvor den holder seg i 8,5 minutter. Etter 15 minutter økes temperaturen til 240 °C for å skille ut rester. Total kjøretid er 19 minutter. Maksimal temperatur for kolonne- ovnen er 450 °C.

Det er to vaske- løsningsmidler; en fylles med *n*- heksan og den andre fylles med kloroform: metanol 2:1 (v/ v). Programvaren er 'Chromeleon Chromatography Data System,' programmert av Dionex, en del av Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, USA).

FAME identifikasjon og kvantifisering

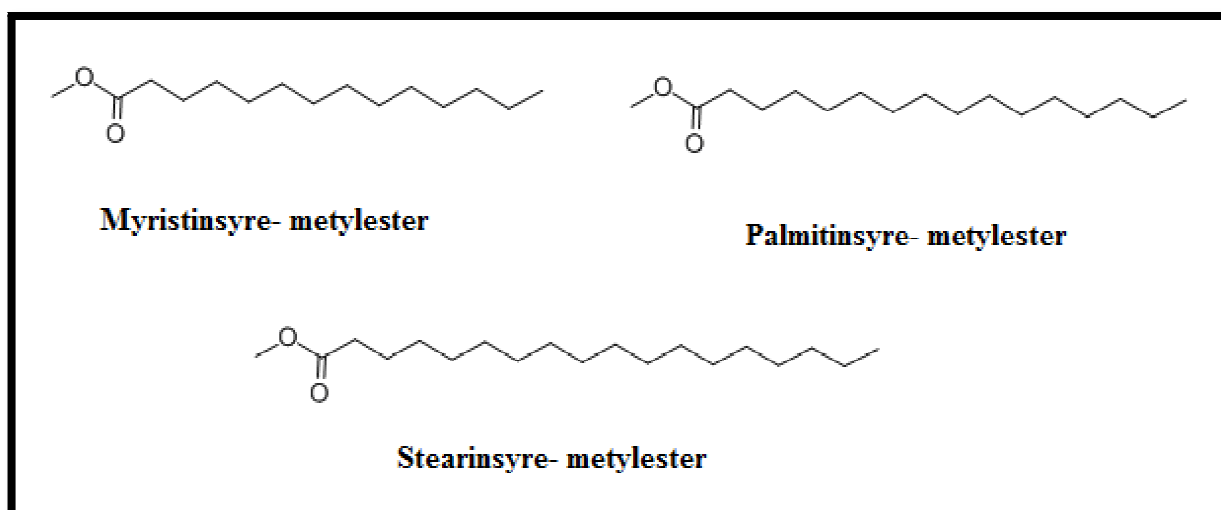
FAME retensjonstiden øker med kjede- lengden til FAME- molekylet, fordi GC- FID stasjonærfasen er polar (polyetylenglykol), og gir normalfase separasjon. Molekylvekt til acylglyserol- fettsyrer og omestret FAME vises i tabell 3.5, mens strukturen til FAME vises i figur 3.4.

Utbytte av FAME regnes ut ved å bruke relativ respons faktor (RRF), hvor FID toppareal respons (mV *min) og FID topphøyde respons (mV) måles. Detektor respons til FAME fra separerte acylglyseroler deles på responsen til FAME standarder; gitt at det er samme konsentrasjon av FAME i prøven og standarden (Huang et al. 1990):

$$\text{RRF} = \frac{\text{Detektor respons til FAME}}{\text{Detektor respons til FAME standarder}} \quad (1)$$

Tabell 3.5 Fettsyre og omestret fettsyremetylester molekulvekt

Fraksjon	Molekyl	Molekylvekt (g/ mol)
TAG	Stearinsyre	284,48
	Stearinsyre- metylester	298, 51
DAG	Palmitinsyre	256,42
	Palmitinsyre- metylester	270,45
MAG	Myristinsyre	228,37
	Myristinsyre- metylester	242,40



Figur 3.4 Strukturen til FAME analytter (ChemicalBook 2008)

3.3 Framgangsmåte

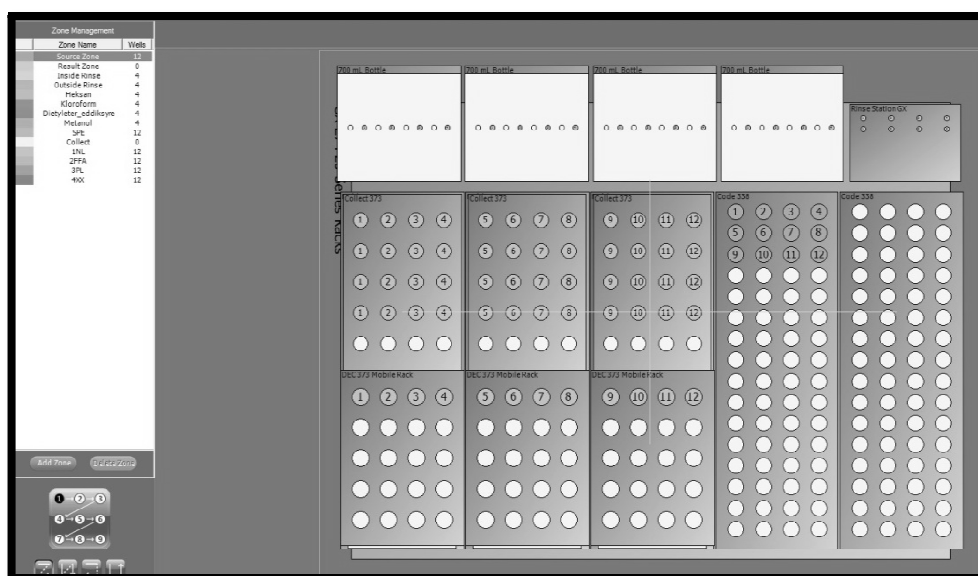
Framgangsmåten er basert på utprøving og assistanse fra veiledere.

Tillagging av prøver til SPE

1. Tillagging av prøver med analytt for SPE:
 - 1.1. Lag en 50 mL batch av løsningsmiddel som skal brukes til å løse de nøytrale lipidene ved hjelp av 50 mL målekolbe.
 - 1.2. Ta en tom 25 mL målekolbe og vei ut 10 mg av hver acylglyserol- standard, altså 10 mg tristearin, 10 mg dipalmitin og 10 mg monomyristin i en og samme målekolbe. Det gir 30 mg total mengde nøytrale lipider.
 - 1.3. Fyll 25 mL målekolben med de nøytrale lipidene fra trinn 2 med løsningsmiddelet som ble tilberedt i trinn 1. Spar på de resterende 25 mL av løsningsmiddel.
 - 1.4. Løs de nøytrale lipidene hjelp av ultralyd bad og bruk gjerne oppvarming med 50 °C.
 - 1.5. Overfør de løste lipidene til tre stykk 11 mm hetteglass ved hjelp av 150 mm pasteurpipetter.
 - 1.6. Overfør løsningsmiddel uten løste lipider til en stykk 11 mm hetteglass.
 - 1.7. Plasser hetteglass på SPE robot.

2. Tillagging av løsningsmidler for elusjon med SPE robot:
 - 2.1. Tilbered de fire løsningsmidlene i 250 mL begerglass.
 - 2.1.1. En brukes til kondisjonering,
 - 2.1.2. En til elusjon av triacylglyserol,
 - 2.1.3. En til elusjon av diacylglyserol,
 - 2.1.4. En til elusjon av monoacylglyserol.
 - 2.2. Overfør løsningsmidlene fra begerglass til plast beholder fra SPE roboten.
 - 2.3. Plasser plastbeholdere på rack på SPE roboten.

3. Forberedelse av SPE til å kjøre separasjon (se figur 3.5 for oversikt over SPE robot rackstativ):
 - 3.1. Sjekk at det er fylt på isopropanol og at avfallsbeholder ikke er full.
 - 3.2. Plasser 12 oppsamlingsrør og 4 kolonner på SPE roboten.
 - 3.3. Kjører en renging av systemet med isopropanol
 - 3.4. Kjører programmert metode for separasjon.

