

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

Masteroppgave 2016
60 stp

Fettsyreestere i toksiske skjell: fettsyreprofil, DTX-3-profil og optimalisering av hydrolyse

Fatty Acid Esters in Toxic Shellfish: Fatty Acid Profile,
DTX-3 Profile and Optimization of Hydrolysis

Stine Therese Aanrud

Kjemi

Forord

Denne oppgaven er et samarbeid mellom Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) og Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi (MatInf) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven utgjør 60 av 120 studiepoeng i en mastergrad, og arbeidet med oppgaven har vært utført i perioden januar 2015 til mai 2016.

Det praktiske arbeidet har vært utført ved forskningsgruppen for naturstoffkjemi og organisk analyse ved IKBM og ved Algelaboratoriet på MatInf, og er en oppgave innen fagområdet organisk analytisk kjemi. Arbeidet med oppgaven har vært spennende, morsomt og utfordrende, og har lært meg utrolig mye om ulike kromatografiske instrumenter og metodeutvikling. Jeg vil takke alle som har bidratt til at jeg fikk gjennomført denne oppgaven. Spesielt vil jeg takke:

Veilederen min ved IKBM, Dag Ekeberg, for hjelp med utarbeidelsen av oppgaven, for konstruktive tilbakemeldinger og støtte gjennom hele prosessen.

Veilederen min ved MatInf, John A. Aasen Bunæs, for opplæring innen algetoksiner og på LC-MS/MS og for at jeg fikk være en del av Algelaboratoriet.

Alle som jobber på Algelaboratoriet, for at jeg fikk være hos dere, forstyrre dere og diskutere med dere. En ekstra takk til Marit Spidsberg Paulsrud for at du alltid slipper det du har i hendene for å hjelpe meg, uansett hva det skulle være.

Lena Foseid og Hanne Devle, for opplæring på lab og GC-MS, og hjelp med skriveprosessen.

Siri Isaksen og Pia Victoria Aanrud for all støtte, peptalker, treningsøkter og sene, morsomme kvelder når jeg trenger å fokusere på noe annet, og Anja Ruud Winter, for at du vet hva jeg går gjennom, for at du alltid vet hva du skal si, for lange samtaler og kaffe, og for at du faktisk har lest hele oppgaven.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til min kjære samboer, Dennis J. Gøransson, for at du lager middag til jeg kommer hjem, for at du orker å høre om algetoksiner og fettsyrer, og for at du alltid er der for meg. Tusen takk for at du tåler meg på mitt verste, og gjør meg til mitt beste.

Oslo, 10. mai 2016

Stine Therese Aanrud

Sammendrag

Denne oppgaven studerte hvordan skjell kan danne fettsyreestere fra toksiner som forsvarsmekanisme. Likheter og forskjeller i fire arter ble vurdert ved å sammenligne dannelse av dinophysistoksin-3 (DTX-3) fra fettsyrer (FA), FA-profilen og konsentrasjon av okadasyre (OA-) gruppetoksiner. Kunnskap om toksiner i skalldyr langs den norske kysten er viktig for å forhindre potensielt skadelig inntak av giftige skalldyr.

For å få informasjon om dannelsen av DTX-3 ble analyser utført for å optimalisere hydrolysen og bestemme konsentrasjon av OA-gruppetoksiner ved bruk av LC-MS/MS. En metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner ble utviklet for LC-MS/MS og FA-profilen i skjellene ble funnet ved bruk av GC-MS. Analysene ble utført på 33 prøver av toksiske og ikke-toksiske blåskjell (*Mytilus edulis*), kamskjell (*Pecten maximus*), O-skjell (*Modiolus modiolus*) og stillehavsøsters (*Crassostrea gigas*).

En forbedret metode for hydrolyse ble utarbeidet, og består i å ha 150 μ L 4,0 M NaOH i H₂O i et polypropylen (PP-) rør med 1,2 mL skjellekstrakt. Prøvene settes i et 37 °C vannbad i 45 minutter og avkjøles i 20-30 minutter før hydrolysen avsluttes ved tilsetning av 150 μ L 4,25 M HCl i metanol. Selv om metoden er forbedret bør videre undersøkelser av temperatur og tid for hydrolyse utføres for å oppnå størst mulig grad av hydrolyse for OA-gruppetoksinene.

Metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner detekterte DTX-3-profil for ti prøver blåskjell. I tillegg ble ett DTX-3-toksin bestemt i 13 skjellprøver. Toksiner med fettsyreesterne C16:0, C16:1 og C18:1 var dominerende i alle DTX-3-profilene.

En fettsyreprofil for alle prøvene ble rapportert. De dominerende fettsyrene i alle artene var C16:0 (20 – 25%), C16:1 *cis* 9 (10 – 15%), C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 (10 – 20%) og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 (15 – 20%), med unntak av østers som inneholdt mindre enn 5% C16:1 *cis* 9 og O-skjell som inneholdt mindre enn 10% C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19.

Alle prøver har en større andel C16:0, C16:1 og C18:0 i DTX-3-profilen enn i FA-profilen. Det motsatte er tilfellet for C20:5 og C22:6. Dette indikerer at når DTX-3 dannes, skjer prosessen sannsynligvis ved forestring av medium korte, mettede FAr. Det er en høy andel lengre, umettede FAr skjellene, men disse blir i mindre grad benyttet til dannelse av DTX-3, noe som kan skyldes at DTX-3 med umettede FAr er mer giftig for skjellene (Yanagi *et al.*, 1989).

Summary

The aim of this thesis was to consider how shellfish produce fatty acid (FA) esters from toxins as a defense mechanism. Similarities and differences of four species of shellfish was considered by comparing the making of dinophysistoxin-3 (DTX-3) from FA, the FA profile and the concentration of ocaadaic acid (OA) group toxins. Knowledge of toxins in shellfish found along the Norwegian shore is crucial in order to circumvent potential harmful intake of toxic shellfish.

To discover information on the production of DTX-3, an optimization of the hydrolysis was done and the concentration of OA group toxins was determined by LC-MS/MS. An analytical method to examine the share of different DTX-3 toxins was developed for LC-MS/MS, and the profile of FA in shellfish was found using GC-MS. All analyses were performed on 33 samples of toxic and non-toxic blue mussels (*Mytilus edulis*), scallops (*Pecten maximus*), northern horsemussels (*Modiolus modiolus*) and pacific oysters (*Crassostrea gigas*).

An improved method for hydrolysis was developed, which consists of adding 150 μ L 4.0 M NaOH in H₂O to a polypropylene (PP-) plastic tube with 1,2 mL of shellfish extract. The sample was placed in a 37 °C water bath for 45 minutes, cooled for 20-30 minutes and then hydrolysis was stopped by adding 150 μ L 4.25 M HCl in methanol. Even though the method is improved, more testing of the optimal temperature and time for the hydrolysis is necessary to accomplish the highest degree of hydrolysis for the OA group toxins.

The method to determine different DTX-3 toxins resulted in a DTX-3 profile in ten samples of toxic blue mussels. In addition, one DTX-3 toxin was detected in 13 samples of shellfish. Toxins containing the FAs C16:0, C16:1 and C18:0 are most abundant in the DTX-3 profiles.

An FA profile of all samples was reported. The most abundant FAs in all species was C16:0 (20 – 25%), C16:1 *cis* 9 (10 – 15%), C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 (10 – 20%) and C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 (15 – 20%), except oysters which contained less than 5% C16:1 *cis* 9 and northern horsemussels which contained less than 10% C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19.

All samples show a higher share of C16:0, C16:1 and C18:0 in the DTX-3 profile than the FA profile. It is the other way around for C20:5 and C22:6. This indicates that when DTX-3 is created, the process often occurs by esterification with medium short, saturated FAs. Longer, more unsaturated FAs represent a high share of the FAs in shellfish, but they have a lower chance of being used for DTX-3 toxins, which may be because toxins containing unsaturated FA-esters are more toxic to the shellfish (Yanagi *et al.*, 1989).

Forkortelser

Følgende forkortelser er benyttet i oppgaven

ASP	Hukommelsestapforgiftning
AZA	Azaspiracid
CE	Kollisjonsenergi
CRM	Sertifisert referansemateriale
DA	Domoisyre
DC	Potensial
Δ EMV	Spenningsforskjell for elektronmultiplikatoren
DSP	Diarefremkallende skjellforgiftning
DTX-1	Dinophysistoksin-1
DTX-2	Dinophysistoksin-2
DTX-3	Dinophysistoksin-3
EI	Elektronioniseringskilde
ESI	Elektrospray ioniseringskilde
FA	Fettsyre
FAME	Fettsyremetyler
FFE	Fast-fase ekstraksjon
FID	Flammeionisasjonsdetektor
GC	Gasskromatografi
HCl	Hydrogenklorid
HPLC	Høy-ytelse væskeskromatografi
M	mol/L
MBA	Musebioassay
MeOH	Metanol
MRM	Multipel reaksjonsovervåking
MS	Massespektrometri
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NSP	Nevrotoksisk skjellforgiftning
OA	Okadasyre
PP	Polypropylen
PSP	Paralytisk skjellforgiftning
PTX	Pectenotoksin
rcf	Relativ sentrifugalkraft
RF	Elektrisk felt
RI	Refraksjonsindeks
RSD	Relativt standardavvik
SD	Standardavvik
STX	Saxitoksin
UV	Ultrafiolett
VVE	Væske-væske ekstraksjon
YTX	Yessotoksin

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Summary	III
Forkortelser	IV
Innholdsfortegnelse	V
1. Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn og mål for oppgaven	1
1.2 Helsefare ved å spise skjell	1
1.3 Opphav til DSP-toksiner	4
1.4 Tilsynsprogram.....	4
1.5 Okadasyregruppen	6
1.6 Dinophysistoksin-3.....	6
1.7 Toksiske grenseverdier	9
1.8 Ulik grad av forgiftning i blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers	9
1.9 Analysemetoder for fettløselige algetoksiner ved bruk av bioassay	11
1.10 Analyse av fettløselige toksiner ved LC-MS/MS.....	11
1.11 Uregelmessigheter ved kvantitativ bestemmelse av DTX-3	12
1.12 Analyse av ulike DTX-3-toksiner	12
1.13 Fettsyreprofil i skjell	12
2 Teori.....	15
2.1 Separasjon	15
2.1.1 Væske-væske ekstraksjon	15
2.1.2 Fast-fase ekstraksjon	16
2.1.3 Høy-ytelse væskerkromatografi	17
2.1.4 Gasskromatografi	18
2.2 Massespektrometri.....	18
2.2.1 Ionisering.....	19
2.2.2 Kvadrupol massefilter	20
2.2.3 Trippelkvadrupol	21
2.2.4 Multipel reaksjonsovervåking	21
2.2.5 Fotomultiplikator.....	21
2.3 Hydrolysereaksjon.....	22
2.4 Derivatisering av lipider	23

3	Ekspérimentelt	25
3.1	Oversikt over prøveopparbeidelse og analysemetoder	25
3.2	Utstyr	26
3.2.1	Forbruksmateriell	26
3.2.2	Kjemikalier	26
3.2.3	Referansestoffer	27
3.2.4	Annet utstyr	27
3.2.5	Prøvemateriale og blank	28
3.3	Tillaging av løsninger	29
3.3.1	Standarder og kalibreringsløsninger	29
3.3.2	Syrer og baser	30
3.3.3	Mobilfaser	31
3.3.4	Andre løsninger	32
3.4	Prøveopparbeidelse	32
3.4.1	Optimalisering av hydrolysetrinn	32
3.4.2	Metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner	33
3.4.3	Fettsyreprofil i skjell	34
3.5	Optimalisering av metode for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner	35
3.5.1	Valg av løsninger med NaOH og HCl	36
3.5.2	Optimalisering av [NaOH] og [HCl]	37
3.5.3	Optimalisering av [HCl] når [NaOH] er konstant	37
3.5.4	Optimalisering av temperatur og tid for hydrolyse	37
3.5.5	Optimalisering av tid for avkjøling før HCl tilsettes	38
3.5.6	Kontroll av muligheten for tap av metanol ved oppvarming	38
3.5.7	Holdbarhet for løsninger med NaOH og HCl	38
3.5.8	Endring i areal og retensjonstid	39
3.6	Kromatografiske metoder	39
3.6.1	Kromatografisk metode for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner	40
3.6.2	Kromatografisk metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner	41
3.6.3	Kromatografisk metode for bestemmelse av fettsyreprofil i skjell	43
4	Resultater og diskusjon	45
4.1	Optimalisering av hydrolyse for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner	45
4.1.1	Valg av løsninger med NaOH og HCl	45
4.1.2	Optimalisering av [NaOH] og [HCl]	46
4.1.3	Optimalisering av [HCl] når [NaOH] er konstant	47

4.1.4	Optimalisering av temperatur og tid for hydrolyse	48
4.1.5	Optimalisering av tid for avkjøling før HCl tilsettes.....	49
4.1.6	Kontroll av muligheten for tap av metanol ved oppvarming	51
4.1.7	Holdbarhet for løsninger av NaOH og HCl	51
4.1.8	Endring i areal og retensjonstid.....	53
4.1.9	Oppsummering: Optimal metode for kvantitativ bestemmelse av OA- gruppetoksiner	55
4.1.10	Problem med hydrolyse av DTX-3-toksiner	56
4.1.11	Kvantitativ analyse av OA, DTX-1, DTX-2 og DTX-3 i skjell.....	56
4.2	Metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner i skjellmateriale	64
4.2.1	Prøver med kun et toksin detektert.....	66
4.2.2	Prøver med DTX-3-profil.....	67
4.3	Fettsyrer i blåskjell, O-skjell, kamskjell og østers	71
4.3.1	Funn av fettsyrer.....	71
4.3.2	Tilpasninger og antagelser ved metoden	71
4.3.3	Sammenligning av fettsyreprofil i blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers	74
4.3.4	Toksiske og ikke-toksiske skjell fra samme art	76
4.3.5	Fettsyreprofil i ulike arter fra samme lokalitet.....	79
4.3.6	Endring i fettsyreprofil i blåskjell fra Flødevigen	81
4.4	Relasjon mellom arbeidene	83
4.4.1	Prøver med kun et DTX-3-toksine detektert.....	83
4.4.2	Prøver med DTX-3-profil.....	86
4.4.3	Forslag til forklaring på funn for dannelse av DTX-3.....	93
4.4.4	Konsentrasjonsbegrensninger for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner.....	94
5	Konklusjon.....	97
6	Videre arbeid.....	99
7	Referanser	101
8	Vedlegg.....	A
8.1	Vedlegg 1: Prøveoversikt	A
8.2	Vedlegg 2: Rådata for undersøkelse av hydrolyse	B
8.3	Vedlegg 3: Konsentrasjon av OA-gruppetoksiner	C
8.4	Vedlegg 4: DTX-3-profiler	E
8.5	Vedlegg 5: Fettsyreprofil for alle prøver.....	G

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn og mål for oppgaven

Algetoksiner kan gi mennesker matforgiftning gjennom ulike skjell, og denne masteroppgaven tar for seg en gruppe algetoksiner som heter okadasyre (OA-) gruppen. OA-gruppen er den vanligste årsaken til diaréfremkallende skjellforgiftning (DSP) i Norge. Oppgaven består av tre hoveddeler:

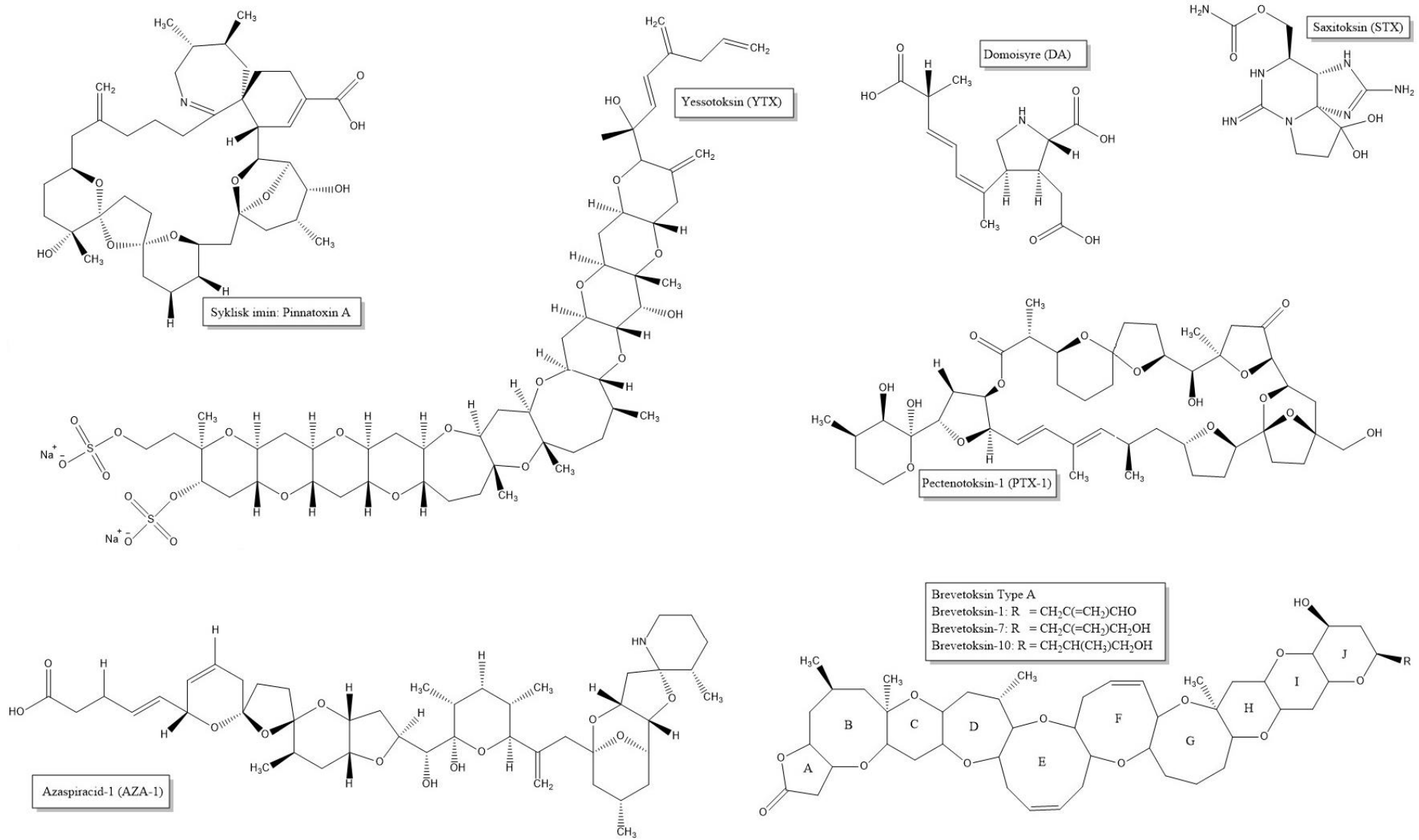
- 1) Optimalisering av hydrolyse i Algelaboratoriets metode, M-AL 10. Ved å studere mulige endringer i hydrolysen ble metoden for hydrolysen forbedret.
- 2) Videreutvikling av en metode for analyse av dinophysistoksin-3 (DTX-3) i skjell ved bruk av LC-MS/MS. Metoden ble benyttet til å finne en profil for DTX-3-toksiner med ulike fettsyrestere, og sammenlignet profilen i ulike skjell. Sammenligningen gav informasjon om dannelsen av DTX-3-toksiner over tid og i ulike arter.
- 3) Karakterisering av total fettsyre (FA-) profil til fire arter skjell: a) blåskjell (*Mytilus edulis*), b) kamskjell (*Pecten maximus*), c) O-skjell (*Modiolus modiolus*) og d) stillehavsøsters (*Crassostrea gigas*). Dette ble gjort ved bruk av GC-MS med en etablert metode for analyser av fettsyremetylestere (FAMEe). Målet med studiet var å finne likheter og forskjeller i fettsyreprofilen til de artene som allerede er analysert for toksiske fettsyrestere.

Resultatene fra de tre hoveddelene ble til slutt satt i sammenheng og det ble diskutert hvordan skjellene benytter dannelse av FA-estere som forsvarsmekanisme. Ved å vurdere de fire artene mot hverandre ble det mulig å oppdage forskjeller og likheter mellom dem. Analyse av prøver fra samme område over tid viste endringer i den toksiske profilen hos blåskjell. Ved å vurdere ulike aspekter ved analyse av DSP-toksiner, var målet med oppgaven å skaffe informasjon som forhindrer at mennesker forgiftes av DSP fra skjell i fremtiden.

1.2 Helsefare ved å spise skjell

Faren for å bli matforgiftet ved å spise blåskjell har vært kjent siden slutten av 1940-tallet (Hashimoto *et al.*, 1949). De ulike giftene har tidligere vært delt inn i grupper etter symptomene de gir ved forgiftning. Blant disse gruppene finnes DSP, hukommelsestapforgiftning (ASP –

Amnesic shellfish poisoning), nevrotoksisk skjellforgiftning (NSP) og paralytisk skjellforgiftning (PSP). En reklassifisering ga åtte grupper med gifter, delt inn etter kjemisk struktur. Disse er azaspiracid (AZA-), brevetoksin-, domoisyre (DA-), okadasyre (OA-), pectenotoksin (PTX-), saxitoksin (STX-), sykliske imin- og yessotoksin (YTX-) gruppene (EFSA, 2009a, 2009b; FAO/IOC/WHO, 2005). Eksempler på toksiner fra de ulike gruppene er vist i figur 1.1. At OA-gruppetoksiner er en av årsakene til at DSP forekommer i Europa har vært kjent siden midten av 1980-tallet (Kumagai *et al.*, 1986). OA-gruppen er vist i detalj i figur 1.2 fordi denne toksingruppen har vært hovedfokus for oppgaven.



Figur 1.1: Eksempler på toksiner fra syv av de åtte toksingruppene: azaspiracid-1 fra AZA-gruppen, brevetoksin type A fra brevetoksingruppen, domoisyre fra DA-gruppen, pectenotoksin-1 fra PTX-gruppen, saxitoksin fra STX-gruppen, pinnatoksin A fra sykliske imingruppen og yessotoksin fra YTX-gruppen.

1.3 Opphav til DSP-toksiner

Toksiner som fører til DSP kommer opprinnelig fra alger. Giftige skjell er et resultat av at skjellene filtrerer vannet for alger og får slik i seg toksiner fra AZA-, OA-, PTX-, og YTX-gruppene når algene er giftige (Yasumoto *et al.*, 1978). Toksiner som gir DSP er fettløselige, og akkumuleres i fett til bløtdyr på grunn av lav polaritet og høy molekylvekt (Fux *et al.*, 2009). Algetoksiner kan påvirke større organismer, som for eksempel Brunkrabbe (*Cancer pagurus*) (Torgersen *et al.*, 2008a) og mennesker, ved at de spiser toksiske skjell. Ulike arter reagerer forskjellig på de samme toksinene. DSP-toksinene gir symptomer som diaré og oppkast hos mennesker, men er ikke bevist å ha ført til dødsfall. De samme toksinene gir magekramper og død hos mus (Fernandez & Cembella, 1995).

En oppblomstring av alger som produserer forbindelser som er potensielt skadelige for fisk, dyr og mennesker kalles en skadelig algeoppblomstring (Anderson, 1989). I Norge produseres OA-gruppetoksinene av algene *Dinophysis acuta* og *Dinophysis Norvegica*, som begge er dinoflagellater (Lee *et al.*, 1989). En skadelig algeoppblomstring varierer i omfang og hvilken konsentrasjon som kan føre til fare for mennesker (Van Egmond *et al.*, 2004; Zingone & Enevoldsen, 2000). En manglende syklus på oppblomstring av giftige alger gjør kontroll av skjell ekstra viktig, da flere typer skjell er lett tilgjengelig nær land, og befinner seg langs hele den norske kystlinjen. Det er viktig å analysere blåskjell og andre bløtdyr for disse giftene, slik at ingen mennesker kommer til skade (EFSA, 2009c).

1.4 Tilsynsprogram

Mattilsynet startet et tilsynsprogram for skjell i 2006. Dette var en videreføring av overvåkingen av blåskjell som Statens næringsmiddeltilsyn startet opp i 1988. Tilsynsprogrammet har per 2016 30 helårlige kontrollsteder, og 9 kontrollsteder som sjekkes kun i sommerhalvåret, da det plukkes og spises mest blåskjell i denne perioden. Kontrollstedene er listet opp i Tabell 1.1, med sommerlokaliteter merket med understrek. Lokalitetene er valgt ut fordi de er typiske populære sankesteder for blåskjell. Ved kontrollstedene tas både vannprøver, som testes for giftproduserende alger, og skjellprøver, som analyseres for toksinkonsentrasjoner. Skjelldyrkere som vil omsette sine skjell har krav fra Mattilsynet om toksinanalyse av skjellene før skjellene kan høstes (Mattilsynet, 2015). Analyse av toksiner i skjell utføres på Algelaboratoriet ved Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi (MatInf)

ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Algelaboratoriet mottar i underkant av 1000 prøver i året, både fra Mattilsynet og fra private skjelldyrkere.

Tabell 1.1: Oversikt over kontrollsteder for Mattilsynets Tilsynsprogram for skjell. Sommerlokaliteter er merket med understrek. Kilde: Mattilsynet (2015)

Landsdel	Område	Tettsted	Målested
Stor-Oslo	Østfold og Follo	Hvaler	Utgårdskilen
Stor-Oslo	Østfold og Follo	Fredrikstad	<u>Engelsvik</u>
Stor-Oslo	Oslo, Asker og Børum	Asker	Vollen
Øst-Norge	Vestfold	Tønsberg	Vallø
Øst-Norge	Vestfold	Larvik	<u>Ødegårdsbukta i Viksfjorden</u>
Øst-Norge	Telemark	Kragerø	<u>Saltneven</u>
Sør og Vest-Norge	Agder	Risør	Finnøysundet
Sør og Vest-Norge	Agder	Arendal	Flødevigen
Sør og Vest-Norge	Agder	Kristiansand	Flekkerøy
Sør og Vest-Norge	Sør-Rogaland	Egersund	<u>Nordasund</u>
Sør og Vest-Norge	Sør-Rogaland	Viganeset	Forsand, Blåskjell
Sør og Vest-Norge	Sør-Rogaland	Viganeset	Forsand, Ville O-skjell
Sør og Vest-Norge	Sør-Rogaland	Kvitsøy	Buøyflæet
Sør og Vest-Norge	Sør-Rogaland	Kvitsøy	Fluarholmen, Kamskjell
Sør og Vest-Norge	Sør-Rogaland	Stavanger	Kalvøysundet
Sør og Vest-Norge	Haugalandet	Sveio	Trettøy, Østers
Sør og Vest-Norge	Hardanger og Sunnhordland	Bømlo	Rogøysund
Sør og Vest-Norge	Bergen og omland	Øygarden	Ulvsundet
Sør og Vest-Norge	Sunnfjord og Sogn	Fjaler	Bortheim
Sør og Vest-Norge	Sunnfjord og Sogn	Fjaler	Gjeldet
Midt-Norge	Sunnmøre	Skodje	<u>Mørkesetsundet</u>
Midt-Norge	Nordmøre og Romsdal	Molde	Cap Clara
Midt-Norge	Trondheim og Omland	Hitra	Fillan (Valen)
Midt-Norge	Innherred og Fosen	Rissa	Straumen
Midt-Norge	Innherred og Fosen	Åfjord	Oldøya
Midt-Norge	Innherred og Fosen	Åfjord	Oldøya Nord
Midt-Norge	Innherred og Fosen	Åfjord	Kjørem
Midt-Norge	Innherred og Fosen	Åfjord	Hommelvika
Midt-Norge	Innherred og Fosen	Åfjord	Råned/Mindebukta
Midt-Norge	Innherred og Fosen	Åfjord	Askerholmen
Midt-Norge	Sør-Innherred	Levanger	<u>Skånestangen</u>
Midt-Norge	Namdal	Fosnes	Urdvika
Midt-Norge	Namdal	Fosnes	Djupvika
Nord-Norge	Helgeland	Bindal	Jupvika
Nord-Norge	Salten	Bodø	<u>Kobbvika</u>
Nord-Norge	Midtre Hålogaland	Vestvågøy	<u>Valbergene</u>
Nord-Norge	Midtre Hålogaland	Bø i Nordland	<u>Møkland</u>
Nord-Norge	Troms og Svalbard	Tromsø	Havbruksstasjonen Skulgambukt
Nord-Norge	Troms og Svalbard	Nordreisa	Kjempebakken

1.5 Okadasyregruppen

Okadasyre (OA-) gruppen består av toksinet okadasyre, og flere av syrens strukturelle analoger, der de to viktigste er dinophysistoksin-1 og -2, også kalt DTX-1 og DTX-2. OA-gruppetoksinene er avbildet i figur 1.2. Forgiftning fra OA-gruppen gir mennesker symptomer som diaré og oppkast, og hørte derfor tidligere inn under gruppen toksiner som gir DSP (Yasumoto *et al.*, 1978). OA-gruppen har vist seg å kunne hindre proteinfosfatase, og kan føre til at muskler trekker seg sammen. Det er antatt at det er dette som fører til magekramper og de andre symptomene ved forgiftning av OA-gruppen (Fernandez & Cembella, 1995; Takai *et al.*, 1987; Takai, 1988).

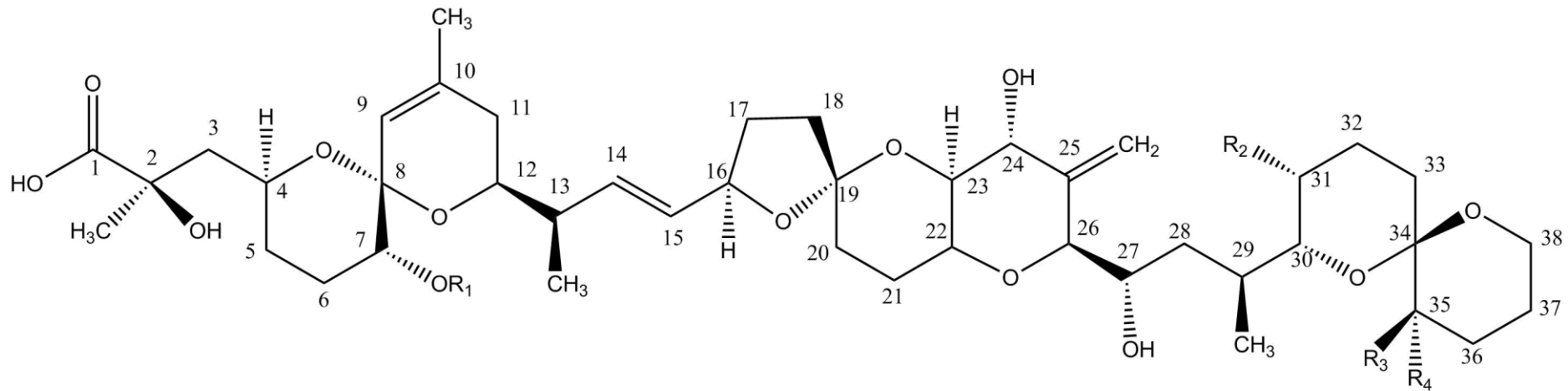
1.6 Dinophysistoksin-3

En nyere og mindre studert del av OA-gruppen er den gruppen stoffer som kalles dinophysistoksin-3 (DTX-3) (Yasumoto *et al.*, 1985). DTX-3 er ifølge Van Egmond *et al.* (2004) en samlebetegnelse for OA-gifter som har en fettsyreester i R₁-posisjonen, se figur 1.2, og kan bestå av strukturelle analoger av både OA, DTX-1 og DTX-2. Hydrogenet til OH-gruppen ved 7. posisjon er byttet ut med en fettsyre, slik at det dannes en fettsyreester. Fettsyreesteren kan være både mettet og umettet, og kan variere fra 12 til 24 karbonatomer i lengde. Det er ikke funnet noen former av DTX-3 i dinoflagellatene som produserer de andre OA-gruppetoksinene. Den ledende teorien er at skjellene selv produserer DTX-3 fra OA, DTX-1 og DTX-2 (Lee *et al.*, 1989). Det er foreslått at skjellene gjør dette som en forsvarsmekanisme, da endringer i strukturen til toksinene fører til mindre hindring hos proteinfosfataser (Takai *et al.*, 1992), og lavere grad av toksistet. Kinetikken bak produksjonen har blitt studert i kamskjell, og det ble bevist at skjellene kan produsere DTX-3 fra de andre toksinene i OA-gruppen (Suzuki *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2005; Vale & Sampayo, 2002).

Når de ulike DTX-3-toksinene skal skilles fra hverandre senere i oppgaven vil fettsyreesteren oppgis med toksinet det stammer fra, deretter lengden på karbonkjeden og antall dobbeltbindinger i fettsyren. For eksempel forkortes 7-O palmitinacyl dinophysistoksin-1 til DTX-1 C16:0 fordi fettsyreesteren består av en mettet hydrokarbonkjede med 16 karboner og det er dannet fra toksinet DTX-1.

Det er ikke bare OA, DTX-1 og DTX-2 som er giftig, mennesker får symptomer på DSP når de utsettes for DTX-3 (García *et al.*, 2005). Det er vist at DTX-3 kan være mindre giftig enn OA, DTX-1 og DTX-2. Et forsøk utført med mus i Japan viste at den dødelige dosen for OA C16:0

krever 30 ganger høyere toksinkonsentrasjon i forhold til OA (Yanagi *et al.*, 1989). Det samme forsøket viste at den dødelige dosen for mus ble mindre når graden av umettethet i fettsyren økte. Det ble senere bevist at 7-O-acylsterbindingen i DTX-3 kan brytes ned hos mennesker, og en forsinket forgiftning forekommer når fettsyreesterne brytes ned til OA, DTX-1 eller DTX-2 (García *et al.*, 2005). Det er derfor viktig å kunne analysere konsentrasjonen av DTX-3 i en prøve, for å oppnå en god oversikt over toksinnivået i skjell, og faren dette innebærer for mennesker.



Toksin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
OA	H	CH ₃	H	H
DTX-1	H	CH ₃	CH ₃	H
DTX-2	H	H	H	CH ₃
DTX-3 fra OA	Fettsyre	CH ₃	H	H
DTX-3 fra DTX-1	Fettsyre	CH ₃	CH ₃	H
DTX-3 fra DTX-2	Fettsyre	CH ₃	H	CH ₃

Figur 1.2: Okadasyregruppens struktur. Med en 7-O-acyl ester i R₁ dannes det DTX-3 fra toksinene OA, DTX-1 og DTX-2. Forskjellige DTX-3-toksiner kan dannes, avhengig av lengde og grad av metning hos fettsyren som bindes i R₁.

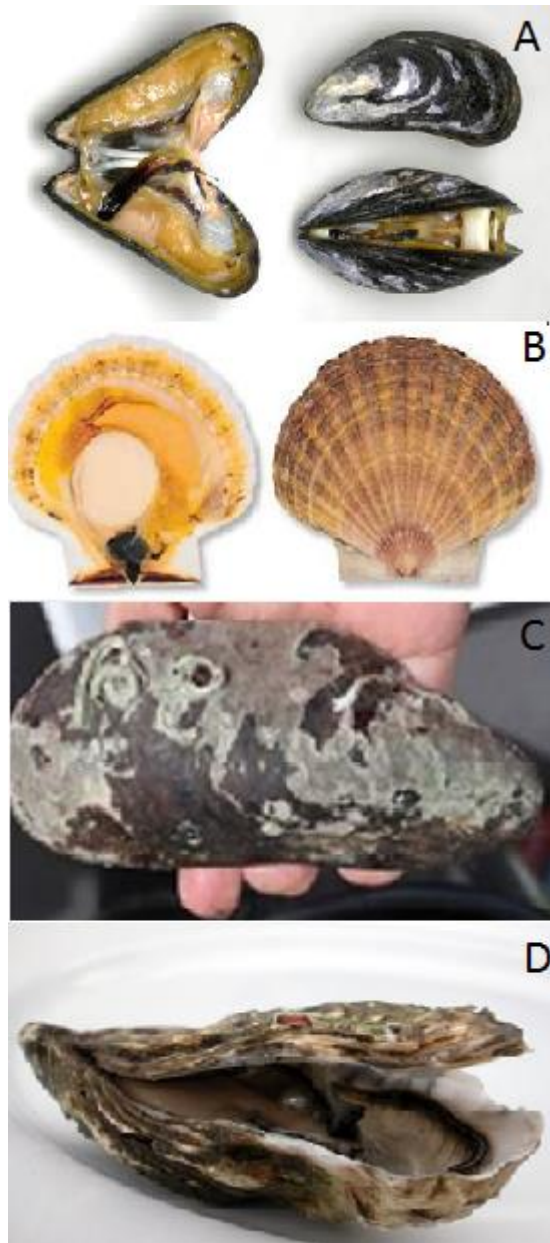
1.7 Toksiske grenseverdier

Forslag til grenseverdi for hvilken konsentrasjon av OA-toksiner i skjell som er farlig for mennesker har endret seg over de siste tiårene. Yasumoto *et al.* (1985) skrev at DTX-1 ga DSP-symptomer ved inntak av 32 µg toksin/kg kroppsvekt hos et voksent menneske. Toyofuku (2006) skriver at nedre grense for symptomer for forgiftning er 1,0 – 1,6 µg toksin/kg kroppsvekt til den som forgiftes. I Norge er det de felles bestemmelsene fra EU som følges, og EU (2004) setter øvre grense for fettløselige toksiner til 160 µg OA-ekvivalent/kg skjellmat, og benytter en sikkerhetsmargin på ti ganger konsentrasjonen som gir symptomer på forgiftning. En OA-ekvivalent tar hensyn til at DTX-2 har en toksisitet som er 0,6 ganger toksisiteten til OA (Aune *et al.*, 2007). Et DTX-3-toksin ansees som like giftig for mennesker som det toksinet det stammer fra. Konsentrasjoner av DTX-3 fra OA og DTX-1 ganges med 1,0 og konsentrasjoner av DTX-3 fra DTX-2 ganges med 0,6 for å bestemme konsentrasjonen i OA-ekvivalent.

1.8 Ulik grad av forgiftning i blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers

Blåskjell (*Mytilus edulis*, figur 1.3A) er en musling som lever i blant annet norske farvann, og selges kommersielt eller plukkes direkte av forbrukerne. Kamskjell (*Pecten maximus*, figur 1.3B) er en annen type musling, hvor lukkemuskelen selges som en delikatesse. O-skjell (*Modiolus modiolus*, figur 1.3C) er veldig like blåskjell, men større, og er spiselig i likhet med blåskjellene. Stillehavsøsters (*Crassostrea gigas*, figur 1.3D), videre kalt østers, er en robust art av østers som har spredd seg til nordiske farvann det siste tiåret. Disse fire bløtdyrartene er alle i fare for å bli påvirket av algetoksiner, og kontrolleres derfor på Algelaboratoriet. Konsentrasjonen av toksiner er vanligvis høyest i leveren til dyret (Suzuki *et al.*, 2005). Selv om kun andre deler av skjellet benyttes i matlagning analyseres hele innholdet i skjellet. Dette for å sikre at også skjell benyttet på andre måter enn normalt er trygt, som for eksempel ved koking av kraft.

Forskjellige skjell kan påvirkes ulikt av de samme algetoksinene. Graden av toksinopptak og nedbrytning kan være forskjellig for de ulike artene. Blåskjell blir i stor grad påvirket av algeoppblomstringer (Fux *et al.*, 2009). Toksinene blir lett tatt opp i blåskjellene, og det kan ta lang tid for skjellene å bli kvitt høye toksinnivåer (Lindegarh *et al.*, 2009). Det er lite informasjon om hvordan O-skjell spesifikt påvirkes av toksiner eller i hvilken grad de skiller seg fra blåskjell. Det er gjort flere studier som sammenligner toksisiteten i blåskjell, kamskjell og østers. Yasumoto *et al.* (1978) fant at blåskjell ble mest toksisk av de tre artene, deretter



Figur 1.3: Bilde av de fire artene som analyseres i oppgaven. A) blåskjell, B) kamskjell, C) O-skjell og D) østers. Figur satt sammen av bilder fra: Flåten (2012); iStockPhoto (2016); NDLA (2016) og Zenz (2016).

kamskjell, mens østers bare ble svakt toksiske, ved tilgang på samme konsentrasjon og type alger. Når disse forsøkene ble utført var ikke faren ved DTX-3 kjent, og kun OA, DTX-1 og DTX-2 ble vurdert. Resultatene stemmer likevel godt overens med konklusjonen fra Bauder *et al.* (2001), som fant at kamskjell i større grad kan forhindre akkumulering av DSP-toksiner, i tillegg til at toksinene ikke bindes så lett til fettvevet. Kamskjellene har også en mer effektiv mekanisme for å rense ut giften ved tilgang på annen mat, sett i forhold til blåskjell. Det ble i mange år antatt at østers ikke kan påvirkes av algetoksiner slik at det blir farlig for mennesker, men dette har senere vist seg å ikke stemme (Shumway *et al.*, 1990).