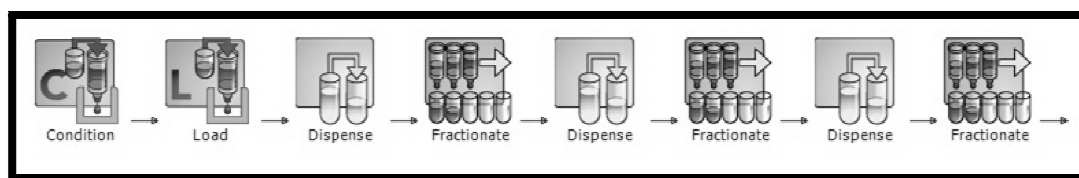


Figur 3.5 Skjematiske oversikt over rackstativ på SPE roboten, hentet fra Gilson Trilution LH programvare (Middleton, USA)

Programmering av SPE robot

Programmering av SPE roboten gjøres i fem steg, som vist i figur 3.6:

1. Kondisjonering av kolonnen med 7,5 ml løsningsmiddel
2. Applisering av 500 μ l prøve på kolonnen
3. Kjører 3 ml av første eluent i systemet
4. Eluerer kolonnen med 5 ml av første eluent
5. Repeterer trinn 3 og 4 for henholdsvis andre og tredje eluent
6. Kjører en air push for å fjerne resten av væsken fra kolonnen.



Figur 3.6 Programmering av metoden for separasjon av nøytrale lipider, hentet fra Gilson Trilution LH programvare (Middleton, USA)

Analyse av lipid separasjon med GC- FID

Etter at de nøytrale lipidene er separert med SPE ble ekstraktene behandlet på følgende måte:

1. Inndampes ved hjelp av nitrogen og varmeblokk:
 - 1.1. Væsken i oppsamlingsrørene fra SPE roboten overføres til nye rør med skrukork ved hjelp av 150 mm pasteurpippetter.
 - 1.2. Rørene med skrukork plasseres i varmeblokk (for reagensrør) med nitrogen- inndampnings stativ plassert direkte ovenfor vannbadet.
 - 1.3. Damp inn prøvene med en svak strøm av nitrogen, slik at all løsningsmiddel fordamper
2. Omestring ved bruk av natrium- metanolat som katalysator:
 - 2.1. Natrium- metanolat tilberedes ved å løse 4 mg metallisk natrium per mL metanol (Husk at metallisk natrium ikke må komme i kontakt med vann, ettersom de vil gi en eksplosiv reaksjon).
 - 2.2. Rørene med de tørkede lipidene tilsettes 2 mL ren *n*- heksan og deretter 1,5 mL natrium- metanolat (bruk plastpipette).
 - 2.3. Korken på rørene skrues på og de ristes på ristebord ved 360 RPM i 30 minutter.
3. Analyse ved GC- FID:
 - 3.1. Korken på rørene skrues av og den øverste fasen, heksanfasen, overføres fra rørene til hetteglass.
 - 3.2. Heksanfasen inneholder FAME, mens glyserin blir ligger igjen i metanolfasen.
 - 3.3. Lokk settes på hetteglass med tang og prøvene settes på GC-FID for analyse
 - 3.4. Pass på at GC- FID har fått påfyll av vaske løsningsmidler og at avfalls løsningsmidler er tømt.

Opparbeidelse av FAME standarder

1. Tilberedning av standarder
 - 1.1. Tilbered en 100 mL batch av løsningsmiddel for nøytrale lipider. Bruk en 100 mL målekolbe.
 - 1.2. Finn tre 25 mL målekolber. Plasser 10 mg av hvert nøytralt lipid i hver sin målekolbe.
 - 1.2.1. 10 mg monomyristin i målekolbe 1
 - 1.2.2. 10 mg dipalmitin i målekolbe 2
 - 1.2.3. 10 mg tristearin i målekolbe 3
 - 1.3. Bruk 75 mL løsningsmiddel fra batchen i trinn 1 og fyll de tre 25 mL målekolbene i trinn 2.
 - 1.4. Løs opp de nøytrale lipidene med ultralyd bad med temperatur på 50 °C.
 - 1.5. Bruk plastpipette til å måle ut 500 µl fire ganger fra hver av de tre 25 mL målekolbene og overfør til 12 rør med kork. Det gir fire paralleller av hver av de tre standardene.
2. Inndampning ved hjelp av nitrogen og varmeblokk til reagensrør.
 - Bruk samme framgangsmåte som beskrevet tidligere. Her har alle prøvene samme løsningsmiddel så alle kan dampes inn samtidig.
3. Omestring ved bruk av natrium- metanolat som katalysator, som bidrar til økt reaksjonshastighet
 - Bruk samme framgangsmåte som beskrevet tidligere.
4. Analyse ved GC- FID.
 - Bruk samme framgangsmåte som beskrevet tidligere.

4. Metodeutvikling

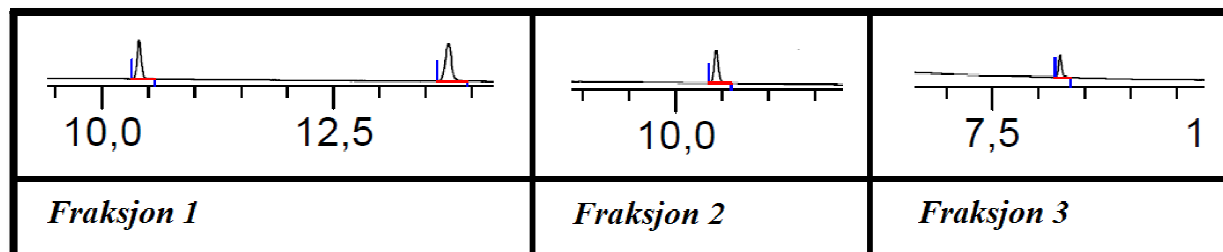
Test metode A

Metoden i tabell 4.1 er beskrevet tidligere i oppgaven, se tabell 2.4. Den er hentet fra arbeidet til Kaluzny et al. (1985). *N*-heksan brukes for å løse prøven; *n*-heksan er såpass upolart at det gir dårlig løselighet av dipalmitin (16:0- 0- 16:0) og monomyristin (C14:0- 0- 0).

Tabell 4.1 SPE oppsett, test metode A

Løsningsmidler		Proporsjon (v/ v)	Volum	Lipid fraksjon
Aktivering	Heksan	Rent	7,5 mL	
Prøve	Heksan	Rent	0,5 mL	NL
Fraksjon 1	Heksan: Diklorometan: Dietyleter	89:10:1	5 mL	TAG
Fraksjon 2	Heksan: Etylacetat	85:15	5 mL	DAG
Fraksjon 3	Kloroform: Metanol	2:1	5 mL	MAG

Figur 4.1 viser kromatogrammer fra denne SPE metoden. Toppene viser GC- FID respons til FAME som er omestret fra separerte acylglyseroler. Toppene er små, og separasjonen er ikke tilfredsstillende. Metoden må endres – både lipid oppløsnings- middel og løsningsmidler for trinnvis elusjon må tilpasses.



Figur 4.1 Utdrag fra kromatogrammer, test metode A

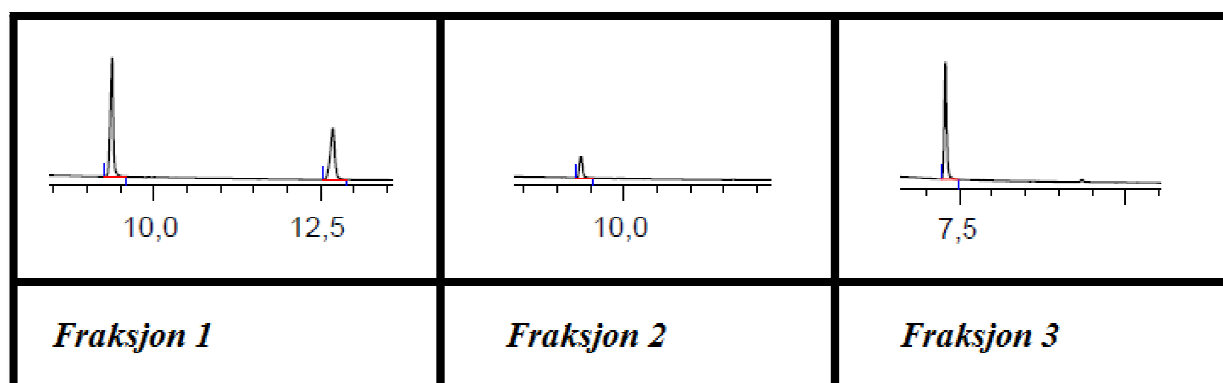
Test metode B

Som vist i tabell 4.2 er løsningsmiddelet for de samlede lipidene byttet fra *n*-heksan til kloroform: metanol 2:1 (v/v). Kloroform: metanol 2:1 (v/v) løser i prinsippet alle lipider. Kloroform løser de upolare lipidene, mens metanol løser de polare lipidene (Ferraz et al. 2004). Folch et al. (1957) klarte å ekstrahere lipider fra mat ved å bruke kloroform: metanol 2:1 (v/v).