Fire studier som vurderer to av de tre artene blåskjell, kamskjell og østers mot hverandre, som også vurderer DTX-3, er Suzuki og Mitsuya (2001), Madigan *et al.* (2006), Torgersen *et al.* (2008c) og Lindegarth *et al.* (2009). De fire studiene benytter ulike ekstraksjonsmetoder, og vurderer DTX-3 ved å hydrolysere skjellmateriale. Torgersen *et al.* (2008c) analyserer de samme prøvene ved bruk av LC-MS/MS. Konklusjonen fra disse undersøkelsene er at blåskjell i størst grad blir påvirket av DSP-toksiner, østers påvirkes i mindre grad enn

blåskjell, og kamskjell påvirkes minst av de tre artene. Blåskjell er også den arten som danner lavest andel fettsyrestere. Østers og kamskjell inneholder en større andel DTX-3 enn det blåskjell gjør, og østers bruker kortere tid på å skille ut toksinene enn det blåskjell gjør. De ulike ekstraksjonsmetodene benyttet i forsøkene er ikke alle tilpasset ekstraksjon av fettsyrestere, men heller ekstraksjon av de andre OA-gruppetoksiner, og dette kan ha hatt påvirkning på

resultatene. Det har ikke lyktes forfatteren å finne en artikkel som sammenligner OA-gruppetoksiner, og deres fettsyrestere i de tre artene blåskjell, kamskjell og østers.

1.9 Analysemetoder for fettløselige algetoksiner ved bruk av bioassay

En metode som benytter levende dyr, planter eller celler til å måle en form for biologisk aktivitet kalles bioassay. Mus har vært benyttet som kontroll av blåskjell siden de første undersøkelsene av algetoksiner med bioassay i 1937 (Fernandez & Cembella, 1995). Musebioassay (MBA) for deteksjon av marine algetoksiner begynte som en metode for kontroll av vannløselige gifter som PSP, men ble i 1978 brukt for nye grupper toksiner som var fettløselige (Yasumoto *et al.*, 1978). MBA har veldig lav spesifisitet, og det har vist seg at metoden innebærer fare for falsk positiv bekreftelse av DSP-toksiner, fordi frie fettsyrer er dødelig for mus (Suzuki *et al.*, 1996). Likevel har MBA i lang tid vært den foretrukne metoden for analyse av DSP (EU, 2005; Fernandez & Cembella, 1995; Lawrence *et al.*, 2011; Van Egmond *et al.*, 2004). I 2011 ble en metode som benytter LC-MS/MS oppgitt som foretrukken referansemetode (EU, 2011). Før dette måtte alle blåskjellprøver kontrolleres med MBA for å kunne godkjennes av EUs referanselaboratorium for Marine Biotoksiner (EU-RL-MB). Bruk av MBA er ikke bare uheldig på grunn av de farene ved metoden som er nevnt over, men av etiske hensyn bør man unngå unødvendig eller overdreven bruk av forsøksdyr. I Norge benyttes ikke MBA til analyse av skjell for kommersiell omsetning. Det benyttes kun et lite antall i overvåkning av ukjente toksiner i det offisielle overvåkningsprogrammet. For å opprettholde denne positive trenden, hvor MBA kan benyttes i mindre grad enn før, er det viktig å utvikle nye og bedre metoder for analyse av blåskjellgifter.

1.10 Analyse av fettløselige toksiner ved LC-MS/MS

Algelaboratoriet ved NMBU bruker metoden M-AL 10 (NMBU, 2013) til analyse av DSP-toksiner. Metoden er basert på Van den Top *et al.* (2011) og EU-RL-MB (2011), og analyserer alle de fettløselige toksinene som må kontrolleres i henhold til EU-direktiver. Dette innebærer analyse av toksiner fra gruppene AZA, OA, PTX og YTX. OA-gruppetoksinene krever et ekstra hydrolysetrinn for å kunne analysere konsentrasjonen av DTX-3. Ved analyse på LC-MS/MS av uhydrolysert skjellmateriale bestemmes konsentrasjonen til de tre toksinene OA, DTX-1 og DTX-2. Analyse av hydrolysert skjellmateriale finner den samlede konsentrasjonen av for eksempel OA og DTX-3 fra OA. Konsentrasjonen av OA i en uhydrolysert prøve trekkes fra

konsentrasjonen av OA i den samme prøven etter hydrolyse, og slik kan konsentrasjonen av DTX-3 fra OA bestemmes. OA, DTX-1 og DTX-2 kan separeres med LC-MS/MS og bestemmelsen av toksinkonsentrasjon før og etter hydrolyse gjøres for hvert toksin separat. Resultatet for total konsentrasjon av OA, DTX-1, DTX-2 og DTX-3 omregnes til OA-ekvivalent og oppgis i µg toksin/kg skjellmat. Metoden benyttes til å bestemme konsentrasjonen av de ulike DTX-3-toksinene, men rapporterer kun den totale toksisiteten fra alle toksiner med samme virkningsmekanisme.

1.11 Uregelmessigheter ved kvantitativ bestemmelse av DTX-3

Algelaboratoriet har ved enkelte tilfeller opplevd uregelmessigheter i resultatene sine når konsentrasjonen av DTX-3 skal bestemmes ved hydrolyse av skjellmateriale. Noen ganger har konsentrasjonen i en hydrolysert prøve blitt lavere enn konsentrasjonen i den samme prøven før hydrolyse, uten at det er noen klar årsak til dette. Fenomenet forekommer også med kontrollprøven som analyseres hver uke. Dette vitner om en ukjent svakhet i metoden og Algelaboratoriet ønsket på bakgrunn av dette en optimalisering av hydrolysen.

1.12 Analyse av ulike DTX-3-toksiner

Det er gjort flere forsøk på å finne metoder for å analysere de ulike DTX-3-toksinene, blant annet av Vale (2006, 2010) og Torgersen (2008). Det ble funnet mest DTX-3-toksiner med fettsyreesteren C16:0. Funn fra artiklene vil diskuteres opp mot funn av DTX-3-toksiner i denne oppgaven. Etter hvert som virkningen og giftigheten til de ulike DTX-3-toksinene blir mer kjent, kan det bli behov for en metode som raskt og effektivt kan bestemme forhold mellom, eller konsentrasjonen av, de ulike giftige fettsyreesterne. Svensson og Forlin (2004) studerte sammenhengen mellom lipidinnhold og konsentrasjon av OA-gruppetoksiner i skjell, og fant at når konsentrasjonen av toksiner gikk ned, gikk også lipidinnholdet ned.

1.13 Fettsyreprofil i skjell

Fettsyreprofilen til blåskjell, kamskjell og østers har vært studert tidligere (Abad *et al.*, 1995; Caers *et al.*, 1999; Passi *et al.*, 2002; Zandee *et al.*, 1980), enten ved GC-MS eller GC-FID. Ingen av disse undersøkelsene er sett i sammenheng med om skjellene er utsatt for skjellforgiftning eller ikke. Det har heller ikke lyktes forfatteren å finne tilgjengelig

informasjon om fettsyreprofilen til O-skjell. De tre mest fremtredende fettsyrene i blåskjell, kamskjell og østers er C16:0, C20:5 og C22:6. Andelen av disse fettsyrene kan variere mellom art og innad i en art fra ulike områder. Andre viktige fettsyrer er C16:1 og C18:0 for blåskjell, C16:4, C18:1, C18:4 og C20:1 for østers, og C16:1, C18:0 og C18:1 for kamskjell (Abad *et al.*, 1995; Caers *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003; Napolitano *et al.*, 1992; Passi *et al.*, 2002; Zandee *et al.*, 1980). Passi *et al.* (2002) sammenligner fettsyreprofilen til blant annet blåskjell og østers, og fant at blåskjell inneholder en større andel av C20:5 og C22:6 enn østers. Andelen C16:0 i begge artene er lik, men østers inneholder større andeler C18:1.

2 Teori

2.1 Separasjon

Separasjon er et viktig begrep innen faget analytisk kjemi, fordi det ofte er behov for å skille ulike komponenter i en blanding. For å kunne bestemme forskjellige stoffer kvalitativt og kvantitativt kan diverse former for separasjon benyttes. Felles for alle kjemiske separasjoner er at det benyttes minimum to faser, og stoffenes affinitet til fasene fører til separasjon (Miller, 2005). Polaritet er en viktig faktor for separasjon av stoffer og ulik polaritet i de to fasene kan være like viktig som ulik polaritet hos stoffene som skal separeres. Prinsippet om separasjon benyttes både i prøveopparbeidelse og analyse i denne oppgaven.

Kromatografi er et separasjonssystem med en stillestående stasjonærfase, og en mobilfase som skal forflytte analytten forbi stasjonærfasen. Kromatografi som separasjonsteknikk skiller seg fra andre separasjonsteknikker ved at stoffene som separeres danner nye likevekter mellom mobilfasen og stasjonærfasen samtidig som de hele tiden forflytter seg fremover i mobilfasen. Kromatografi deles inn etter hvilken type stasjonærfase eller type mobilfase som benyttes. I denne oppgaven benyttes høy-ytelse væskechromatografi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) og gasskromatografi (GC). Andre separasjonsteknikker som benyttes er væske-væske ekstraksjon (VVE) og fast-fase ekstraksjon (FFE).

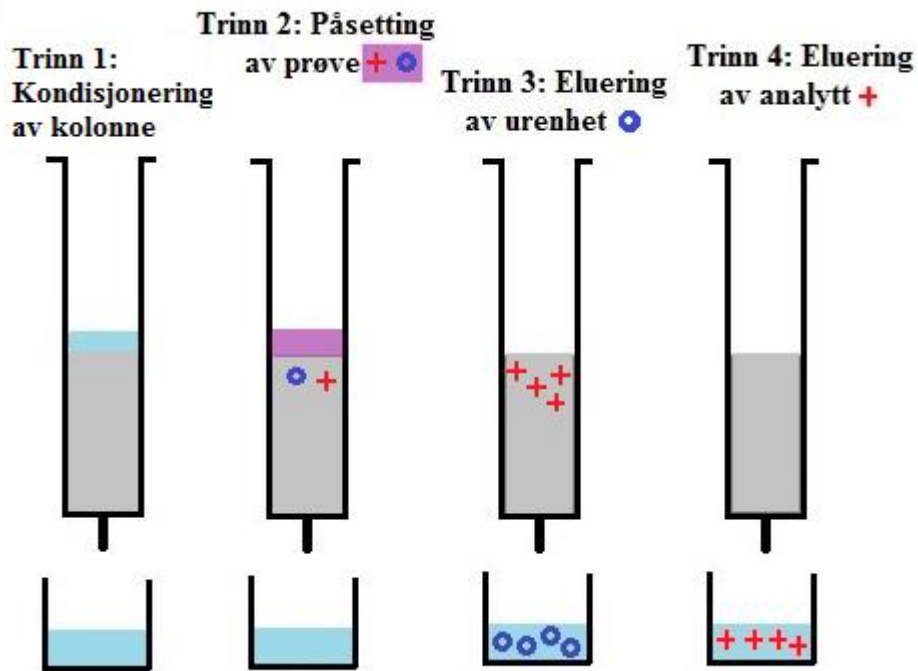
2.1.1 Væske-væske ekstraksjon

En metode som kan isolere ønskede analytter fra uønskede stoffer er VVE. Ekstraksjonen utføres ved bruk av to faser som begge er væsker. De to fasene kalles den vandige fasen, og den organiske fasen, og de må være uløselige i hverandre (Harwood *et al.*, 1999). Prøven som skal ekstraheres tilsettes først i én av væskene, for eksempel i den polare, vandige fasen. Deretter tilsettes den mer upolare, organiske fasen. Ved å blande væskene vil separasjon av prøven forekomme. Deretter skilles fasene fra hverandre, ved hjelp av for eksempel sentrifugering. Enkelte stoffer løses best i den vandige fase, mens andre stoffer løses bedre i den organiske fasen. Den fasen analytten befinner seg i kalles ekstraksjonsmiddel (Miller, 2005). Ekstraksjonsmiddelet med analytten overføres til en ny beholder. Det er vanlig å ekstrahere den gjenværende væsken med flere volum ekstraksjonsmiddel for å ekstrahere større mengder analytt, og samle ekstraktene til slutt (Harwood *et al.*, 1999). Å bruke ekstraksjonsmiddelet til å ekstrahere analytten er kun en av mulighetene ved VVE. En annen mulighet er å vaske

gjentatte ganger med et ekstraksjonsmiddel som ekstraherer urenheter, men lar analytten forbli løst i den første væsken. Valg av de to væskene påvirker hvilke analytter som kan separeres ut i hvilken fase.

2.1.2 Fast-fase ekstraksjon

En ekstraksjonsmetode med én fase av fast stoff, stasjonærfasen, og én fase bestående av en eller flere løsningsmidler kalles FFE. En FFE starter med at stasjonærfasen kondisjoneres og aktiveres med et egnet løsemiddel, før en prøve appliseres. Enkelte komponenter absorberes på stasjonærfasen, mens andre føres gjennom stasjonærfasen og ut i løsning. Hvilke stoffer som blir igjen, og hvilke som elueres ut er avhengig av egenskapene til stasjonærfasen, eluenten og til komponentene i prøven. Ved å benytte forskjellige eluenter tilpasset bestanddelene i prøven kan svært like komponenter trekkes gjennom stasjonærfasen til ulik tid. Figur 2.1 viser et eksempel på de ulike elueringstrinnene. Det er flere måter å bruke FFE på, for eksempel kan urenheter vaskes ut før ønsket analytt elueres, urenheter kan absorberes på stasjonærfasen og analytten elueres med én gang, eller en kombinasjon av disse (Miller, 2005). FFE er en god metode for å separere ulike stoffer fra en prøve, men denne spesifisiteten går på bekostning av tidsbruk og behov for å tilpasse metoden for de enkelte analyttene som skal isoleres.

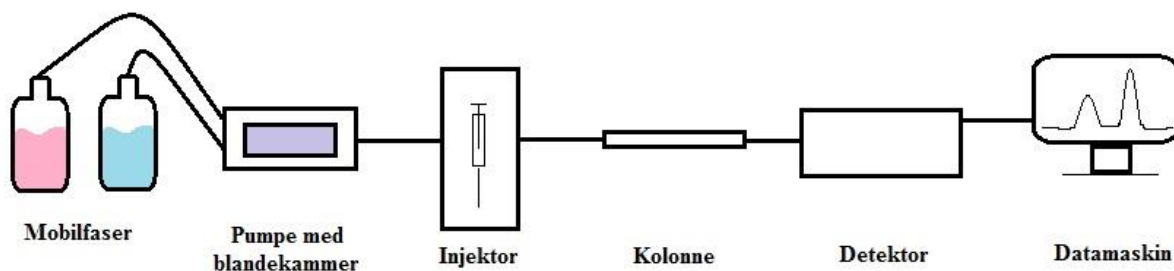


Figur 2.1: Eksempel på prosedyre for FFE med fire trinn. Blå ring er uønskede stoffer, og røde kryss er analytt.

2.1.3 Høy-ytelse væskerkromatografi

Kromatografi der mobilfasen består av én eller flere væsker kalles HPLC. Et typisk HPLC-system består av mobilfasereservoarer, pumper, injektor, en kolonne for separasjon og en detektor, se figur 2.2. Det benyttes en kolonne pakket med stasjonærfase. Normalfasekromatografi er HPLC med en polar stasjonærfase og upolar mobilfase. En upolar stasjonærfase med polar mobilfase gir omvendtfasekromatografi (Miller, 2005).

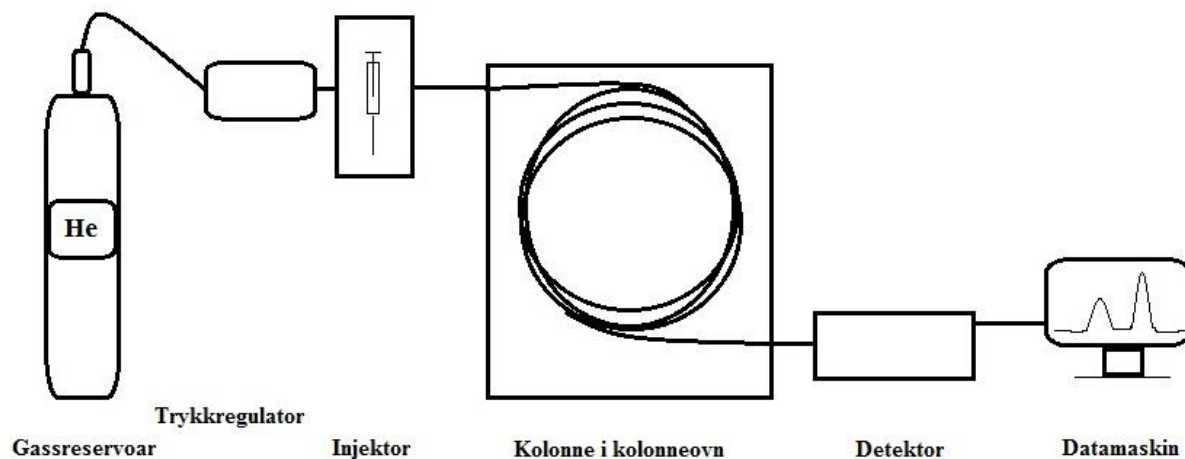
En pumpe trekker mobilfasen gjennom kolonnen og har ofte et blandekammer som gir muligheten for en gradient av flere mobilfaser. Det gir mulighet for separasjon av veldig like analytter. En automatisk injektor påsetter en prøve på kolonnen. Prøven vil separeres i sine enkeltkomponenter på vei gjennom kolonnen. En detektor leser av signalet til prøven og sender informasjonen til en datamaskin. Vanlige teknikker som benyttes i detektorer er UV, refraksjonsindeks (RI) og massespektrometri (MS). En god HPLC-metode har kolonne og mobilfase som er tilpasset prøven som injiseres og analyttene som skal bestemmes. Hvilke stoffer som kan analyseres på en HPLC avgjøres av detektoren som benyttes, men alle prøver som er væske, eller kan løses i en væske har potensiale til å separeres med HPLC.



Figur 2.2: Grafisk fremstilling av et væskerkromatografisk system med to mobilfaser og blandekammer.

2.1.4 Gasskromatografi

For GC er mobilfasen en gass, og systemet består av et gassreservoar, trykkregulator, injektor, en kolonne i en ovn og detektor, se figur 2.3. De vanligste mobilfasene er nitrogen, helium eller hydrogen. GC skiller seg fra HPLC ved at mobilfasen kun skal forflytte analytten gjennom kolonnen, uten at analytten må løses i mobilfasen (Harwood *et al.*, 1999). Mobilfasen trenger derfor ikke tilpasses hva som skal analyseres i samme grad som for HPLC. Ulikt kokepunkt for analytter og retensjon til kolonnen fører til den største graden av separasjon i prøven. Gasskromatografi kan analysere analytter som er flyktige under 300 °C (Snyder *et al.*, 2010). Vanlige detektorer for GC er flammeionisasjonsdetektor (FID) og MS.



Figur 2.3: Grafisk fremstilling av et gasskromatografisk system.

2.2 Massespektrometri

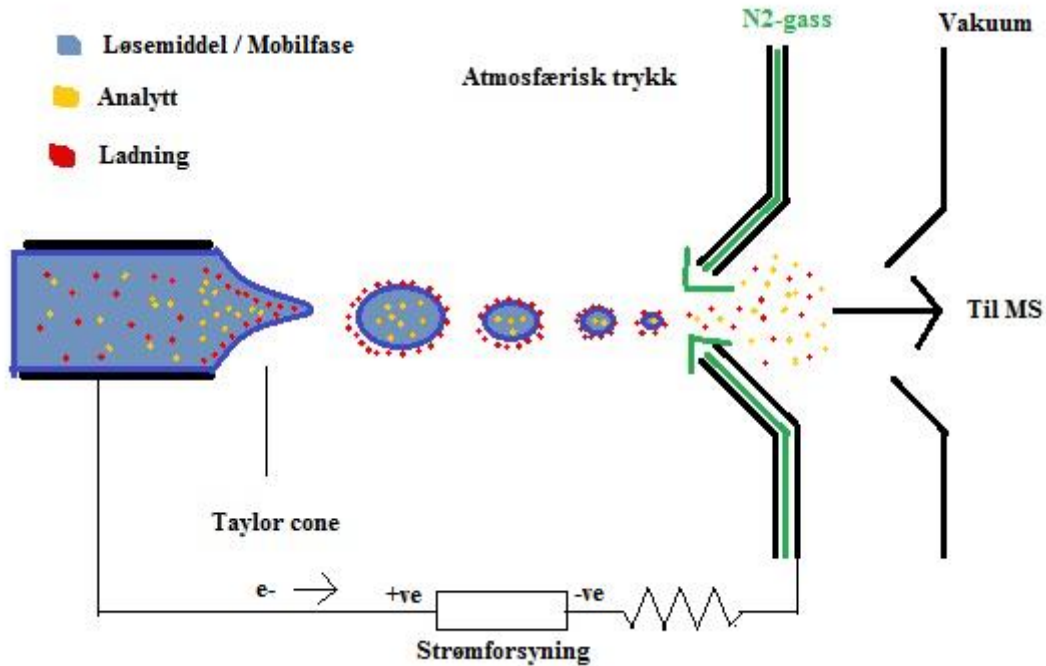
Deteksjonsmetoden MS skiller analytter avhengig av masse-ladnings ratio, m/z . En prøve bombarderes med energirike elektroner slik at det dannes ladede ioner i en ionekilde. Videre

filtreres ionene ved bruk av magnetiske og/eller elektriske felt i massefilteret, og detekteres av for eksempel en fotomultiplikator.

2.2.1 Ionisering

Før prøven kan analyseres i massefilteret må den ioniseres. Dette gjøres på forskjellige måter avhengig av om massespektrometeret er koblet til en GC, en HPLC eller ved direkte innføring av prøven. Prøven må være i gassform for å ioniseres. For GC kreves det ingen spesiell overgang, da prøven er en gass, og den vanligste måten å ionisere prøven på er ved bruk av en elektronioniseringskilde (EI). Prøven føres inn i et kammer hvor den bombarderes med elektroner fra et filament, slik at noen av ionene fragmenteres. Fragmenteringen av et stoff vil være repeterbar ved de samme betingelsene, og kan brukes i både kvalitativ og kvantitativ analyse (Harwood *et al.*, 1999).

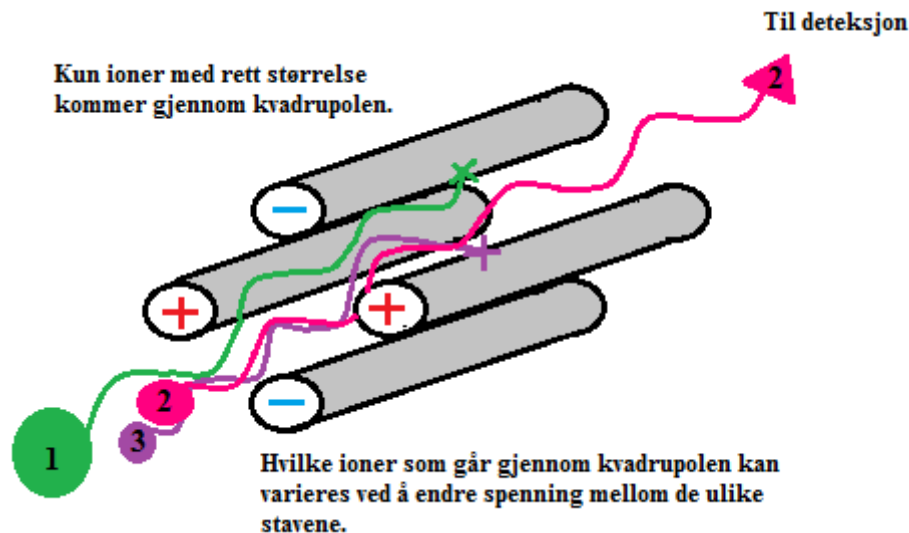
Når en MS skal kobles til en HPLC er det behov for å overføre prøven fra væskefase til gassfase før ionisering. Den vanligste måten å gjøre dette på er ved en elektropray ioniseringskilde (ESI), se figur 2.4. ESI benytter et elektrisk felt til å samle ladningen ved væskens overflate. Dette gir en dråpespray med høy ladning. Sprayen føres så gjennom en inert gass eller et oppvarmet kapillær, slik at mobilfasen dampes bort (Harwood *et al.*, 1999). Prøven er nå ionisert og kan gå videre til massefilteret. Eksempler på ulike massefiltre er sektorinstrumenter, Time-of-Flight-instrumenter og kvadrupoler. Metoden som er utviklet i denne oppgaven bruker kvadrupoler, og prinsippet for dette massefilteret er beskrevet i detalj.



Figur 2.4: Beskrivelse av en elektropray ioniseringskilde. En samling av spenning ved overflaten av mobilfasen danner en Taylor cone, og væsken vil omdannes til en dråpespray. Avdampning av mobilfasen fører til dannelse av mindre og mindre dråper med høy ladning. Prøven består til slutt kun av ioner og er klar for innføring i massefilteret.

2.2.2 Kvadrupol massefilter

En kvadrupol består av fire hyperbolske staver, hvor to og to staver er posisjonert parallelt ovenfor hverandre, se figur 2.5. Stavene på motsatt side av hverandre har samme type ladning, mens de ved siden av hverandre har motsatt ladning. Stavene oscillerer hele tiden mellom positiv og negativ ladning. Når et ion går inn mellom stavene, vil det trekkes mot en stav med motsatt ladning. Ved å endre det påførte elektriske feltet (radio frequency voltage, RF) og potensialet (direct current, DC) med en bestemt hastighet, vil ioner med en bestemt m/z passere gjennom filteret. Ioner med for høy eller for lav masse vil oscillere henholdsvis for mye eller for lite, og kolliderer med stavene istedenfor å nå gjennom filteret.



Figur 2.5: Grafisk fremstilling av en kvadrupol som kan fungere som massefilter i en MS. Kun ion nr. 2 har rett størrelse for å nå gjennom de fire stavene og videre til deteksjon.

2.2.3 Trippelkvadrupol

En trippelkvadrupol er et MS-system med tre kvadrupoler satt opp etter hverandre. Den første kvadrupolen brukes som massefilter som filtrerer eller analyserer ioner fra ionekilden. Den andre kvadrupolen brukes som en kollisjonscelle hvor fragmentering forekommer, mens den tredje analyserer fragmentene som har oppstått i kollisjonscellen. En trippelkvadrupol kan brukes til å innhente mer detaljert informasjon om analytter og prøver, både i form av kvalitativ og kvantitativ informasjon.

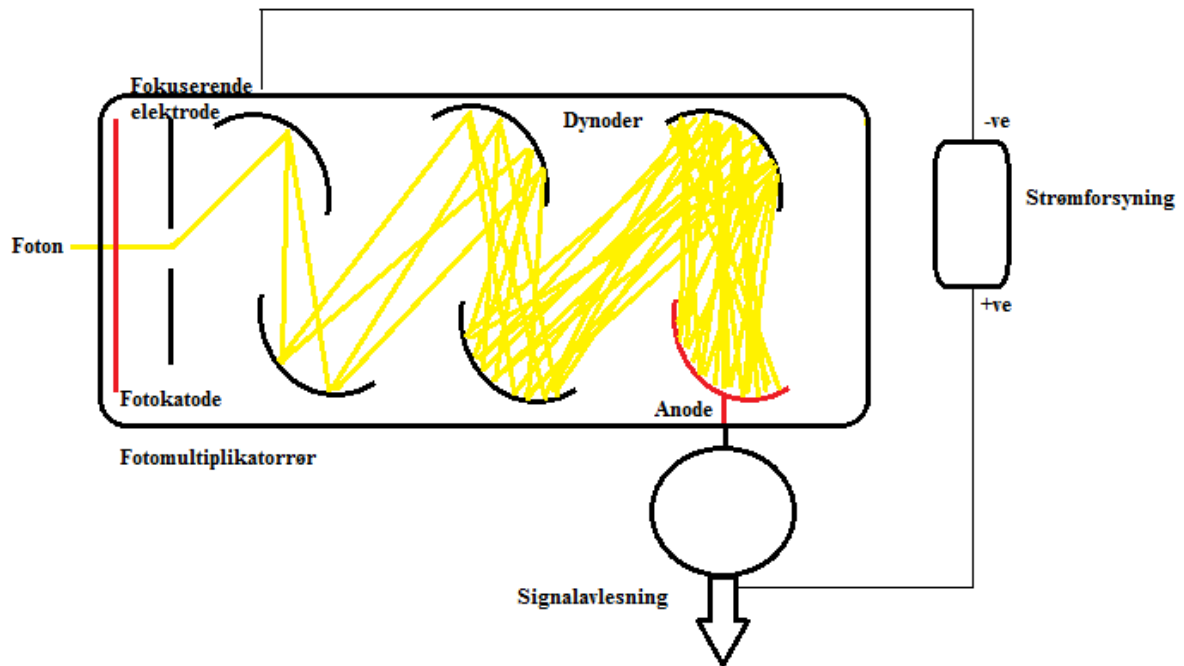
2.2.4 Multippel reaksjonsovervåking

Multippel reaksjonsovervåking (*Multipel reaction monitoring, MRM*) er en av mange måter å bruke en trippelkvadrupol på. Ved bruk av MRM skannes det for utvalgte masser i både første og tredje kvadrupol. Det benyttes ofte til kvantitativ bestemmelse, hvor det analyseres etter spesifikke analytter. En kjent masse for et ion til analytten velges ut i første kvadrupol. I tredje kvadrupol velges massen til et fragmention som dannes i kollisjonscellen og kun den valgte kombinasjonen av ioner sender signal til detektoren.

2.2.5 Fotomultiplikator

Detektoren skal lese av signal for ionene som kommer gjennom massefilteret. En vanlig detektor for MS er fotomultiplikatoren. Fragmentionene som kommer inn til detektoren

konverteres til fotoner som treffer en dynode som forsterker signalet. Ved bruk av flere dynoder forsterkes signalet slik at ionene blir mulig å detektere, se figur 2.6.

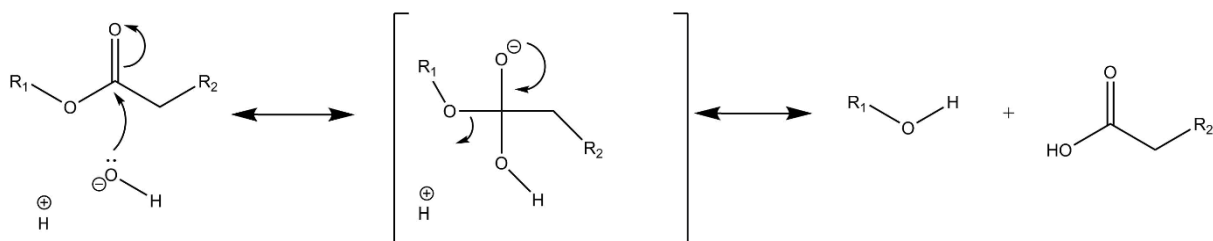


Figur 2.6: Grafisk fremstilling av en fotomultiplikator når et foton går gjennom fotomultiplikatoren og gir signal som sendes videre til en datamaskin.

2.3 Hydrolysereaksjon

Hydrolyse er en kjemisk reaksjon hvor egenskapene til H_2O som Brønsted-Lowry-syre og Brønsted-Lowry-base benyttes til å bryte og danne nye bindinger. I denne oppgaven benyttes hydrolyse til å bryte en fettacylester-binding, og danne en alkohol og en fettsyre. Hydrolysen benyttes til kvantitativ analyse av fettløselige toksiner i skjell.

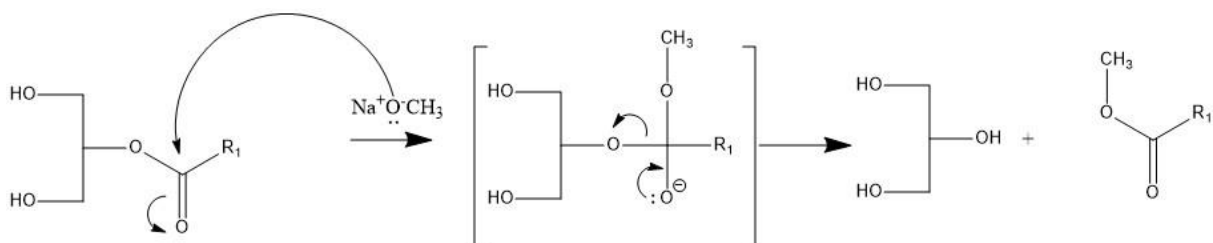
Skjellekstrakt tilsettes NaOH slik at det er mange tilgjengelige OH-grupper i løsningen. Deretter varmes prøven opp, slik at reaksjonen går raskere. Etter avkjøling tilsettes HCl for å gi en pH-nøytral prøve. Den kjemiske reaksjonen som foregår i prøven er illustrert i figur 2.7.



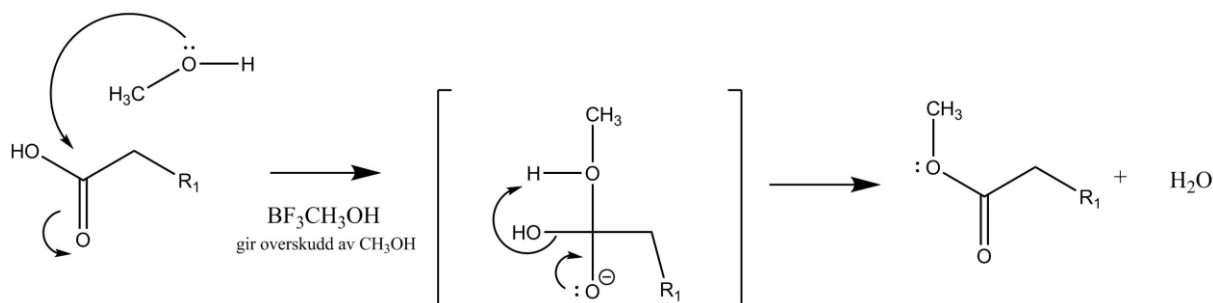
Figur 2.7: Kjemisk reaksjon for hydrolyse av fettacylester til alkohol og fettsyre. For OA-gruppen tilsvarende R_1 resten av et molekyl i OA-gruppen og R_2 en karbonkjede.

2.4 Derivatisering av lipider

Fett kan deles inn i fraksjonene polare lipider, nøytrale lipider og frie fettsyrer. En vanlig metode for å analysere fett i en prøve er ved bestemmelse av fettsyreprofil. Hvis GC skal benyttes til separasjon er det vanlig å derivatisere fettmolekylene for å oppnå separasjon og deteksjon, for eksempel ved omdannelse til FAMEe. Polare og nøytrale lipider bundet med ester-bindinger kan omestres med natriummetanolat (NaOCH_3), mens frie fettsyrer kan forestres med bortrifluoridmetanol ($\text{BF}_3\text{CH}_3\text{OH}$). I denne oppgaven skal en total fettsyreprofil bestemmes, og derfor er disse metodene kombinert, slik at alle polare og nøytrale lipider og frie fettsyrer i ekstraktet omdannes til FAMEe. De to reaksjonene er illustrert i figur 2.8 og 2.9.



Figur 2.8: Reaksjon av ester med natriummetanolat for dannelse av alkohol og metylester.

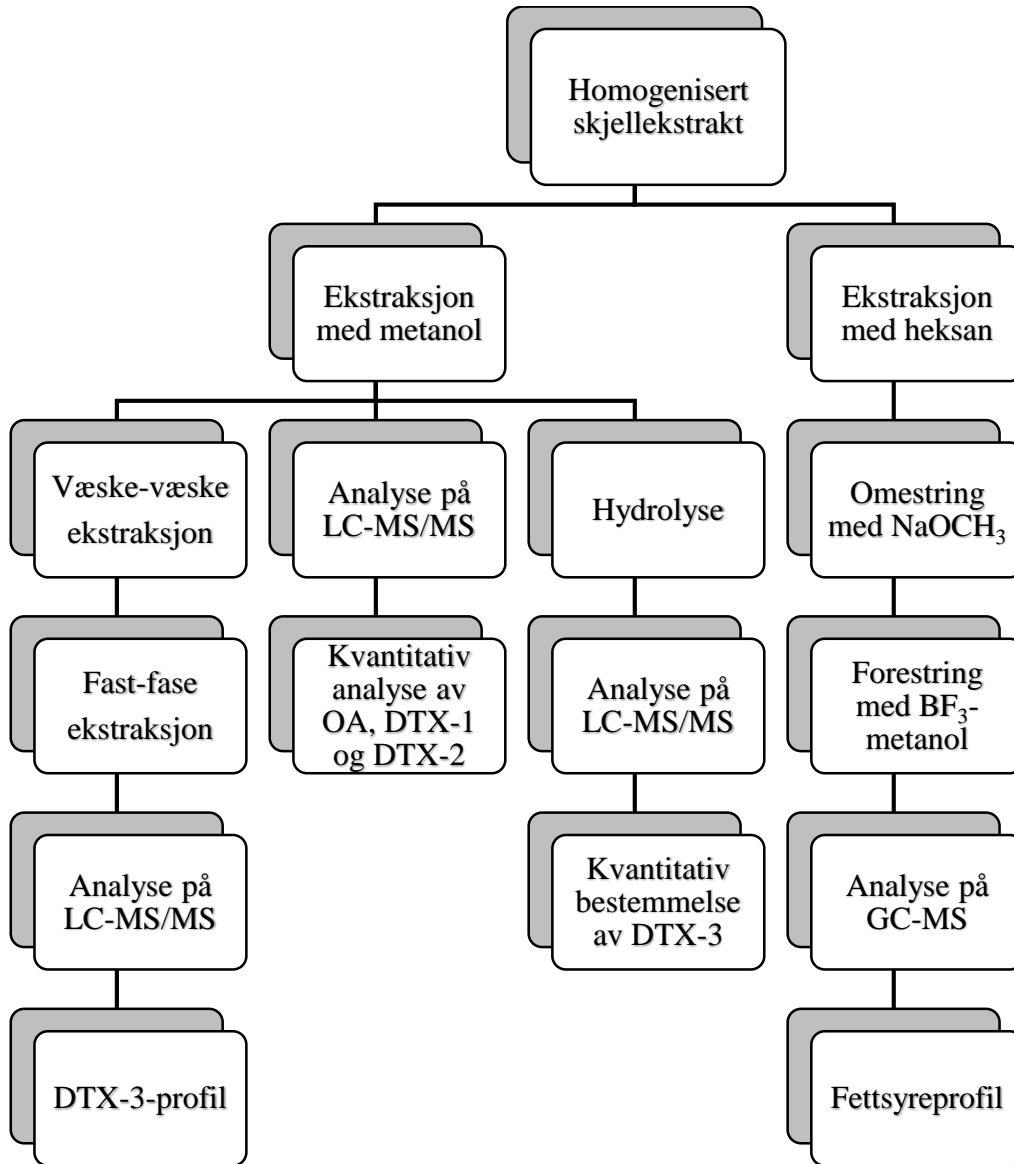


Figur 2.9: Reaksjon av karboksylsyre med bortrifluoridmetanol for dannelse av metylester og H_2O .

3 Eksperimentelt

3.1 Oversikt over prøveopparbeidelse og analysemetoder

En grafisk fremstilling av prøveopparbeidelse og analysemetoder er vist i figur 3.1.



Figur 3.1: Flytskjema med oversikt over hvordan skjellekstrakt opparbeides og analyseres for å få en DTX-3-profil, en fettsyreprofil, og en kvantitativ analyse av OA, DTX-1, DTX-2 og deres DTX-3-toksiner.

3.2 Utstyr

3.2.1 Forbruksmateriell

Forbruksmateriell benyttet i oppgaven er oppgitt i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Forbruksmateriell

Forbruksmateriell	Produsent
Prøveglass for GC med kork	VWR
Prøveglass for HPLC med skrukork	VWR
Insert til prøveglass, spisse	VWR
Oasis HLB 1cc kolonne	Waters
Pasteurpipetter	VWR
Pipettespisser	Eppendorf Research
Plastsprøyte 10 mL	Becton Dickinson
Sprøytefilter 0,2 µm	Pall Life Science

3.2.2 Kjemikalier

Kjemikalier benyttet i oppgaven er oppgitt i tabell 3.2.

Tabell 3.2: Kjemikalieoversikt. Kjemikaliene benyttet i oppgaven er oppgitt med renhet, kvalitet, produsent og CAS-nr.

Kjemikalie	Renhet [%]	Kvalitet	Produsent	CAS-nr.
Acetonitril	99,9	p.a	VWR	75-05-8
Ammonium format	98	Normapur	VWR	540-69-2
Bortrifluoridmetanol	10	for GC-derivatisering	Fluka analytical	373-57-9
Diklormetan	99,9	for HPLC	VWR	75-09-2
Heksan	98	p.a	Merck	110-54-3
Helium	99,9999	6,0	Yara	7440-59-7
Heptan	≥ 99	p.a	Sigma Aldrich	142-82-5
Hydrogenklorid	37-38	p.a	Merck	7647-01-0
Kloroform	100	for HPLC	Sigma Aldrich	67-66-3
Maursyre	98	p.a	Merck	64-18-6
Metanol	100	HPLC-grade	VWR	67-56-1
MilliQ-vann		Type 2	Millipore	
Natrium (s)			Merck	7440-23-5
Natriumhydroksid	≥ 99	Normapur	VWR	1310-73-2
Natriumklorid (s)	≥ 99		Sigma Aldrich	7647-14-5
Phenolphthalein i 50% etanol	1		VWR	77-09-8
Toluen	99.8	vannfritt	Sigma Aldrich	108-88-3

3.2.3 Referansestoffer

Referansestoffer og standarder som er benyttet i oppgaven er oppgitt i tabell 3.3 og 3.4. Standardene for OA, DTX-1 og DTX-2 er sertifisert referansemateriale (CRM) fra det nasjonale forskningsrådet (NRC) i Canada. Standarder for FAME er bestilt fra Restek, USA og Larodan, Sverige.

Tabell 3.3: Oversikt over referansemateriale. CRM står for sertifisert referansemateriale. Konsentrasjonen er målt i μg toksin/g løsning. Food Industry Fame Mix inneholder 38 FAME. Qualmix PUFA fish Natural Menhaden oil ME inneholder 20 FAME.

CRM	Navn	CAS/Cat*-nr [#]	Konsentrasjon [$\mu\text{g/g}$]	Produsent
OA	CRM-OA-c	78111-17-8	$17,3 \pm 0,8$	NRC Canada
DTX-1	CRM-DTX1	81720-10-7	$19,2 \pm 1,4$	NRC Canada
DTX-2	CRM-DTX2	139933-46-3	$9,9 \pm 0,4$	NRC Canada
FAME	Food Industry Fame Mix	*35077	-	Restek USA
FAME	Qualmix PUFA fish Natural Menhaden oil ME	*89-5560	-	Larodan, Sverige

Tabell 3.4: Standarder benyttet til bestemmelse av FAME. Standardene er fra Larodan, Sverige.

Standard	Cat-nr [#]	Mengde/Konsentrasjon	Renhet [%]	Produsent
C14:0 12-metyl ME	21-1412	25 mg	>98	Larodan
C14:0 13-metyl ME	21-1413	25 mg	99	Larodan
C15:0 14-metyl ME	21-1514-7	25 mg	>98	Larodan
C16:0 15-metyl ME	21-1715-7	25 mg	>98	Larodan
C16:1 cis 7 ME	21-1607	25 mg	>98	Larodan
C18:1 cis 11 ME	20-1812-9	100 mg	>99	Larodan
C18:1 cis 13 ME	20-1815	10 mg/mL	>99	Larodan
C20:1 cis 9 ME	20-2001/20-2009-4	10 mg/mL	>99	Larodan

3.2.4 Annet utstyr

Laboratorieutstyr benyttet i oppgaven er oppgitt i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Produsent
Automatpipette	20-200 µL	Eppendorf Research
Automatpipette	100-1000 µL	Eppendorf Research
Automatpipette	500-5000 µL	Eppendorf Research
Byrette	10 ± 0,02 mL	Blaubrand AS Shellbach
Dispensette	0,5-5 mL	Brand
Pipette, gradert	5 mL ± 0,045 mL	Hirschmann EM techcolor
Plastreservoar	30 mL	Analytichem International
Ristebrett	Vibrax VXR basic	IKA
Rotatormikser	Rotary mixer 34526	Snijders
Sentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf Research
Vakuumkanmer		IST Vacmaster
Vannbad		Grant
Whirlmikser	MS2 minishaker	IKA

3.2.5 Prøvemateriale og blank

Prøvene i dette arbeidet var skjellmateriale som ble sendt inn til Algelaboratoriet i perioden 2012 – 2015. Alle prøvene ble analysert for toksiner i henhold til Algelaboratoriets rutiner, og er derfor registrert i Algelaboratoriets kvalitetssystem. Prøvene er i denne oppgaven gitt nye navn med beskrivelse av prøvemateriale. Navnet begynner med bokstavene B, K, O eller Ø, som beskriver skjellarten, henholdsvis blåskjell, kamskjell, O-skjell eller østers. Deretter følger fire sifre. Disse viser til årstallet, og deretter ukenummeret prøven er tatt opp fra havet. Siste del av navnet er området skjellene er tatt opp fra. Informasjonen er i navnet fordi den kan være relevant for diskusjon av resultatene i denne oppgaven. Det betyr at prøven *B-1423 Viganeset* er en blåskjellprøve fra uke 23 i 2014 som er tatt opp fra Viganeset. En oversikt over prøvene som ble benyttet i oppgaven er samlet i Vedlegg 1. For å sikre sporbarhet i forhold til annen informasjon er prøvene oppgitt med Algelaboratoriets referansenummer.

Råmaterialet benyttet til metodeutvikling i oppgaven var *B-1443 Rundhaugen*. Dette skjellmaterialet inneholdt OA og DTX-1, men ikke DTX-2. Prøven er tatt opp ved Rundhaugen i Trondheimsfjorden i Inderøy kommune den 20. oktober 2014.

Blankmateriale som ble benyttet som matriks i standarder, og til fortynning av høykonsentrerte prøver var blåskjellmateriale som er negativt for alle toksiner som Algelaboratoriet analyserer for.

3.3 Tillaging av løsninger

3.3.1 Standarder og kalibreringsløsninger

Referansemateriale for toksiner

Hvert toksin ble levert som NRC-CRM standarder i mørke ampuller. Ampullene ble oppbevart uåpnet ved -20 °C frem til bruk. Før bruk ble ampullen romtempert og åpnet. Løsningen ble overført til et innveid og merket prøveglass med lokk. Glass med lokk og løsning ble veid på nytt etter overføring. Det ble så tilsatt 0,5 mL metanol og prøveglasset ble veid igjen. Nøyaktig konsentrasjon på standardløsning ble beregnet ut fra innveide masser, og benyttet videre til beregning av uttak til standardblandingen. Standardløsningen ble oppbevart ved -20 °C.

Standard for FAME

Standardene ble levert som CRM standarder i gjennomsiktige ampuller. Ampullene ble oppbevart uåpnet ved -20 °C frem til bruk. Enkelte standarder ble levert som løsninger med flere FAME, og disse ble fortynnet med heptan, slik at alle FAMEne kunne detekteres i nivåer tilsvarende det som er forventet av prøvene, med konsentrasjoner rundt 1 µg/mL. Andre standarder ble levert i ampuller med en FAME. Disse ble veid ut, og fortynnet med heptan, slik at konsentrasjonene ble omtrent 1 µg/mL. Standardene ble oppbevart ved -20 °C.

Kalibreringsløsninger til metode for kvantitativ bestemmelse av OA-gruppetoksiner ved LC-MS/MS

Standardblanding med OA, DTX-1 og DTX-2 ble laget fra CRM. Denne ble laget avhengig av konsentrasjonen på standardløsningene for de ulike toksinene, for en sluttkonsentrasjon på 400 ng/mL av hvert toksin og et totalvolum på 1,6 mL. Blandingen ble laget ved å benytte tabell 3.6, og fylle inn konsentrasjon for CRM-materialet som er tilgjengelig. Standardløsningen var holdbar i 1 år etter tillaging.

Tabell 3.6: Beregning for uttak til standardblanding av OA, DTX-1 og DTX-2.

Toksin	[CRM] [µg/mL]	Volum pipettert [µL]	Metanol [µL]	Sluttkons. [ng/mL]
OA	Fyll inn [OA]	400 ng/mL * 1600 µL/Fyll inn [OA]	1600 µL -	400
DTX-1	Fyll inn [DTX-1]	400 ng/mL * 1600 µL/Fyll inn [DTX-1]	µL OA - µL DTX-1 - µL	400
DTX-2	Fyll inn [DTX-2]	400 ng/mL * 1600 µL/Fyll inn [DTX-2]	DTX-2	400

Deretter ble det laget kalibreringsløsninger med seks nivåer ved å pipettere i henhold til tabell 3.7. Totalvolum av hver standard var 1,5 mL. Standardblandingen ble pipettert ut i PP-rør, og korrekt volum metanol ble tilsatt. Løsningene ble korket mellom overføringene. Etter overføring ble rørene ristet, og 100 µL ble overført til merkede prøveglass med insert. Prøveglassene ble tettet med parafilm og oppbevart ved -20 °C frem til analyse. Før kalibreringsløsningene ble benyttet ble løsningenes konsentrasjon kontrollert mot tidligere godkjente kalibreringsløsninger.

Tabell 3.7: Skjema for tillaging av kalibreringsløsninger til kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner.

Nivå	[OA], [DTX-1] og [DTX-2] [ng/mL]	Standardblanding [µL]	Metanol [µL]	Blank [µL]
1	0	0	360	1140
2	4	15	345	1140
3	16	60	300	1140
4	32	120	240	1140
5	48	180	180	1140
6	96	360	0	1140

3.3.2 Syrer og baser

2,5 M NaOH i H₂O

1,00 g NaOH ble veid inn i en 10 mL målekolbe. Målekolben ble fylt halvfull med H₂O, og ble stående til all NaOH var løst. Når løsningen hadde nådd romtemperatur ble kolben fylt med H₂O til 10 mL og ristet. Basen var klar til bruk, og hadde holdbarhet på en uke i romtemperatur i en tett beholder.

2,5 M HCl i H₂O

En 10 mL målekolbe ble fylt halvfull med H₂O. Deretter ble 2,072 mL 37% HCl overført til målekolben med automatpipette, og når løsningen hadde oppnådd romtemperatur ble kolben fylt med H₂O til 10 mL. Kolben ble ristet, og syren var klar til bruk. Løsningen hadde holdbarhet på en uke i romtemperatur i en tett beholder.

HCl og NaOH i andre konsentrasjoner og løsemidler

HCl og NaOH ble også laget i andre volum og konsentrasjoner ved å tilpasse prosedyren ovenfor. Syren og basen kan lages i andre løsemidler enn H₂O, for eksempel metanol, eller 80% metanol i H₂O. For å lage 10 mL NaOH i 80% metanol i H₂O ble NaOH veid inn i en 10 mL kolbe, tilsatt 2 mL H₂O, som stod til all NaOH var løst. Deretter ble kolben fylt nesten full med metanol. Når løsningen oppnådde romtemperatur, ble det etterfylt med metanol til streken.

3.3.3 Mobilfaser

Basiske mobilfaser til kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner

Mobilfase A: 0,05% (v/v) ammoniakk i H₂O (pH = 11). 1,0 liter

En 1000 mL målekolbe ble tilsatt H₂O til den var nesten full. Deretter ble det tilsatt 0,5 mL 25% ammoniakk, og kolben ble fylt til 1000 mL med H₂O. Mobilfasen var holdbar i to uker i romtemperatur.

Mobilfase B: 0,05% (v/v) ammoniakk og 10% H₂O i acetonitril. 1,0 liter

100 mL H₂O ble tilsatt en 1000 mL målekolbe. Kolben ble fylt nesten full med acetonitril, og korket. Når løsningen hadde nådd romtemperatur ble det tilsatt 0,5 mL 25% ammoniakk og kolben ble fylt til 1000 mL med acetonitril, ristet godt og overført til en duranflaske. Mobilfasen var holdbar i to uker i romtemperatur.

Sure mobilfaser til metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner

Mobilfase A: 2 mM ammoniumformat og 50 mM maursyre i H₂O. 0,5 liter.

64 mg ammoniumformat ble veid inn i en 500 mL målekolbe. Omtrent 100 mL H₂O ble tilsatt for å løse ammoniumformatet. 944 µL maursyre ble tilsatt kolben, og kolben ble justert med H₂O til 500 mL, blandet godt og overført til en duranflaske. Mobilfasen var holdbar i to uker i romtemperatur.

Mobilfase B: 100% acetonitril.

3.3.4 Andre løsninger

0,1 M NaCl i H₂O

2,92 g NaCl ble veid ut i en 500 mL målekolbe, og kolben ble fylt opp med H₂O. Løsningen ble overført til en duranflaske og oppbevart i kjøleskap.

10% metanol i H₂O

En 500 mL målekolbe ble tilsatt 50 mL metanol. Kolben ble fylt opp med H₂O. Løsningen ble overført til en duranflaske og oppbevart i romtemperatur.

70% metanol i H₂O

En 500 mL målekolbe ble tilsatt 150 mL H₂O. Kolben ble fylt opp med metanol. Løsningen ble overført til en duranflaske og oppbevart i romtemperatur.

3,3 mg/mL natriummetanolat

En duranflaske ble fylt med 60 mL metanol. Natrium (s) ble tørket og kuttet til, og deretter veid inn til 230 mg. Natriumet ble løst i metanolen, før 10 mL metanol ble tilsatt. Siste tilsetning av metanol var utregnet volum for å oppnå en 3,3 mg/mL løsning.

3.4 Prøveopparbeidelse

Skjellprøver som ankom laboratoriet ble åpnet, og innmaten til minimum 15 blåskjell eller 10 andre skjell ble tatt ut, til total mengde skjellmateriale var over 100 g. Overflødig væske ble silt bort før den samlede skjellmaten for én prøve ble homogenisert med stavmikser. Prøven ble deretter overført til merkede plastposer og oppbevart ved -20 °C.

3.4.1 Optimalisering av hydrolysetrinn

Prøveekstrakt

Opparbeiding av skjellekstrakt ble gjort i henhold til Algelaboratoriets metode M-AL 10. 1 ± 0,05 g skjellmateriale ble veid inn i et prøveglass med skrukork. Prøven ble tilsatt 3 mL metanol og mikset på whirlmikser før prøven ble ristet i ett minutt. Deretter ble prøven sentrifugert ved

2000 relativ sentrifugalkraft (rcf) i fem minutter. Supernatanten ble overført til en 10 mL målekolbe gjennom en trakt. Ekstraksjonsprosessen ble gjentatt to ganger til, og supernatantene ble overført til samme målekolbe. Volumet i målekolben ble justert til 10 mL. Prøvene ble så filtrert gjennom et 0,2 µm membranfilter ved hjelp av en 10 mL plastsprøyte, og var klar for analyse på LC-MS/MS eller videre hydrolyse.

Blankmaterialet ble opparbeidet på samme måte som annet skjellmateriale. Skjellmaterialet ble oppbevart ferdig homogenisert i en fryser, og veid ut i frossen tilstand, før det ble opparbeidet parallelt med andre skjellprøver.

Hydrolysetrinn i henhold til M-AL 10

150 µL 2,5 M NaOH i H₂O ble tilsatt et PP-rør med skrukork. Deretter ble det tilført 1,2 mL skjellekstrakt. Løsningen ble whirlmikset, og satt i et 76 °C vannbad i 45 minutter. Prøven ble avkjølt til romtemperatur før 150 µL 2,5 M HCl i metanol ble tilsatt, og løsningen ble whirlmikset på nytt. Skjellmaterialet var klart for kvantitativ analyse av OA, DTX-1 og DTX-2 på LC-MS/MS.

3.4.2 Metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner

Prøveekstrakt

Prøveekstraktet er opparbeidet på samme måte som skjellekstrakt benyttet til kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. Prøvene ble opparbeidet en gang, og analysert i to injeksjonsparalleller.

Hver gjennomføring av prøveoppbeidelse for prøver til metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner ble gjennomført med en prøve av *B-1443 Rundhaugen*. Prøven ble opparbeidet fem ganger som kontroll og en gang som reell prøve, totalt seks ganger.

Væske-væske ekstraksjon

5 mL blåskjellekstrakt og 5 mL H₂O ble tilsatt et glassrør på minimum 30 mL med skrukork. Prøven ble tilsatt 10 mL heksan, og rotert på snurrebrett på lav hastighet i fem minutter. Prøven ble sentrifugert på 670 rcf i fem minutter. Den øvre heksanfasen ble tatt ut med pasteurpipette og overført til en glasskolbe. Vannfasen ble tilsatt 10 mL heksan, og prosessen ble gjentatt til

totalt 30 mL heksan var benyttet og samlet i glasskolben. Heksanfasen ble dampet inn, og prøven var klar for FFE.

Fast-fase ekstraksjon

En 1 cc Oasis HLB-kolonne ble benyttet til FFE. Kolonnen ble festet til et vakuumkammer, med prøverør til oppsamling i vakuumkammeret, og et reservoar over kolonnen. Kolonnen ble først kondisjonert med 2 mL metanol og deretter 2 mL H₂O. Gjennomstrømning gjennom kolonnen var på omtrent en dråpe i sekundet. Kolonnen ble aktivert med 6 mL 10% metanol i H₂O, før prøven ble satt på kolonnen. Inndampet heksanfraksjon fra VVE ble tilsatt 20 µL 100% metanol og deretter 180 µL H₂O. Når væsken hadde løst VVE-fraksjonen, ble den overført til kolonnen. 200 µL 10% metanol ble tilsatt kolben med VVE-fraksjonen og satt på samme kolonne. Uønskede stoffer ble vasket ut med 6 mL 70% metanol. Deretter ble prøverøret byttet ut med et rent og merket prøverør og prøven ble eluert ut med 6 mL 100% metanol. Et sammendrag av FFE er fremstilt i tabell 3.8. Prøven ble satt til inndamping med trykkluft til løsemiddelet var tørket inn, og deretter reløst i 50 µL 100% metanol. Prøven ble overført til et prøveglass med insert, korket umiddelbart og var klar til injeksjon på HPLC.

Tabell 3.8: Oppsummering av metode for FFE.

Trinn	Volum	Løsemiddel	Funksjon
1	2 mL	100% metanol	Kondisjonering
2	2 mL	100% H ₂ O	Kondisjonering
3	6 mL	10% metanol i H ₂ O	Aktivering
4	200 + 200 µL	Påsetting av prøve	
5	6 mL	70% metanol i H ₂ O	Vasking
6	6 mL	100% metanol	Eluering

3.4.3 Fettsyreprofil i skjell

Prøveekstrakt for lipidekstraksjon

Ekstraksjonen av skjellmateriale ble utført på basis av metoden til Bligh og Dyer (1959), med endringer tidligere utført av Murphy *et al.* (2002) og Ezgeta-Balić *et al.* (2012). Det ble veid inn $5 \pm 0,05$ g homogenisert skjellmateriale i et 30 mL glass med skrukork. Glasset ble så tilsatt 5 mL kloroform og 10 mL metanol ved bruk av automatpipette. Prøvene ble whirlmikset i ti sekunder og stod over natten på et ristebrett på lav hastighet. Prøvene ble tilsatt 5 mL kloroform og ristet, og deretter tilsatt 5 mL 0,1 M NaCl i H₂O og ristet. Til slutt ble prøvene sentrifugert

ved 670 rcf i fem minutter. Vannfasen ble dekantert av, og kloroformfasen tatt ut med pasteurpipette og overført til merkede glass med skrukork.

Derivatisering av lipidekstraksjon fra skjellmateriale

Prøvene fra ekstraksjonen av lipider ble overført til reagensrør i glass, og opprinnelig beholder ble skylt to ganger med kloroform. Prøvene ble dampet inn med nitrogengass til nesten tørrhet og reløst i 500 µL toluen. 1,0 mL natriummetanolat ble tilsatt, og prøvene ble ristet vertikalt i 20 minutter. Prøvene ble så tilsatt 1,0 mL BF₃-metanol, og ristet vertikalt i 20 minutter. Deretter ble prøveglassene satt i et 80 °C vannbad i 20 minutter, og avkjølt til romtemperatur. Prøvene ble tilsatt 400 µL heptan og 800 µL 1,0 M NaCl i MilliQ-vann. Prøvene ble til slutt sentrifugert ved 2000 rcf i tre minutter. Den øvre heptanfasen ble overført til rene glassrør, sentrifugert på nytt ved 2000 rcf i tre minutter, og deretter ble øvre del av væsken overført til prøveglass. Til slutt ble prøven fortynnet 1:9 med heptan i et prøveglass for GC. Både ufortynnet og fortynnet prøve ble oppbevart i fryser på -20 °C frem til analyse.

3.5 Optimalisering av metode for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner

For å optimalisere hydrolysen ble seks forslag til hydrolyse av skjellmateriale sammenlignet, og ut fra disse ble syv ulike parametere i hydrolysen undersøkt. De seks ulike typene hydrolyse, og hvilken publikasjon de kommer fra er beskrevet i tabell 3.9. Metodene skiller seg fra hverandre ved ulike valg av løsemidler, konsentrasjon og volum for NaOH og HCl, og volum skjellekstrakt. De har også forskjeller i utførelsen av hydrolysen, ved å benytte ulik temperatur eller tid.

Der annet ikke er oppgitt følger hydrolysen fremgangsmåten til M-AL 10. 150 µL av både 2,5 M HCl i H₂O og 2,5 M NaOH i H₂O ble brukt til testing. 1,2 mL skjellekstrakt er benyttet og hydrolysen utføres ved 76 °C i 45 minutter. Ekstrakt fra det samme skjellmaterialet er benyttet for alle forsøkene.

Metoden som benyttes på Algelaboratoriet beregner relativt standardavvik ut fra 20 injeksjoner av samme prøve fra ulike dager, og beregnes på nytt hvert år. I 2016 er det relative standardavviket beregnet til 63% for total konsentrasjon av DTX-3. Til sammenligning har konsentrasjon av OA-ekvivalent før hydrolyse et relativt standardavvik på 10%, og

konsentrasjon av OA-ekvivalent etter hydrolyse har et relativt standardavvik på 23%. Det er ønskelig å utvikle en metode for kvantitativ analyse av DTX-3 med et relativt standardavvik under 20%.

Tabell 3.9: Oversikt over seks ulike hydrolysemetoder, med kildehenvisning. De seks metodene er navngitt A-F. Øverste del (1) viser forskjell i hvor mye NaOH og skjellekstrakt som benyttes til hydrolyse. Midtre del (2) viser forskjell i HCl, og nederste del (3) viser forskjell i utførelsen av hydrolysen.

Metode	NaOH løst i	[NaOH] [M]	NaOH [μ L]	Ekstrakt [mL]	Kilde	(1)
A	100% H ₂ O	2,5	150	1,2	NMBU (2013)	
B	100% H ₂ O	2,5	313	2,5	EU-RL-MB (2015)	
C	80% MeOH	1,0	400	1,0	Aasen (2005)	
D	100% H ₂ O	5,0	200	0,8	Torgersen <i>et al.</i> (2008b)	
E	100% MeOH	1,0	400	2,0	Vale og Sampayo (1999)	
F	90% MeOH	1,0	400	2,0	Vale og Sampayo (2002)	

Metode	HCl løst i	[HCl] [M]	HCl [μ L]	Kilde	(2)
A	100% MeOH	2,5	150	NMBU (2013)	
B	100% H ₂ O	2,5	313	EU-RL-MB (2015)	
C	100% H ₂ O	1,0	450	Aasen (2005)	
D	100% H ₂ O	5,0	210	Torgersen <i>et al.</i> (2008b)	
E	100% H ₂ O	1,0	450	Vale og Sampayo (1999)	
F	100% H ₂ O	1,0	425	Vale og Sampayo (2002)	

Metode	Hydrolysetemperatur [°C]	Hydrolysetid [Minutter]	Kilde	(3)
A	76	45	NMBU (2013)	
B	76	40	EU-RL-MB (2015)	
C	Romtemperatur	60	Aasen (2005)	
D	37	45	Torgersen <i>et al.</i> (2008b)	
E	Romtemperatur	60	Vale og Sampayo (1999)	
F	35	40	Vale og Sampayo (2002)	

3.5.1 Valg av løsninger med NaOH og HCl

Hvilke typer NaOH- og HCl-løsninger som er benyttet varierer for metodene i tabell 3.8. Derfor ble påvirkningen av dette undersøkt. NaOH ble løst i 100% H₂O, 80% metanol i H₂O og 100% metanol. HCl ble løst i 100% H₂O og 100% metanol. Forsøket gikk ut på å hydrolysere prøver ved å benytte de ulike syrene og basene i kombinasjon med hverandre, som beskrevet i tabell 3.10.

Tabell 3.10: Beskrivelse av løsemiddelforsøk

	NaOH løst i	HCl løst i	Antall replikater
1	100% H ₂ O	100% MeOH	3
2	100% H ₂ O	100% H ₂ O	3
3	80% MeOH i H ₂ O	100% MeOH	3
4	80% MeOH i H ₂ O	100% H ₂ O	3
5	100% MeOH	100% MeOH	3
6	100% MeOH	100% H ₂ O	3

3.5.2 Optimalisering av [NaOH] og [HCl]

Effekt av konsentrasjonen til NaOH og HCl som ble benyttet til hydrolysen ble testet. 150 μ L NaOH i H₂O og 150 μ L HCl i H₂O ble tilsatt. Konsentrasjonen ble målt på syv nivåer som varierte mellom 0,5 M og 5,0 M. Forholdet mellom konsentrasjonen til NaOH og HCl var alltid 1. Alle konsentrasjonsnivåene ble benyttet til tre hydrolyser av samme skjellmateriale (n=3).

3.5.3 Optimalisering av [HCl] når [NaOH] er konstant

Effekt av konsentrasjonen til HCl som ble benyttet til hydrolysen ble testet. 150 μ L 2,5 M NaOH i H₂O ble tilsatt før prøven ble satt i vannbad. 150 μ L HCl i H₂O med ulik konsentrasjon ble tilsatt prøven etter uttak fra vannbadet. Konsentrasjonen til HCl ble målt på seks nivåer som varierte mellom 1,0 M og 5,0 M. Alle nivåene ble benyttet til tre hydrolyser av samme skjellmateriale (n=3), men ved en feil ble 3,5 M kun analysert i to replikater (n=2).

3.5.4 Optimalisering av temperatur og tid for hydrolyse

Fire forskjellige måter for gjennomføring av hydrolysen ble testet. De ulike metodene er satt sammen for best å representere alle de ulike hydrolysene som er brukt til sammenligning i dette forsøket. Metodene benytter varierende temperatur og tid for hydrolysens varighet, og er beskrevet i tabell 3.11. Alle prøvene som ble varmebehandlet over romtemperatur ble avkjølt i 15 minutter før HCl ble tilsatt. Hver metode ble benyttet til å hydrolysere fem prøver (n=5).

Tabell 3.11: Beskrivelse av de fire metodene med ulik hydrolyse som ble testet. Metodene er videre i oppgaven navngitt med en sammensetning av temperatur og tid for hydrolysen i minutter. Romtemperatur ved utførelse av forsøket var 21 °C.

Temperatur [°C]	Tid [Minutter]	Replikater [n]	Navn på metode
76	45	5	76 45
76	40	5	76 40
37	45	5	37 45
21	60	5	21 60

3.5.5 Optimalisering av tid for avkjøling før HCl tilsettes

Hvor lang tid prøvene ble stående etter at de ble tatt ut av vannbadet, men før HCl ble tilsatt for å stoppe hydrolysen, ble testet. Under forsøket ble 150 µL 2,5 M HCl tilsatt ved tolv ulike tidspunkter etter at prøvene ble tatt ut av vannbadet. Tiden etter uttak fra vannbad var mellom 10 og 1440 minutter. Det ble utført tre replikater for hver variabel (n=3), med unntak av for 1440 minutter, der det ble gjennomført seks replikater (n=6).

3.5.6 Kontroll av muligheten for tap av metanol ved oppvarming

Muligheten for at metanol damper av i løpet av oppvarmingen i hydrolysen ble testet. Flere prøver som har gjennomgått hydrolyse, blant annet i forsøkene beskrevet over, ble veid før og etter at prøven hadde vært i vannbad. 161 prøver fra åtte ulike hydrolyse utført på åtte ulike dager ble testet. Rørene ble veid inn med skjellekstrakt, NaOH, skrukort og merkelapp. Etter vannbadet, men før siste innveiling, ble rørene avkjølt i et stativ i omtrent ti minutter.

3.5.7 Holdbarhet for løsninger med NaOH og HCl

Holdbarheten til de ulike løsningene med NaOH og HCl, se avsnitt 3.5.1, ble testet. 100 mL av hver løsning ble laget, med en konsentrasjon på 2,5 M. Løsningene ble så oppbevart på samme måte som HCl og NaOH-løsninger ble oppbevart på Algelaboratoriet. For å simulere jevnlig bruk av løsningene ble løsningene satt åpne i et avtrekkskap i ti minutter hver uke. Hver 4. uke ble konsentrasjonen i løsningene målt ved titrering. Til titrering ble testløsninger på 2,5 M NaOH og 2,5 M HCl laget, sammen med kontroll-løsninger på 0,7 M NaOH og 6,0 M HCl. Løsningene ble laget i henhold til fremgangsmåten beskrevet i avsnitt 3.3.2. Deretter ble syv manuelle titreringer foretatt i henhold til tabell 3.12.

Tabell 3.12: Oversikt over gjennomførelse av titreringsforsøk for bestemmelse av [NaOH] og [HCl] ved titrering.

Titrering	[HCl] [M]	HCl [mL]	[NaOH] [M]	Hensikt
1	2,5	2,5	0,7	Test av 0,7 M NaOH i H ₂ O
2	X	2,5	0,7	Måling av HCl i 100% H ₂ O
3	X	2,5	0,7	Måling av HCl i 100% MeOH
4	6	3	2,5	Test av 6,0 M HCl i H ₂ O
5	6	3	X	Måling av NaOH i 100% H ₂ O
6	6	3	X	Måling av NaOH i 80% MeOH i H ₂ O
7	6	3	X	Måling av NaOH i 100% MeOH

3.5.8 Endring i areal og retensjonstid

En vanlig rutineanalyse av fettløselige algetoksiner på LC-MS/MS starter med en til tre injeksjoner av en toksisk kontrollprøve, og analyse av seks kalibreringsløsninger og deretter kontrollprøver. Uhydrolyserte prøver analyseres før andre injeksjon kalibreringsløsninger og kontrollprøver. Til slutt analyseres hydrolyserte prøver og tredje injeksjon av kalibreringsløsningene. En kalibreringskurve lages med data fra de tre injeksjonene av hver kalibreringsløsning, og brukes videre til beregning av konsentrasjonen til alle prøver. En vanlig rutineanalyse kan vare 24 til 36 timer, avhengig av antall prøver.

Endring i retensjonstid og areal som oppnås for OA og DTX-1 ble testet ved å injisere det samme skjellmaterialet 40 ganger etter hverandre. Med et analyseprogram på 20 minutter gir det en total analysetid på 13 timer.

3.6 Kromatografiske metoder

To kromatografiske metoder for LC-MS/MS er benyttet. Den første er en tilpasning av den kromatografiske delen av M-AL 10-metoden, med analyse av OA, DTX-1 og DTX-2. Metoden benyttes for kvantitativ analyse av OA, DTX-1, DTX-2 og deres DTX-3-toksiner i skjellmateriale og til vurdering av prosedyre for hydrolyse av DTX-3. Den andre metoden er laget til denne oppgaven, og brukes til bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner i skjellprøver.

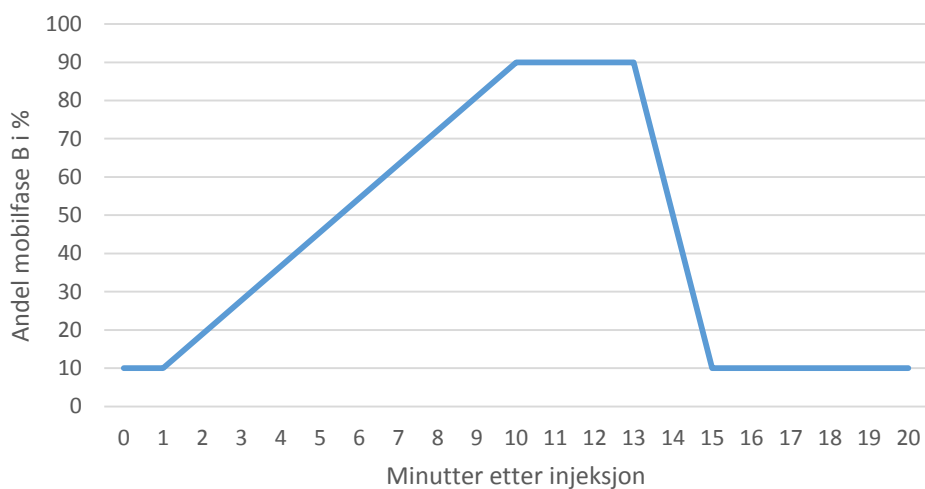
En kromatografisk metode for bestemmelse av FAME ved bruk av GC-MS er også benyttet.

3.6.1 Kromatografisk metode for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner

Kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner ble utført ved bruk av en Agilent 1200 LC. Kolonnen som ble benyttet var en 15 cm Waters XBridge C18-kolonne med 3,0 mm diameter og 5 µm partikkelstørrelse. HPLC-betingelsene for metoden er oppgitt i tabell 3.13. Mobilfaseprogrammet for mobilfase B er fremstilt i figur 3.2.

Tabell 3.13: Betingelser for HPLC for metoden benyttet til kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner.

HPLC-parametere	
Analysetid	20 min
Mobilfasehastighet	0,4 mL/min
Injeksjonsvolum	10,00 µL
Temperatur i autosampler	4 °C
Kolonnetemperatur	40 °C
Mobilfase A	0,05% (v/v) ammoniakk i H ₂ O
Mobilfase B	0,05% (v/v) ammoniakk i en løsning av 90% acetonitril og 10% H ₂ O



Figur 3.2: Mobilfaseprogram med andel mobilfase B i metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. Programmet varer i 20 minutter.

Deteksjonen ble utført på en Agilent 6460 trippel kvadrupol (QqQ) MS. Massespektrometeret er utstyrt med en ESI. Betingelsene for ionekilden er gitt i tabell 3.14.

Tabell 3.14: Parametere for ESI for LC-MS/MS

Ionekildeparametere	
Ionekildetemperatur	120 °C
Gass hastighet	10 L/min
Forstøver trykk	30 psi
Tørkegasstemperatur	350 °C
Tørkegass hastighet	11 L/min
Kapillærspenning	4000 V

Det ble benyttet en MRM-metode for kvantitativ analyse av OA, DTX-1 og DTX-2 som allerede er optimalisert for deteksjon av disse. Bestemmelsen foregår kun i negativ modus. Det benyttes to MRM-overganger for hver av stoffene. OA og DTX-2 har samme masse, og samme overganger. Den første overgangen, merket med *, ble benyttet til kvantitativ bestemmelse. Den andre overgangen ble benyttet som kvalitativ bekreftelse. Spenningsforskjellen for elektronmultiplikatoren (ΔEMV) for metoden var 600. De benyttede MRM-overgangene og deres MS-betingelser er oppgitt i tabell 3.15. MassHunter versjon B.06.00 ble benyttet til bearbeiding av analysedata.

Tabell 3.15: Betingelser for MS og MRM-overganger for metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. MRM-overgangene merket med * benyttes til kvantitativ bestemmelse. Dwell er hvor lenge hver overgang skannes. Frag er fragmentorspenningen som skal minimalisere kollisjonsindusert dissosiasjon. CE er kollisjonsenergien som benyttes i kollisjonscellen, og CA er spenningen for celleakselerasjon.

Toksin	Forløperion	Produksjon	Dwell	Frag	CE	CA
	[m/z]	[m/z]	[ms]	[V]	[V]	[V]
DTX-1*	817,5	255,2	100	300	45	7
DTX-1	817,5	113,1	100	300	50	7
OA, DTX-2*	803,5	255,2	100	300	45	7
OA, DTX-2	803,5	113,1	100	300	50	7

3.6.2 Kromatografisk metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner

Bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner ble utført ved bruk av samme LC-MS/MS-instrument som ble benyttet for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. Se spesifikasjoner i avsnitt 3.6.1.

Kolonnen som ble benyttet var en omvendtfase 15 cm Thermo Scientific Hypersil BDS C8-kolonne med 2,1 mm diameter og 3 μ m partikkelstørrelse. Kolonnen ble benyttet med en Hypersil BDS C8 Javelin forkolonne med 5 μ m partikkelstørrelse. HPLC-betingelsene for

metoden er oppgitt i tabell 3.16. Mobilfaseprogrammet som ble benyttet var isokratisk med 95% mobilfase B.

Tabell 3.16: Parametere for HPLC ved bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner.

HPLC-parametere	
Analysetid	15 min
Mobilfasehastighet	0,2 mL/min
Injeksjonsvolum	10,00 µL
Temperatur i autosampler	4 °C
Kolonnetemperatur	40 °C
Mobilfase A	2 mM ammonium format og 50 mM maursyre i H ₂ O
Mobilfase B	100% acetonitril

Parameterne for ESI er de samme som er oppgitt i tabell 3.14. Det ble benyttet en MRM-metode for bestemmelse av 15 DTX-3 fra OA/DTX-2 og 16 DTX-3 fra DTX-1. Masseovergangene for toksinene er oppgitt i tabell 3.17, sammen med MS-betingelser. Det er benyttet en overgang for hvert toksin. Overgangene tilsvarer tapet av fettsyreesteren.

Tabell 3.17: Betingelser for MS og MRM-overganger for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner, med retensjonstid. Dwell er hvor lenge hver overgang skannes. Frag er fragmentorspenningen som skal minimalisere kollisjonsindusert dissosiasjon. CE er kollisjonsenergien som benyttes i kollisjonscellen, og CA er spenningen for celleakselerasjon.

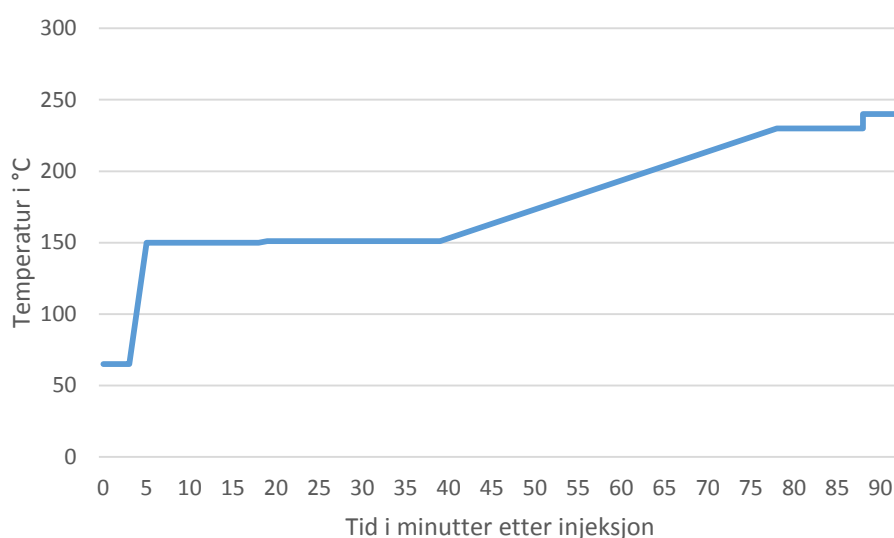
Toksin	Forløperion [m/z]	Produksjon [m/z]	Dwell [ms]	Frag [V]	CE [V]	CA [V]	Rt [min]
DTX-1 14:0	1027,7	799,5	40	60	60	1	5.8
DTX-1 15:0	1041,7	799,5	40	60	60	1	6.5
DTX-1 15:1	1039,7	799,5	40	60	60	1	5.8
DTX-1 16:0	1055,7	799,5	40	60	60	1	7.0
DTX-1 16:1	1053,7	799,5	40	60	60	1	6.0
DTX-1 16:4	1047,6	799,5	40	60	60	1	4.5
DTX-1 17:0	1069,7	799,5	40	60	60	1	9.4
DTX-1 17:1	1067,7	799,5	40	60	60	1	7.8
DTX-1 18:0	1083,7	799,5	40	60	60	1	9.0
DTX-1 18:1	1081,7	799,5	40	60	60	1	7.4
DTX-1 18:2	1079,7	799,5	40	60	60	1	7.0
DTX-1 18:4	1075,7	799,5	40	60	60	1	5.1
DTX-1 20:1	1109,8	799,5	40	60	60	1	11.2
DTX-1 20:2	1107,7	799,5	40	60	60	1	9.3
DTX-1 20:5	1101,7	799,5	40	60	60	1	5.6
DTX-1 22:6	1127,7	799,5	40	60	60	1	5.7
OA/DTX-2 14:0	1013,7	785,5	40	60	60	1	5.7
OA/DTX-2 15:0	1027,7	785,5	40	60	60	1	6.0
OA/DTX-2 16:0	1041,7	785,5	40	60	60	1	6.3
OA/DTX-2 16:1	1039,7	785,5	40	60	60	1	5.8
OA/DTX-2 17:0	1055,7	785,5	40	60	60	1	6.7
OA/DTX-2 17:1	1053,7	785,5	40	60	60	1	6.5
OA/DTX-2 18:0	1069,7	785,5	40	60	60	1	6.5
OA/DTX-2 18:1	1067,7	785,5	40	60	60	1	6.4
OA/DTX-2 18:2	1065,7	785,5	40	60	60	1	5.9
OA/DTX-2 18:4	1061,7	785,5	40	60	60	1	4.4
OA/DTX-2 20:1	1095,7	785,5	40	60	60	1	8.0
OA/DTX-2 20:2	1093,7	785,5	40	60	60	1	6.8
OA/DTX-2 20:3	1091,7	785,5	40	60	60	1	6.4
OA/DTX-2 20:5	1087,7	785,5	40	60	60	1	4.6
OA/DTX-2 22:6	1113,7	785,5	40	60	60	1	4.9

3.6.3 Kromatografisk metode for bestemmelse av fettsyreprofil i skjell

Analyse av FAME ble utført på en Agilent 6890 GC. Prøvene injiseres av en CTC PAL automatisk injektor fra CTC Analytics. Separasjonen ble utført på en 60 m kolonne fra Restek med en indre diameter på 0,25 mm, og en filmtykkelse på 0,2 µm. Stasjonærfasen besto av silika biscyanopropyl cyanopropylfenol polysiloxan. Bæregassen som ble benyttet var

99,9999% heliumgass med mobilfasehastighet på 1 mL/min. Det ble injisert 1 µL prøve med en splitratio på 1:10. Hver prøve ble opparbeidet i to replikater og hvert replikat hadde to injeksjonsparalleller.