Tabell 4.2 SPE oppsett, test metode B

Løsningsmidler		Proporsjon (v/v)	Volum	Lipid fraksjon
Aktivering	Heksan	Rent	7,5 mL	
Prøve	Kloroform: Metanol	2:1	0,5 mL	NL
Fraksjon 1	Heksan: Diklorometan	90:10	5 mL	TAG
Fraksjon 2	Heksan: Etylacetat	90:10	5 mL	DAG
Fraksjon 3	Kloroform: Metanol	2:1	5 mL	MAG

Figur 4.2 viser kromatogrammer fra denne SPE metoden. Toppene er store og fine, men separasjonen er dårlig. Samspillet mellom løsningsmiddelet til lipid oppløsning og løsningsmidler til trinnvis elusjon fungerer dårlig – metoden må endres.



Figur 4.2 Utdrag fra kromatogrammer, test metode B

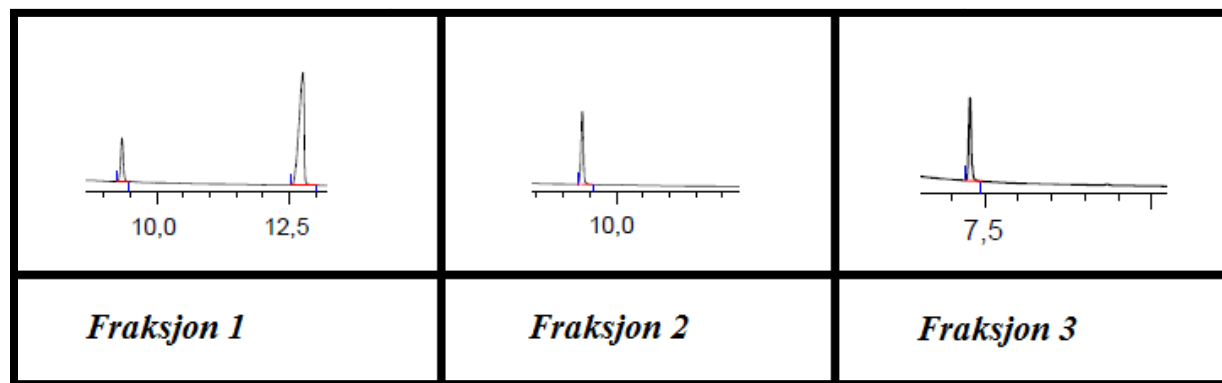
Test metode C

Ettersom det fungerte dårlig med løsningsmidlene brukt til lipid oppløsning i de to forrige metodene, må det tenkes nytt. Pinkart et al. (1998) modifiserte metoden til Kaluzny et al. (1985) slik at den løste mer polare lipid standarder, se tabell 2.5. Pinkart et al. brukte heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v).

Tabell 4.3 SPE oppsett, test metode C

Løsningsmidler		Proporsjon (v/ v)	Volum	Lipid fraksjon
Aktivering	Heksan	Rent	7,5 mL	
Prøve	Heksan: Kloroform: Metanol	95:3:2	0,5 mL	NL
Fraksjon 1	Heksan	Rent	5 mL	TAG
Fraksjon 2	Heksan: Etylacetat	90:10	5 mL	DAG
Fraksjon 3	Kloroform: Metanol	2:1	5 mL	MAG

Figur 4.3 viser kromatogrammer fra denne SPE metoden. Toppene er store og fine, og samspillet mellom lipid oppløsning og trinnvis elusjon virker lovende, selv om det er noe krysskontaminasjon. Metoden til Pinkart et al. (1998) er et godt utgangspunkt for å utvikle en metode for separasjon av lipid standarder.



Figur 4.3 Utdrag fra kromatogrammer, test metode C

5. Resultater og diskusjon

Pinkart et al. (1998) modifiserte metoden til Kaluzny et al. (1985) for å separere mikrobielle lipider - som er mindre polare enn lipider i fettvev, se tabell 2.4 og 2.5. Mens Kaluzny et al. separerte lipider med flerumettede fettsyrer, ville Pinkart et al. separere enumettede og mettede bakterielle lipider. Pinkart et al. løste lipidene i heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/v), som ble testet med gode resultater i metodeutviklingen.

Pinkart et al. og Kaluzny et al. bruker det samme eluent- systemet for separasjon av NL, som ble testet i metodeutviklingen. Eluent- systemet var problematisk - det var gjennombrudd av DAG i første fraksjon, sammen med TAG. Det ble testet med ulike kombinasjoner av *n*- heksan og diklorometan, som hadde dårlig selektivitet for TAG. Eluenten ble for polar, og diklorometan må erstattes av et annet løsningsmiddel.

5.1 Teoretisk konsentrasjon og mengde lipider

Det appliseres en 0,5 ml prøve med acylglyserol- standarder på SPE kolonnen – konsentrasjonen av lipider er 1,2 mg/ mL. Det appliseres altså 0,6 mg lipider, med 0,2 mg av hver acylglyserol-standard. Lipider separeres med SPE, og løsningsmidler dampes inn med nitrogen.

Acylglyseroler omestres til FAME som oppløses i 2 mL *n*- heksan. Av disse 2 mL blir 1 µL injisert og analysert med GC- FID. Den teoretiske konsentrasjonen og mengden lipider er regnet ut med antakelsen at utbytte er 100 % - både med SPE separasjon og derivatisering av acylglyseroler til FAME. Se tabell 5.1, 5.2 og 5.3 for utregninger av teoretisk konsentrasjon og mengde lipider.

Tabell 5.1 Teoretisk konsentrasjon og mengde acylglyseroler som appliseres på SPE kolonnen

Enhet	Konsentrasjon		Applisert mengde (0,5 ml)	
	(M)	(%, w/w)	mg	mol
TAG	$4,486 \times 10^{-4}$	0,0587	0,200	$2,243 \times 10^{-7}$
DAG	$7,030 \times 10^{-4}$	0,0587	0,200	$3,515 \times 10^{-7}$
MAG	$1,323 \times 10^{-3}$	0,0587	0,200	$6,613 \times 10^{-7}$
Totalt	$2,475 \times 10^{-3}$	0,1761	0,600	$1,237 \times 10^{-6}$

*Heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v) har en tetthet på 0,682 g/ mL

Tabell 5.2 Teoretisk mengde lipider som omestres fra acylglyseroler til FAME

		TAG		DAG		MAG		Totalt	
		FFA	FAME	FFA	FAME	FFA	FAME	FFA	FAME
Mengde	mol	$6,729 \times 10^{-7}$		$7,030 \times 10^{-7}$		$6,613 \times 10^{-7}$		$2,037 \times 10^{-6}$	
	mg	0,191	0,200	0,180	0,190	0,151	0,160	0,522	0,550

Tabell 5.3 Teoretisk konsentrasjon og mengde FAME som injiseres på GC- FID

<i>Enhet</i>	Konsentrasjon, oppløst i heksan		Applisert mengde, 1 μL heksan	
	<i>(M)</i>	<i>(%, w/w)</i>	μ g	<i>mol</i>
Stearinsyre- metylester	$3,367 \times 10^{-4}$	0,0153	0,1005	$3,367 \times 10^{-10}$
Palmitinsyre- metylester	$3,516 \times 10^{-4}$	0,0145	0,0951	$3,516 \times 10^{-10}$
Myristinsyre- metylester	$3,307 \times 10^{-4}$	0,0122	0,0802	$3,307 \times 10^{-10}$
Totalt	$1,019 \times 10^{-3}$	0,0420	0,2758	$1,019 \times 10^{-9}$

*Heksan har en tetthet på 0,6548 g/ mL

5.2 Opparbeidelse av FAME standarder

FAME standarder opparbeides og responsen måles med GC-FID for å gi en kvantitativ referanse på utbytte. Acylglyserol- standarder tilberedes i separate løsninger slik at de er adskilt – de separeres ikke med SPE. Lipider ekstraheres med heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v), før de omestres til FAME. Tap som forekommer med derivatisering vil ikke måles.