Temperaturprogrammet som ble benyttet hadde en varighet på 92 minutter. Starttemperaturen var 65 °C, og ble holdt i 3,0 minutter. Temperaturen ble økt med 40 °C/minutt til 150 °C og holdt i 13,0 minutter. Temperaturen ble så satt opp til 151 °C i løpet av 30 sekunder, og holdt i 20,0 minutter. Deretter ble temperaturen økt til 230 °C med en hastighet på 2 °C/minutt, og holdt i 10,0 minutter. Til slutt ble temperaturen satt opp med 50 °C/minutt til 240 °C, og holdt i 3,7 minutter. Temperaturprogrammet er vist grafisk i figur 3.3.



Figur 3.3: Temperaturprogrammet for GC-MS-metode. Programmet er benyttet for bestemmelse av FAME i skjellekstrakt.

Deteksjonen ble gjort på en Autospec Ultima MS fra Micromass Ltd. med en EI. Skannmodus benyttes i MSen, og det utvalgte masseområdet er fra 40 – 600 m/z . Ionekilden ble brukt i positiv modus og produserer 70 eV elektroner. Ionekildetemperaturen er på 250 °C. Masseoppløsningen er 1000 og det ble benyttet en skanntid på 0,3 sekunder, en forsinkelse mellom hvert skann på 0,2 sekunder, og en syklustid på 0,5 sekunder. Temperaturen ved overgangen til ionekilden var 270 °C.

Identifikasjon av FAME ble utført ved sammenligning av retensjonstider i standarder for 33 ulike FAME, i kombinasjon med biblioteksøk i NIST 08 Mass Spectral Library (Gaithersburg, MD, USA). Behandling av analysedata ble utført i MassLynx versjon 4.0.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Optimalisering av hydrolyse for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner

4.1.1 Valg av løsninger med NaOH og HCl.

Hva NaOH og HCl er løst i kan påvirke konsentrasjonen av DTX-3 som bestemmes etter hydrolyse, og effekten av dette ble derfor testet. Resultatene for hydrolyse utført med NaOH løst i enten H₂O, 80% metanol i H₂O eller metanol, i kombinasjon med HCl løst i enten H₂O eller metanol er gjengitt i tabell 4.1.

Tabell 4.1: Konsentrasjon av DTX-3 fra OA og DTX-1, i µg toksin/kg skjellmat (S), oppnådd med forskjellige løsemidler. Det er gjennomført tre hydrolyser med hver kombinasjon av løsninger (n=3).

2,5 M NaOH løst i	2,5 M HCl løst i	DTX-3 fra OA [µg/kg S]	RSD [%]	DTX-3 fra DTX-1 [µg/kg S]	RSD [%]	Total DTX-3 [µg/kg S]	RSD [%]
100% H ₂ O	100% MeOH	1323	4	1807	12	3130	7
100% H ₂ O	100% H ₂ O	1269	2	1418	10	2686	4
80% MeOH i H ₂ O	100% MeOH	1202	1	1571	9	2773	5
100% MeOH	100% MeOH	1178	13	1589	18	2767	15
80% MeOH i H ₂ O	100% H ₂ O	1173	3	1400	17	2573	11
100% MeOH	100% H ₂ O	1128	3	1416	22	2544	13

Høyest konsentrasjon av DTX-3 fra både OA og DTX-1 ble oppnådd ved bruk av NaOH i H₂O og HCl i metanol. Når HCl er løst i metanol er det ingen signifikant forskjell på om NaOH er løst i 80% metanol i H₂O, eller i 100% metanol. Hydrolyse hvor HCl i H₂O ble benyttet kom dårligst ut for konsentrasjonen av DTX-3 fra DTX-1, uten signifikant påvirkning fra hva NaOH er løst i. Det relative standardavviket varierer for ulike kombinasjoner av løsninger. Tre kombinasjoner har relativt standardavvik som er mindre enn 10% for total konsentrasjon av DTX-3. Dette gjelder for NaOH løst i H₂O kombinert med HCl løst i enten H₂O eller metanol, og NaOH i 80% metanol i H₂O når HCl er løst i metanol. Hydrolyse med både NaOH og HCl løst i metanol har størst relativt standardavvik, på 15% for total DTX-3. Disse resultatene tyder på at hydrolyse med NaOH løst i H₂O, og HCl løst i metanol er optimalt. Da oppnås størst grad av hydrolyse og et standardavvik under 7% for analyse av total DTX-3.

4.1.2 Optimalisering av [NaOH] og [HCl]

De seks hydrolysemetodene fra tabell 3.9 benytter varierende volum og konsentrasjon for tilsatt NaOH og HCl, og varierende volum skjellekstrakt. To av seks metoder benytter like mye NaOH som HCl, mens fire av seks tilsetter mer HCl enn NaOH. En omregning til mol NaOH eller HCl tilsatt/mL skjellekstrakt ble gjort for både NaOH og HCl. Antall mol NaOH/mL og HCl/mL skjellekstrakt ligger henholdsvis mellom 0,02 – 0,125 og 0,025 – 0,131. Variasjonen i metodene gjorde dette til en interessant faktor å undersøke. Resultatene for gjennomføringen av forsøket er gitt i tabell 4.2.

Tabell 4.2: Konsentrasjonen av DTX-3 bestemt ved hydrolyse utført med varierende konsentrasjon av NaOH og HCl. Forholdet mellom tilsatt konsentrasjon av NaOH og HCl holdes konstant til 1. Konsentrasjon av DTX-3 er oppgitt i μg toksin/kg skjellmat (S), og med relativt standardavvik (RSD). Samme skjellmateriale er benyttet for alle prøvene. Det er hydrolysert 3 prøver for hvert konsentrasjonsnivå ($n=3$).

[NaOH] og [HCl] i H ₂ O	DTX-3 fra OA	RSD	DTX-3 fra DTX-1	RSD	Total DTX-3	RSD
[M]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	[%]
0,5	1092	2	2282	2	3374	1
1,0	1519	5	3164	12	4683	10
2,0	1498	8	3483	9	4981	8
2,5	1477	8	3491	14	4968	12
3,0	1529	9	4098	24	5627	20
4,0	1486	4	3837	12	5323	9
5,0	1521	4	4070	9	5591	8

Toksinkonsentrasjon i prøver som kommer inn for analyse er ukjent, og varierer fra prøve til prøve. Fordi samme volum NaOH og HCl skal tilsettes alle prøver ved hydrolyse er det viktig at dette er nok til å hydrolysere en prøve med konsentrasjoner innenfor hele deteksjonsområdet. For M-AL 10-metoden er deteksjonsområdet 2,0 – 96,0 ng/mL for hvert toksin. Konsentrasjonen av DTX-1 i *B-1443 Rundhaugen* ble etter hydrolyse målt til 106 ng/mL, en konsentrasjon som ligger utenfor deteksjonsområdet til prøven. Det betyr at forsøket tar høyde for høykonsentrerte prøver, noe som kan gå på bekostning av usikkerheten i målingene av DTX-1. Det ansees som viktigere å vite at det benyttes nok NaOH og HCl for prøver med høye konsentrasjoner enn at alle målingene i dette forsøket faller innenfor det kontrollerte deteksjonsområdet. Konsentrasjonen av OA ligger innenfor det lineære området etter hydrolyse. Resultatene i tabell 4.2 tyder på at å bruke 150 μL 0,5 M NaOH ikke er nok til å hydrolysere alle toksinene i skjellmateriale. Det relative standardavviket er lavt, i tillegg til at verdiene for DTX-3 er lavere enn for resten av forsøkene. Det kan bety at all tilgjengelig OH

har reagert, og at det er flere toksiner igjen som ikke har blitt hydrolysert. Prøver utført med NaOH og HCl med konsentrasjoner fra 1,0 M til 2,5 M har ingen signifikant forskjell i konsentrasjon DTX-3 som ble bestemt. Det ble hydrolysert mer DTX-3 fra DTX-1 enn ved bruk av 0,5 M NaOH og HCl. Høyest konsentrasjon ble oppnådd med 3,0 M – 5,0 M NaOH og HCl, og av disse har både 4,0 M og 5,0 M et relativt standardavvik under 10% for konsentrasjon av total DTX-3. Fordi det av sikkerhetsmessige årsaker er bedre å jobbe med svakere baser og syrer kan det være hensiktsmessig å benytte 4,0 M NaOH og HCl. Uforutsette endringer i volum eller konsentrasjon av NaOH og HCl vil ikke føre til signifikant endring i konsentrasjon av DTX-3 som bestemmes etter hydrolyse, så lenge konsentrasjonen til løsningene med NaOH og HCl er over 2,5 M.

4.1.3 Optimalisering av [HCl] når [NaOH] er konstant

Forholdet mellom hvor mye NaOH og HCl som blir tilsatt prøvene ved hydrolyse varierer i de ulike metodene som ble vurdert. Ved å holde konsentrasjonen av NaOH som blir tilsatt prøvene konstant, ble påvirkning av endring i konsentrasjon av HCl testes. Resultatene fra forsøket er fremstilt i tabell 4.3.

Tabell 4.3: Konsentrasjon av DTX-3 målt i hydrolyserte prøver, hvor hydrolyseprosessen ble stanset av HCl-løsning med ulik konsentrasjon. DTX-3-konsentrasjoner er oppgitt i μg toksin/kg skjellmat (S). Hver løsning med HCl er benyttet på tre hydrolyserte prøver av samme skjellmateriale ($n = 3$), med unntak av 3,5 M, som kun ble analysert i to replikater ($n=2$).*

[HCl] i H ₂ O [M]	DTX-3 fra OA [$\mu\text{g}/\text{kg S}$]	RSD [%]	DTX-3 fra DTX-1 [$\mu\text{g}/\text{kg S}$]	RSD [%]	Total DTX-3 [$\mu\text{g}/\text{kg S}$]	RSD [%]
1,0	451	2	805	3	1255	2
2,5	546	2	1288	9	1834	6
2,8	585	5	1381	2	1966	3
3,0	566	10	1216	9	1782	9
3,5*	595	3	1450	5	2046	5
5,0	554	6	1327	9	1881	8

Innenfor deteksjonsområdet til metoden ble det antatt at 150 μL av 2,5 M NaOH var nok til å hydrolysere en hvilken som helst prøve. Da burde ikke konsentrasjon av HCl, som tilsettes for å avslutte hydrolysen og gi prøven en nøytral pH, påvirke konsentrasjon av toksiner som blir bestemt etter hydrolyse. Resultatene i tabell 4.3 tyder på at konsentrasjonen til HCl-løsningen har en innvirkning på konsentrasjonen toksin som bestemmes etter hydrolyse. Når syren som tilsettes prøvene har en konsentrasjon på 1,0 M bestemmes det lavere konsentrasjoner av DTX-

3-toksiner enn når mer konsentrert HCl benyttes. Effekten ved å endre konsentrasjonen fra 2,5 M til 5,0 M er liten, og viser at metoden tåler endringer i konsentrasjonen av HCl som tilsettes, så lenge denne er 2,5 M eller mer.

Det er i dette forsøket valgt å undersøke flere konsentrasjoner som ligger over 2,5 M. Det kan se ut som at å tilsette HCl med høyere konsentrasjon enn NaOH er fordelaktig for hydrolysens resultater. Prøver tilsatt 2,8 M HCl oppnår nest høyest konsentrasjon av total DTX-3 og prøver tilsatt 3,5 M HCl gir høyest konsentrasjon av DTX-3. Gjennomsnittet for 3,5 M HCl er basert på kun to replikater. Prøvene tilsatt 2,8 M HCl har det laveste relative standardavviket av prøvene tilsatt HCl mellom 2,5 M og 5,0 M. Alle variablene testet i dette forsøket har relative standardavvik på 10% eller mindre. Forrige avsnitt konkluderte med at det var hensiktsmessig å benytte NaOH og HCl ved 4,0 M. Dette forsøket viser at det er fordelaktig å tilsette mer HCl enn NaOH. Ut fra resultatene anbefales det å tilsette 150 µL 4,3 M HCl etter at hydrolysen er utført.

4.1.4 Optimalisering av temperatur og tid for hydrolyse

En annen faktor som kan påvirke hydrolysen er temperaturen. Hydrolysen starter når NaOH blir tilsatt, og avsluttes ikke før HCl blir tilsatt, men reaksjonen går raskere ved høyere temperaturer. I dette forsøket testes fire ulike hydrolysemetoder. Det er opparbeidet fem replikater for hver metode. Toksinkonsentrasjonene som ble bestemt i forsøket er vist i tabell 4.4.

Tabell 4.4: Toksinkonsentrasjon målt ved forsøk med ulike metoder for hydrolyse. Konsentrasjonen av DTX-3-toksiner er oppgitt i µg toksin/kg skjellmat (S). Hver av metodene er utført i 5 replikater (n = 5). Romtemperaturen ved utførelse av forsøket var 21 °C.

Metodenavn	DTX-3 fra OA	RSD	DTX-3 fra DTX-1	RSD	Total DTX-3	RSD
	[µg/kg S]	[%]	[µg/kg S]	[%]	[µg/kg S]	[%]
76 45	361	28	615	46	976	39
76 40	313	21	494	29	808	25
37 45	270	6	452	5	722	3
21 60	120	16	53	305	173	104

De ulike metodene for hydrolyse gir forskjellig konsentrasjon av toksiner etter hydrolyse. Metoden utført ved 21 °C i 60 minutter, 21 60, kan ikke benyttes til å bestemme konsentrasjon av DTX-3 i skjellmateriale. 21 60 ga den laveste bestemte konsentrasjonen av DTX-3 fra OA og DTX-3 fra DTX-1. Det relative standardavviket for metoden er 104%, og vitner om en lite

velfungerende metode. Romtemperatur er en vanskelig faktor å forholde seg til, da den varierer fra laboratorium til laboratorium. Hvis en reaksjon skal foregå ved romtemperatur bør den være repeterbar ved fra 15°C til 25°C. Det er ikke tilfellet for denne reaksjonen.

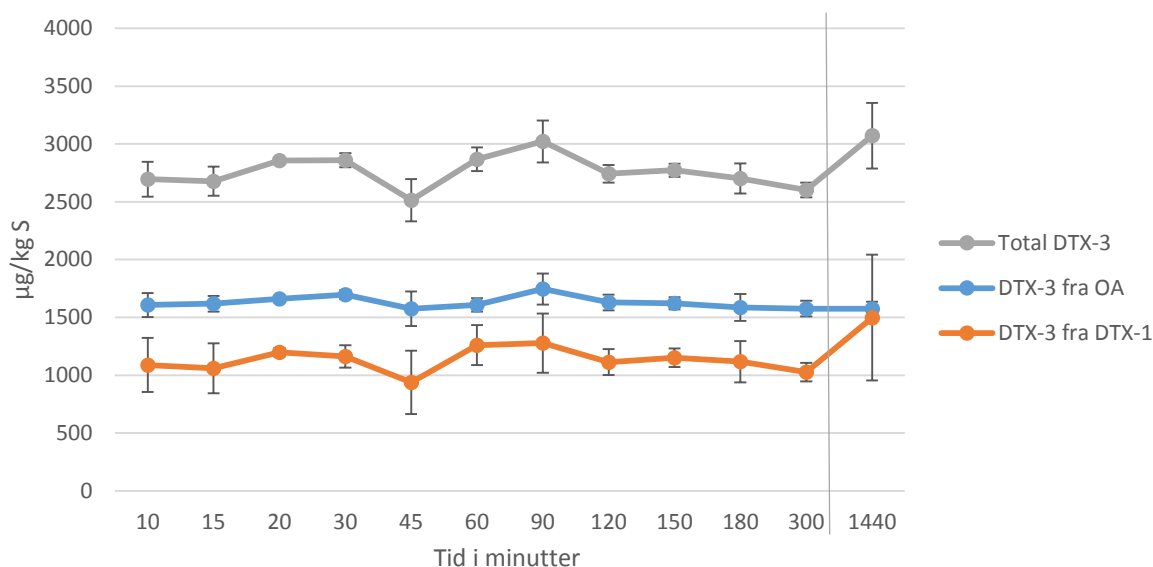
Metodene 76 40 og 76 45 skilles kun ved de siste fem minuttene med oppvarming. Forventningen til de to forsøkene er at analyse etter hydrolyse gir samme konsentrasjon av DTX-3-toksiner. Det stemmer overens med resultatene. Med metode 76 45 bestemmes en gjennomsnittlig høyere konsentrasjon av toksiner, men på grunnlag av standardavvik på 25 og 39% for metodene, er ikke dette en signifikant forskjell.

Metode 37 45, utført ved 37 °C i 45 minutter, skiller seg fra de andre metodene ved at det relative standardavviket for metoden er signifikant lavere. Gjennomsnittlig analysert konsentrasjon er lavere enn for metodene utført ved 76 °C, men høyere enn for metoden utført ved romtemperatur.

Når de fire metodene sees i sammenheng er 21 60 utelukket å benytte, da de andre fungerer bedre. Det kan virke som at metodene utført ved 76 °C innebærer en for kraftig oppvarming, noe som fører til variasjon i hvilken konsentrasjon DTX-3 som bestemmes. Hva som er årsaken til dette er vanskelig å si, men relative standardavvik over 25% kan tyde på at metodene ikke er optimale. Metode 37 45 gir et relativt standardavvik på 3%. Hydrolysen gir lavere resultater enn 76 40 og 76 45, noe som kan tyde på at ikke alle toksinene er blitt hydrolysert ved bruk av 37 45. En videre undersøkelse med variasjoner fra 45 – 60 minutter, og temperaturer opp mot 40 – 50 °C anbefales, for å finne en hydrolysemetode med fullstendig gjennomført hydrolyse, og lavere standardavvik enn den metoden som benyttes i dag. Ved videre testing av temperatur og tid anbefales det å benytte de optimaliserte parameterne bestemt i denne oppgaven.

4.1.5 Optimalisering av tid for avkjøling før HCl tilsettes

Etter at hydrolyse er gjennomført ved 76 °C avkjøles prøvene før HCl tilsettes. Dette gjøres for å redusere avdamping av metanol, samt at det er lite hensiktsmessig å håndtere varme prøver. Ingen av hydrolysemetodene som ble sammenlignet oppgir noen tidsbegrensning for avkjølingen. For å teste effekten av å vente med tilsetning av HCl og om prøvene blir stående over natten ble det valgt å utføre et forsøk hvor tiden før tilsetning av HCl varieres mellom 10 og 1440 minutter. Resultatene for dette forsøket er fremstilt i figur 4.1.



Figur 4.1: Konsentrasjon av DTX-3-toksiner, μg toksin/kg skjellmat (S), bestemt ved hydrolyse hvor tiden før det ble tilsatt HCl varierer. Hver variabel ble målt i tre replikater ($n=3$), med unntak av målingen ved 1440 minutter, som ble utført i seks replikater ($n=6$). X-aksen er ikke proporsjonal med tiden som har gått. Tidsskillet mellom 300 og 1440 minutter er markert i figuren. Resultatene er oppgitt i tabellform i vedlegg 2.

Det var forventet en økende eller synkende trend hvis tiden for tilsetning av HCl påvirker hydrolysen. En økende trend kan bety at en større del av toksinene blir hydrolysert etter hvert som prøven får stå. En synkende trend kan bety at overvekten av base fører til for eksempel en ukjent nedbrytning av toksinene hvis prøven ikke nøytraliseres. Resultatene viser ingen signifikant trend over det tidsintervallet som er undersøkt. Det er ingen signifikant variasjon med hensyn på konsentrasjonen av DTX-3 som bestemmes etter hydrolyse når prøven får stå før HCl tilsettes. Resultatene i figur 4.1 viser at standardavviket for konsentrasjon av total DTX-3 er høyere for HCl tilsatt etter 10 og 15 minutter enn for 20 og 30 minutter. Dette kan skyldes at prøvene ikke er blitt tilstrekkelig avkjølt, slik at metanol i enkelte av prøvene har dampet bort. Resultatene for målinger ved 45 minutter er de laveste, og har høyt standardavvik, uten at det er noen klar årsak til dette. Resultatet for målinger etter 24 timer har et høyt standardavvik på tross av flere replikater, og vitner om at det ikke er gunstig å la prøvene stå over natten uten å tilsette HCl. Da analysemetoden bør være så effektiv og tidsbesparende som mulig anbefales det å la prøvene stå i 20 til 30 minutter før tilsetning av HCl. Et annet alternativ er å kjøle ned prøvene ved bruk av isbad, slik at nedkjølingen går raskere.

4.1.6 Kontroll av muligheten for tap av metanol ved oppvarming

Når resultatene fra analyse etter hydrolyse beregnes om fra ng/mL til µg toksin/kg skjellmat tas det hensyn til at prøven blir tilsatt 150 µL NaOH og 150 µL HCl. Hvis oppvarming av prøvene ved hydrolyse fører til fordampning av metanol, vil dette kunne føre til en overestimering av konsentrasjonen av toksiner i en prøve fordi volumet i prøven er mindre enn antatt. Metanol har et kokepunkt på 64,7 °C, og vil derfor dampe av hvis ikke reagensrøret og korken er tett når prøven har en temperatur på 76 °C. Det ble derfor etablert et gravimetrisk forsøk for å sjekke i hvilken grad avdampning av metanol forekommer ved hydrolyse. Det forventes at endringen i vekt før og etter hydrolyse skal være omtrent 0.

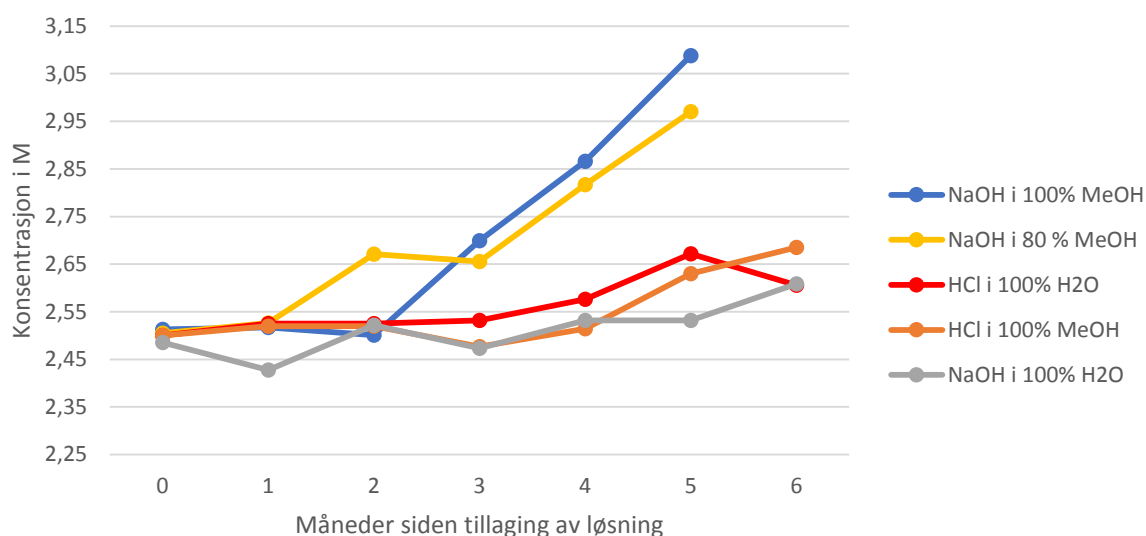
Resultatene fra forsøket viser at gjennomsnittlig vektendring for prøvene er 0,16%. 39 prøver har tap av vekt som er større enn 0,16%. Av disse har ni prøver et tap som er større enn 0,50%. Det største tapet er på 1,44%. Når reagensrøret inneholder 1,35 mL væske, vil et væsketap på 1,44% tilsvare 0,019 mL. Fordampning av metanol under hydrolyse i vannbad antas å være neglisjerbar.

4.1.7 Holdbarhet for løsninger av NaOH og HCl

Holdbarheten til løsningene med NaOH og HCl som benyttes til hydrolyse, er i M-AL 10 oppgitt til seks måneder. EU-RL-MBs referansemetode oppgir holdbarheten for løsningene til tre måneder (EU-RL-MB, 2011). Algelaboratoriet har opplevd uventede resultater ved analyse av konsentrasjonen av DTX-3 i kontrollprøver, noe som blir forbedret når løsningen med HCl lages på nytt. Derfor ble det utført en test av holdbarhet til løsningene NaOH i H₂O, 80% metanol i H₂O og i metanol, og HCl løst i H₂O og i metanol.

Løsningen med NaOH i 80% metanol i H₂O og NaOH i metanol blir blakket. Det dannes hvite partikler i løsningen, som mest sannsynlig er uløst NaOH. Når løsningene skal føres gjennom byretten, samles partiklene i bunnen og resulterer i at løsningen ikke kommer ut. Dette gjør det vanskelig å måle konsentrasjonen til disse løsningene. Ved å la løsningene stå i ro før titrering, og unngå å ta opp nedre del av væsken med uløst NaOH ble bestemmelse mulig. Det ble for lite væske igjen til å måle konsentrasjonen den sjette måneden og holdbarheten blir kun testet over fem måneder for disse løsningene. Endringen i konsentrasjonen for alle løsningene er illustrert i figur 4.2. Forventningene for forsøket er at løsningene som inneholder metanol i større grad vil oppnå økt konsentrasjon i løpet av seks måneder, fordi metanol er mer flyktig

enn H₂O ved romtemperatur. Optimalt vil graden av fordampning være liten, slik at løsningene kan benyttes i seks måneder før de må byttes ut.



Figur 4.2: Konsentrasjonen til to løsninger med HCl og tre løsninger med NaOH over seks måneder, bestemt ved titrering ($n=1$). Første konsentrasjon, 0, er beregnet teoretisk konsentrasjon i løsningen. NaOH i 100% metanol og i 80% metanol ble ikke bestemt ved sjette måling på grunn av mangel på løsning. Y-aksen til figuren er forstørret slik at endringene kommer godt frem, og begynner ikke på 0. Målingene er oppgitt i tabellform i vedlegg 2.

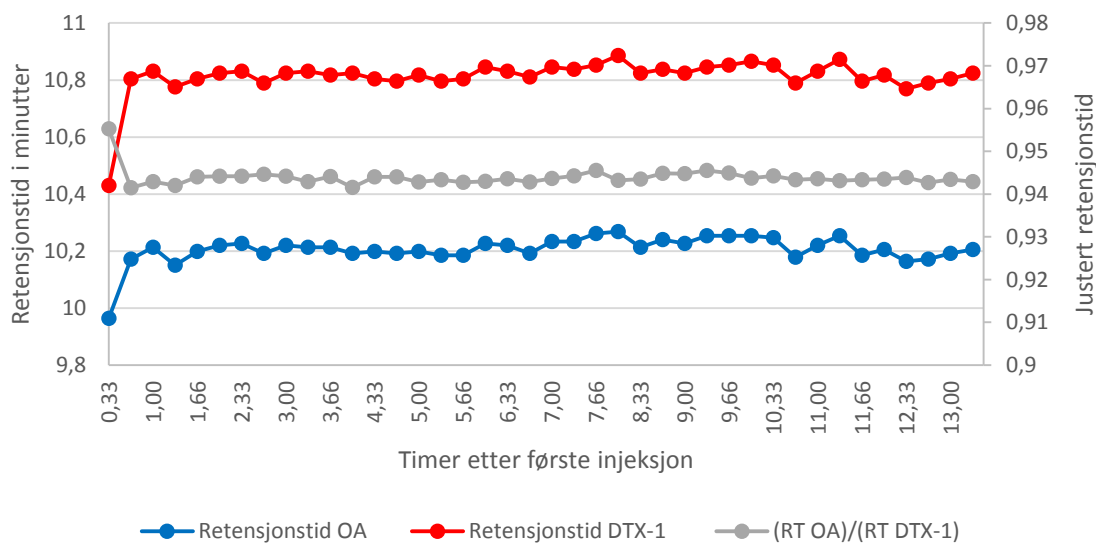
To løsninger oppnådde resultater nær det som var forventet. Konsentrasjonen til HCl i H₂O og HCl i metanol holder seg jevn de første tre månedene, og øker etter dette. Konsentrasjonen til NaOH i H₂O øker og synker om hverandre. Endringene i konsentrasjonen er små, men øker jevnt. Dette kan skyldes usikkerheten ved den manuelle titreringen, men dersom dette er tilfellet burde samme trend vært synlig i de andre løsningene. De tre løsningene diskutert over, HCl i H₂O, HCl i metanol og NaOH i H₂O, kan benyttes de første tre månedene uten fare for endring av konsentrasjonen. Etter dette kan konsentrasjon ha økt, og nye løsninger bør lages.

Det er målt stabil konsentrasjon for NaOH i metanol i to måneder, mens NaOH i 80% metanol i H₂O kun virker stabil i én måned. Deretter bør disse løsningene lages på nytt. Konsentrasjonen i løsningene har en jevnt økende konsentrasjon etter henholdsvis to og én måned, og det kan være vanskelig å vite konsentrasjonen i løsningene. Hvis disse løsningene benyttes i forsøkene bør de lages nye hver måned, og de egner seg derfor dårlig til bruk i rutineanalyser.

4.1.8 Endring i areal og retensjonstid

For å vurdere hvordan arealet og retensjonstiden til toksinene endres over tid, ble dette testet ved en rekke injeksjonsreplikater. Det ble ikke analysert kalibreringsløsninger, fordi det vil forstyrre tidsoversikten for testingen. Prøvematerialet har ikke vært hydrolysert. LC-MS/MS-systemet fikk cirka 45 minutter til stabilisering før oppstart.

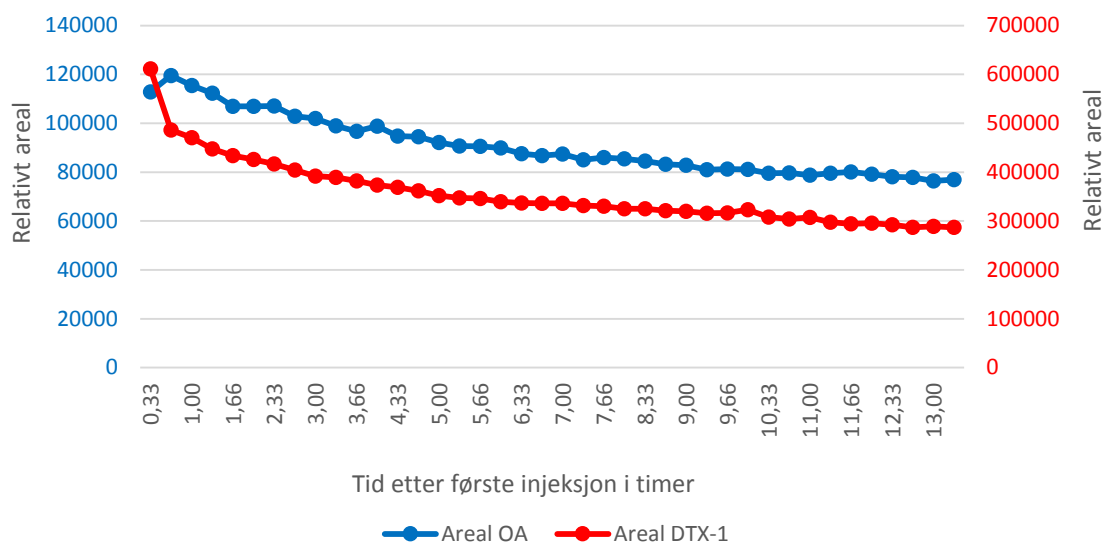
Variasjonen i retensjonstidene i løpet av 40 injeksjoner av samme skjellmateriale er vist i figur 4.3. Retensjonstiden til OA og DTX-1 har et relativt standardavvik på henholdsvis 0,48 og 0,62%. I første injeksjon kommer toppene ut signifikant tidligere. Variasjonen i resten av injeksjonsreplikatene er tilfeldig. Forskjellen i retensjonstid for OA og DTX-1 ble vurdert ved å beregne justert retensjonstid. Forholdet mellom retensjonstiden til toppene ble funnet ved å beregne $(RT-OA) / (RT-DTX-1)$ for alle injeksjonsreplikatene. Resultatene for justert retensjonstid er også fremstilt i figur 4.3. Relativt standardavviket for justert retensjonstid var 0,22%. Kun første injeksjon er signifikant forskjellig fra resten av injeksjonsreplikatene.



Figur 4.3: Variasjon i retensjonstiden (RT) for OA i blått og DTX-1 i rødt bestemt ved 40 injeksjonsparalleller og følger venstre Y-akse. Justert retensjonstid er vist i grått og er forholdet mellom retensjonstiden til OA og DTX-1. Justert retensjonstid ble beregnet som $(RT-OA)/(RT-DTX-1)$, og følger høyre Y-akse.

Figur 4.4 viser endring i arealene som ble målt etter oppstart av analyse. OA oppnår et areal som er $\frac{3}{4}$ av første injeksjon i løpet av de første seks timene, og DTX-1 oppnår et areal som er omtrent halvparten av første injeksjon på den samme tiden. Reduksjonen i areal er tydelig de første 4 timene, og synker etter dette, men i mindre grad tidligere. Dette har konsekvenser for analysene, spesielt når ikke-hydrolyserte prøver analyseres i den første halvdel av kjøringen,

og hydrolyserte prøver analyseres i andre halvdel av kjøringen. Når samme kalibreringskurve benyttes for alle prøvene vil dette føre til en overestimering av de ikke-hydrolyserte prøvene, og en underestimering av de hydrolyserte prøvene. Det vil i enkelte tilfeller gi negative resultater for hydrolysen.



Figur 4.4: Endring i areal for OA i blått og DTX-1 i rødt bestemt ved 40 injeksjoner av toksisk skjellmateriale fra samme prøveglass. Den høyre Y-aksen viser intensitet for det relative arealet til kromatografisk topp for OA, og den venstre Y-aksen viser intensitet for det relative arealet til kromatografisk topp for DTX-1.

For å fjerne den overnevnte effekten i systemet, fikk LC-MS/MS-systemet alltid minimum to timer kondisjonering før analysene ble startet opp med ti injeksjoner av skjellmateriale, hvor resultatene ikke blir benyttet videre. Dette er ikke en perfekt korreksjon som fjerner påvirkningen av variasjonen, men på grunn av begrenset tid ble dette ansett som beste midlertidige løsning.

I tillegg til å finne ut hvorfor dette forekommer, bør analysene beskyttes mot effekten. Det forslås å gi systemet god tid til kondisjonering og utføre mange injeksjoner av toksisk skjellmateriale før oppstart av analyse, gjerne mellom 10 og 20. En annen endring vil være å analysere uhydrolysert og hydrolysert skjellmateriale fra samme prøve rett etter hverandre. Ved å kontrollere kalibreringskurven nøye, og eventuelt benytte bracketing vil bestemmelsen av OA-gruppetoksinene bli mer nøyaktig. Bracketing kalibrerer konsentrasjonen til en prøve kun utfra kalibreringsløsningene som analyseres rett før og rett etter prøven. Et annet alternativ er å vurdere bruk av internstandard som kontroll av den kvantitative analysen.

4.1.9 Oppsummering: Optimal metode for kvantitativ bestemmelse av OA-gruppetoksiner

Studiene utført i dette arbeidet har resultert i optimale parametere, hvor ikke alle stemmer overens med parameterne til M-AL 10-metoden. Ved å endre hydrolysen kan det bli mulig å oppnå mer presise og nøyaktige resultater for kvantitativ analyse av DTX-3. Noen av faktorene ved M-AL 10-metoden var allerede tilpasset de optimale forholdene. Følgende endringer foreslås. Konsentrasjonen til NaOH-løsningen bør økes til 4,0 M for å sikre hydrolyse av alle toksiner i prøvene. Konsentrasjonen til HCl-løsningen som tilsettes bør økes til 4,25 M fordi et lite overskudd av HCl kan gi et høyere utbytte av hydrolysen. Ved å velge at HCl skal tilsettes mellom 20 og 30 minutter etter at hydrolysen er fullført forhindres avdamping av metanol. Løsningene med NaOH og HCl som benyttes til hydrolysen bør lages nye hver tredje måned, eller oftere.

Den største endringen er forslaget om en mildere hydrolyse. Det var ikke forutsett at den lavere temperaturen skulle virke mer optimal, derfor er det ikke gjort videre forsøk for å øke utbytte av hydrolysen ved 37 °C. En videre test av dette, hvor temperaturen testes fra 40 – 50 °C, eller tiden økes fra 45 til 60 minutter, for å optimalisere metoden anbefales. Den opprinnelige metoden, M-AL 10, og den foreslåtte metoden er oppsummert i tabell 4.5.

*Tabell 4.5: Oppsummering av M-AL 10-metode, og optimalisert metode. Parametere som bør endres er merket i fet skrift. Parameterne merket med * er ikke ferdig optimalisert.*

	M-AL 10	Forslag
Løsemiddel NaOH	100% H ₂ O	100% H ₂ O
Løsemiddel HCl	100% metanol	100% metanol
Volum NaOH	150 µL	150 µL
Konsentrasjon NaOH	2,5 M	4,0 M
Volum HCl	150 µL	150 µL
Konsentrasjon HCl	2,5 M	4,25 M
Vannbad	76 °C	37 °C *
Tid for hydrolyse	45 minutter	45 minutter *
Tid før tilsatt HCl	Ukjent	20-30 minutter
Utstyr til hydrolyse	PP-rør med skrukork	PP-rør med skrukork
Holdbarhet NaOH	6 måneder	3 måneder
Holdbarhet HCl	6 måneder	3 måneder

4.1.10 Problem med hydrolyse av DTX-3-toksiner

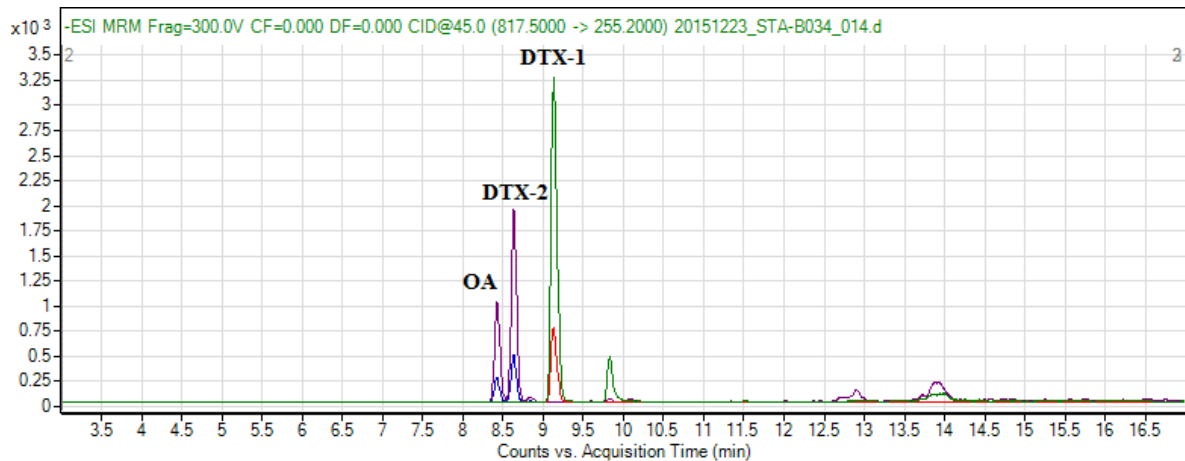
Som tidligere nevnt har Algelaboratoriet opplevd at hydrolyse av OA-gruppetoksinene gir negative resultater for konsentrasjon av DTX-3. Det skyldes at den kvantitative analysen av OA, DTX-1 og DTX-2 gir en lavere toksinkonsentrasjon etter hydrolyse enn før hydrolyse. I løpet av denne oppgaven er det utført flere undersøkelser for å finne ut av problemet. Fenomenet oppstår ikke konsekvent i en prøve, da en prøve som inneholder flere av toksinene kun får negativ verdi for en av dem. Det er heller ikke slik at alle prøver som analyseres samtidig får negative verdier. Det er ingen av forsøkene utført i denne oppgaven som konsekvent har gitt negative resultater for en eller flere av toksingruppene.

En mulig forklaring på problemet kan være den endringen av signal som skjer etter oppstart av en analyse. Det er likevel ikke helt enstydig at dette er årsaken. Selv om det ble gjort ti injeksjoner av skjellmateriale før analysene startet opp, og systemet fikk tid til å kondisjoneres, oppstod problemet fortsatt. Ut i fra funnene i denne oppgaven anbefales det å innføre en rutine på å injisere uhydrolysert og hydrolysert prøve fra samme materiale rett etter hverandre, og eventuelt vurdere å benytte internstandard for kvantitativ kontroll.

En faktor som gjør vurderingen av dette problemet enda vanskeligere er at den kvantitative analysen av DTX-3 ved hydrolyse har et relativt standardavvik på 63% på Algelaboratoriet. En sjekk av hvilke type prøver som har oppnådd negative verdier tidligere, viser at det er DTX-1 og DTX-2 som oftest bestemmes til negative verdier. Det forekommer for OA, men da inneholder prøvene lave konsentrasjoner av OA og DTX-3 fra OA. Ved å optimalisere hydrolysen og kondisjonere LC-MS/MS-instrumentet med prøvemateriale, i tillegg til å injisere prøver som skal brukes i samme utregning rett etter hverandre, kan problemet reduseres. Det kan ikke trekkes noen konklusjoner om hvorfor det noen ganger oppnås negative verdier for beregning av DTX-3, annet enn at metoden er lite robust.

4.1.11 Kvantitativ analyse av OA, DTX-1, DTX-2 og DTX-3 i skjell

Prøver av toksiske og ikke-toksiske blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers ble analysert. Konsentrasjonen ble bestemt før og etter hydrolyse for OA, DTX-1, DTX-2. Ut fra dette ble konsentrasjon av DTX-3 beregnet. Oversikt over konsentrasjon av OA-gruppetoksinene for alle prøvene er tilgjengelig i vedlegg 3. Et typisk kromatogram for analyse av OA-gruppetoksinene er vist i figur 4.5.



Figur 4.5: Kromatogram for injeksjon av toksisk skjellmateriale, analysert ved LC-MS/MS med MRM. Prøven inneholder OA, DTX-1 og DTX-2. Signal ved 8,4 min er deteksjon av OA og signal ved 8,6 min er deteksjon av DTX-2. Disse toksinene har samme masse. Masseovergangene vist i lilla og blått må være tilstede for deteksjon. Signal ved 9,1 min er deteksjon av DTX-1, med masseoverganger i grønt og rødt.

Den kvantitative analysen er gjort i henhold til M-AL 10-metoden. Den eneste endringen er at NaOH og HCl benyttet under hydrolysen ble løst i H₂O. Dette er i henhold til den EU-godkjente metoden beskrevet i EU-RL-MB (2011). M-AL 10-metoden har en nedre kvantifiseringsgrense på 20 µg toksin/kg skjellmat for total konsentrasjon av toksiner bestemt i OA-ekvivalent. For denne analysen er alle resultatene notert til den konsentrasjonen som ble bestemt, av interesse for videre diskusjon, men det er viktig å være oppmerksom på kvantifiseringsgrensen. I denne oppgaven beregnes ikke OA-ekvivalent, og det er mye informasjon som ville gått tapt dersom alle verdier under 20 µg/kg skjellmat blir behandlet likt.

Alle prøvene som ble valgt ut som ikke-toksiske prøver av hver art inneholdt mindre enn 20 µg toksin/kg skjellmat totalt. Også én av de toksiske kamskjellprøvene, *K-1206 Fluarholmen*, ble bestemt til mindre enn 20 µg/kg skjellmat. Et generelt problem med utvalg av kamskjellprøver var at det var få tilgjengelige prøver som inneholdt OA-gruppetoksiner. Denne prøven ble bestemt til mer enn 20 µg/kg skjellmat DTX-2-toksiner av Algelaboratoriet for fire år siden. Det kan se ut som at toksinene kan brytes ned over tid, selv om skjellmateriale oppbevares ved -20 °C. Det er vanskelig å vite hvor lang tid nedbrytningen tar, dermed kan prøvene kun behandles ut fra toksinkonsentrasjonene bestemt i denne oppgaven.

Andel DTX-3 fra OA, DTX-1 og DTX-2 i toksiske blåskjell

Tabell 4.6 viser de blåskjellene med en samlet konsentrasjon av toksiner over 100 µg/kg skjellmat, med hensyn på andel DTX-3 for toksinene. Sammenligningen viser en forskjell i andelen DTX-3 for OA og DTX-2. DTX-3 fra OA utgjør gjennomsnittlig 43% av OA-toksinene, mens DTX-3 fra DTX-2 utgjør gjennomsnittlig 12% av DTX-2-toksinene. Få av blåskjellene inneholdt DTX-1, og den eneste prøven som inneholdt DTX-3 fra DTX-1 inneholdt 4%. Den ulike fordelingen av OA, DTX-1 og DTX-2 i prøvene gir variasjon i andelen total DTX-3, som ender opp mellom 2 og 47%, med et gjennomsnitt på 19%.

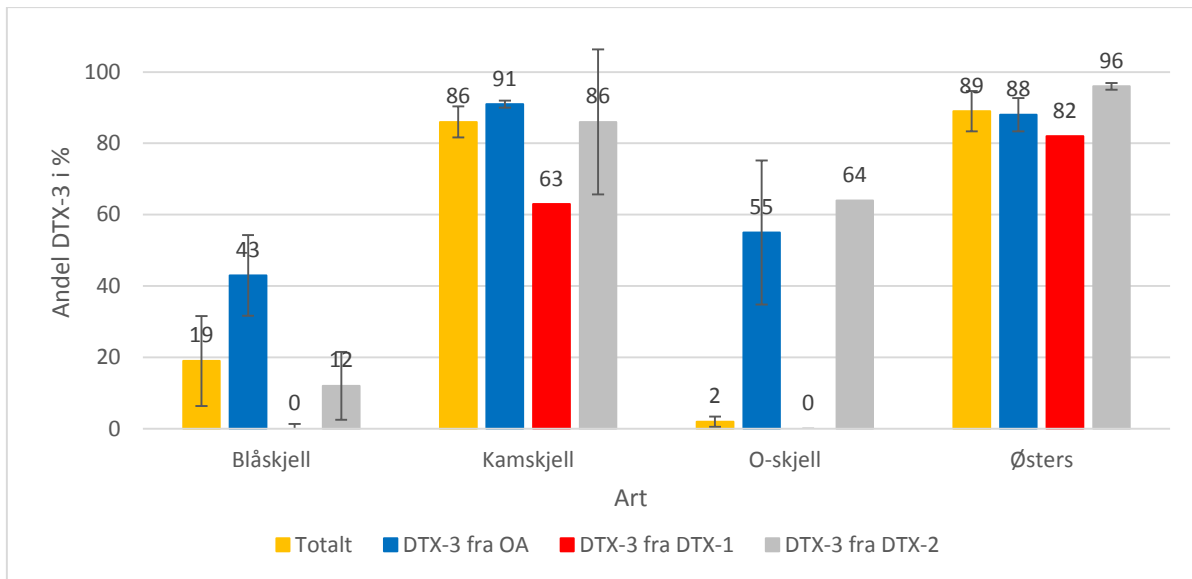
*Tabell 4.6: Blåskjellprøver med total toksinkonsentrasjon over 100 µg toksin/kg skjellmat, med gjennomsnitt. Tabellen viser andelen DTX-3-toksiner, både total DTX-3-konsentrasjon og fordelt på OA, DTX-1 og DTX-2. *For beregning av gjennomsnittet til DTX-3 fra DTX-2 for B-1423 Viganeset fjernet. Den er bestemt til å inneholde 1 µg DTX-3/kg skjellmat, noe som utgjør 100 % av DTX-2-toksinene i prøven. Dette trekker gjennomsnittet for andelen DTX-3 av DTX-2 for mye opp i forhold til at det representerer 1 µg/kg skjellmat. En prøve som ikke inneholder en toksingruppe er merket «I.D» for ikke detektert. Til forskjell vil prøvene med andel DTX-3 på 0, inneholde kun OA, DTX-1 eller DTX-2, og ikke DTX-3 av disse.*

Prøve	DTX-3 fra OA	DTX-3 fra DTX-1	DTX-3 fra DTX-2	Totalt
	[%]	[%]	[%]	[%]
B-1538 Flødevigen	55	0	3	47
B-1540 Flødevigen	28	0	11	22
B-1542 Flødevigen	41	0	9	25
B-1544 Flødevigen	42	0	9	17
B-1546 Flødevigen	45	0	17	19
B-1548 Flødevigen	33	I.D	0	4
B-1550 Flødevigen	48	I.D	20	23
B-1443 Rundhaugen	57	4	I.D	18
B-1437 Kaldvellfjorden	44	0	33	2
B-1544 Langholmen	51	I.D	8	21
B-1543 Langholmen	49	I.D	10	24
B-1423 Viganeset	19	0	100*	2
Gjennomsnitt	43	0	12	19

Sammenligning av toksininhold i de forskjellige skjellartene

Andelen DTX-3 ble beregnet for OA, DTX-1 og DTX-2, og sammenlignet i blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers, se figur 4.6. Konsentrasjonen av toksiner kan variere, også innenfor samme art. Derfor ble det laget et gjennomsnitt for andelen DTX-3 i hver art. Hvert gjennomsnitt ble beregnet ut fra to toksiske prøver for kamskjell og O-skjell, tre prøver for østers, og tolv prøver for blåskjell. For blåskjellene ble de syv mest toksiske prøvene fra Flødevigen valgt ut, i tillegg til fem prøver fra fire andre lokaliteter. De resterende

blåskjellprøvene fra Flødevigen inneholder totalt under 100 µg toksin/kg skjellmat og ansees ikke å være representative for toksiske blåskjell. For kamskjell, O-skjell og østers er alle prøver med bestemt toksinkonsentrasjon tatt med ved beregning av gjennomsnittet.



Figur 4.6: Grafisk fremstilling av andelen toksiner som er DTX-3 i fire arter: blåskjell (n=12), kamskjell (n=2), O-skjell (n=2) og østers (n=3), med standardavvik. For beregning av gjennomsnittet til DTX-3 fra DTX-2 for blåskjell er en prøve fjernet. Den er bestemt til å inneholde 1 µg DTX-3/kg skjellmat, noe som utgjør 100% av DTX-2-toksinene i prøven. Dette trekker gjennomsnittet for andelen DTX-3 av DTX-2 for mye opp i forhold til at det representerer 1 µg/kg skjellmat. Barene i figuren som ikke har standardavvik har kun fått bestemt prosentandel i en prøve. Andelen DTX-3 fra OA, DTX-1 og DTX-2 er vist hver for seg, i tillegg til andelen DTX-3 samlet for de tre toksinene. Figuren sier ingenting om konsentrasjon av toksiner i hver art, kun andelen DTX-3. Andelen er beregnet ut fra et gjennomsnitt av flere toksiske prøver fra samme art.

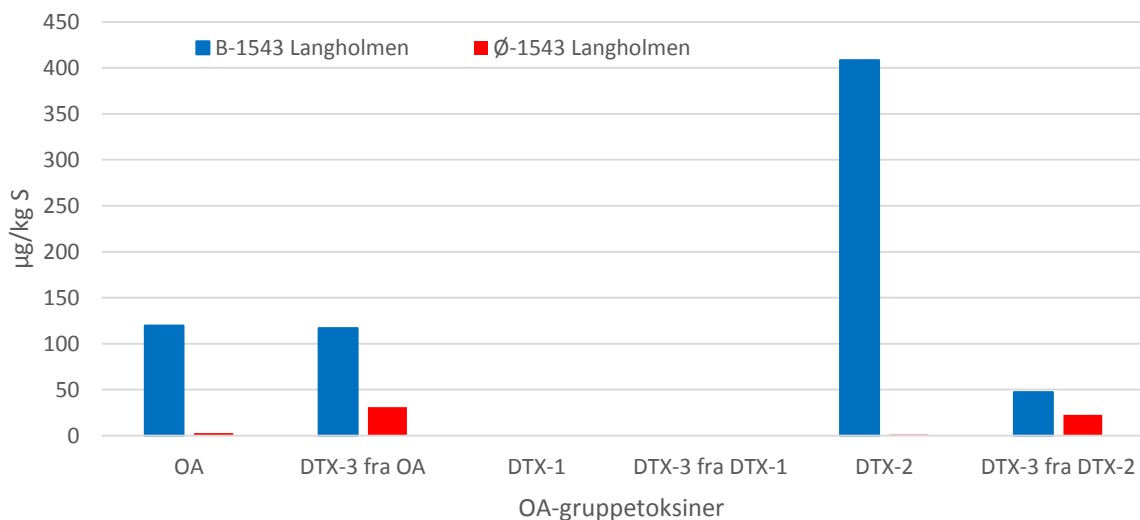
Ut fra tallene i figur 4.6 er det forskjeller i hvor stor andel av toksinene som består av DTX-3. Blåskjell inneholder en andel på 19% DTX-3 totalt, med et standardavvik på 13%. Andelen DTX-3 i blåskjell ble diskutert i forrige avsnitt. Den bestemte andelen DTX-3 stemmer godt overens med tidligere funn for blåskjell (Losada *et al.*, 1999; Torgersen *et al.*, 2008c). De analyserte O-skjellene inneholder OA og DTX-2, og DTX-3 fra disse to toksinene, men i konsentrasjoner under 20 µg toksin/kg skjellmat. Konsentrasjonen til DTX-1 er større i O-skjellene, men det ble ikke funnet DTX-3 fra DTX-1. Dette gir en totalandel DTX-3 som er veldig liten, selv om andelen DTX-3 fra OA og DTX-2 er over halvparten. Kamskjell og østers har større andeler DTX-3 enn blåskjell og O-skjell. Dette stemmer godt overens med tidligere funn for kamskjell og østers, som viser at den største andelen av toksinene er i form av DTX-3

(Lindegarth *et al.*, 2009; Madigan *et al.*, 2006; Suzuki & Mitsuya, 2001). Dette gjelder for alle de tre gruppene DTX-3-toksiner.

Sammenligning av ulike arter fra samme lokalitet

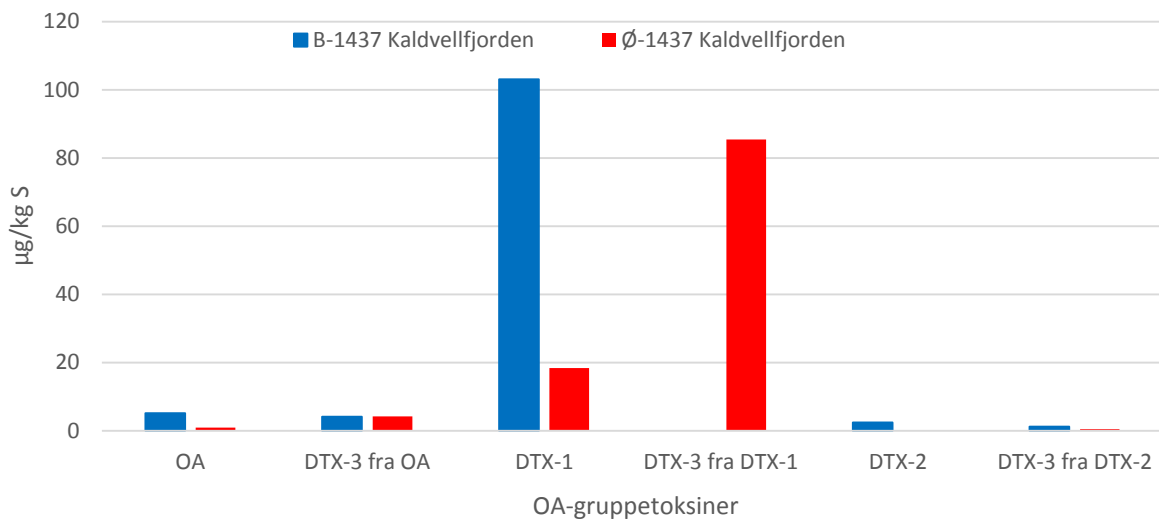
Noen av prøvene som er analysert består av ulike arter tatt opp fra samme sted, til samme tid. Ved å sammenligne disse prøvene kan hvordan toksiske alger påvirker ulike typer skjell vurderes. En sammenligning av blåskjell og østers fra Langholmen er gjort i figur 4.7, og fra Kaldvellfjorden i figur 4.8. Figur 4.9 sammenligner blåskjell og O-skjell fra Viganeset. Skjell fra samme sted har sannsynligvis tilgang på samme mengde og type alger, både toksiske og ikke-toksiske.

Figur 4.7 viser to forskjellige toksiske profiler i de to skjellartene. Blåskjellene inneholder OA og DTX-2, men det ble kun detektert 3 µg OA/kg skjellmat, og 1 µg DTX-2/kg skjellmat i østersene. Begge artene inneholder DTX-3 fra OA og DTX-2, men det er mer av begge i blåskjellene. Østersene kan ha omdannet alle inntatte toksiner fordi de har lettere for å omdanne disse til mindre toksisk DTX-3. Tidligere har det blitt vist at østers påvirkes mindre av OA-gruppetoksiner, og det er mulig østers har en evne til å filtrere bort toksiske alger, i tillegg til raskere å bearbeide toksinene de utsettes for (Lindegarth *et al.*, 2009).



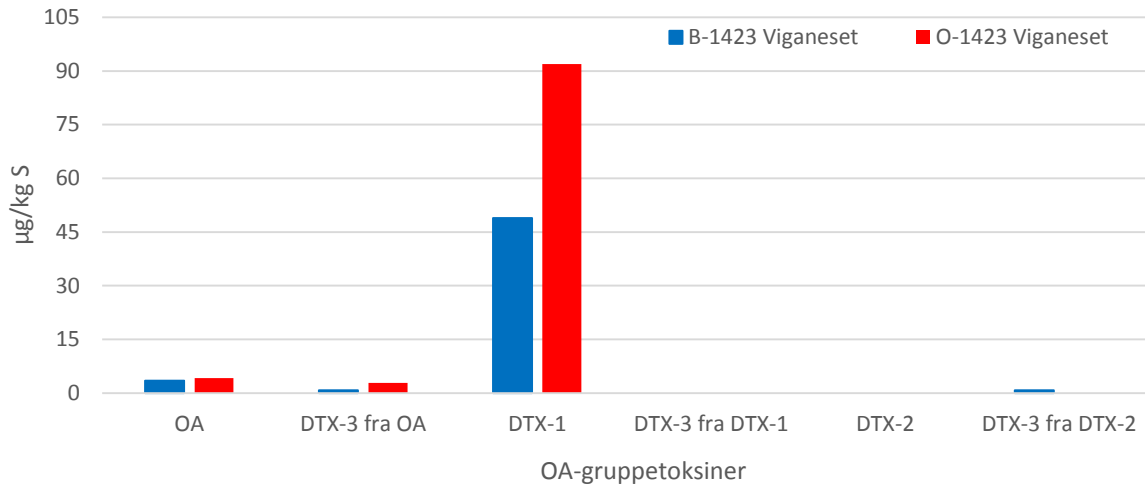
Figur 4.7: Sammenligning av toksinkonsentrasjon i blåskjell og østers fra Langholmen (n=1). Prøvene er tatt opp i uke 43 2015. Konsentrasjon til toksinene er oppgitt i µg toksin/kg skjellmat.

Figur 4.8 viser en sammenligning av blåskjell og østers fra Kaldvellfjorden. Begge artene inneholder mindre enn 20 µg/kg skjellmat OA-toksiner og DTX-2-toksiner. Blåskjellene inneholder 103 µg/kg skjellmat DTX-1, men det er ikke funnet DTX-3 fra DTX-1. Østersene inneholder 85 µg DTX-3 fra DTX-1/kg skjellmat, i tillegg til 18 µg DTX-1/kg skjellmat. Figur 4.8 viser samme trend som figur 4.7, og bekrefter at østers påvirkes av toksinene i mindre grad enn blåskjell, og er raskere til å omdanne OA-gruppetoksiner til DTX-3. Figur 4.7 og 4.8 samlet viser at det samme gjelder for alle tre toksinene OA, DTX-1 og DTX-2.



Figur 4.8: Sammenligning av toksinkonsentrasjoner i blåskjell og østers fra Kaldvellfjorden (n=1). Prøvene er tatt opp uke 37 i 2014. Konsentrasjonen til toksinene er oppgitt i µg toksin/kg skjellmat.

Figur 4.9 sammenligner blåskjell og O-skjell fra Viganeset. Det har ikke lyktes å finne andre kilder som ser på DSP-toksiner i O-skjell, dermed er det interessant å se hvordan de påvirkes av OA-gruppetoksiner. Diskusjonen om O-skjell blir kun i forhold til blåskjellene funnet i samme område. Resultatene viser at O-skjell kan påvirkes av toksiner i større grad enn blåskjell. Både blåskjellene og O-skjellene inneholder mindre enn 20 µg toksin/kg skjellmat for OA-toksiner og DTX-2-toksiner. Blåskjellene inneholder 49 µg DTX-1/kg skjellmat. O-skjellene inneholder 92 µg DTX-1/kg skjellmat, nesten dobbelt så høy konsentrasjonen som i blåskjellene.



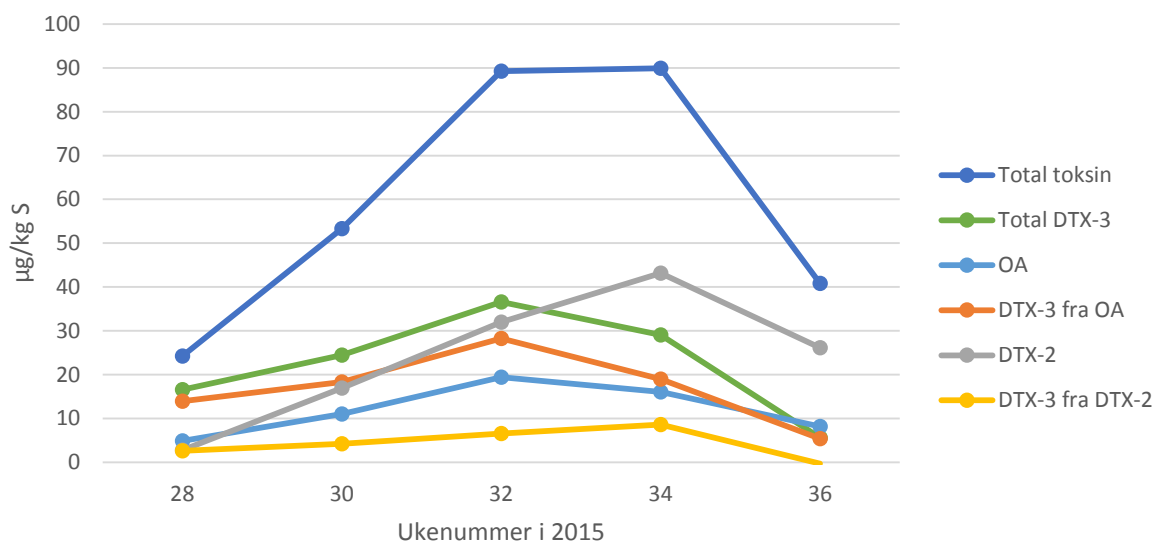
Figur 4.9: Sammenligning av konsentrasjon av toksiner i blåskjell og O-skjell fra Viganeset (n=1). Prøvene er tatt opp uke 23 i 2014. Konsentrasjonen er oppgitt i µg toksin/kg skjellmat.

O-skjellene som ble analysert er én av få O-skjellprøver som har blitt bestemt som toksiske på Algelaboratoriet. På grunn av de få toksiske prøvene Algelaboratoriet har mottatt er det lett å anta at faren for DSP-forgiftning fra O-skjell er liten. Det må likevel tas med i denne vurderingen at nesten alle O-skjellene som analyseres ved Algelaboratoriet kommer fra samme område. Det er en mulighet for at dette er et område som i liten grad utsettes for skadelig algeoppblomstring. Hvis det stemmer at O-skjell tar opp toksiner i større grad enn blåskjell, er dette viktig informasjon. Blåskjell og O-skjell er like av utseende, der den største variasjonen ligger i størrelsen til skjellene. Et stort blåskjell og et lite O-skjell kan være vanskelig å skille fra hverandre for et utrent øye. Det kan føre til at publikum som plukker blåskjell, kan få med seg O-skjell i tillegg til eller istedenfor blåskjell. Da kan de utsettes for DSP, selv om blåskjellene i området er analysert til konsentrasjoner under toksisk grenseverdi. En videre undersøkelse av toksisiteten til O-skjell bør derfor utføres.

Blåskjell fra Flødevigen

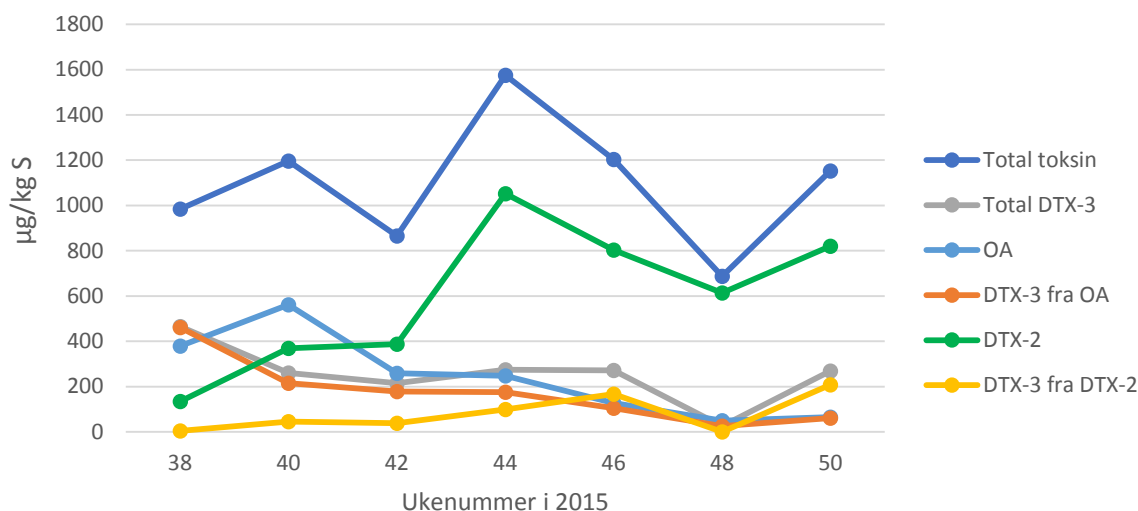
Ved å se på 12 blåskjellprøver som er tatt ut fra Flødevigen, kan endringer i toksisiteten studeres. Prøvene er bestemt til å inneholde OA og DTX-2, men ikke DTX-1. To ulike stadier er fremstilt i figurene 4.10 og 4.11. Figur 4.10 viser endringene i toksisiteten til blåskjellene før toksinkonsentrasjonen øker til over 1000 µg/kg skjellmat. Prøvene inneholder toksiner, men under den toksiske grensen for inntak av skjell (120 µg OA-ekvivalent/kg skjellmat). Målingene er ikke omregnet til OA-ekvivalent, men en OA-ekvivalent er mindre enn eller lik den totale

konsentrasjonen av toksiner, avhengig av hvor stor andel av toksinene som er DTX-2. Den totale toksinkonsentrasjonen fortsetter å være under 120 μg toksin/kg skjellmat i disse fem prøvene, med en økning i uke 32, og en tilsvarende nedgang i uke 36. Det blir mer av alle toksinene ettersom tiden går, noe som fører til at den totale toksinkonsentrasjonen blir tre ganger så stor. Konsentrasjonen av DTX-3 toksiner synker før den totale toksinkonsentrasjonen synker.



Figur 4.10: Endringen i konsentrasjon av OA, DTX-2 og DTX-3, i tillegg til total toksinkonsentrasjon før sistnevnte ble over 1000 μg toksin/kg skjellmat ($n=1$). Dataene er fra blåskjellprøver hentet opp ved Flødevigen i uke 28 – uke 36 i 2015.

Både figur 4.10 og 4.11 viser at prøvene inneholder høyere konsentrasjoner av DTX-2 enn OA. Det vil påvirkes av hvilke alger blåskjellene er utsatt for. Det er likevel mindre DTX-3 fra DTX-2, enn det er DTX-3 fra OA. Konsentrasjonen av DTX-3 fra DTX-2 ligger under 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ skjellmat fra uke 28 til uke 36, selv om konsentrasjonen av DTX-2 i prøvene både stiger og synker. Mønsteret for endringen av DTX-2 og DTX-3 fra DTX-2 endres omtrent samtidig, og det er tydelig at det dannes lite DTX-3 fra DTX-2. Dette kan skyldes at mekanismen for omdannelsen til DTX-3 opprinnelig ble laget for å omdanne OA, og at prosessen ikke fungerer like godt for DTX-2 på grunn av metylgruppens ulike posisjon i de to molekylene.

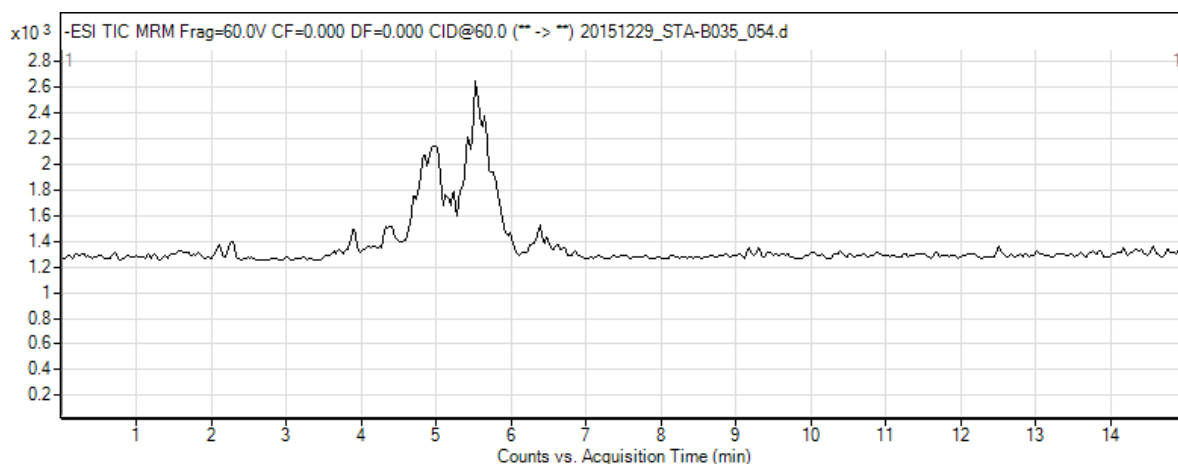


Figur 4.11: Endringen i konsentrasjon av OA, DTX-2 og DTX-3, i tillegg til total toksinkonsentrasjon etter at sistnevnte ble over 1000 µg toksin/kg skjellmat. Dataene er fra blåskjellprøver tatt opp fra Flødevigen i uke 38 – 50 i 2015.

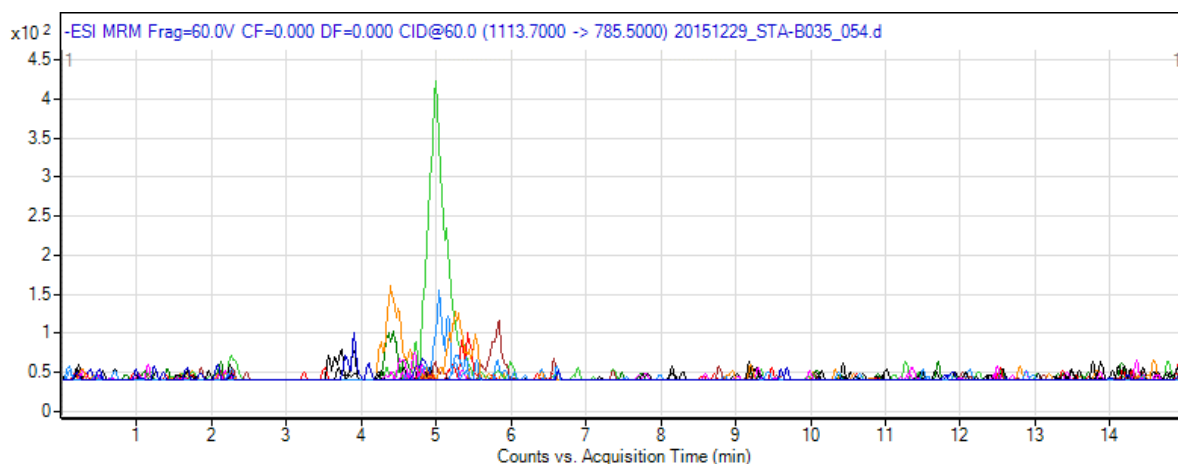
Figur 4.11 viser endringen fra uke 38 – 50, i den perioden hvor skjellene er giftige for mennesker. Til å begynne med er det mest OA og DTX-3 fra OA i skjellene, men fra uke 38 øker konsentrasjon av DTX-2, og erstatter OA som det toksinet med høyest konsentrasjon i uke 42. Det er DTX-2 som gir stigninger i total toksinkonsentrasjon i uke 44 og uke 50. Når konsentrasjon av OA og DTX-3 fra OA blir lav, øker konsentrasjon av DTX-3 fra DTX-2.

4.2 Metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner i skjellmateriale

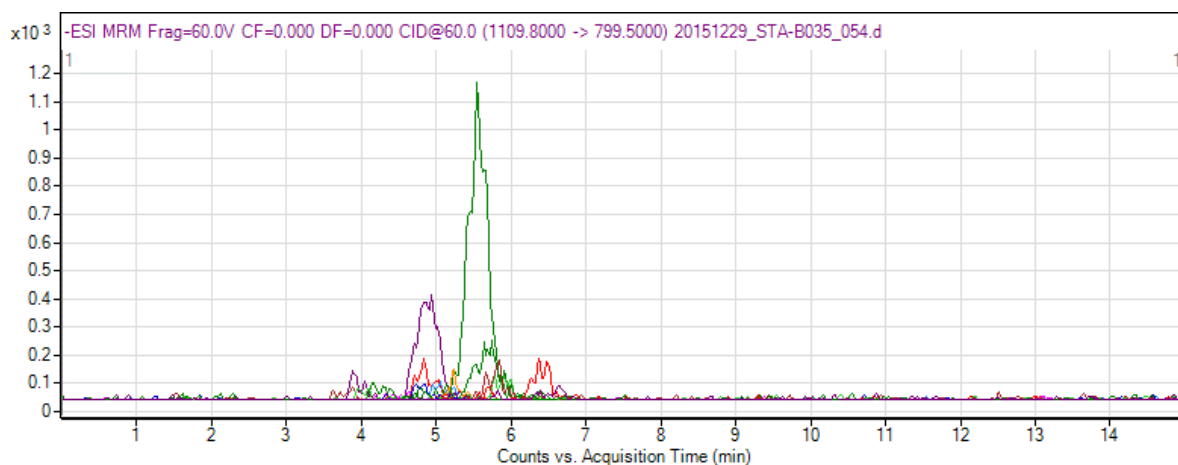
Metoden som ble laget for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner separerer de DTX-3-toksinene som ble funnet i skjellene i løpet av 15 minutter. 7-O-acylsterene separeres med hensyn på lengde på fettsyreesteren, og metningsgrad. Typiske kromatogram er vist i figur 4.12 – 4.14, for prøve *B-1443 Rundhaugen* som inneholder DTX-3 fra OA og DTX-1. Figurene viser henholdsvis TIC, overganger for DTX-3 fra OA/DTX-2 og overganger for DTX-3 fra DTX-1. Bruk av de ulike MRM-overgangene for tap av fettsyren til foreldretoksinet bør gi deteksjon av toksinene. DTX-3 fra DTX-1 har en annen masse når fettsyreesteren er den samme, og skilles slik fra DTX-3 fra OA og DTX-3 fra DTX-2. Det er ikke mulig å skille DTX-3-toksinene med hensyn på plassering av dobbeltbindingene i de umettede fettsyrene.



Figur 4.12: Totalt ionekromatogram fra analyse av B-1443 Rundhaugen på LC-MS/MS. Y-aksen viser utslag for én eller flere av de utvalgte masseovergangene og X-aksen viser retensjonstiden.



Figur 4.13: Kromatogram av MRM-overganger for DTX-3 fra OA og DTX-2. Massene for toksinene er like når fettsyren er lik, og kan ikke skilles fra hverandre med denne metoden. Y-aksen viser utslag for hver enkelt masseovergang, og X-aksen viser retensjonstid. Hvert fargede signal tilsvarer et DTX-3-toksin. Dataene kommer fra analyse av B-1443 Rundhaugen.



Figur 4.14: Kromatogram av MRM-overganger for DTX-3 fra DTX-1. Y-aksen viser utslag for enkelte masseoverganger og X-aksen viser retensjonstid. Hvert fargede signal tilsvarer et DTX-3-toksin. Dataene kommer fra analyse av B-1443 Rundhaugen.

Det er ikke mulig å skille DTX-3 fra OA og DTX-3 fra DTX-2 med samme fettsyreester fra hverandre ved bruk av denne metoden. DTX-2 eluerer ut mellom OA og DTX-1 ved metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. DTX-3 fra OA kommer tidlig ut, og DTX-3 fra DTX-1 med samme fettsyreester kommer ut senere i metoden for bestemmelse av DTX-3-toksiner. Det er derfor naturlig å anta at DTX-3 fra DTX-2 ville eluert ut mellom disse hvis fettsyren i molekylet er lik. Det er ikke tilfellet. Det dannes ikke to adskilte topper for DTX-3 fra OA/DTX-2. Noen av toppene i kromatogrammene gir ujevne signaltopper, som kan se ut som en kombinasjon av flere topper. Om dette skyldes DTX-3 fra OA og DTX-2, eller om det skyldes DTX-3 fra OA med ulik plassering av dobbeltbindingene, er vanskelig å vite. De ujevne toppene kan også skyldes lave konsentrasjoner av analyttene i prøven. Det er få av prøvene som inneholder DTX-3 fra DTX-2, så det er vanskelig å vurdere om toksinkonsentrasjonen ikke er mulig å detektere ved metoden, eller om signalene koeluerer med DTX-3 fra OA. Ved å gjøre en vurdering fra en prøves resultater fra metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner, kan det spesifiseres om DTX-3-profilen antas å være en kombinasjon av DTX-3 fra OA og DTX-2, videre kalt DTX-3 fra OA/DTX-2, eller kun DTX-3 fra OA eller DTX-3 fra DTX-2.

Skjellprøver av toksiske og ikke-toksiske skjell fra blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers ble analysert med metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner. De ikke-toksiske prøvene ga konsekvent ingen detekterte DTX-3-toksiner, som forventet. Enkelte av de toksiske prøvene ga heller ingen detekterte DTX-3-toksiner. Dette gjaldt begge de toksiske kamskjellprøvene, flere av blåskjellprøvene fra Flødevigen med lav toksisitet, og en O-skjellprøve. Prøvene med detekterte DTX-3-toksiner er presentert og diskutert i de neste avsnittene. Prøvene deles inn i to grupper, prøver med kun et toksin detektert, og prøver med en DTX-3-profil.

4.2.1 Prøver med kun et toksin detektert

Når konsentrasjon av DTX-3 i en prøve er liten, kan det ofte ikke bestemmes en DTX-3-profil fordi kun ett DTX-3-toksin finnes i konsentrasjoner som kan detekteres. Det kan være andre DTX-3-toksiner til stede i prøven, men i lavere konsentrasjoner enn metoden kan detektere. Begrensinger for deteksjon av DTX-3 med denne metoden i forhold til konsentrasjon av toksiner diskuteres i avsnitt 4.4.4. Det er naturlig å anta at DTX-3-toksinet som detekteres er det toksinet det dannes mest av når prøven utsettes for toksiske alger. I tabell 4.7 presenteres de prøvene hvor det ble detektert kun ett DTX-3-toksin. Det er overraskende at det er detektert DTX-1 C15:1 i noen av prøvene, da tidligere publikasjoner ikke har nevnt dette som et toksin

de har funnet. Resultatene er diskutert videre i avsnitt 4.4.1, hvor de settes i sammenheng fettsyreprofilen for skjellene, og konsentrasjonen av toksiner som ble bestemt i prøvene.