Tabell 5.4 Respons fra FAME standarder på GC- FID

		Høyde (mV)	Areal (mV* min)
TAG FAME, n = 4	Gjennomsnitt	99,0	7,9
	SD	7,0	0,6
DAG FAME, n = 4	Gjennomsnitt	136,0	7,2
	SD	8,1	0,5
MAG FAME, n= 4	Gjennomsnitt	177,1	7,4
	SD	14,0	0,6

*TAG, DAG og MAG omestret og metylert til FAME

Tabell 5.4 viser responsen til FAME standarder på GC- FID, som gir referanseverdier for kvantifisering av utbytte. Utbytte regnes ut ved å bruke relativ respons faktor (RRF) (se ligning 1, kapittel 3.2). Toppene til FAME fra MAG er spissere enn toppene til TAG. TAG har lengre retensjonstid og derfor blir toppen bredere. Arealet til toppene er omtrent det samme - fordi det er samme mengde av hver acylglyserol- standard. Tabell 5.5 viser retensjonstiden til FAME på GC- FID.

Tabell 5.5 Retensjonstid til FAME på GC- FID

FAME	Retensjonstid (min)
Stearinsyre- metylester	8,25
Palmitinsyre- metylester	10,5
Myristinsyre- metylester	13,75

5.3 Metodevalidering og kvalitetssikring

Metode 1

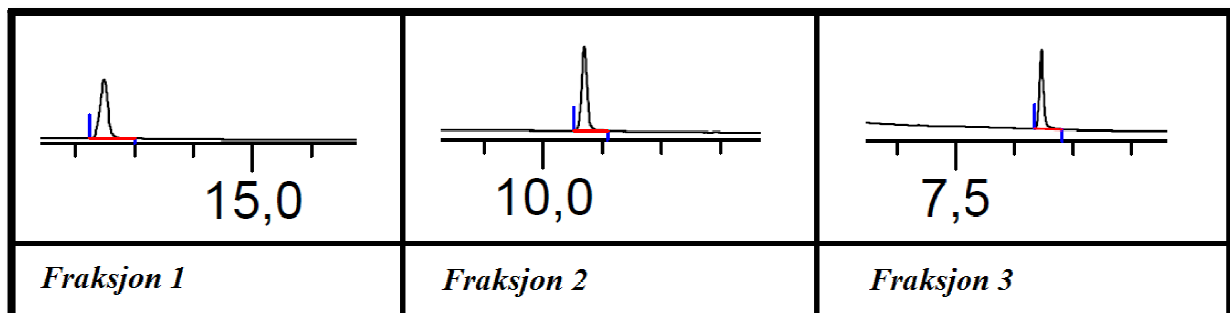
I tabell 5.6 er metode 1 oppført med løsningsmidler. Prøve oppløsnings- middel er heksan: kloroform: metanol 90:6:4 (v/ v). Det gjøres en liten justering av løsningsmiddelet til Pinkart et al. (1998), som er heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v), se tabell 2.5.

Den vanskeligste separasjonen var separasjon av DAG fra TAG. Heksan: dietyleter 97: 3 (v/ v) ble testet, og hadde god selektivitet for TAG. Denne eluenten er hentet fra arbeidet til Kaluzny et al. (1985), som brukte heksan: diklorometan: dietyleter 89:10:1 (v/ v) til elusjon av TAG, se tabell 2.4

Tabell 5.6 SPE oppsett, metode 1

Løsningsmidler		Proporsjon (v/ v)	Volum	Lipid fraksjon
Aktivering	Heksan	Rent	7,5 mL	
Prøve	Heksan: Kloroform: Metanol	90:6:4	0,5 mL	NL
Fraksjon 1	Heksan: Dietyleter	97:3	5 mL	TAG
Fraksjon 2	Heksan: Etylacetat	90:10	5 mL	DAG
Fraksjon 3	Kloroform: Metanol	2:1	5 mL	MAG

Figur 5.1 viser kromatogrammer fra denne SPE metoden. Toppene viser GC- FID respons til FAME som er omestret fra separerte acylglyseroler. Toppene er fine og symmetriske, med minimal kryss- kontaminasjon.



Figur 5.1 Utdrag fra kromatogrammer, metode 1

I tabell 5.7 er det oppført utbytte av de ulike FAME basert på toppenes høyde og areal. Samlet utbytte for FAME fra TAG er $78,3 \pm 2,2$ %, DAG er $82,5 \pm 5,7$ % og MAG er $58,4 \pm 1,6$ %. Det betydelig bedre utbytte av FAME fra DAG og TAG enn det er av MAG.

Det er høyest utbytte av DAG FAME, men den har også høyest RSD. Utbytte fra areal og høyde er omtrent det samme. Det er 5,5 % kontaminasjon under elusjon av TAG FAME.

Tabell 5.7 Oversikt over utbytte (%) og RSD (%) av FAME, metode 1

		Høyde	Areal	Samlet
TAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	79,2	77,3	78,3
	RSD (%)	1,7	2,7	2,2
	Kontam. (%)	6,5	4,4	5,5
DAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	80,7	84,3	82,5
	RSD (%)	5,6	5,8	5,7
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
MAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	57,3	59,5	58,4
	RSD (%)	1,8	1,4	1,6
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0

*TAG, DAG og MAG omestret og metylert til FAME

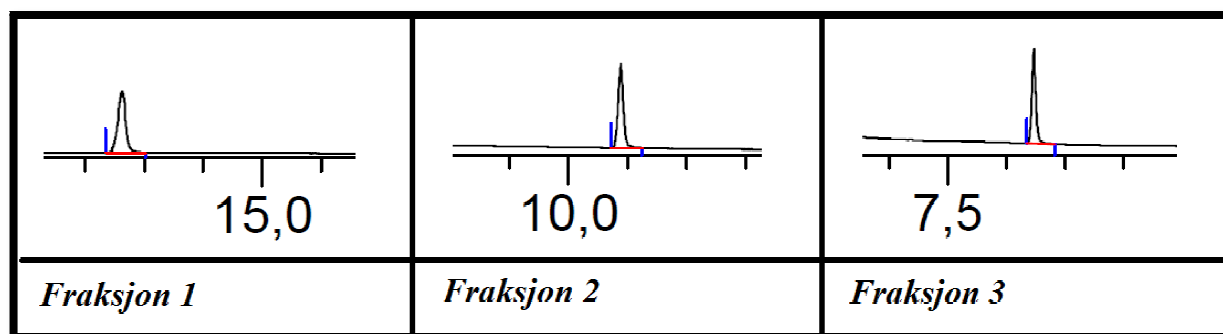
Metode II

I tabell 5.8 er parameterne for metode 2. Heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v) ble brukt som oppløsnings- middel i stedet for 90:6:4 (v/ v) fra første oppsett. Første eluent ble byttet fra heksan: dietyleter 97:3 (v/ v) til ren *n*- heptan. Heptan er litt mindre polart enn *n*- heksan, som kan gi noe bedre selektivitet under elusjon av tristearin.

Tabell 5.8 SPE oppsett, metode 2

Løsningsmidler		Proporsjon (v/ v)	Volum	Lipid fraksjon
Aktivering	Heksan	Rent	7,5 mL	
Prøve	Heksan: Kloroform: Metanol	95:3:2	0,5 mL	NL
Fraksjon 1	Heptan	Rent	5 mL	TAG
Fraksjon 2	Heksan: Etylacetat	85:15	5 mL	DAG
Fraksjon 3	Kloroform: Metanol (v/ v)	2:1	5 mL	MAG

Figur 5.2 viser kromatogrammer fra denne SPE metoden. Toppene er fine og symmetriske, med minimal kryss- kontaminasjon.