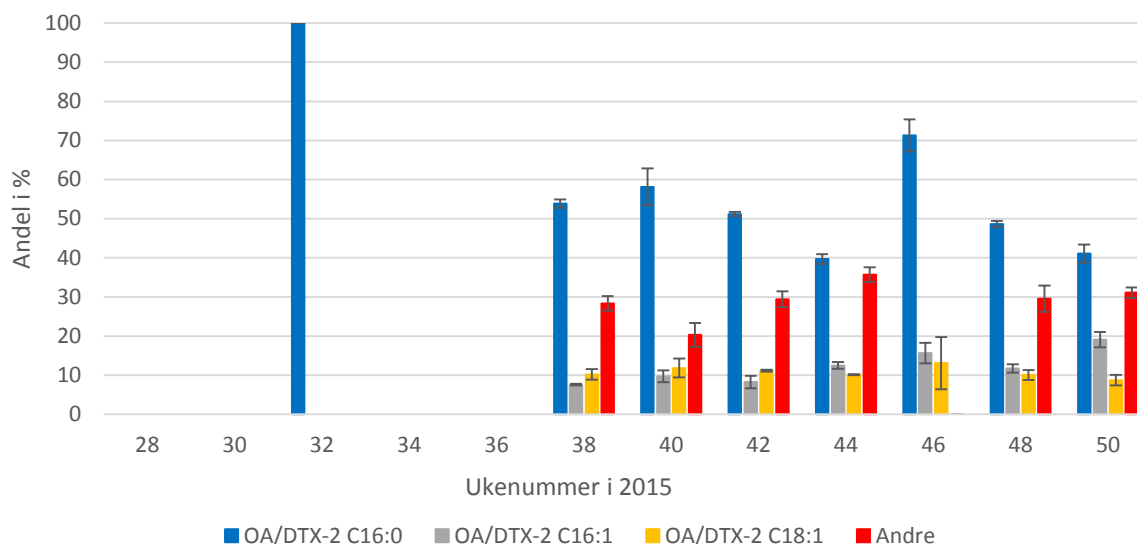
*Tabell 4.7: Oversikt over de prøvene som inneholdt kun et DTX-3-toksin i en konsentrasjon som kunne detekteres av metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner, og hvilket toksin som ble detektert i prøven (n=2). *O-1535 Viganeset hadde kun deteksjon av DTX-3 i en av to paralleller (n=1). De prøvene som har fått detektert DTX-1 C15:1 har i tillegg også en DTX-3-profil for OA-toksiner.*

Prøve	DTX-3-toksin
Ø-1542 Langholmen	OA/DTX-2 C16:0
Ø-1543 Langholmen	OA/DTX-2 C16:0
B-1532 Flødevigen	OA/DTX-2 C16:0
B-1437 Kaldvellfjorden	DTX-1 C16:0
Ø-1437 Kaldvellfjorden	DTX-1 C16:1
B-1423 Viganeset*	DTX-1 C16:1
O-1535 Viganeset	DTX-1 C16:0
B-1538 Flødevigen	DTX-1 C15:1
B-1542 Flødevigen	DTX-1 C15:1
B-1544 Flødevigen	DTX-1 C15:1
B-1550 Flødevigen	DTX-1 C15:1
B-1544 Langholmen	DTX-1 C15:1
B-1543 Langholmen	DTX-1 C15:1

4.2.2 Prøver med DTX-3-profil

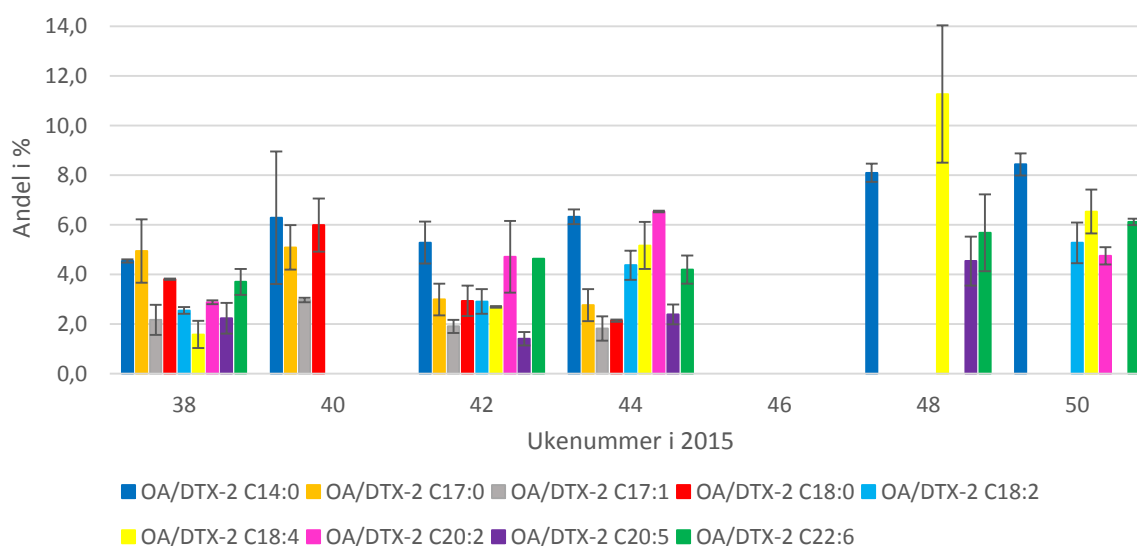
Det var mulig å detektere en DTX-3-profil fra OA for ti av prøvene, og en av prøvene fikk også detektert en DTX-3-profil fra DTX-1. Disse resultatene er presentert i figur 4.15 – 4.18. Profilene er også oppgitt i tabellform i vedlegg 4.

Figur 4.15 og 4.16 viser endringen i DTX-3-profilen til blåskjellprøvene fra Flødevigen. I uke 28 til 36 er det lite DTX-3 i prøvene, og det er derfor ikke mulig å detektere en DTX-3-profil. I uke 32 ble det detektert OA/DTX-2 C16:0, som eneste DTX-3-toksin. Fra uke 38 til uke 50 ble det bestemt en DTX-3-profil for OA/DTX-2. Figur 4.15 viser uke 28 til uke 50, med toksiner som utgjør mer enn 12%, med de toksinene som utgjør mindre enn 12% samlet i en bar merket «Andre». Figur 4.16 viser «Andre» toksiner i mer detalj for uke 38 til uke 50.



Figur 4.15D: Endring av DTX-3-profilen fra OA/DTX-2 i blåskjellprøver fra Flødevigen i siste halvdel av 2015 (n=2). Baren med «Andre» er vist i detalj i figur 4.16. Prosentandelene er oppgitt med standardavvik. DTX-3-profilen for prøvene er oppgitt i tabellform i vedlegg 4.

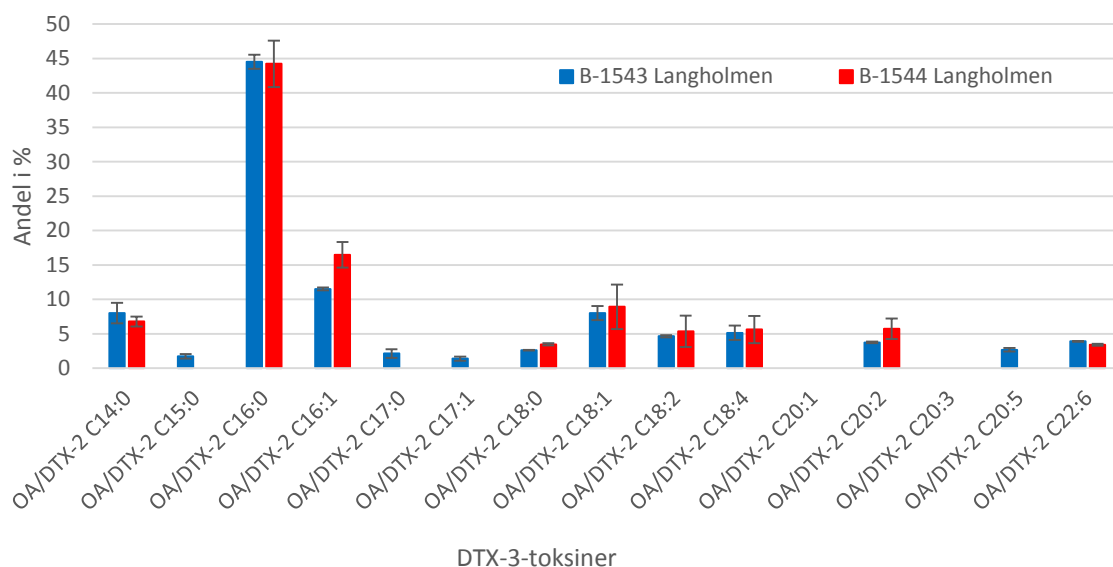
Det er mest OA/DTX-2 C16:0 i prøven, som utgjør mellom 40 og 80% av DTX-3-toksinene i uke 38 – 50. Videre utgjør OA/DTX-2 C16:1 og OA/DTX-2 C18:1 størst andel, og varierer mellom 8 og 20%. Andelen til de to toksinene er signifikant forskjellig i fire av syv prøver. OA/DTX-2 C18:1 utgjør en signifikant større andel i uke 38, og OA/DTX-2 C16:1 bidrar med størst andel i uke 44 og uke 50.



Figur 4.16: Endring av prosentandelen for OA/DTX-2 C14:0, OA/DTX-2 C17:0, OA/DTX-2 C17:1, OA/DTX-2 C18:0, OA/DTX-2 C18:2, OA/DTX-2 C18:4, OA/DTX-2 C20:2, OA/DTX-2 C20:5 og OA/DTX-2 C22:6 i blåskjellprøver fra Flødevigen for prøver tatt opp mellom uke 38 og uke 50 (n=2). Prosentandelene er oppgitt med standardavvik. DTX-3-profil for prøvene er oppgitt i tabellform i vedlegg 4.

I figur 4.16 virker fordelingen av de andre toksinene tilfeldig. I de fleste prøvene er det detektert flere ulike DTX-3-toksiner. I uke 46 er det ikke detektert andre enn de tre toksinene som er vist i figur 4.15. Det er bestemt OA/DTX-2 C14:0 i resten av prøvene, og dette er en av DTX-3-toksinene med høyest andel etter OA/DTX-2 C16:0, C16:1 og C18:1. Fra uke 38 til uke 44 varierer det hvilke DTX-3-toksiner som bestemmes, og de kortere og mettede fettsyrene er mest vanlig. Fra uke 46 til 50 blir det færre forskjellige DTX-3-toksiner, og flere av toksinene som detekteres har umettede fettsyreestere med lange karbonkjeder.

Figur 4.17 viser DTX-3-profilen fra OA/DTX-2 til to blåskjellprøver fra Langholmen. Andelen av de tre vanligste DTX-3-toksinene ligner på resultatene fra Flødevigen. Det er mest av OA/DTX-2 C16:0 og andelen ligger rundt 45%. Utenom OA/DTX-2 C16:0 er det mest OA/DTX-2 C16:1, og deretter er OA/DTX-2 C18:1 og OA/DTX-2 C14:0 de toksinene med størst andel. Disse prøvene er tatt opp fra samme sted, med en ukes mellomrom. Forskjellene mellom prøvene er at variasjonen i antall ulike toksiner som kan detekteres går nedover, og andelen OA/DTX-2 C16:1 og OA/DTX-2 C20:2 øker.

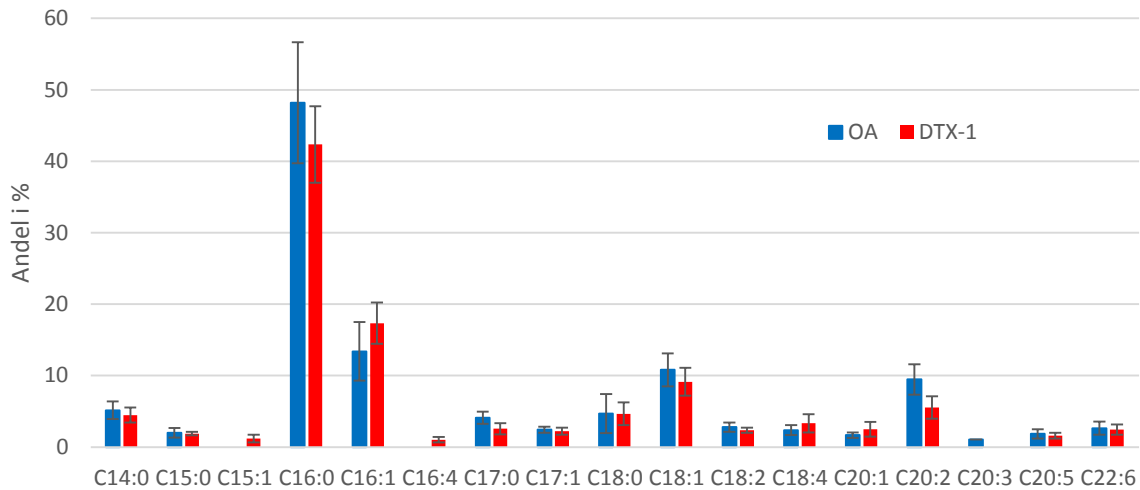


Figur 4.17: DTX-3-profil fra OA/DTX-2 i blåskjellprøver fra Langholmen fra uke 43 og 44 i 2015 (n=2). Prosentandelene er oppgitt med standardavvik. DTX-3-profilene er oppgitt i tabellform i vedlegg 4.

Prøve B-1443 Rundhaugen inneholder DTX-3-toksiner fra både OA og DTX-1 og en DTX-3-profil for hver gruppe ble bestemt. Til sammenligning er DTX-3-profilen fra både OA og DTX-1 oppgitt i figur 4.18. Det er mange av de samme toksinene som bestemmes fra OA og DTX-1, men OA/DTX-2 C20:3, DTX-1 C15:1 og DTX-1 C16:4 bestemmes kun i en av dem. Denne

sammenligningen kan benyttes til å vurdere om prosessen for omestring til DTX-3 fungerer ulikt for OA og DTX-1. Profilene for de to toksinene er veldig like. Toksiner med fettsyreesteren C20:2 har signifikant større andel fra OA/DTX-2 enn fra DTX-1.

Prøve B-1443 Rundhaugen ble opparbeidet seks ganger, og kan benyttes som en vurdering av om prøveoppbeidelsen er repeterbar. Standardavvikene for resultatene er noe høyere enn optimalt, men vitner om en prøveoppbeidelse som fungerer slik den er tiltenkt.



Lengde og metning for FA i toksin

Figur 4.18: DTX-3-profil fra OA/DTX-2 og DTX-1 for B-1443 Rundhaugen (n=12). Dette er den eneste prøven med en profil for DTX-3 fra DTX-1. Prosentandelene er oppgitt med standardavvik. OA/DTX-2 20:3, DTX-1 15:1 og DTX-1 16:4 er kun analysert i en av profilene. Profilene er også oppgitt i tabellform i vedlegg 4.

Fordelingen av DTX-3-toksiner i blåskjell er blitt studert av Vale (2006), Torgersen *et al.* (2008c) og Torgersen *et al.* (2008d). De har funnet mange av de samme DTX-3-toksinene som er bestemt i denne oppgaven. Torgersen *et al.* (2008c) og Torgersen *et al.* (2008d) fant DTX-3-toksiner med fettsyreestere av C20:4 og C18:3, som ikke er funnet i denne oppgaven. Funn av DTX-3-toksiner med fettsyreestere av C15:1, C16:4 og C20:3 er ikke nevnt i noen av disse artiklene. Torgersen *et al.* (2008c) har også vurdert andeler av de ulike DTX-3-toksinene, og fant størst andel av C16:0 for alle gruppene DTX-3-toksiner, deretter C16:1. Andelen OA C16:1 var mindre enn for DTX-1 C16:1 og DTX-2 C16:1. Andre vanlige fettsyreestere var C14:0 og C20:5 for alle tre gruppene med DTX-3-toksiner, i tillegg til OA C18:4. Til sammenligning har resultatene fra dette arbeidet funnet større andeler C18:1 og C20:2 fra OA/DTX-2 og DTX-1.

4.3 Fettsyrer i blåskjell, O-skjell, kamskjell og østers

4.3.1 Funn av fettsyrer

Figur 4.19 viser et typisk kromatogram for analyse av FAMEe ved GC-MS. Arealene for FAMEne bestemt med GC-MS er omregnet til en fettsyreprofil som viser hvor stor prosentandel av den totale mengden fettsyrer hver fettsyre utgjør i den enkelte prøven. Fettsyreprofilen er så benyttet til sammenligning av prøver av toksiske og ikke-toksiske blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers. Fullstendig fettsyreprofil med standardavvik for alle prøvene er oppgitt i vedlegg 5. Det ble bestemt 49 ulike fettsyrer i skjellprøvene. Disse er oppgitt i tabell 4.8. Det ble funnet fettsyrer med en overvekt av *cis*-konfigurasjoner. Enkelte fettsyrer i skjellene med en eller to dobbeltbindinger har *trans*-konfigurasjon, men alle fettsyrer med tre dobbeltbindinger eller mer har *cis*-konfigurasjon. Det ble ikke detektert noen fettsyrer som er kortere enn C12, eller lengre enn C22. Det ble detektert syv ulike omega-3-fettsyrer: C18:3 *cis* 9,12,15, C18:4 *cis* 6,9,12,15, C20:4 *cis* 8,11,14,17, C20:5 *cis* 5,8,11,14,17, C21:5 *cis* 6,9,12,15,18, C22:5 *cis* 7,10,13,16,19 og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19.

4.3.2 Tilpasninger og antagelser ved metoden

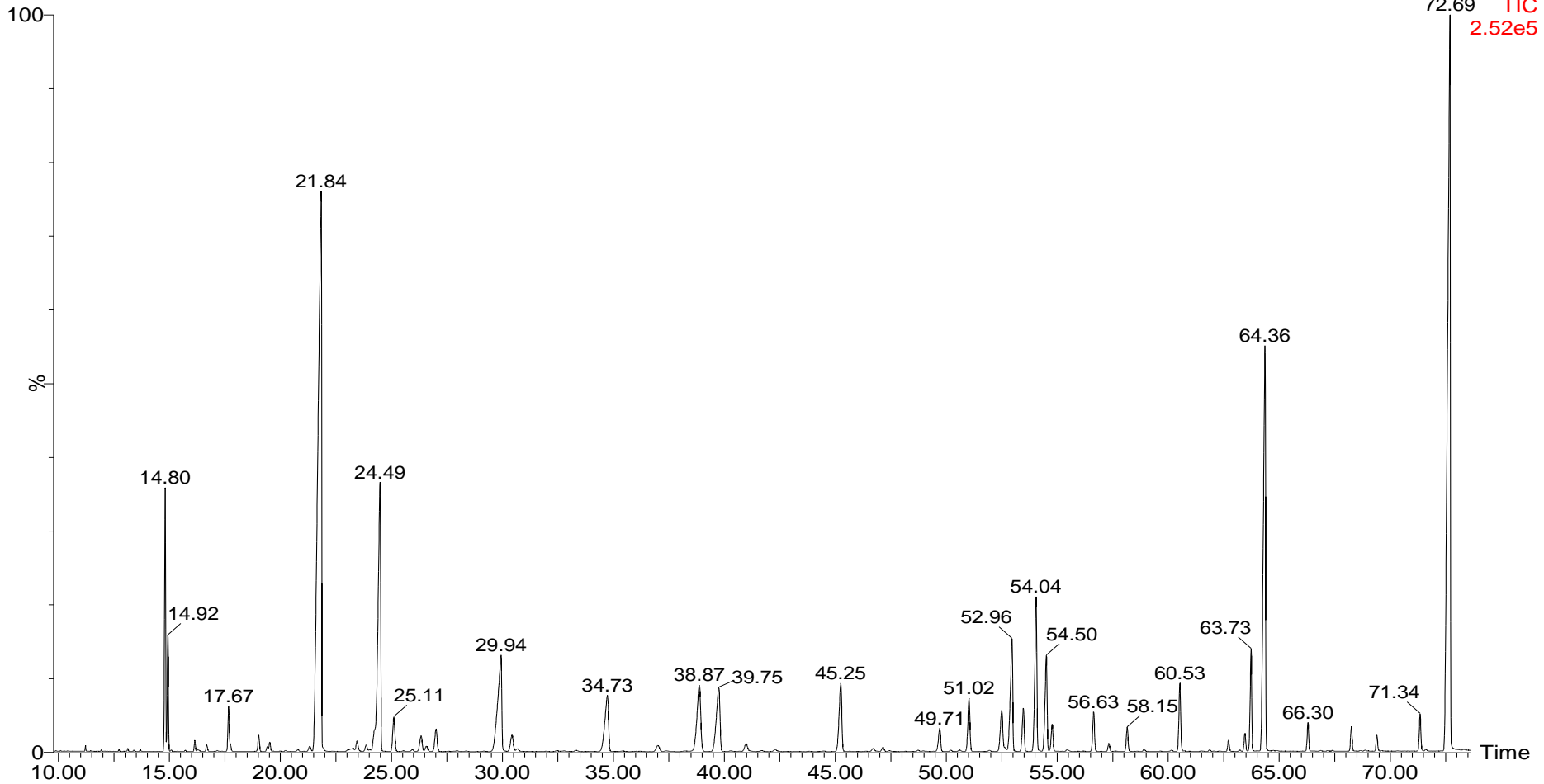
Ved illustrasjon av resultatene til denne delen av oppgaven er ikke fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% av den totale andelen fettsyrer i en prøve rapportert. Dette er gjort for å gi en bedre oversikt over de resterende fettsyrene i prøven. Ved å fjerne 10 – 15 fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% er minimum 97% av fettsyrene i prøven fortsatt med i vurderingen av resultatene, og dette ansees som akseptabelt.

C18:1 *trans* 5 og C18:1 *cis* 6 eluerer ut samtidig, og det er vanskelig å vite om en prøve inneholder én eller begge av disse. De er derfor alltid oppgitt som en topp. C16:2 *trans* 9,12 koeluerer med et annet signal i kromatogrammet. Dette signalet vanskeliggjør identifiseringen av C16:2 *trans* 9,12 i mange av prøvene. Deteksjon av C16:2 *trans* 9,12 er derfor ikke oppgitt, men fettsyren kan likevel være til stede. Deteksjon av en topp er gjort når toppen fikk bestemt et integrert areal på mer enn 100. Dette tilsvarer et manuelt beregnet signal til støy-forhold (S/N) på 12.

STA-P164_01
STA20160127108

10-Feb-2016

12:26:26
Magnet EI+
72.69 TIC
2.52e5



Figur 4.19: Et typisk kromatogram for skjellekstrakt som har gjennomgått analyse på GC-MS. Løsemiddeltoppen som kommer rundt 5 minutter er ikke med i kromatogrammet, for å gi god oversikt over FAME-toppene. Kromatogrammet er for blåskjellprøve B-1443 Rundhaugen.

Tabell 4.8: Oversikt over fettsyrer funnet i skjellprøvene. Forkortelsen for fettsyren, og navnet på FAMEen som ble bestemt ved GC-MS er oppgitt, i tillegg til retensjonstid, matchfaktor (MF), reversert matchfaktor (R.MF) og sannsynlighet for korrekt bestemmelse ved biblioteksøk (Prob.) for FAMEen. MF er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret, og har en maksverdi på 999. R.MF er en matchfaktor hvor toppen som kun er funnet i det analyserte spekteret blir fjernet. Maksverdien for R.MF er også 999. En FAME som er bekreftet med standard er merket ved understreket retensjonstid. *C16:2 trans 9,12 koeluerer med en annen topp, og er derfor ofte ikke mulig å detektere, men kan likevel være til stede i prøvene.

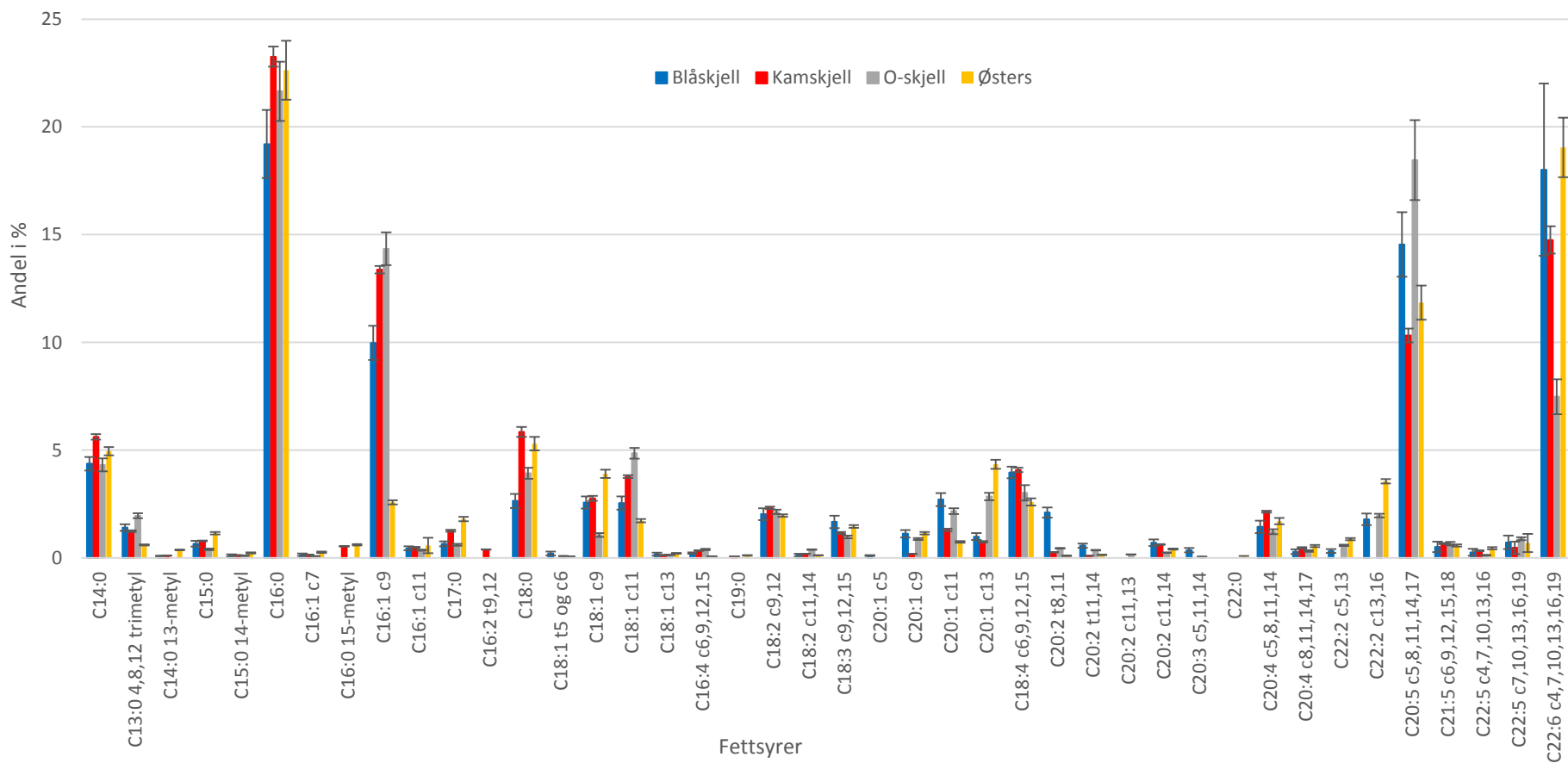
Fettsyre	FAME	RT [min]	MF	R.MF	Prob. [%]
C12:0	Metyl dodekanoat	<u>11,28</u>	888	897	62,9
C14:0	Metyl tetradekanoat	<u>14,86</u>	940	942	68,3
C13:0 4,8,12 trimetyl	Metyl 4, 8, 12-trimetyl tridekanoat	14,96	878	888	80,0
C14:0 13-metyl	Metyl 13-metyltetradekanoat	<u>16,19</u>	874	881	18,0
C14:0 12-metyl	Metyl 12-metyltetradekanoat	<u>16,70</u>	850	936	48,8
C15:0	Metyl pentadekanoat	<u>17,71</u>	939	940	63,3
C15:0 14-metyl	Metyl 14-metylpentadekanoat	<u>19,53</u>	889	906	40,7
C16:0	Metyl heksadekanoat	<u>21,82</u>	945	952	77,3
C16:1 cis 7	Metyl Z7-heksadekanoat	<u>23,80</u>	899	899	31,1
C16:0 15-metyl	Metyl 15-metylheksadekanoat	<u>24,11</u>	910	921	32,0
C16:1 cis 9	Metyl Z9-heksadekanoat	<u>24,52</u>	954	954	41,6
C16:1 cis 11	Metyl Z11-heksadekanoat	25,02	901	922	27,7
C17:0	Metyl heptadekanoat	<u>27,10</u>	907	912	54,4
C16:2 trans 9,12*	Metyl E9,E12-heksadekadienoat	29,85	915	915	40,2
C18:0	Metyl oktadekanoat	<u>34,85</u>	952	954	74,8
C18:1 trans 5 og/eller cis 6	Metyl Z6-oktadekanoat	36,88	843	843	11,8
	Metyl E5-oktadekanoat	36,92	845	845	19,9
C18:1 cis 9	Metyl Z9-oktadekanoat	<u>38,97</u>	870	898	11,7
C18:1 cis 11	Metyl Z11-oktadekanoat	<u>39,84</u>	931	931	8,1
C18:1 cis 13	Metyl Z13-oktadekanoat	<u>40,90</u>	891	891	6,7
C16:4 cis 6,9,12,15	Metyl Z6,Z9,Z12,Z15- heksadekatetraenoat	41,64	911	913	50,5
C19:0	Metyl nonadekanoat	<u>43,88</u>	837	837	44,2
C18:2 cis 9,12	Metyl Z9,Z12-oktadekadienoat	<u>45,31</u>	952	953	32,2
C18:2 trans 11,14	Metyl E11,E14-oktadekadienoat	46,79	903	903	13,0
C19:1 trans10	Metyl E10-nonadekanoat	46,90	798	798	13,6
C18:3 cis 6,9,12	Metyl Z6,Z9,Z12 oktadekatrienoat	<u>48,64</u>	852	852	26,0
C20:0	Metyl eikosanoat	<u>50,50</u>	864	887	68,7
C18:3 cis 9,12,15	Metyl Z9, Z12, Z15 oktadekatrienoat	<u>51,10</u>	937	937	56,0
C20:1 cis 5	Metyl Z5-eikosenoat	51,90	789	789	9,2
C20:1 cis 9	Metyl Z9-eikosenoat	<u>52,43</u>	901	901	15,4
C20:1 cis 11	Metyl Z11-eikosenoat	<u>52,93</u>	952	952	29,9
C20:1 cis 13	Metyl Z13-eikosenoat	53,49	944	944	25,1

Fortsettelse av tabell 4.8.

Fettsyre	FAME	RT [min]	MF	R.MF	Prob. [%]
C18:4 cis 6,9,12,15	Metyl Z6,Z9,Z12,Z15- oktadekatetraenoat	<u>54,12</u>	910	924	44,0
C20:2 trans 8,11	Metyl E8,E11-eikosadienoat	54,43	847	847	11,5
C20:2 trans 11, 14	Metyl E11,E14-eikosadienoat	54,71	850	863	16,4
C20:2 cis 11, 13	Metyl Z11,Z13-eikosadienoat	54,90	777	777	6,2
C20:2 cis 11,14	Metyl Z11,Z14-eikosadienoat	<u>56,69</u>	916	916	50,6
C20:3 cis 5,11,14	Metyl Z5,Z11,Z14-eikosatrienoat	58,10	923	924	64,1
C20:3 cis 8,11,14	Metyl Z8,Z11,Z14-eikosatrienoat	<u>58,97</u>	812	823	8,8
C22:0	Metyl dokosanoat	<u>60,20</u>	841	860	64,0
C20:4 cis 5,8,11,14	Metyl Z5,Z8,Z11,Z14- eikosatetraenoat	<u>60,58</u>	945	946	66,2
C22:1 cis13	Metyl Z13-dokosenoat	<u>61,58</u>	724	724	7,15
C20:4 cis 8,11,14,17	Metyl Z8,Z11,Z14,Z17- eikosatetraenoat	<u>62,78</u>	907	911	52,2
C22:2 cis 5,13	Metyl Z5,Z13-dokosadienoat	63,45	855	855	16,0
C22:2 cis 13,16	Metyl Z13,Z16-dokosadienoat	63,73	895	895	27,7
C20:5 cis 5,8,11,14,17	Metyl Z5,Z8,Z11,Z14,Z17- eikosapentaenoat	<u>64,30</u>	948	948	50,6
C21:5 cis 6,9,12,15,18	Metyl Z6,Z9,Z12,Z15,Z18- heneikosapentaenoat	<u>68,31</u>	902	905	20,8
C22:5 cis 4,7,10,13,16	Metyl Z4,Z7,Z10,Z13,Z16- dokosapentaenoat	69,45	901	901	35,1
C22:5 cis 7,10,13,16,19	Metyl Z7,Z10,Z13,Z16,Z19- dokosapentaenoat	<u>71,39</u>	907	909	32,5
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	Metyl Z4,Z7,Z10,Z13,Z16,Z19 dokosaheksaenoat	<u>72,66</u>	948	948	59,3

4.3.3 Sammenligning av fettsyreprofil i blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers

En sammenligning av fettsyreprofilen for de fire artene er vist i figur 4.20. Sammenligning er gjort ut fra et gjennomsnitt av analyserte prøver fra både toksiske og ikke-toksiske skjell, fra minimum to ulike steder og fire ulike prøver av hver art. Prøver fra Flødevigen er ikke tatt med, men alle andre analyserte prøver av blåskjell er med i beregningen av gjennomsnitt for blåskjell. Figur 4.20 viser at tre dominerende fettsyrer i alle artene er C16:0, C20:5 cis 5,8,11,14,17 og C22:6 cis 4,7,10,13,16,19, unntatt O-skjell som inneholder kun 7% C22:6 cis 4,7,10,13,16,19. En annen fettsyre med høy andel hos blåskjell, kamskjell og O-skjell er C16:1 cis 9, men denne er mindre fremtredende i østers. Resultatene er i overensstemmelse med tidligere funn for blåskjell, kamskjell og østers (Abad *et al.*, 1995; Caers *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003; Napolitano *et al.*, 1992; Passi *et al.*, 2002; Zandee *et al.*, 1980). Andre markante fettsyrer for alle arter er C14:0, C18:0, C18:1 cis 9 og cis 11, i tillegg til C18:4 cis 6,9,12,15. Av disse er C14:0 funnet i større andel enn i tidligere publikasjoner.

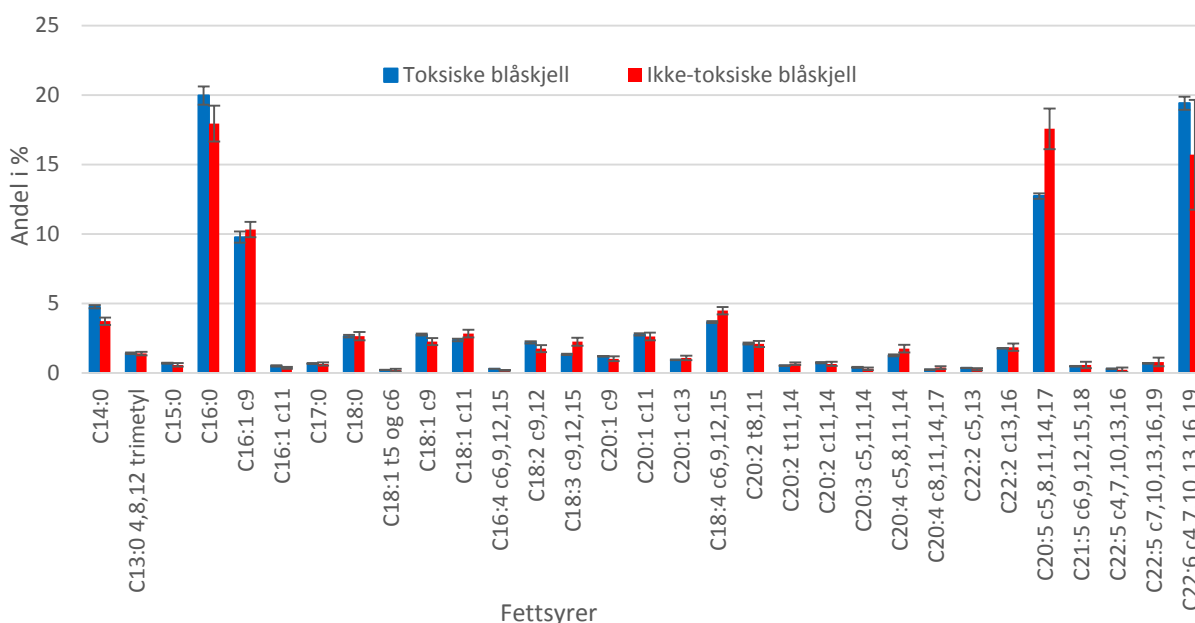


Figur 4.20: Sammenligning av fettsyreprofil for blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers. Fettsyrene er vist med andel av hver fettsyre (n=4), med standardavvik. c i figuren betyr at dobbeltbindingene har cis-konfigurasjon og t betyr trans-konfigurasjon. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% av andelen fettsyrer for alle arter er ikke rapportert. Dette gjelder C12:0, C14:0 12-metyl, C19:1 trans 10, C18:3 cis 6,9,12, C20:0, C20:3 cis 8,11,14 og C22:1 cis 13.

O-skjell skiller seg fra de andre artene ved å inneholde større andeler C16:1 *cis* 9, C18:1 *cis* 11 og C20:5 *cis* 5,8,11,14,17, i tillegg mindre C18:1 *cis* 9 og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19. Østers inneholder mer C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 enn blåskjell, i overenstemmelse med funn av Passi *et al.* (2002). Kamskjellene inneholder en overvekt av C16:0 og C16:1 *cis* 9, og mindre av de lange, umettede fettsyrene sett i forhold til blåskjell og østers. Fettsyreprofilen for blåskjell er i god overenstemmelse med funn fra tidligere nevnte publikasjoner.

4.3.4 Toksiske og ikke-toksiske skjell fra samme art

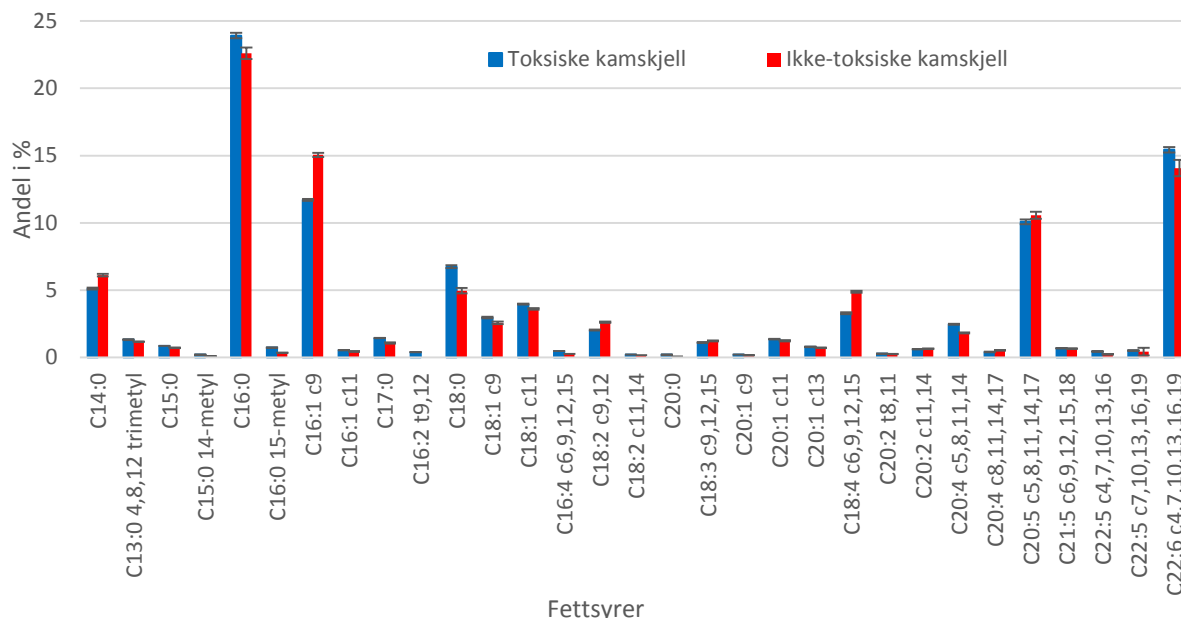
Det ble beregnet et gjennomsnitt for hver art avhengig av om prøvene var toksiske eller ikke-toksiske. De samme prøvene som ble benyttet til sammenligning av arter i forrige avsnitt, er delt inn i toksiske og ikke-toksiske prøver. Sammenligningen av toksiske og ikke-toksiske skjell fra hver art er illustrert i figur 4.21 – 4.24.



Figur 4.21: Sammenligning av fettsyreprofil for toksiske og ikke-toksiske blåskjell (n=4), med standardavvik. c i figuren betyr at dobbeltbindingene har *cis*-konfigurasjon og t betyr *trans*-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i blåskjellene: C16:0 15-metyl, C19:0, C20:2 *cis* 11,13 og C22:0. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% er ikke rapportert.

Det ble funnet at toksiske blåskjell inneholder signifikant mer C14:0 og C16:0 enn de ikke-toksiske skjellene, og mindre C18:1 *cis* 11, C18:4 *cis* 6,9,12,15, C20:4 *cis* 5,8,11,14 og C20:5 *cis* 5,8,11,14,17. Andelen C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 i toksiske blåskjell er nær 20%, og utgjør

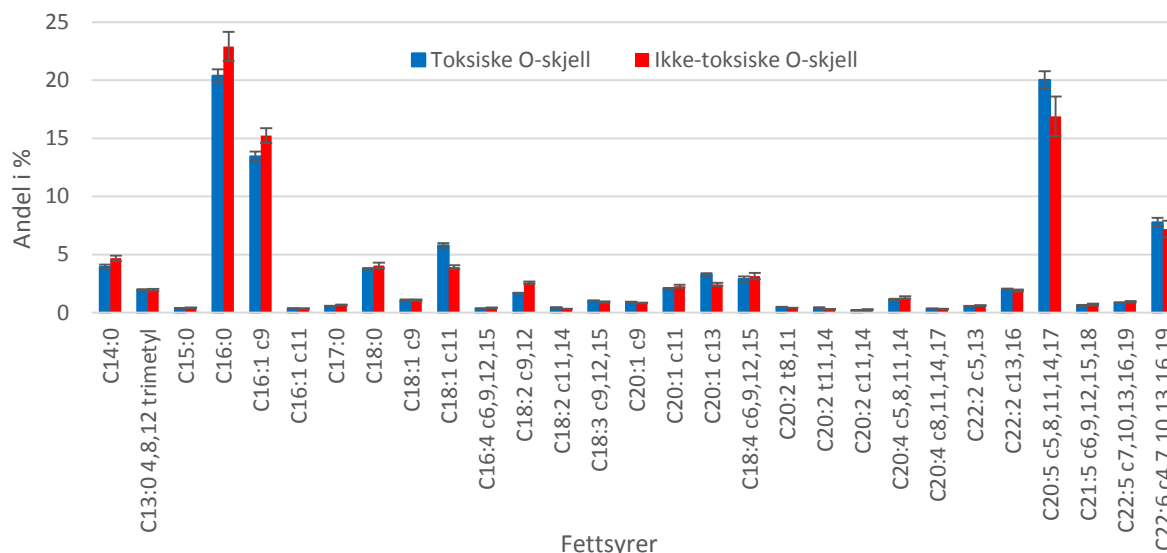
en av de to viktigste fettsyrene for toksiske blåskjell. For ikke-toksiske blåskjell er andelen C16:0, C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 likt fordelt. De andre fettsyrene bidrar med tilnærmet like andeler i toksiske og ikke-toksiske blåskjell.