Figur 5.2 Utdrag fra kromatogrammer, metode 2

I tabell 5.9 er det oppført utbytte av de ulike FAME basert på toppenes høyde og areal. Samlet utbytte for FAME fra TAG er $78,4 \pm 3,1$ %, DAG er $78,7 \pm 2,2$ % og MAG er $68,7 \pm 2,2$ %. Sammenlignet med metode 1 er det omtrent samme utbytte av FAME fra DAG og TAG, mens utbytte av MAG øker fra 58,4 til 68,7 %.

Det er fortsatt lavere utbytte av MAG, men det er ikke like lavt. RSD er på 2- 4 % for alle FAME, som er tilfredsstillende. Utbytte fra areal og høyde er omtrent det samme og det er ingen kontaminasjon.

Tabell 5.9 Oversikt over utbytte (%) og RSD (%) av FAME, metode 2

		Høyde	Areal	Samlet
TAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	79,5	77,3	78,4
	RSD (%)	3,2	2,9	3,1
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
DAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	79,2	78,2	78,7
	RSD (%)	2,3	2,1	2,2
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
MAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	69,0	68,5	68,7
	RSD (%)	2,3	2,1	2,2
	Kontam (%)	0,0	0,0	0,0

*TAG, DAG og MAG omestret og metylert til FAME

Metode III

I tabell 5.10 står det hvilke parametere som brukes i metode 3. Den eneste forskjellen fra metode 2 er at første eluent byttes fra ren *n*-heptan til heptan: dietyleter 95:5 (v/v).

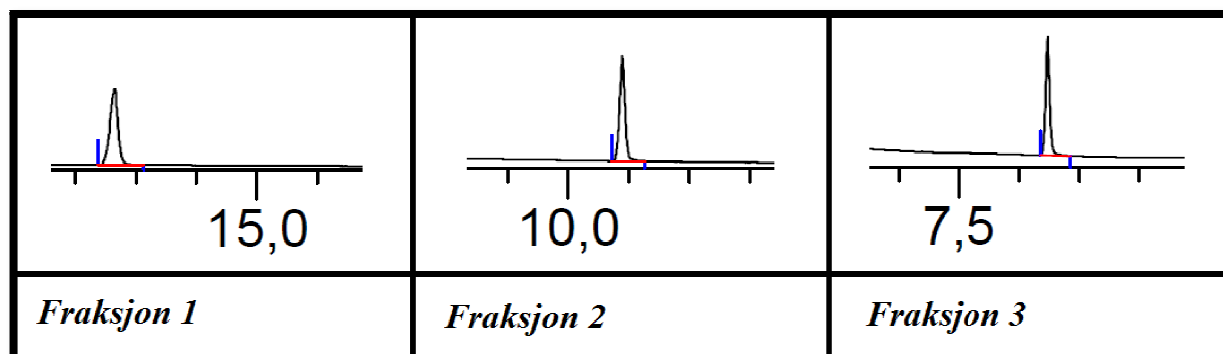
Heptan gir noe mer selektiv elusjon av TAG enn *n*-heksan fordi det er litt mindre polart.

Dietyleter har også god selektivitet for TAG og sørger for at det ikke blir noe gjennombrudd av DAG.

Tabell 5.10 SPE oppsett, metode 3

Løsningsmidler		Proporsjon (v/v)	Volum	Lipid fraksjon
Aktivering	Heksan	Rent	7,5 mL	
Prøve	Heksan: kloroform: metanol	95:3:2	0,5 mL	NL
Fraksjon 1	Heptan: dietyleter	95:5	5 mL	TAG
Fraksjon 2	Heksan: etylacetat	85:15	5 mL	DAG
Fraksjon 3	Kloroform: metanol	2:1	5 mL	MAG

Figur 5.3 viser kromatogrammer fra denne SPE metoden. Toppene er fine og symmetriske, med minimal kryss-kontaminasjon.



Figur 5.3 Utdrag fra kromatogrammer, metode 3

I tabell 5.11 er det oppført utbytte av de ulike FAME basert på toppenes høyde og areal. Samlet utbytte for FAME fra TAG er $85,1 \pm 13,6$ %, DAG er $83,9 \pm 13,0$ % og MAG er $72,8 \pm 11,6$ %.

Det er 5- 10 % bedre utbytte av FAME enn i metode 2, men RSD er betydelig høyere. Det er ingen kontaminasjon.

Tabell 5.11 Oversikt over utbytte (%) og RSD (%) av FAME, metode 3

		Høyde	Areal	Samlet
TAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	86,0	84,1	85,1
	RSD (%)	12,9	14,4	13,6
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
DAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	84,4	83,3	83,9
	RSD (%)	12,8	13,3	13,0
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
MAG FAME, n= 3	Utbytte (%)	73,0	72,5	72,8
	RSD (%)	12,1	11,0	11,6
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0

*TAG, DAG og MAG omestret og metylert til FAME

5.4 Sammenlikning av metoder

I tabell 5.12 presenteres en sammenlikning av utbytte av FAME fra de ulike metodene. Her er utbytte basert på toppareal og topphøyde samlet, og det totale utbytte fra hver metode er inkludert. Det totale utbytte for metode 1 er $73,0 \pm 11,6$ %, metode 2 er $75,3 \pm 5,4$ %, metode 3 er $80,6 \pm 12,5$ %. Metode 3 har best totalt utbytte på over 80,6 %, og har høyt utbytte av FAME fra DAG og TAG.

Utbytte av FAME fra MAG er lavt, og RSD er høyt. Metode 2 har lavest RSD med 5,4 %, og jevnest utbytte. Metode 1 har 1,8 % kontaminasjon, samt det laveste utbytte.

Tabell 5.12 Oversikt over utbytte (%) og RSD (%) av FAME fra hver metode

		Metode 1	Metode 2	Metode 3
TAG FAME, (n= 3)	Utbytte (%)	78,3	78,4	85,1
	RSD (%)	2,2	3,1	13,6
	Kontam. (%)	5,5	0,0	0,0
DAG FAME, (n= 3)	Utbytte (%)	82,5	78,7	83,9
	RSD (%)	5,7	2,2	13,0
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
MAG FAME, (n= 3)	Utbytte (%)	58,4	68,7	72,8
	RSD (%)	1,6	2,2	11,6
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
Totalt FAME, (n = 9)	Utbytte (%)	73,0	75,3	80,6
	RSD (%)	11,6	5,4	12,5
	Kontam. (%)	1,8	0	0

*TAG, DAG og MAG omestret og metylert til FAME

5.5 Samlede resultater

I tabell 5.13 presenteres utbytte av FAME basert på topphøyde og toppareal, og samlet. Samlet utbytte for FAME fra TAG er $80,6 \pm 7,8$ %, DAG er $81,7 \pm 7,6$ % og MAG er $66,6 \pm 8,7$ %. Det er bedre utbytte av FAME fra DAG og TAG enn det er av MAG.

RSD er under 10 % for hver enkelt lipidklasse, mens total RSD er 10,5 %. Total utbytte for FAME er $76,3 \pm 10,5$ %. TAG FAME har 1,8 % kontaminasjon, noe som gir samlet kontaminasjon på 0,6 %.