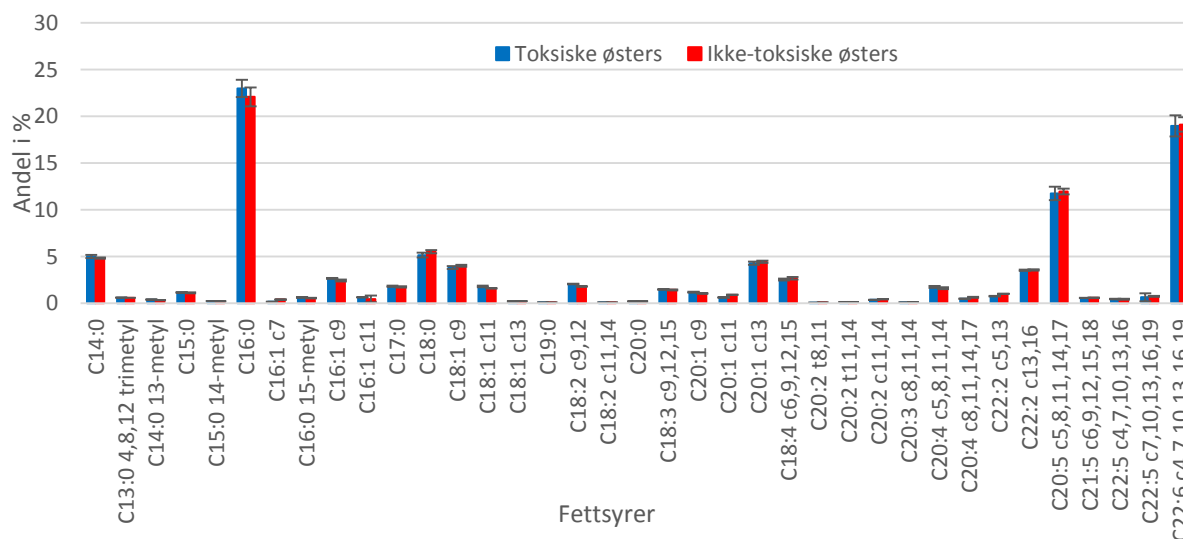
Figur 4.22: Sammenligning av fettsyreprofil for toksiske og ikke-toksiske kamskjell ($n=4$), med standardavvik. *c* i figuren betyr at dobbeltbindingene har *cis*-konfigurasjon og *t* betyr *trans*-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i kamskjellene: C12:0, C18:1 *trans* 5 og *cis* 6, C19:1 *trans* 10, C20:1 *cis* 5, C20:2 *cis* 11,13, C20:3 *cis* 5,11,14, C22:0, C22:2 *cis* 5,13 og C22:2 *trans* 13,16. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% er ikke rapportert.

Sammenligningen av toksiske og ikke-toksiske kamskjell i figur 4.22 viser at de toksiske skjellene inneholder større andel C16:0, C18:0 og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19, men lavere andel C14:0, C16:1 *cis* 9 og C18:4 *cis* 6,9,12,15 enn de ikke-toksiske kamskjellene. Den største forskjellen i andel er for C16:1 *cis* 9. Det er også variasjoner i de fettsyrene det er mindre av, uten noe klart mønster i forhold til metning og lengde på karbonkjeden.

Sammenligningen av toksiske og ikke-toksiske O-skjell som er fremstilt i figur 4.23 viser et interessant mønster. De toksiske O-skjellene inneholder større andel av lange, umettede fettsyrer, som C20:5 *cis* 5,8,11,14,17. De ikke-toksiske skjellene har en større andel av kortere og mettede eller enumettede fettsyrer, som C14:0, C16:0, C16:1 *cis* 9 og C18:0. Et unntak er C18:1 *cis* 11, som det er mest av i de toksiske skjellene. De gjenværende fettsyrene har lignende andeler for de to typene O-skjell.



Figur 4.23: Sammenligning av fettsyre-profil for toksiske og ikke-toksiske O-skjell (n=4), med standardavvik. c i figuren betyr at dobbeltbindingene har cis-konfigurasjon og t betyr trans-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i O-skjellene: C14:0 13-metyl, C14:0 12-metyl, C16:0 15-metyl, C19:0, C19:1 trans 10, C20:1 cis 5 og C22:0. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% er ikke rapportert.

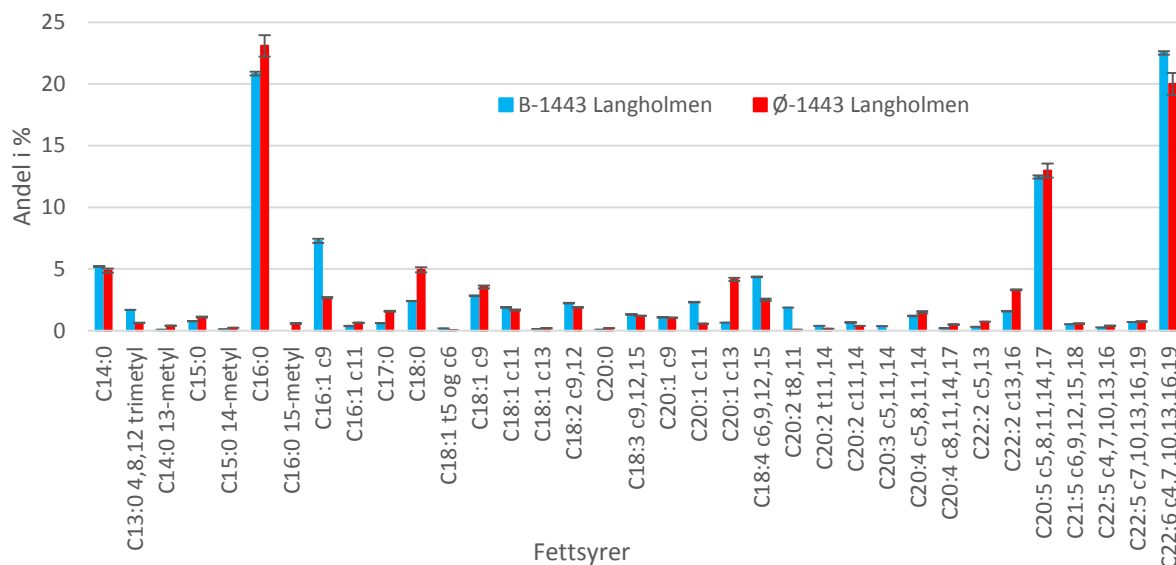


Figur 4.24: Sammenligning av fettsyreprofil for toksiske og ikke-toksiske østers (n=4), med standardavvik. c i figuren betyr at dobbeltbindingene har cis-konfigurasjon og t betyr trans-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i østersene: C19:1 trans 10, C20:1 cis 5, C20:2 cis 11,13 og C20:3 cis 5,11,14. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% er ikke rapportert.

Sammenligningen av østers ser annerledes ut enn for de andre skjellartene. Det er ingen av fettsyrene som har signifikant forskjell mellom de toksiske og ikke-toksiske skjellene, slik det kommer frem av figur 4.24.

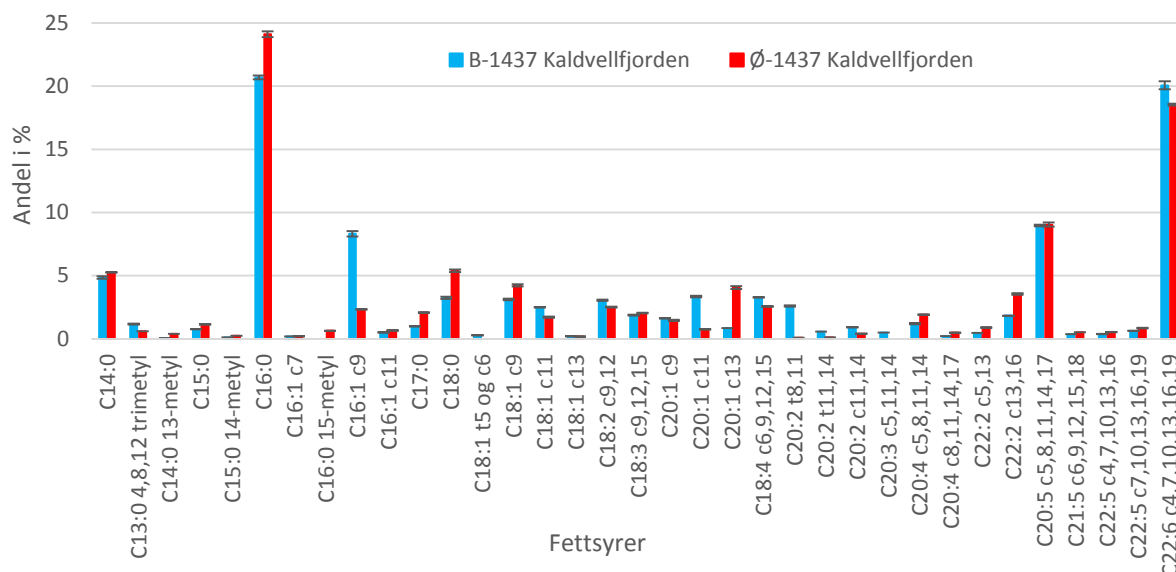
4.3.5 Fettsyreprofil i ulike arter fra samme lokalitet

Prøvene fra ulike arter som er tatt opp på samme sted og til samme tid ble sammenlignet med hensyn på fettsyreprofil for å se etter forskjeller mellom artene når tilgangen på næring er den samme. Resultatene for disse sammenligningene er vist i figur 4.25 – 4.27.

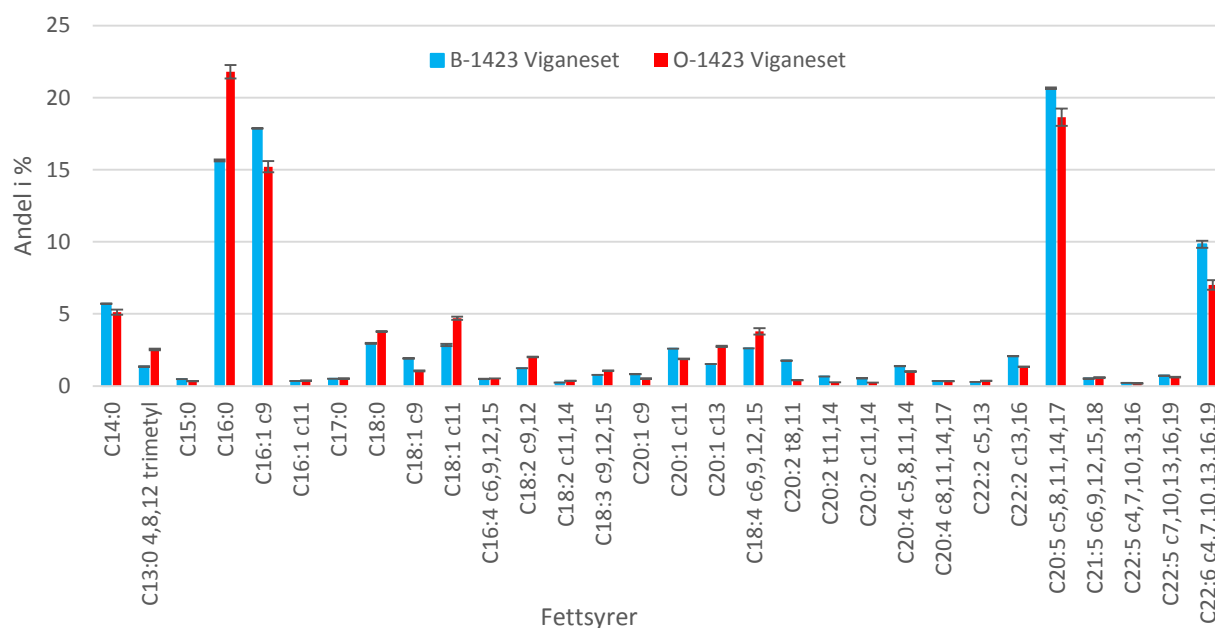


Figur 4.25: Sammenligning av fettsyreprofil for blåskjell og østers fra Langholmen ($n=4$), med standardavvik. *c* i figuren betyr at dobbeltbindingene har *cis*-konfigurasjon og *t* betyr *trans*-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i skjellene: C18:3 *cis* 6,9,12, C20:1 *cis* 5 og C20:2 *cis* 11,13. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% for begge arter er ikke rapportert.

Figur 4.25 sammenligner blåskjell og østers hentet fra Langholmen. Fettsyreprofilen til blåskjell og østers fra Kaldvellfjorden er vist i figur 4.26. Fettsyreprofilene ser veldig like ut, selv om andelen av hver fettsyre varierer. På begge lokalitetene har blåskjellene en større andel C16:1 *cis* 9, C20:1 *cis* 11, C18:4 *cis* 6,9,12,15, C20:2 *trans* 8,11 og 22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19. Østers har en større andel C16:0, C17:0, C18:0, C18:1 *cis* 9, C20:1 *cis* 13 og C22:2 *cis* 13,16. Det faktum at skjell fra samme art oppnår så like profiler på tross av ulikt opptakssted, vitner om at skjellenes fettsyreprofil er mer avhengig av arten, enn tilgangen på næring.



Figur 4.26: Sammenligning av fettsyreprofil for blåskjell og østers fra Kaldvellfjorden (n=4), med standardavvik. c i figuren betyr at dobbeltbindingene har cis-konfigurasjon og t betyr trans-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i skjellene: C12:0, C16:4 cis 6,9,12,15, C18:3 cis 6,9,12, C20:1 cis 5, C20:2 cis 11,13, C22:0 og C22:1 cis 13. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% for begge arter er ikke rapportert.



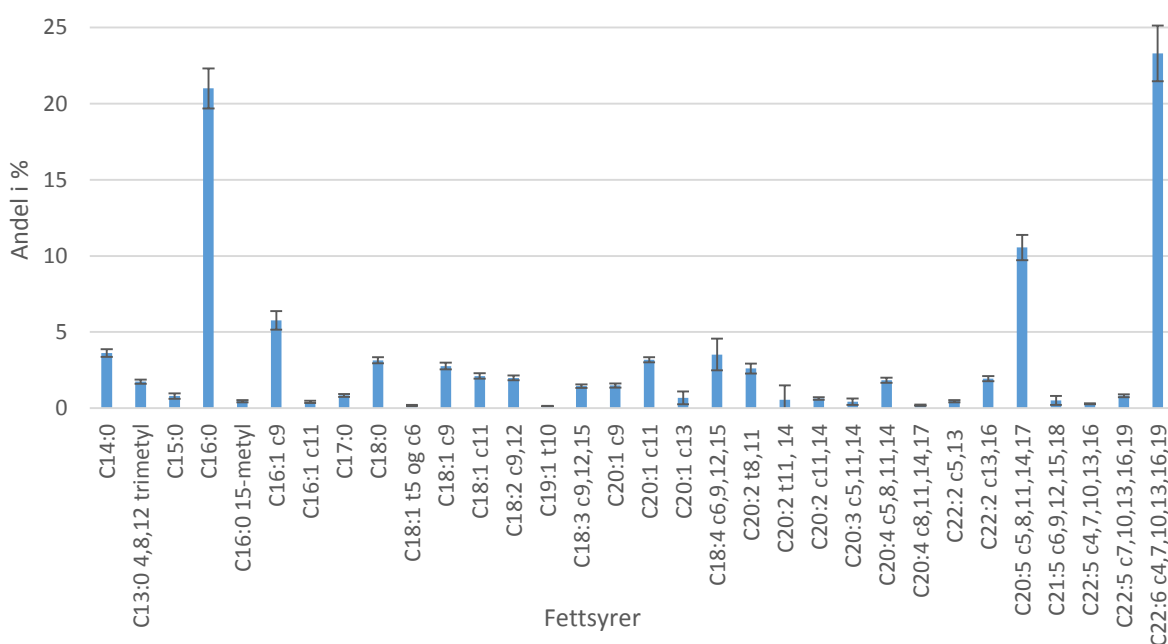
Figur 4.27: Sammenligning av fettsyreprofil for blåskjell og O-skjell fra Viganeset (n=4), med standardavvik. c i figuren betyr at dobbeltbindingene har cis-konfigurasjon og t betyr trans-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i skjellene: C14:0 13-metyl, C16:0 15-metyl, C19:0, C20:1 cis 5, og C22:0. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% for begge arter er ikke rapportert.

Sammenligningen av blåskjell og O-skjell fra Viganeset er illustrert i figur 4.27. Det ble funnet at blåskjell inneholder en større andel C14:0, C16:1 cis 9, C18:1 cis 9, C20:1 cis 11, C22:2 cis

13,16, C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19. O-skjell inneholder større andeler C16:0, C18:0, C18:1 *cis* 11, C18:2 *cis* 9,12, C20:1 *cis* 13 og C18:4 *cis* 6,9,12,15. Det er klare forskjeller i fettsyreprofilen til de to artene, i likhet med fettsyreprofilene funnet for blåskjell og østers. Fettsyreprofilen for blåskjell fra Viganeset avviker fra den generelle fettsyreprofilen for blåskjell på flere måter, se figur 4.20. Toksiske blåskjell inneholder i de andre prøvene signifikant mer C16:0 enn C16:1 *cis* 9, og mer C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 enn C20:5 *cis* 5,8,11,14,17. I blåskjellene fra Viganeset er det motsatt.

4.3.6 Endring i fettsyreprofil i blåskjell fra Flødevigen

En gjennomsnittlig fettsyreprofil for blåskjell fra Flødevigen ble laget fra et gjennomsnitt av tolv prøver. Profilen er fremstilt i figur 4.28. Profilen er veldig lik den generelle profilen for blåskjell i figur 4.20, men inneholder signifikant lavere andel C16:1 *cis* 9 og C20:5 *cis* 5,8,11,14,17.

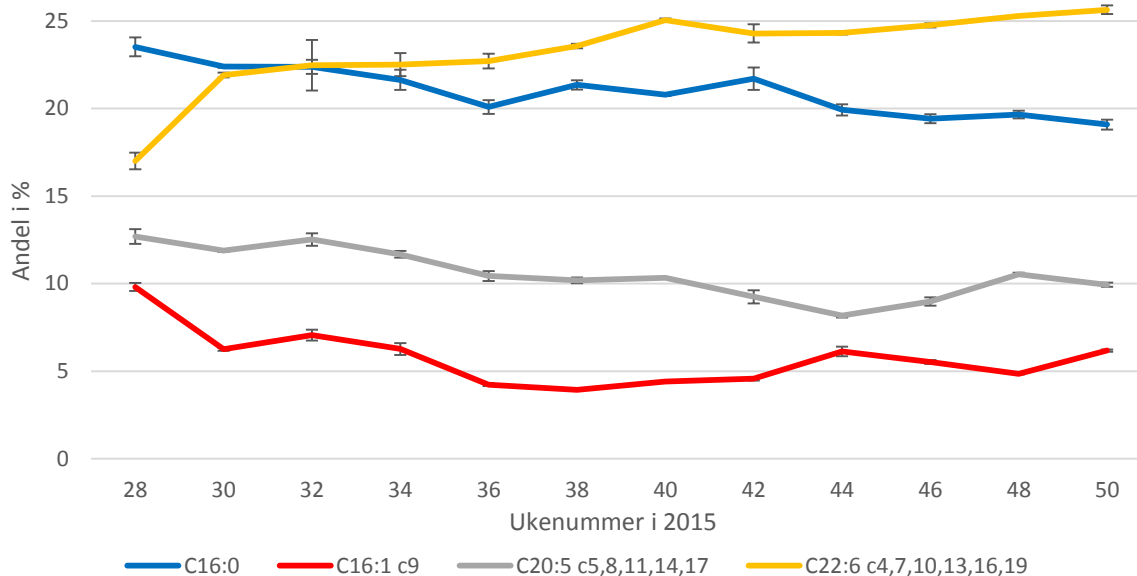


Figur 4.28: Fettsyreprofil for blåskjell fra Flødevigen som gjennomsnitt av tolv prøver (n=46), med standardavvik. *c* i figuren betyr *cis*-konfigurasjon og *t* betyr *trans*-konfigurasjon. Følgende fettsyrer ble ikke detektert i skjellene: C16:4 *cis* 6,9,12,15, C19:0, C18:3 *cis* 6,9,12, C20:2 *cis* 11,13 og C22:0. Fettsyrer som utgjør mindre enn 0,2% for alle prøver er ikke rapportert.

For å se på endringene i fettsyreprofilen over tid, ble blåskjellprøvene fra Flødevigen satt i sammenheng. Resultatene er fremstilt i figur 4.29 og 4.30. Figur 4.29 viser de fire mest dominante fettsyrene i prøvene, og hvordan andelen av disse forandrer seg over tid. Figur 4.30

viser endringene i åtte utvalgte fettsyrer som bidrar med mer enn 1% av andelen fettsyrer og har synlige endringer i hvor stor andel de bidrar med i løpet av tidsperioden.

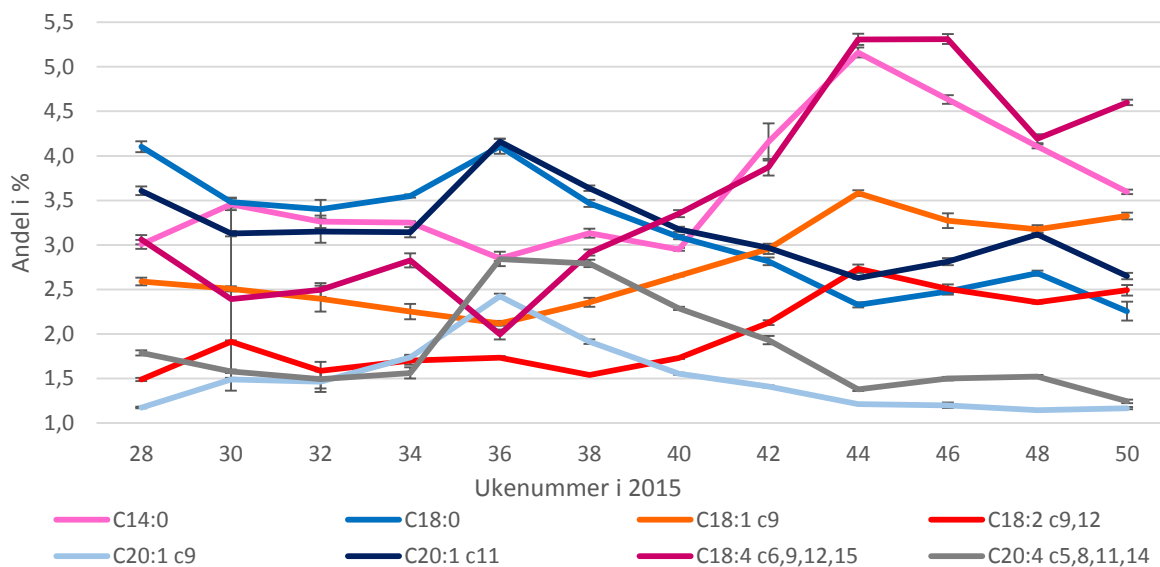
I løpet av det halve året prøvene fra Flødevigen ble tatt ut, økte prosentandelen C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19, mens andelen C16:0, C16:1 *cis* 9 og C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 avtok. Det er ikke mulig å vurdere fettsyrenes avhengighet av hverandre, fordi de allerede har direkte sammenheng ved å være andeler av samme sum.



Figur 4.29: Endringen i prosentandelen til fettsyrene C16:0, C16:1 *cis* 9, C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 ($n=4$). Dette er de fire fettsyrene med høyest prosentandel i prøvene fra Flødevigen, med standardavvik. *c* i figuren betyr at dobbeltbindingene har *cis*-konfigurasjon.

Fra uke 28 til uke 30 endres andelen for alle fettsyrene som er vist i figur 4.30. Uke 30 til uke 34 er andelen fettsyrer stabile, og deretter oppstår det to ulike trender. C18:0, C20:1 *cis* 9, C20:1 *cis* 11 og C20:4 *cis* 5,8,11,14 har en økning i uke 36 og deretter en jevn minking frem til uke 50. C14:0, C18:1 *cis* 9, C18:2 *cis* 9,12 og C18:4 *cis* 6,9,12,15 avtar i uke 36, stiger frem til uke 44, for deretter å avta igjen.

Det er enda fire fettsyrer med prosentandel over 1%. Disse er C18:1 *cis* 11, C18:3 *cis* 9,12,15, C20:2 *trans* 8,11 og C22:2 *cis* 13,16. Disse fettsyrene holder seg stabile over hele perioden på henholdsvis 2,1%, 1,5%, 2,6% og 1,9%. Resten av fettsyrene utgjør mindre enn 1% og det er vanskelig å trekke noen slutninger om disse.



Figur 4.30: Endringen i prosentandelen til fettsyrene C14:0, C18:0, C18:1 cis 9, C18:2 cis 9,12, C20:1 cis 9, C20:1 cis 11, C18:4 cis 6,9,12,15 og C20:4 cis 5,8,11,14 ($n=4$), med standardavvik. Resultatene er fra blåskjell fra Flødevigen. c i figuren betyr at dobbeltbindingene har cis-konfigurasjon.

4.4 Relasjon mellom arbeidene

En sammenligning av resultatene for DTX-3-profilen og fettsyreprofilen til en prøve utføres. Det er ikke hensiktsmessig å gjøre en sammenligning for prøvene som ikke har fått bestemt et eller flere DTX-3-toksiner. Følgende diskusjon er gjort for prøver som enten har fått detektert et DTX-3-toksin eller en DTX-3-profil.

Metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner kan ikke skille fettsyreesterne med hensyn på plassering av dobbeltbindinger, og *cis*- og *trans*-konfigurasjon. Det kan metoden for bestemmelse av FAME ved GC-MS. For å kunne sammenligne resultater fra disse to metodene har fettsyrer som er bestemt med GC-MS som har lik karbonkjede og lik grad av metning blitt lagt sammen til en felles prosentandel.

4.4.1 Prøver med kun et DTX-3-toksin detektert

Det er sannsynlig at skjellprøvene med et DTX-3-toksin detektert ved analyse på LC-MS/MS inneholder flere DTX-3-toksiner, men i konsentrasjoner under det som er mulig å detektere ved metoden. En prøve vil bli vurdert ut fra de fire fettsyrene det er detektert mest av i prøven, og andelen av disse, og hvilket DTX-3-toksin som ble detektert i prøven. Konsentrasjonen av

DTX-3-toksiner, det detekterte DTX-3-toksinet og de fire fettsyrene det er mest av er oppsummert i tabell 4.9.

Ved å se på dataene fremstilt i tabell 4.9 dukker det opp en rekke usikkerheter. Prøve *B-1437 Kaldvellfjorden*, *B-1423 Viganeset* og *O-1535 Viganeset* har fått deteksjon av DTX-3-toksinene DTX-1 C16:0 eller DTX-1 C16:1, selv om metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner oppgir konsentrasjonen av DTX-3 fra DTX-1 til 0 µg toksin/kg skjellmat. Dette betyr at ett av resultatene er feil, og vitner om en svakhet ved analysene, mest sannsynlig i metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner, men mulig også i metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. *Ø-1437 Kaldvellfjorden* inneholder DTX-3 fra DTX-1, men kun 3% av C16:1, noe som gjøre det lite sannsynlig at dette er det eneste DTX-3-toksinet i høy nok konsentrasjon til å gi deteksjon. Nesten alle prøvene som har fått bestemt en DTX-3-profil har OA/DTX-1 C16:0 som det dominerende toksinet. Dette er likevel den eneste østersprøven med DTX-1-toksiner som er analysert, og det er ikke umulig at DTX-1 C16:1 er lettere for østersen å danne enn DTX-1 C16:0. Dette må i så fall undersøkes nærmere ved å se på flere prøver av østers som er positive for DTX-1.

Østersprøvene fra Langholmen er positive for OA og DTX-1, og det er kun detektert OA/DTX-2 C16:0 i prøvene. Det samme gjelder *B-1532 Flødevigen*. C16:0 er den fettsyren prøvene inneholder mest av, og det er plausibelt å anta at dette kan være det eneste toksinet som er dannet i konsentrasjoner som kan detekteres ved analysemetoden. Hvis det er korrekt at disse prøvene inneholder OA/DTX-2 C16:0, og ikke kun en forurensning med samme masseovergang som toksinet, så kan metoden detektere toksiner med konsentrasjoner fra 26 µg DTX-3/kg skjellmat. Dette er en lavere konsentrasjon detektert enn det som var forventet for metoden. Resten av dataene i tabell 4.9 vitner om at metoden likevel ikke kan benyttes for prøver med denne konsentrasjonen av DTX-3-toksiner, fordi det er fare for falsk positiv deteksjon.

Tabell 4.9: Prøver med funn av kun et DTX-3-toksin. Oversikt over hvilket DTX-3-toksin som ble funnet ($n=2$), hvilken konsentrasjon av DTX-3-toksiner som ble bestemt ($n=1$), og de fire fettsyrene det er mest av i prøven, med prosentandel for fettsyrene i parentes ($n=4$). Konsentrasjon av DTX-3-toksin er oppgitt i μg toksin/kg skjellmat (S). Det er ikke registrert fettsyren til C15:1 i fettsyreprofilen til noen av skjellene. Ø-1437 Kaldvellfjorden har funn av DTX-3-toksin som ikke er blant de fire fettsyrene det er mest av, og har derfor angitt prosentandelen til den fettsyren som er funnet i toksinet. *B-1423 Viganeset har kun hatt deteksjon av DTX-3 i en av to injeksjonsparalleller.

	Ø-1542 Langholmen	Ø-1543 Langholmen	B-1532 Flødevigen	B-1437 Kaldvellfjorden	Ø-1437 Kaldvellfjorden	B-1423 Viganeset*	O-1535 Viganeset
DTX-3 funnet	OA/DTX-2 C16:0	OA/DTX-2 C16:0	OA/DTX-2 C16:0	DTX-1 C16:0	DTX-1 C16:1	DTX-1 C16:1	DTX-1 C16:0
μg DTX-3/kg S	26 fra OA/DTX-2	54 fra OA/DTX-2	35 fra OA/DTX-1	0 fra DTX-1	85 fra DTX-1	0 fra DTX-1	0 fra DTX-1
Fettsyrer	C16:0 (23%) C20:1 (6%) C20:5 (13%) C22:6 (18%)	C16:0 (24%) C20:1 (6%) C20:5 (13%) C22:6 (20%)	C16:0 (24%) C16:1 (8%) C20:5 (12%) C22:6 (23%)	C16:0 (22%) C16:1 (9%) C20:5 (9%) C22:6 (20%)	C16:0 (25%) C20:1 (6%) C20:5 (9%) C22:6 (19%) C16:1 (3%)	C16:0 (17%) C16:1 (18%) C20:5 (21%) C22:6 (10%)	C16:0 (20%) C16:1 (12%) C20:5 (21%) C22:6 (9%)
	B-1538 Flødevigen	B-1542 Flødevigen	B-1544 Flødevigen	B-1550 Flødevigen	B-1543 Langholmen	B-1544 Langholmen	
DTX-3 funnet	DTX-1 C15:1	DTX-1 C15:1	DTX-1 C15:1	DTX-1 C15:1	DTX-1 C15:1	DTX-1 C15:1	
μg DTX-3/kg S	0 fra DTX-1	0 fra DTX-1	0 fra DTX-1	0 fra DTX-1	0 fra DTX-1	0 fra DTX-1	
Fettsyrer	C16:0 (24%) C20:1 (6%) C20:5 (10%) C22:6 (24%)	C16:0 (24%) C18:1 (5%) C20:5 (9%) C22:6 (24%)	C16:0 (22%) C16:1 (7%) C20:5 (8%) C22:6 (24%)	C16:0 (21%) C16:1 (7%) C20:5 (10%) C22:6 (26%)	C16:0 (23%) C16:1 (8%) C20:5 (12%) C22:6 (23%)	C16:0 (22%) C16:1 (8%) C20:5 (11%) C22:6 (22%)	

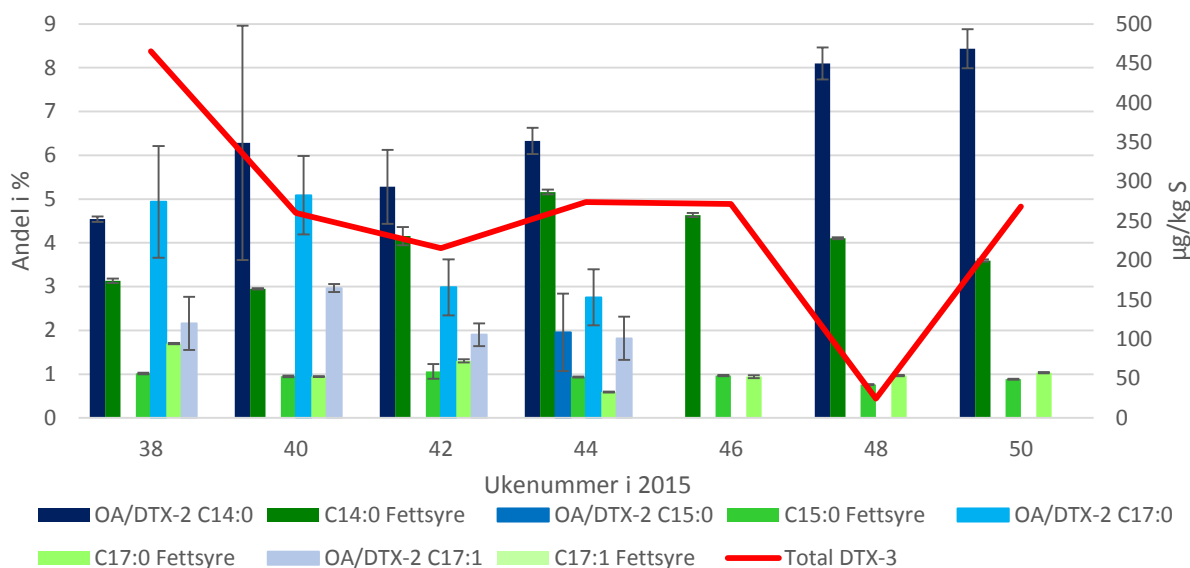
Flere av prøvene som har fått detektert en DTX-3-profil for OA-toksiner har også fått detektert DTX-1 C15:1. Det er en mulighet at toksinet ikke er til stede i noen av prøvene, men er en konsekvent urenhet, eller at deteksjonen er korrekt, og det er konsentrasjonen av DTX-3 fra DTX-1 som er underestimert. Felles for prøvene er at de ikke inneholder DTX-3 fra DTX-1 i henhold til metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. I tillegg er det ikke detektert fettsyren C15:1 ved analyse på GC-MS. I dette tilfellet mistenkes en forurensning i prøven som har samme masseovergang som DTX-1 C15:1. Det kan ikke utelukkes at tilsvarende er tilfellet for DTX-1 C16:0 og DTX-1 C16:1. En ting å merke seg er at alle prøvene som har fått deteksjon av DTX-3, er prøver som ble bestemt som toksiske ved metoden for kvantitativ analyse av OA-gruppetoksiner. Ingen av de ni prøvene som ble tatt ut som ikke-toksiske skjellprøver har fått bestemt DTX-3-toksiner ved metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner.

4.4.2 Prøver med DTX-3-profil

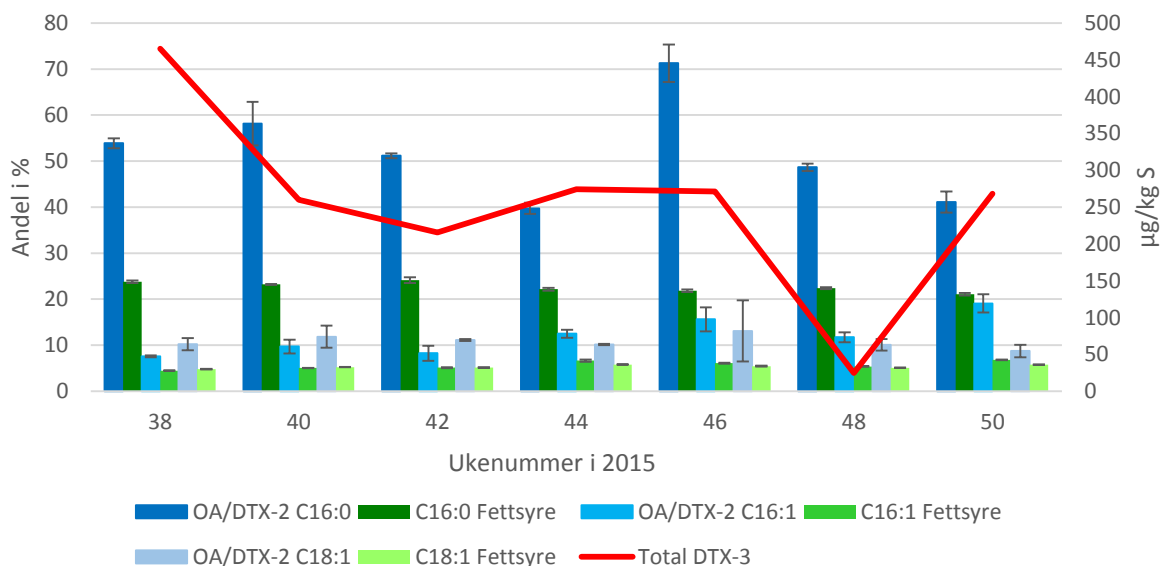
Det er kun ti prøver som fikk bestemt en DTX-3-profil. De andre prøvene inneholdt ikke nok DTX-3-toksiner til å bestemme en profil. Prøvene som fikk bestemt profil er syv prøver med blåskjell fra Flødevigen fra uke 38 – 50 i 2015, to prøver med blåskjell fra Langholmen og en blåskjellprøve fra Rundhaugen. *B-1443 Rundhaugen* fikk bestemt profil for DTX-3 både fra OA/DTX-2 og fra DTX-1, de andre prøvene fikk kun bestemt profil fra OA/DTX-2. Prøvene fra Flødevigen sees i sammenheng for å kunne vurdere endringene i toksinkonsentrasjonen, type toksiner og type fettsyrer i prøvene. Prøvene fra Langholmen presenteres i en felles figur og *B-1443 Rundhaugen* presenteres med resultatene for de to profilene hver for seg, sammen med de fettsyrene som også er funnet som fettsyrestere i DTX-3-profilen.

Prøver fra Flødevigen uke 38 – 50

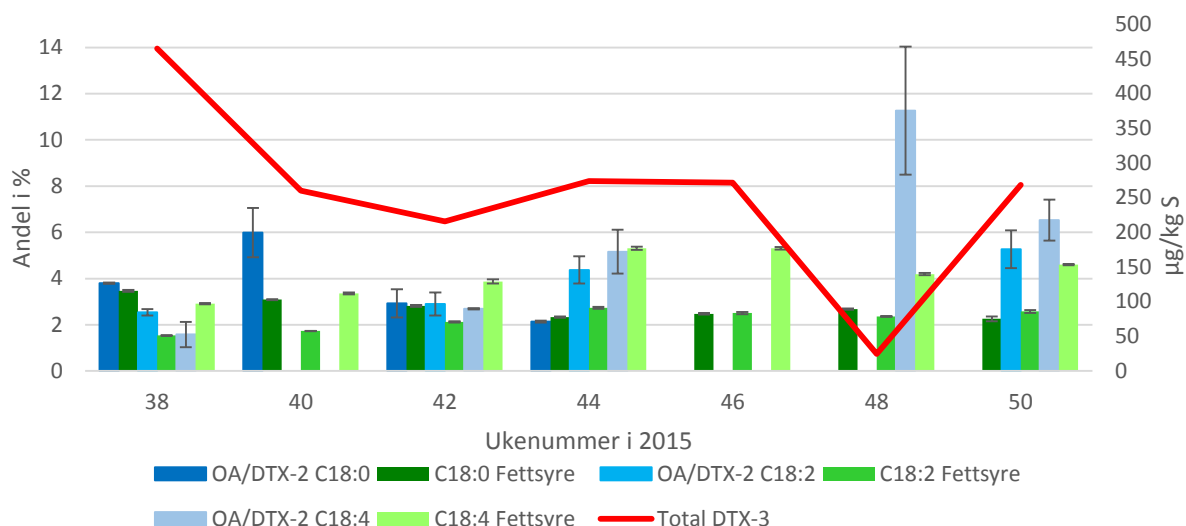
Resultatene for blåskjellprøver fra Flødevigen fra uke 38 – 50 i 2015 er fremstilt i figur 4.31 – 4.34. Det er detektert 13 ulike DTX-3-toksiner fra OA/DTX-2 i prøvene, og det er fremstilt tre eller fire av disse i hver figur. De fire figurene bør derfor sees i sammenheng. I tillegg er prosentandelen til de samme fettsyrene fremstilt i samme figur. Fettsyrer med lik karbonkjede og grad av metning er lagt sammen. Endring i konsentrasjon av DTX-3-toksiner er beskrevet i en kurve, og viser konsentrasjon av DTX-3-toksin fra OA og DTX-2 i µg toksin/kg skjellmat. Fettsyrer som ikke har tilsvarende DTX-3-toksin detektert i prøvene er ikke tatt med i figurene.