Tabell 5.13 Oversikt over samlet utbytte (%) og RSD (%) av FAME

		Høyde	Areal	Samlet
TAG FAME, (n=9)	Utbytte (%)	81,6	79,5	80,6
	RSD (%)	7,5	8,2	7,8
	Kontam. (%)	2,2	1,5	1,8
DAG FAME, (n=9)	Utbytte (%)	81,4	81,9	81,7
	RSD (%)	7,5	7,8	7,6
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
MAG FAME, (n=9)	Utbytte (%)	66,4	66,8	66,6
	RSD (%)	9,4	8,1	8,7
	Kontam. (%)	0,0	0,0	0,0
Totalt FAME, (n= 27)	Utbytte (%)	76,5	76,1	76,3
	RSD (%)	10,7	10,3	10,5
	Kontam. (%)	0,7	0,5	0,6

*TAG, DAG og MAG omestret og metylert til FAME

5.6 Utvikling av metoden

De tre acylglyserol- standardene tristearin (18:0- 18:0- 18:0), dipalmitin (16:0- 0- 16:0) og monomyristin (14:0- 0- 0) oppløses og påføres en NH₂ kolonne. NH₂- kolonner foretrekkes framfor andre modifiserte silikafaser fordi de danner mer selektive polare interaksjoner med nøytrale lipider (Perona & Ruiz- Gutierrez 2003)

Lipid standarder elueres selektivt med løsningsmidler av økende polaritet. Dette gir en separasjon med krysskontaminasjon for samlede lipider på 0,6 %. Samlet utbytte av FAME er 76,3 % og RSD er 10,5 %. Målet var å ha et utbytte høyere enn 70 %, en RSD lavere enn 10 % og minimal kontaminasjon. RSD er så vidt høyere, mens utbytte og kontaminasjon er tilfredsstillende.

Metoden som ble utviklet i denne oppgaven er basert på metoden utviklet av Kaluzny et al. (1985), se tabell 2.4. Det oppsto problemer med metoden til Kaluzny et al. fordi *n*- heksan ikke løste acylglyserol- standardene. Derfor ble andre løsningsmidler testet; først ble det forsøkt å løse lipidene i kloroform: metanol 2:1 (v/ v), og deretter ble heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v) testet. Sistnevnte løsningsmiddel er hentet fra metoden til Pinkart et al. (1998), se tabell 2.5.

Eluent- systemet var også problematisk - det var gjennombrudd av DAG i første fraksjon, sammen med TAG. Derfor måtte eluenten i første fraksjon gjøres mer selektiv, og det ble testet med ulike kombinasjoner av *n*- heksan og diklorometan. Det viste seg at dette ble for polart, og derfor ble diklorometan byttet ut med dietyleter. *N*- heksan ble byttet ut med *n*- heptan, som er noe mindre polart. Ulempen med *n*- heptan er at det har veldig lav flyktighet – det tar lang tid å dampe inn med nitrogen. Polaritetsforskjellen mellom *n*- heptan og *n*- heksan minimal, og derfor foretrekkes *n*- heksan.

Det beste løsningsmiddelet for elusjon av TAG er heksan: dietyleter 95:5 (v/ v), som ga mest utbytte i metode 3 (*n*- heksan foretrekkes framfor *n*- heptan fordi det har høyere flyktighet). Til elusjon av DAG brukes heksan: etylacetat 85: 15 (v/ v). Til elusjon av MAG brukes kloroform: metanol 2: 1 (v/ v). MAG og DAG eluenten er hentet fra metoden til Pinkart et al. (1998), mens TAG eluenten er utviklet med testing på laboratoriet.

5.7 Feilkilder

Systematiske feil og tap av analytt

Den største systematiske feilkilden i forsøkene er tap av analytt når det kjøres SPE. Dette tapet gjør at utbytte blir dårligere, og gjenspeiles i resultatene. Det er ikke mulig å eluere all analytt fra kolonnen. Det kan sammenliknes med en klut som fuktes med vann og deretter vrís opp – kluten er fortsatt fuktig. Kolonnen har en kapasitet på 10 mg fett, men det appliseres kun 0,6 mg fett i de separasjonene som utføres. Hvis det appliseres mer fett vil kanskje utbytte bli bedre. Det forekommer også unøyaktighet i veiing av lipider. Små tap av analytt gir systematiske feil når utbytte måles.

Det ble påvist lavere utbytte av FAME fra MAG enn FAME fra TAG og DAG. Tap av analytt forekommer enten med SPE separasjon, eller med nitrogen- inndampning. (C14: 0) - FAME er meget flyktig, og ble løst i kloroform: metanol 2:1 (v/v), som har lav flyktighet. Analytt fordampet muligens sammen med løsningsmiddelet under nitrogen- inndampning. En annen mulighet er at MAG FAME gikk tapt under SPE separasjon. Dette skyldes enten dårlig retensjon under prøve applisering, eller dårlig elusjon når analytten skulle fjernes fra kolonnen.

Blanke prøver

Kolonnene som brukes i denne oppgaven er laget av plast og inneholder derfor ftalater som har en myknings funksjon. Ftalater kan gi falske topper under analyse av FAME med GC- FID. Noen av disse materialene fjernes når kolonnen kondisjoneres med upolare løsningsmidler som *n*-heksan. Det ble kjørt blanke prøver på samtlige separasjoner med SPE for å avdekke feilkilder. De blanke prøvene fra SPE separasjon hadde ikke falske topper.

Fuktighet i kolonnen

Det ble kjørt noen innledende tester med kolonner av et annet merke, Macherey- Nagel (Düren, Germany). De innledende testene med disse kolonnene ga ikke like god separasjon som kolonnene fra Agilent (Santa Clara, USA). Agilent kolonnene var ikke vakuumpakket, og derfor ble adsorbenten fuktig. De nye kolonnene fra Macherey- Nagel var ikke fuktige.

Hamilton & Comai (1988) drøftet denne problemstillingen, og kom fram til at egenskapene til kloroform endres når kolonnene har fuktighet i seg. Hvis kloroform byttes ut med MTBE, vil metoder som brukes med fuktige kolonner fungere på kolonner som ikke er fuktige. Alternativt kan fuktige kolonner tørkes før de brukes, noe som burde vært gjort med kolonne i dette forsøket.

GC analyse av FAME

Tap av analytt under omestring og nitrogen- inndampning ble ikke målt. Acylglyserol- standarder ble omestret og metylert til FAME standarder - FAME standarder ble opparbeidet med betingelser som kun måler systematiske feil fra SPE separasjon. Derfor er det viktig å bruke de samme løsningsmidlene (som har samme flyktighet under nitrogen- inndampning) når separerte acylglyseroler derivatiseres og FAME standarder opparbeides. I denne oppgaven ble det brukt ulike løsningsmidler, og det kan ha gitt tap av flyktig FAME under nitrogen- inndampning.

De to løsningsmidlene som er minst flyktig ved nitrogen- inndampning er heptan og kloroform. Heptan har lavt damptrykk (5,3 kPa ved 20 °C) og høyt kokepunkt (98,5 °C). Kloroform har veldig høy tetthet i væskeform (1,483 g/ mL). Derfor bør kloroform og heptan helst ikke brukes som eluenter med SPE. De ble brukt som eluenter i denne oppgaven, og det kan ha gitt tap av flyktig FAME under nitrogen- inndampning.

Det ble kun kjørt tester med en konsentrasjon av acylglyserol- standarder - 1,2 mg/ mL. Det bør vært kjørt tester med flere konsentrasjoner, for å kontrollere lineariteten i responsen fra GC- FID. GC- FID respons er som regel lineær for ulike konsentrasjoner av samme analytt, men dette må alltid kontrolleres. Sprøyten, en del av injektoren, tettet seg. Løsningsmiddelet som skulle rense sprøyten var *n*- heptan. *N*- heptan løser ikke alle FAME, og derfor ble ikke sprøyten renset. En av de to vaske- løsningsmidlene ble byttet ut med kloroform: metanol 2:1 (v/ v), og da ble sprøyten renset ordentlig.

5.8 Standard prosedyre

SPE med NH₂ kolonner var først rapportert av Kaluzny et al. (1985), som fraksjonerte MAG, DAG og TAG, CE, FFA, PhL og sterolestere (Dybvik et al. 2008). Metoden har primært vært brukt til fraksjonering av lipidklasser fra blodplasma og biologisk vev (Kaluzny et al. 1985; Kim and Salem 1990). NH₂ kolonner har også vært brukt til fraksjonering av lipidklasser fra mikroorganismer (Pinkart et al. 1998), organer i dyr (Kim and Salem, 1990; Giacometti et al. 2002; Ruiz et al. 2004) og fiskegjeller (Bodennec et al. 2000).

Av metodene nevnt ovenfor er det metoden til Kaluzny et al. (1985), se tabell 2.4, som har mest historisk betydning, men det er metoden til Pinkart et al. (1998), se tabell 2.5, som er mest relevant i denne oppgaven. Pinkart et al. modifiserte metoden til Kaluzny et al. (1985) for å separere mikrobielle lipider - som er mindre polare enn lipider i fettvev. Mens Kaluzny et al. separerte lipider med flerumettede fettsyrer, ville Pinkart et al. separere enumettede og mettede bakterielle lipider. Pinkart et al. løste lipidene i heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/v), som ble testet med gode resultater i metodeutviklingen.

Den vanskeligste separasjonen var separasjon av DAG fra TAG. Heksan: dietyleter 95: 5 (v/v) ble testet, og hadde god selektivitet for TAG med høyt utbytte i metode 3. Denne eluenten blir ikke blitt nevnt av Pinkart et al. (1998), eller Kaluzny et al (1985). Til elusjon av DAG brukes heksan: etylacetat 85: 15 (v/v) og til elusjon av MAG brukes kloroform: metanol 2: 1 (v/v). De to sistnevnte eluentene brukes av Kaluzny et al. og Pinkart et al.. Pinkart et al. understreker at prøven skal appliseres med så lite løsningsmiddel som mulig, og velger å løse prøven i 150 µL løsningsmiddel. Tabell 5.14 viser et forslag til en standard prosedyre.

Tabell 5.14 Standard prosedyre

Løsningsmidler		Proporsjon	Volum	Lipid fraksjon
Aktivering	Heksan	Rent	7,5 mL	
Prøve	Heksan: kloroform: metanol	95:3:2	0,15 mL	NL
Fraksjon 1	Heksan: dietyleter	95:5	5 mL	TAG
Fraksjon 2	Heksan: etylacetat	85:15	5 mL	DAG
Fraksjon 3	Kloroform: metanol	2:1	5 mL	MAG

6. Konklusjon

Det er publisert mange artikler med SPE metoder som separerer lipid- klasser i ulike organiske prøver, men ingen av metodene separerer lipid- klasser i melkefett. Sammensetningen av svensk melk ble målt til 69,4 % mettede fettsyrer og 30,6 % umettede fettsyrer (Lindmark- Månssen og Åkesson 2001). De vanligste mettede fettsyrene i kumelk er palmitinsyre (C16: 0), etterfulgt av myristinsyre (C14: 0) og stearinsyre (C18: 0) (Månsson 2008).

Acylglyserol- standardene tristearin (18:0- 18:0- 18:0), dipalmitin (16:0- 0- 16:0) og monomyristin (14:0- 0- 0) skal separeres med aminopropyl (NH₂) kolonner. Det brukes en moderne GX-274 automatisert robot fra Gilson Inc. (Middleton, USA) for å utføre separasjoner. FAME standarder opparbeides og responsen måles med GC-FID for å gi en kvantitativ referanse på utbytte. Systematisk feil med SPE måles, mens tap med nitrogen- inndampning og omestring ikke måles.

Arbeidet med metodeutvikling baseres på tidligere metodikk utviklet av Kaluzny et al. (1985) og Pinkart et al. (1998). Acylglyserol- standarder oppløses i et løsningsmiddel bestående av heksan: kloroform: metanol 95:3:2 (v/ v). Lipidene oppløses 100 % i løsningsmiddelet, og påføres en NH₂ kolonne. Det beste løsningsmiddelet for elusjon av TAG er heksan: dietyleter 95: 5 (v/ v). Til elusjon av DAG brukes heksan: etylacetat 85: 15 (v/ v) og til elusjon av MAG brukes kloroform: metanol 2: 1 (v/ v).

Utbytte og separasjon måles i tre metoder med små variasjoner i løsningsmidlene som nevnes ovenfor. Utbytte av FAME fra metode 1 er $73,0 \pm 11,6$ %, metode 2 er $75,3 \pm 5,4$ % og metode 3 er $80,6 \pm 12,5$ %. Samlet utbytte av TAG FAME er $80,6 \pm 7,8$ %, DAG FAME er $81,7 \pm 7,6$ % og MAG FAME er $66,6 \pm 8,7$ %. Samlet utbytte er på 76,3 % med RSD på 10,5 % og 0,6 % kontaminasjon. Målet var å ha minimal kontaminasjon, utbytte høyere enn 70 % og en RSD lavere enn 10 %. RSD er så vidt høyere enn målet, mens utbytte og kontaminasjon er tilfredsstillende.

Den største systematiske feilkilden i forsøkene er tap av analytt når det kjøres SPE. Dette tapet gjør at utbytte blir dårligere, og gjenspeiles i resultatene. Utbytte av MAG FAME var dårligere enn utbytte av FAME fra TAG og DAG. Tapet forekommer enten med SPE separasjon, eller med nitrogen- inndampning. Det ble kjørt blanke prøver på samtlige separasjoner med SPE for å avdekke feilkilder; det ble ikke påvist falske topper. Aminopropyl- kolonnene var muligens påvirket av luftfuktighet – noe som endrer egenskapene til kolonnen. Det er viktig å tørke SPE kolonner som ikke er vakuum- pakket, for å fjerne eventuell fuktighet i kolonnen.

7. Videre arbeid

Naturlig kumelk består av 4,2 % fett, og blant disse er 98 % TAG (Månsson 2008). Mindre enn 2 % av melkefett er DAG, mens mindre enn 0,1 % er MAG. Palmitinsyre (C16: 0) og oljesyre (C18: 1) utgjør 30 og 23,8 % (w/ w) av total mengde fettsyrer (Månsson 2008). Myristinsyre (C14: 0) og stearinsyre (C16: 0) utgjør 11 og 12 % (w/ w).

I denne oppgaven separeres acylglyserol- standardene tristearin (18:0- 18:0- 18:0), dipalmitin (16:0- 0- 16:0) og monomyristin (14:0- 0- 0) med SPE. Acylglyserol- standardene som separeres er kun esterifiserte til mettede fettsyrer; det finnes ingen tidligere artikler som separerer disse lipidene med SPE. Tidligere artikler separerer kun acylglyseroler med mettede og umettede fettsyrer, eller andre lipidklasser.

Det er stor diversitet av TAG molekyler i melkefett, med ulike fettsyrer og forskjellig grad av polaritet (Månsson 2008). Melkefett TAG er syntetisert fra mer enn 400 forskjellige fettsyrer, og er den mest komplekse blandingen av naturlig fett som eksisterer. Mesteparten av fettsyrene finnes kun i spormengder, og kun 15 fettsyrer utgjør hver mer enn 1 % av den totale mengden (Månsson 2008).

Acylglyseroler i melk bør kanskje ikke separeres på samme vis som i denne oppgaven - fordi det er såpass små mengder av DAG og MAG i melkefett. Det er videre usannsynlig at alle TAG molekyler som finnes i melkefett kan elueres i samme fraksjon med SPE. Derfor er det bedre å vaske bort, eller eluere, de andre lipidklassene, slik at TAG fraksjonen sitter igjen på SPE kolonnen.

Denne oppgaven drøfter mange viktige problemstillinger som gjelder når nøytrale lipider i melkefett skal separeres. Metoden som presenteres i denne oppgaven vil sannsynligvis ikke gi en ren separasjon av MAG, DAG og TAG i et ekstrakt av melkefett. Metoden gir allikevel gode indikasjoner på prinsippene som gjelder når acylglyseroler esterifisert til mettede fettsyrer fra melk skal separeres med SPE. Det er et godt utgangspunkt for å jobbe videre med SPE og melkefett.

8. Referanseliste

- Agren, J., Julkunen, A. & Penttilä, I. (1992). Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *Journal of Lipid Research*, 33 (12): 1871-1876.
- Akoh, C. & Min, D. (2002). Structured lipids. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology* (Ed. 2): 877-908.
- Bernatek, E. R. (2009a). *Fett*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/fett> (lest 2/1/2014).
- Bernatek, E. R. (2009b). *Fettsyrer*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/fettsyrer> (lest 2/1/2014).
- Bodenec, J., Koul, O., Aguado, I., Brichon, G., Zwingelstein, G. & Portoukalian, J. (2000). A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *Journal of lipid research*, 41 (9): 1524-1531.
- Burdge, G. C., Wright, P., Jones, A. E. & Wootton, S. A. (2000). A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *British Journal of Nutrition*, 84 (5): 781-787.
- ChemicalBook. (2008). *Chemical Search Engine*: ChemicalBook. Tilgjengelig fra: <http://www.chemicalbook.com/> (lest 12/1/2014).
- Christie, W. W. & Han, X. (1982). *Lipid analysis*. Pergamon Press Oxford, b. 338.
- Christie, W. W. (1989a). *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. The Oily Press, Dundee, Scotland. Ayr. ix, 307 s. : fig. s.
- Christie, W. W. (1989b). Silver ion chromatography using solid-phase extraction columns packed with a bonded-sulfonic acid phase. *Journal of Lipid Research*, 30 (9): 1471-1473.
- Christie, W. W. (1992). *Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids*. The Oily Press, Dundee, Scotland. 1-18 s.
- Damodaran, S., Parkin, K. & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*. Taylor & Francis. Boca Raton. 1144 s. : ill. s.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. Wiley. Chichester, U.K. x, 539 s., ill 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 (4): 419-428.
- Dybvik, A. I., Falch, E. & Rustad, T. (2008). Solid phase extraction as a tool to separate lipid classes and study deterioration of marine lipids. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17 (1): 39-59.

- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671 (1): 113-131.
- Feltes, M. M. C., de Oliveira, D., Ninow, J. L. & de Oliveira, J. V. (2011). *An Overview of Enzyme-Catalyzed Reactions and Alternative Feedstock for Biodiesel Production*. InTech. Tilgjengelig fra: www.intechopen.com/download/pdf/17584 (lest 5/2/2014).
- Ferraz, T., Fiuza, M., Dos Santos, M., Pontes De Carvalho, L. & Soares, N. (2004). Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 58 (3): 187-193.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem*, 226 (1): 497-509.
- Fontanals, N., Marce, R. & Borrull, F. (2005). New hydrophilic materials for solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24 (5): 394-406.
- Giacometti, J., Milošević, A. & Milin, C. e. (2002). Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 976 (1-2): 47-54.
- Group, M. S. (2014). *Polarity Index*. Louisiana State University. Tilgjengelig fra: <http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm> (lest 17/1/2014).
- Hamilton, J. G. & Comai, K. (1988). Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica Sep-Pak columns. *Lipids*, 23 (12): 1146-1149.
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative chemical analysis*. Freeman. New York. XVII, 663, [136] s. : ill. s.
- Harrison, A. & Walker, D. (1998). Automated 96-well solid phase extraction for the determination of doramectin in cattle plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 16 (5): 777-783.
- Hart, H., Hart, D. J. & Craine, L. E. (2003). *Organic chemistry: a short course*. Houghton Mifflin. Boston. XXIV, 566 s. : ill. + 1 optisk plate (CD-ROM) s.
- Hennion, M.-C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856 (1-2): 3-54.
- Hopia, A. I., Piironen, V. I., Koivistoinen, P. E. & Hyvönen, L. E. (1992). Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69 (8): 772-776.
- Huang, Y., Ou, Q. & Yu, W. (1990). Characteristics of flame ionization detection for the quantitative analysis of complex organic mixtures. *Analytical Chemistry*, 62 (18): 2063-2064.
- Kaluzny, M. A., Duncan, L. A., Merritt, M. V. & Epps, D. E. (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, 26 (1): 135-40.

- Kim, H.-Y. & Salem, N. (1990). Separation of lipid classes by solid phase extraction. *Journal of Lipid Research*, 31 (12): 2285-2289.
- leksikon, S. n. (2009). *Lipider*. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/lipider> (lest 2/1/2014).
- Lindmark-Månsson, H. & Åkesson, B. (2001). Purification and immunochemical assay of bovine extracellular glutathione peroxidase. *International dairy journal*, 11 (8): 649-655.
- Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2005). *Biochemistry*. Addison-Wesley. San Francisco, Calif. XXVIII, 1186 s. : ill. + 1 plate (CD-ROM) s.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. Wiley. Hoboken, N.J. XXVI, 490 s. : ill. s.
- Mozaffarian, D. (2008). Commentary: Ruminant trans fatty acids and coronary heart disease—cause for concern? *International journal of epidemiology*, 37 (1): 182-184.
- Månsson, H. L. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food & nutrition research*, 52.
- Pacheco, Y., Perez-Camino, M., Cert, A., Montero, E. & Ruiz-Gutierrez, V. (1998). Determination of the molecular species composition of diacylglycerols in human adipose tissue by solid-phase extraction and gas chromatography on a polar phase. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 714 (2): 127-132.
- Pei, P. T., Henly, R. S. & Ramachandran, S. (1975). New application of high pressure reversed-phase liquid chromatography in lipids. *Lipids*, 10 (3): 152-156.
- Pérez-Camino, M., Moreda, W. & Cert, A. (1996). Determination of diacylglycerol isomers in vegetable oils by solid-phase extraction followed by gas chromatography on a polar phase. *Journal of Chromatography A*, 721 (2): 305-314.
- Perona, J. & Ruiz-Gutierrez, V. (2004). Analysis of neutral lipids: triacylglycerols. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 138 (1): 275.
- Perona, J. S. & Ruiz-Gutierrez, V. (2003). Simultaneous determination of molecular species of monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols in human very-low-density lipoproteins by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 785 (1): 89-99.
- Pinkart, H. C., Devereux, R. & Chapman, P. J. (1998). Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *Journal of microbiological methods*, 34 (1): 9-15.
- Plattner, R., Spencer, G. & Kleiman, R. (1977). Triglyceride separation by reverse phase high performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54 (11): 511-515.
- Poole, C. F., Gunatilleka, A. D. & Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885 (1): 17-39.
- Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (6): 362-373.

- Rizov, I. & Doulis, A. (2001). Separation of plant membrane lipids by multiple solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 922 (1): 347-354.
- Rossi, D. T. & Zhang, N. (2000). Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *Journal of Chromatography A*, 885 (1): 97-113.
- Ruiz-Gutiérrez, V. & Pérez-Camino, M. C. (2000). Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 885 (1-2): 321-341.
- Ruiz, J., Antequera, T., Andres, A., Petron, M. & Muriel, E. (2004). Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica chimica acta*, 520 (1): 201-205.
- Russell, J. M. & Werne, J. P. (2007). The use of solid phase extraction columns in fatty acid purification. *Organic geochemistry*, 38 (1): 48-51.
- Seppänen-Laakso, T., Laakso, I. & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465 (1): 39-62.
- Simoneau, C. & German, J. B. (1996). Contribution of triglycerides from cocoa butter to the physical properties of milkfat fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (8): 955-961.
- Stuff, S. (2013). *Chemicals*. Tilgjengelig fra: <http://www.sciencestuff.com/chemicals/> (lest 15/1/2014).
- Supelco. (1998). *Guide to Solid Phase Extraction*. Sigma- Aldrich Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (lest 15/1/2014).
- Table, C. P. (2014). *Definition of Solid-phase extraction (SPE)*. Tilgjengelig fra: http://www.chemicool.com/definition/solid_phase_extraction_spe.html (lest 15/1/2014).
- Valenzuela, R. & Valenzuela, A. (2013). *Overview About Lipid Structure*. InTech. Tilgjengelig fra: <http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/overview-about-lipid-structure> (lest 10/2/2014).
- WADA, S., KOIZUMI, C. & NONAKA, J. (1977). Analysis of triglycerides of soybean oil by high-performance liquid chromatography in combination with gas liquid chromatography. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 26 (2): 95-99.
- Zhao, Z. B., A. (2012). *Dynamic Headspace Gas Chromatography Analysis*. Connexions Web site. Tilgjengelig fra: <http://cnx.org/content/m34622/1.2/> (lest 12/2/2014).
- Żwir-Ferenc, A. & Biziuk, M. (2006). Solid phase extraction technique—trends, opportunities and applications. *Polish J Environ Stud*, 15 (5): 677-690.