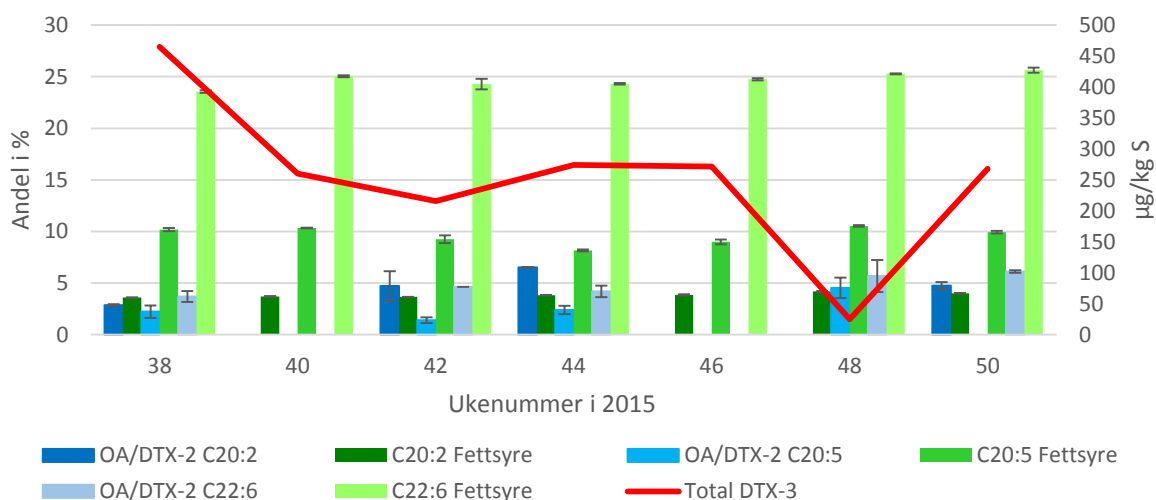
Figur 4.31: Fettsyre- og DTX-3-andeler for blåskjellprøver fra Flødevigen fra uke 38 til uke 50 i 2015. Stolpediagrammet viser prosentandel DTX-3 fra OA/DTX-2 ($n=2$) i blå barer, og prosentandel fettsyrer ($n=4$) i grønne barer, for fire ulike fettsyrer, C14:0, C15:0, C17:0 og C17:1. Alle barene følger venstre Y-akse og er oppgitt i prosentandel, med standardavvik. I tillegg er konsentrasjon av DTX-3 fra OA og DTX-2 ($n=1$) vist som en rød kurve som følger høyre Y-akse og er målt i μg toksin/kg skjellmat (S). Figuren bør sees i sammenheng med figur 4.32 – 4.34.



Figur 4.32: Fettsyre- og DTX-3-andeler for blåskjellprøver fra Flødevigen fra uke 38 til uke 50 i 2015. Stolpediagrammet viser prosentandel DTX-3 fra OA/DTX-2 ($n=2$) i blå barer, og prosentandel fettsyrer ($n=4$) i grønne barer, for tre ulike fettsyrer, C16:0, C16:1 og C18:1. Alle barene følger venstre Y-akse og er oppgitt i prosentandel, med standardavvik. I tillegg er konsentrasjon av DTX-3 fra OA og DTX-2 ($n=1$) vist som en rød kurve. Denne følger høyre Y-akse og er målt i μg toksin/kg skjellmat (S). Figuren bør sees i sammenheng med figur 4.31 og 4.33 – 4.34.



Figur 4.33: Fettsyre- og DTX-3-andeler for blåskjellprøver fra Flødevigen fra uke 38 til uke 50 i 2015. Stolpediagrammet viser prosentandel DTX-3 fra OA/DTX-2 (n=2) i blå barer, og prosentandel fettsyrer (n=4) i grønne barer, for tre ulike fettsyrer, C18:0, C18:1 og C18:4. Alle barene følger venstre Y-akse og er oppgitt i prosentandel, med standardavvik. I tillegg er konsentrasjon av DTX-3 fra OA og DTX-2 (n=1) vist som en rød kurve. Denne følger høyre Y-akse og er målt i µg toksin/kg skjellmat (S). Figuren bør sees i sammenheng med figur 4.31 – 4.32 og 4.34.



Figur 4.34: Fettsyre- og DTX-3-andeler for blåskjellprøver fra Flødevigen fra uke 38 til uke 50 i 2015. Stolpediagrammet viser prosentandel DTX-3 fra OA/DTX-2 (n=2) i blå barer, og prosentandel fettsyrer (n=4) i grønne barer, for tre ulike fettsyrer, C20:2, C20:5 og C22:6. Alle barene følger venstre Y-akse og er oppgitt i prosentandel, med standardavvik. I tillegg er konsentrasjon av DTX-3 fra OA og DTX-2 (n=1) vist som en rød kurve. Denne følger høyre Y-akse og er målt i µg toksin/kg skjellmat (S). Figuren bør sees i sammenheng med figur 4.31 – 4.33.

Utvelgelsesprosessen for hvilke fettsyrer som blir bundet til OA-gruppetoksinene ble vurdert. En måte skjellene kan gjøre dette på, er ved en tilfeldig utvelgelse av tilgjengelige fettsyrer i skjellene. Hvis dette er tilfellet vil DTX-3-profilen og fettsyreprofilen for en skjellprøve likne hverandre. En fettsyre som utgjør 10% av fettsyreprofilen vil føre til at 10% av DTX-3-profilen inneholder toksiner med denne fettsyreesteren. Et annet alternativ er at mekanismen som fester fettsyrene til OA-gruppetoksinene er tilpasset enkelte fettsyrer og ikke andre, slik at forskjeller mellom DTX-3-profilen og fettsyreprofilen er tydelig. DTX-3-profilene og fettsyreprofilene presentert i denne oppgaven er ikke like, og det er tydelig at valg av fettsyre til DTX-3-toksinene ikke er tilfeldig.

Figur 4.31 viser andelen til DTX-3-toksinene med medium korte kjeder og høy grad av metning. Dette gjelder OA/DTX-2 C14:0, C15:0, C17:0 og C17:1, og prosentandelen for de tilsvarende fettsyrene. Fettsyrer og toksiner med C14:0 og C17:0 utgjør en større andel av DTX-3-profilen enn i fettsyreprofilen. De virker godt tilpasset prosessen for dannelse av DTX-3. Dette er ikke like tydelig som for C16:0, se figur 4.32, kanskje fordi de utgjør en mindre andel av fettsyrene i skjellene. OA/DTX-2 C15:0 er kun detektert som DTX-3 i en av prøvene, i uke 44, og tilsvarer da 2% av DTX-3-profilen. Andelen til fettsyren C15:0 ligger stabilt på 1%, og det virker sannsynlig at det kan være korrekt. Konsentrasjonen av C15:0 i de andre prøvene kan være lavere enn det som kan detekteres med denne metoden. Resultatene for C17:1 ser annerledes ut enn for noen av de andre fettsyrene. OA/DTX-2 C17:1 er bestemt til mellom 2 og 3% av fettsyreprofilen, men det er ikke funnet fettsyren tilsvarende C17:1 i noen av skjellprøvene. Fettsyreesteren i DTX-3-toksinene skal ha blitt omdannet til FAME i omestringen med NaOCH₃ under prøveopparbeidelsen, og bør være mulig å detektere i fettsyreprofilen hvis den er til stede som DTX-3. Det er derfor sannsynlig at deteksjonen av OA/DTX-2 C17:1 egentlig er et annet ukjent stoff med samme overgang. Videre undersøkelser av denne overgangen bør utføres.

Figur 4.32 viser de tre mest dominante DTX-3-toksinene fra OA/DTX-2 i prøvene fra Flødevigen. Det er toksiner med fettsyrene C16:0, C16:1 og C18:1. Disse finnes i større andeler i DTX-3-profilen enn i fettsyreprofilen. Dette viser at fettsyrene C16:0, C16:1 og C18:1 mest sannsynlig er godt tilpasset den prosessen som danner DTX-3-toksinene. Felles for disse fettsyrene er at de har høy grad av metning og medium kort karbonkjede.

Andelen DTX-3 og andelen fettsyrer for C18:0, C18:2 og C18:4 er fremstilt i figur 4.33. Alle disse er bestemt i fettsyreprofilen til mellom 2 og 5%. OA/DTX-2 C18:0 og OA/DTX-2 C18:2 er bestemt i lignende andeler som de har i fettsyreprofilen, for de prøvene den er blitt detektert

i. C18:4 viser andre trender enn tidligere diskuterte fettsyrer. Fettsyren endres mellom 3 og 5%, og OA/DTX-2 C18:4 varierer fra ikke detektert i uke 40 og 46, til 11% i uke 48. C18:4 er en medium lang fettsyre, sett i forhold til fettsyrene som er detektert i skjellene, og den har høy grad av umettethet.

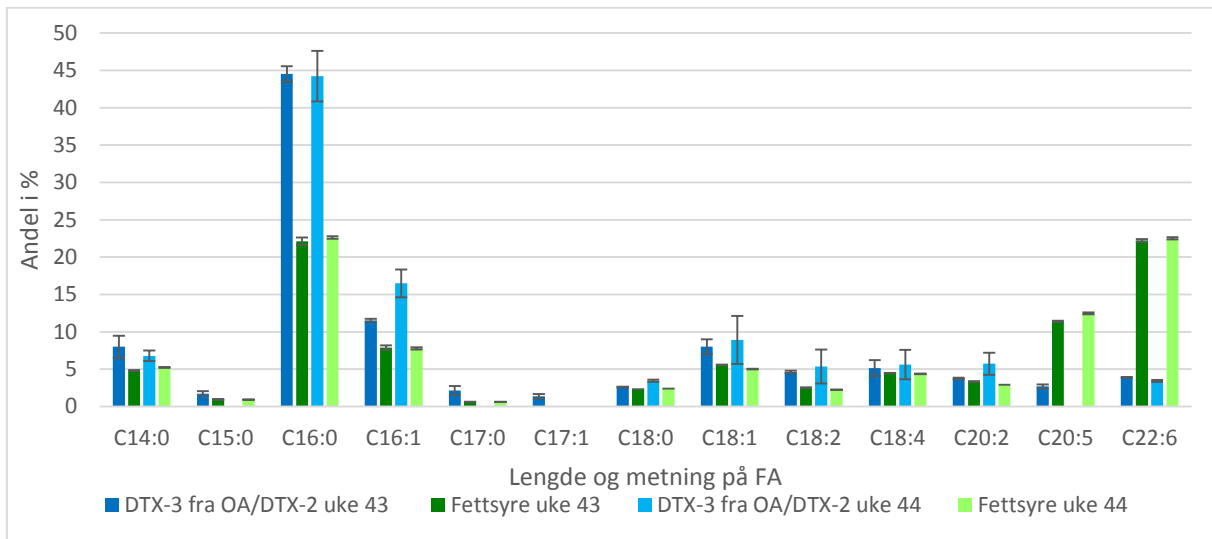
Figur 4.34 viser at C20:5 og C22:6 følger den motsatte trenden av C16:0, C16:1 og C18:1. Fettsyrene utgjør henholdsvis omtrent 10 og 25% av fettsyreprofilen. Det ville vært plausibelt å tro at det burde være tilsvarende andeler DTX-3-toksiner med disse fettsyreestere i prøvene, men det er ikke tilfellet. OA/DTX-2 C20:5 og OA/DTX-2 C22:6 utgjør ikke mer enn omtrent 5% hver av den totale DTX-3-profilen. I prøvene fra uke 40 og 46 er de ikke funnet i konsentrasjoner som er mulig å detektere. Det er plausibelt å anta fra disse resultatene at å benytte disse to fettsyrene til dannelse av DTX-3 er lite effektivt, eller at prosessen ikke fungerer like godt med de lange fettsyrene med høy grad av umettethet. DTX-3-toksin og fettsyre tilsvarende C20:2 er fremstilt i den samme figuren, og viser en trend som ligner C18:0 og C18:2. Andelen fettsyre ligger stabilt på 4%, og andelen i DTX-3-profilen varierer mellom 0 og 7%. Dette er en lang fettsyre med høyere grad av metning enn C20:5 og C22:6, som ikke følger samme trend. Det viser at det ikke kun er lengden på karbonkjeden som avgjør om fettsyrene er tilpasset dannelse av DTX-3.

En oppsummering av dette viser at prosessen for å danne DTX-3-toksiner er godt tilpasset kortere og mettede eller enumettede fettsyrer, men fungerer dårlig med lange, umettede fettsyrer. Mellom disse finnes det DTX-3-toksiner med fettsyreestere som for eksempel C20:2, som er relativt langkjedet, og C18:4, som har mange dobbeltbindinger. Disse to representerer et slags midtpunkt for fettsyrene som lett kan benyttes til dannelse av DTX-3. Begge utgir 3 til 5% av fettsyreprofilen, og en større andel enn dette i DTX-3-profilen i de tilfellene de er detektert.

Blåskjell fra Langholmen

Blåskjellprøvene fra Langholmen har også fått bestemt DTX-3-profil fra OA/DTX-2. Prosentandelene for DTX-3-toksinene og deres tilsvarende fettsyrer er vist i figur 4.35. Fettsyreprofilen for de to prøvene har ingen markante forskjeller, og det er ikke så overraskende, da de er tatt opp med en ukes mellomrom. Sammenligningen mellom DTX-3-profil og fettsyreprofil er veldig lik sammenligningen utført av prøvene fra Flødevigen. For toksinene er det funnet størst andel OA/DTX-2 C16:0, på over 40%, og deretter OA/DTX-2

C16:1 med en andel over 10%. Begge disse toksinene har større andel av DTX-3 enn andelen for de tilsvarende fettsyrene skulle tilsi. Toksinene OA/DTX-2 C14:0, C18:1 og C18:4 ligger mellom 5 og 10%, med andel for den tilsvarende fettsyren under 5%. De lange fettsyrene med høy grad av umettethet, som C20:5 og C22:6, har større andeler i fettsyreprofilen enn i DTX-3-profilen. Alt dette er i god overenstemmelse med det som ble funnet i blåskjellprøvene fra Flødevigen.



Figur 4.35: DTX-3-profil fra OA, med andel for tilsvarende fettsyre for B-1543 Langholmen og B-1544 Langholmen. De to prøvene er gitt navnene uke 43 og uke 44. Stolpediagrammet viser DTX-3-profilen fra OA/DTX-2 (n=2) i blått og andelen til de tilsvarende fettsyrene (n=4) i grønt, begge med standardavvik. Fettsyrer som ikke er bestemt i DTX-3-profilen er ikke rapportert. X-aksen navngis med fettsyren som er i DTX-3-toksinet. Konsentrasjonen av DTX-3 fra OA/DTX-2 i uke 43 og 44 er bestemt til henholdsvis 164 og 166 µg toksin/kg skjellmat.

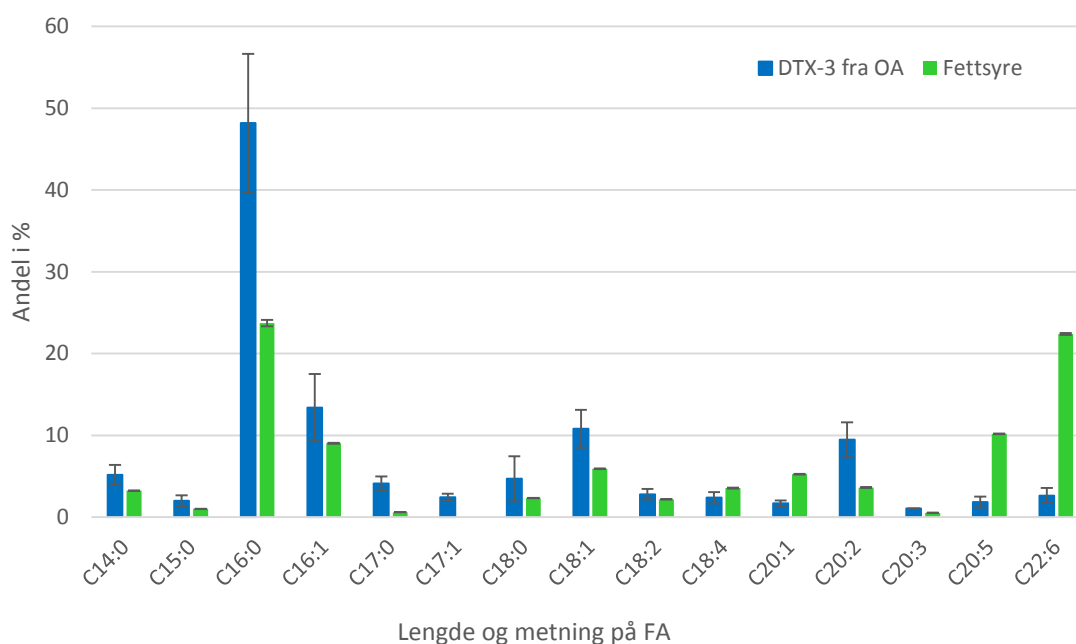
B-1443 Rundhaugen

Den eneste prøven som har fått bestemt en DTX-3-profil fra OA og fra DTX-1 er B-1443 Rundhaugen. Profilene er fremstilt i figur 4.36 og 4.37. Prøven har ikke fått detektert DTX-2 og DTX-3 fra DTX-2, og DTX-3-profilen fra OA/DTX-2 skal kun bestå av DTX-3 fra OA.

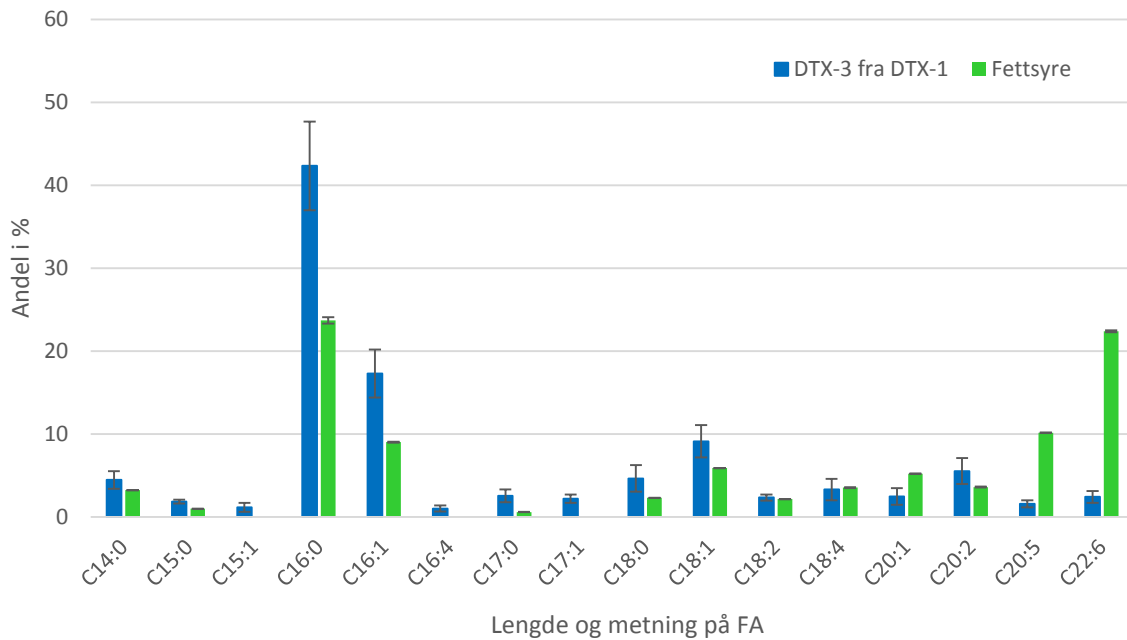
De to figurene viser profiler som er sammenlignbare med prøvene fra Flødevigen og Langholmen, men det er funnet OA C20:1 og OA C20:3, to DTX-3-toksiner som ikke ble detektert i de andre DTX-3-profilene. Det er bestemt større andel OA C20:2 enn DTX-1 C20:2, ellers er det få signifikante forskjeller mellom DTX-3-profilen fra OA og fra DTX-1. Det er bestemt størst andeler OA C16:0 og DTX-1 16:0, deretter følger C16:1 og C18:1 for både OA og DTX-1. Fettsyrene C20:5 og C22:6 er bestemt til andeler på henholdsvis 10 og 22%. Likevel tilsvarer ikke andelen DTX-3-toksiner med de samme fettsyreestene mer enn 3%.

Enkelte DTX-3-toksiner er bestemt kun for OA, og andre er kun bestemt for DTX-1. Dette er fordi toksinene som bestemmes er forskjellige for de to toksingruppene. Et toksin som kun bestemmes for DTX-3 fra OA er OA C20:3. Toksinene som kun bestemmes for DTX-3 fra DTX-1 er DTX-1 C15:1 og DTX-1 C16:4.

Flere av DTX-3-toksinene som har blitt bestemt har senere vist seg ikke å gi deteksjon for tilsvarende fettsyre i fettsyreprofilen. Dette gjør det lite sannsynlig at disse DTX-3-toksinene finnes i skjellene. Toksinene dette gjelder er DTX-1 C15:1, DTX-1 C16:4, DTX-1 C17:1 og OA C17:1. Fettsyrene C15:1 og C17:1 er ikke detektert i noe skjellmateriale. Fettsyren C16:4 er detektert i andre skjell, men ikke i *B-1443 Rundhaugen*. Dette vitner om at de utvalgte MRM-overgangene benyttet i metoden for bestemmelse av disse DTX-3-toksinene ikke er optimale, men kan føre til deteksjon selv om toksinene ikke er til stede i prøven. En nærmere undersøkelse av MS-spekter av mistenkte signaler kan vise mer om hvilke stoffer dette kan være. Hvis det viser seg å være uønskede forurensninger, bør overgangene fjernes fra metoden.



Figur 4.36: DTX-3-profil fra OA, med andel tilsvarende fettsyrer for *B-1443 Rundhaugen*. Stolpediagrammet viser DTX-3-profilen fra OA ($n=12$) i blått og andelen til de tilsvarende fettsyrene ($n=4$) i grønt, begge med standardavvik. Fettsyrer som ikke er bestemt i DTX-3-profilen er ikke tatt med i figuren. X-aksen navngis med fettsyren som er funnet i DTX-3-toksinet. Konsentrasjon av DTX-3 fra OA i prøven er bestemt til $754 \mu\text{g}$ toksin/kg skjellmat.



Figur 4.37: DTX-3-profil fra DTX-1, med andel tilsvarende fettsyrer for B-1443 Rundhaugen. Stolpediagrammet viser DTX-3-profilen fra DTX-1 ($n=12$) i blått og andelen til de tilsvarende fettsyrer ($n=4$) i grønt, begge med standardavvik. Fettsyrer som ikke er bestemt i DTX-3-profilen er ikke tatt med i figuren. X-aksen navngis med fettsyren som er funnet i DTX-3-toksinet. Konsentrasjonen av DTX-3 fra DTX-1 i prøven er bestemt til $142 \mu\text{g}$ toksin/kg skjellmat.

4.4.3 Forslag til forklaring på funn for dannelse av DTX-3

Yanagi *et al.* (1989) fant at DTX-3-toksiner med mange dobbeltbindinger var farligere for mus enn toksiner med høyere grad av metning på fettsyreesteren. Dette ble vist ved at konsentrasjonen av toksin som krevdes for å få en dødelig dose for mus var mindre for DTX-3-toksiner med høy grad av umettethet. Den samme variasjonen ble ikke funnet for symptomer på DSP i musene. Hvis DTX-3 med mettede fettsyrer er de som er minst toksiske for mus, er det ikke usannsynlig at det samme er tilfellet for blåskjellene. Dette gir et forslag til en forklaring på hvorfor DTX-3 i størst grad dannes med korte, mettede fettsyrer. Det er dette som i størst grad gjør toksinene mindre farlige for skjellene. Å bytte ut OA med et DTX-3-toksin med høy grad av umettethet vil gi et nesten like farlig toksin. Mennesker påvirkes av disse toksinene først når de brytes ned til sine opprinnelige toksiner, OA, DTX-1 og DTX-2, og opplever symptomer på DSP. Graden av metning på fettsyreesteren gjør derfor ingen vesentlig forskjell på graden av forgiftning for mennesker. For skjellene kan dette være et viktig valg som sørger for at de får fjernet påvirkningen av toksinene på raskeste måte.

4.4.4 Konsentrasjonsbegrensninger for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner

En vurdering av hvilken konsentrasjon av DTX-3 som er nødvendig for å benytte metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner i en prøve ble gjort. Konsentrasjon av toksiner i prøver ble vurdert ut ifra om de har fått bestemt en DTX-3-profil, ett DTX-3-toksin eller ingen funn av DTX-3-toksiner. En oversikt over hvilke toksiske prøver som har DTX-3-profil og hvilke som kun har detektert ett toksin er fremstilt i tabell 4.10.

*Tabell 4.10: Oversikt over toksiske prøver, konsentrasjonen av DTX-3-toksiner som er bestemt i hver prøve oppgitt i µg toksin/kg skjellmat (S), og om det er bestemt en DTX-3-profil fra OA/DTX-2 og DTX-1. De prøvene som er oppgitt med ett toksin har kun fått bestemt det toksinet. Prøver med mer enn et DTX-3-toksin detektert er merket med Profil. Prøver som ikke har fått detektert DTX-3-toksiner merkes «I.D» for ikke detektert. *Toksinet som er bestemt er mistenkt å være en falsk positiv.*

	DTX-3 fra OA [µg/kg S]	DTX-3 fra DTX-1 [µg/kg S]	DTX-3 fra DTX-2 [µg/kg S]	DTX-3 fra OA/DTX-2	DTX-3-profil fra DTX-1
B-1528 Flødevigen	14	0	3	I.D	I.D
B-1530 Flødevigen	18	2	4	I.D	I.D
B-1532 Flødevigen	28	2	7	OA/DTX-2 C16:0	I.D
B-1534 Flødevigen	19	1	9	I.D	I.D
B-1536 Flødevigen	5	0	0	I.D	I.D
B-1538 Flødevigen	460	0	5	Profil	DTX-1 C15:1*
B-1540 Flødevigen	214	0	46	Profil	I.D
B-1542 Flødevigen	177	0	38	Profil	DTX-1 C15:1*
B-1544 Flødevigen	176	0	98	Profil	DTX-1 C15:1*
B-1546 Flødevigen	104	0	167	Profil	I.D
B-1548 Flødevigen	25	0	0	Profil	I.D
B-1550 Flødevigen	60	0	208	Profil	I.D
B-1544 Langholmen	122	0	44	Profil	DTX-1 C15:1*
B-1543 Langholmen	117	0	47	Profil	DTX-1 C15:1*
B-1443 Rundhaugen	754	142	0	Profil	Profil
B-1423 Viganeset	1	0	1	I.D	DTX-1 C16:1*
B-1437 Kaldvellfjorden	4	0	1	I.D	DTX-1 C16:0*
K-1206 Fluarholmen	7	0	4	I.D	I.D
K-1424 Dyrøy	15	5	16	I.D	I.D
O-1535 Viganeset	7	0	2	I.D	DTX-1 C16:0*
O-1423 Viganeset	3	0	0	I.D	I.D
Ø-1437 Kaldvellfjorden	4	85	0	I.D	DTX-1 C16:1
Ø-1542 Langholmen	16	0	10	OA/DTX-2 C16:0	I.D
Ø-1543 Langholmen	31	0	23	OA/DTX-2 C16:0	I.D

Det er kun *B-1443 Rundhaugen* som har fått bestemt en profil for DTX-3 fra DTX-1. Det betyr at 142 µg DTX-3/kg skjellmat er nok til å lage en DTX-3-profil fra DTX-1. Prøve *Ø-1423*

Kaldvellfjorden har kun fått detektert DTX-1 C16:1, og inneholder 85 µg toksin/kg skjellmat. Det er usikkert om dette er deteksjon av et DTX-3-toksin, eller en falsk positiv deteksjon. Åtte prøver med et detektert DTX-3-toksin fra DTX-1 er bestemt til å inneholde 0 µg toksin/kg skjellmat for DTX-3 fra DTX-1 og det viser at det er mulighet for falsk positiv deteksjon ved bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner fra DTX-1.

Det ser ut til at det kreves lavere konsentrasjoner for bestemmelse av en profil for DTX-3 fra OA/DTX-2 enn for DTX-3 fra DTX-1. Den prøven med lavest bestemt konsentrasjon av DTX-3 fra OA og DTX-2, som har fått bestemt en DTX-3-profil for OA/DTX-2, er *B-1548 Flødevigen*. Prøven er bestemt til å inneholde 25 µg/kg skjellmat DTX-3 fra OA og DTX-2. Dette er overraskende lavt, og kan vitne om en underestimering ved bestemmelse av konsentrasjon av DTX-3-toksiner. Det ble kun detektert tre ulike DTX-3-toksiner, men det er prøver med høyere konsentrasjon av DTX-3-toksiner som har fått bestemt kun ett toksin. Den prøven med DTX-3-profil og nest lavest konsentrasjon av DTX-3-toksiner fra OA/DTX-2 er *B-1543 Langholmen* som inneholder totalt 164 µg toksin/kg skjellmat fra OA og DTX-2, og det er nærmere forventet konsentrasjon for bestemmelse av en DTX-3-profil.

For bestemmelse av ett DTX-3-toksin er grensen lavere, men også mer tvetydig. Prøvene *B-1532 Flødevigen*, *Ø-1542 Langholmen* og *Ø-1543 Langholmen* inneholder henholdsvis 35, 26 og 54 µg toksin/kg skjellmat DTX-3 fra OA og DTX-2, og har fått bestemt ett toksin ved metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner. Prøvene *B-1534 Flødevigen* og *K-1424 Dyrøy* inneholder henholdsvis 28 og 32 µg toksin/kg skjellmat DTX-3 fra OA og DTX-2, men har ikke fått detektert DTX-3-toksiner. Konsentrasjonen av de ulike DTX-3-toksinene vil kunne variere selv om den totale konsentrasjonen av DTX-3 er den samme, fordi deteksjonen også vil avhenge av fordelingen av DTX-3-toksinene. Det er ønskelig å kunne bestemme minimum ett toksin i en prøve som inneholder 50 µg toksin/kg skjellmat DTX-3 fra OA og DTX-2 i blåskjell. For å sørge for at dette er tilfelle, bør flere prøver med konsentrasjon rundt 50 µg/kg skjellmat undersøkes. Den nedre konsentrasjonen som gir deteksjon kan variere for ulike skjellarter, fordi fordelingen av DTX-3-toksiner kan være helt annerledes i andre arter enn blåskjell. Dette bør derfor vurderes for hver nye art som analyseres med metoden. Den laveste konsentrasjonen av DTX-3-toksin som kan oppnå bestemmelse av en DTX-3-profil, vil derfor ligge mellom 50 og 164 µg toksin/kg skjellmat for DTX-3 fra OA/DTX-2, og mellom 85 og 142 µg toksin/kg skjellmat for DTX-3 fra DTX-1.



5 Konklusjon

En optimalisert hydrolyse av skjellmateriale ble diskutert, og følgende metode ble anbefalt: Det bør tilsettes 150 µL 4,0 M NaOH i H₂O til 1,2 mL skjellekstrakt i et PP-rør med skrukork. Prøven bør hydrolyseres ved 37 °C i 45 minutter, og avkjøles i 20-30 minutter før 150 µL 4,25 M HCl i metanol tilsettes og prøven er klar for injeksjon på LC-MS/MS. Temperatur og tid bør testes videre for å oppnå maksimal hydrolyse.

Bestemmelse av en DTX-3-profil med metoden som ble laget, var mulig for prøver med konsentrasjoner fra 164 µg DTX-3/kg skjellmat for OA/DTX-2, og fra 142 µg DTX-3/kg skjellmat for DTX-1. Det ble kun bestemt DTX-3-profil for toksiske blåskjell fra Rundhaugen, Langholmen og Flødevigen. Det kan ikke vises til separasjon av DTX-3-toksiner fra OA og DTX-2 med samme fettsyreester.

Det ble bestemt en fettsyreprofil for prøver av blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers. De dominerende fettsyrene i alle artene var C16:0 (20 – 25%), C16:1 *cis* 9 (10 – 15%), C20:5 *cis* 5,8,11,14,17 (10 – 20%) og C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19 (15 – 20%), med unntak av østers som inneholdt mindre enn 5% C16:1 *cis* 9 og O-skjell som inneholdt mindre enn 10% C22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19.

DTX-3-profilen til blåskjell inneholder størst andel toksiner med medium korte og mettede eller enumettede fettsyrer, som C16:0, C16:1 og C18:1. Selv om fettsyreprofilen inneholder like store andeler av fettsyrene C16:0, C20:5 og C22:6, er det en mindre andel av de lange og umettede fettsyrene som benyttes til dannelsen av DTX-3-toksiner. Dette er i overensstemmelse med tidligere funn, hvor DTX-3 med mange dobbeltbindinger i fettsyreesteren har vist seg å være mer giftig enn toksiner med mettede fettsyreestere (Yanagi *et al.*, 1989).



6 Videre arbeid

Undersøkelsene av hydrolysetrinnet viste at en hydrolyse ved temperatur under 76 °C kan være fordelaktig for kvantitativ analyse av DTX-3-toksiner, men hvilken temperatur og tid som er optimal for en fullstendig og repeterbar hydrolyse ble ikke bestemt. En videre undersøkelse av dette kan være viktig for analyse av toksinkonsentrasjonen i skjell med bedre presisjon enn det som oppnås i dag.

Metoden som ble utviklet for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner fungerer, men er ikke perfekt. Fettsyreprofilen til prøvene inneholdt ikke fettsyrene C15:1 og C17:1. Disse toksinene blir detektert i skjellene av metoden for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner. Dette vitner om at metoden viser falsk positiv deteksjon for toksiner med disse fettsyrene, og en videre undersøkelse av dette er nødvendig for en velfungerende metode. Det samme kan også gjelde DTX-3-toksiner med fettsyreester av C16:4.

Muligheten for å separere DTX-3 fra OA og DTX-2 bør utforskes videre. Dette kan gjøres ved å undersøke om for eksempel en fenylkolonne eller en C4-kolonne fører til separasjonen, eller ved å teste bruk av andre mobilfaser. For disse undersøkelsene vil det være viktig å benytte skjellmateriale som inneholder høyere konsentrasjoner DTX-3 fra DTX-2 enn det som ble benyttet i denne oppgaven. Ved å benytte skjell fra områder som tidligere har vist i stor grad å inneholde DTX-2, som for eksempel skjell fra Irland (Fux *et al.*, 2009), bør det være mulig teste separasjon av DTX-3 fra OA og DTX-2. Videre undersøkelser av profil for ulike DTX-3-toksiner for O-skjell som inneholder OA-gruppetoksiner og østers som inneholder DTX-1 vil utdype funn i denne oppgaven.

Det er i denne oppgaven ikke funnet noen direkte sammenheng mellom prosentandelen fettsyrer i DTX-3-profilen og fettsyreprofilen til en prøve, og det er derfor konkludert med at prosessen med å danne DTX-3-toksiner ikke benytter tilfeldige tilgjengelige fettsyrer. Ut i fra resultatene i denne oppgaven er dette en plausibel konklusjon. Det er ikke blitt vurdert hvilke fraksjoner fettsyrene befinner seg i. For å oppnå mer informasjon om dannelsen av DTX-3, kunne fettsyreprofilen blitt bestemt for polare lipider, nøytrale lipider og frie fettsyrer hver for seg. Disse kan sammenlignes med DTX-3-profilen for å vurdere om de enkelte fraksjonene har bedre overensstemmelse med DTX-3-profilen som er funnet for blåskjellene. Dette vil kunne gi informasjon om hvilke typer molekyler som donerer en fettsyre for dannelse av DTX-3.



7 Referanser

1. Aasen, J. A. (2005). *Identification and quantification of algal toxins in shellfish, and characterisation of toxin profiles in Norwegian mussels*: Norwegian School of Veterinary Science, Department of Food Safety and Infection Biology.
2. Abad, M., Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G. & Sánchez, J. L. (1995). Seasonal variations of lipid classes and fatty acid in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol.*, 110C (2): 109-118.
3. Anderson, D. M. (1989). Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. I: Okaichi, Anderson & Nemoto (red.) *Red tides: Biology, environmental science and toxicology*: Elsevier Science Publishing Co.
4. Aune, T., Larsen, S., Aasen, J. A. B., Rehmann, N., Satake, M. & Hess, P. (2007). Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicon*, 49: 1-7.
5. Bauder, A. G., Cambella, A. D., Bricelj, V. M. & Quilliam, M., A. . (2001). Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopectan irradians*. *Marine Ecology Progress Series*, 213: 39-52.
6. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (8): 911-917.
7. Caers, M., Coutteau, P., Cure, K., Morales, V., Gajardo, G. & Sorgeloos, P. (1999). The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 11819): I. Fatty acid composition and lipid content in six organs. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 123: 89-96.
8. EFSA. (2009a). Marine biotoxins in shellfish - Domoic acid. *The European Food Safety Authority Journal*, 1181: 1-61.
9. EFSA. (2009b). Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group. *The European Food Safety Authority Journal*, 1019: 1-76.
10. EFSA. (2009c). Marine biotoxins in shellfish - Summary on regulated marine biotoxins. *The European Food Safety Authority Journal*, 1306: 1-23.
11. EU-RL-MB. (2011). *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs by LC-MS/MS Version 4*: European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins. 31 s.
12. EU-RL-MB. (2015). *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs by LC-MS/MS Version 5*: European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins. 33 s.
13. EU. (2004). *Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin*: European Union. 61 s.

14. EU. (2005). *Commission regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain product under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004*: European Union. 57 s.
15. EU. (2011). *Commission regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs*: European Union. 4 s.
16. Ezgeta-Balić, D., Najdek, M., Peharda, M. & Blažina, M. (2012). Seasonal fatty acid profile analysis to trace origin of food sources of four commercially important bivalves. *Aquaculture*, 334-337: 89-100.
17. FAO/IOC/WHO. (2005). *Report on the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs*. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotoxin_report_en.pdf.
18. Fernandez, M. & Cembella, A. D. (1995). Chapter 10 Part B, Mammalian bioassays. I: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. & Cembella, A. D. (red.) b. IOC manuals and guides no. 33. *Manual on harmful marine microalgae*, s. 213-228: UNESCO.
19. Flåten, M. (2012). *O-skjell, Bilde*, 15.03.16. https://no.wikipedia.org/wiki/Oskjell#/media/File:Modiolus_modiolus.jpg: Wikipedia.
20. Freitas, L., Fernandez-Reiriz, M. J. & Labarta, U. (2002). Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 132: 453-461.
21. Fux, E., Bire, R. & Hess, P. (2009). Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland. *Harmful Algae*, 8: 523-537.
22. García, C., Truan, D., Lagos, M., Santelices, J. P., Díaz, J. C. & Lagos, N. (2005). Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxins contaminated shellfish. *The Journal of Toxicological Sciences*, 30 (4): 287-296.
23. Harwood, L. M., Moody, C. J. & M., P. J. (1999). *Experimental Organic Chemistry - Standard and microscale*. 2. utg.: Blackwell Science.
24. Hashimoto, Y., Kanna, K. & A., S. (1949). On shell-fish poisons. II Paralytic poison. (Preliminary report.). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 15 (12): 771-776.
25. iStockPhoto. (2016). *Østers, Bilde*. <https://snl.no/%C3%B8sters>: Store Norske Leksikon.

26. Kumagai, M., Yanagi, T., Murata, M., Yasumoto, T., Kat, M., Lassus, P. & Rodriguez-Vazquez, J. A. (1986). Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50 (11): 2853-2857.
27. Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Iddya, K. & Ababouch, L. (2011). *Assessment and management of biotoxin risk in bivalve molluscs*, b. 551: FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. 337 s.
28. Lee, J., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P. & Yasumoto, T. (1989). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of applied phycology*, 1: 147-152.
29. Lindegarh, S., Torgersen, T., Lundve, B. & Sandvik, M. (2009). Differential retention of okadaic acid (OA) group toxins and pectenotoxins (PTX) in the Blue Mussel, *Mytilus edulis* (L.), and the European Flat Oyster, *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Shellfish Research*, 28 (2): 313-323.
30. Losada, M. C., Leao, J. M., Gago-Martinez, A., Rodriguez-Vazquez, J. A. & Quilliam, M., A. (1999). Further studies on the analysis of DSP toxin profiles in Galician mussels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47: 618-621.
31. Madigan, T. L., Lee, K. G., Padula, D. J., McNabb, P. & Pointon, A. M. (2006). Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish. *Harmful Algae*, 5: 119-123.
32. Mattilsynet. (2015). *Blåskjellvarsel*. www.matportalen.no/verktoy/blaskjellvarsel/: Matportalen.no (25.09.2015).
33. Miller, J. M. (2005). *Chromatography - Concepts and contrasts*. 2. utg.: John Wiley & Sons. 490 s.
34. Murphy, K. J., Mooney, B. D., Mann, N. J., Nichols, P. D. & Sinclair, A. J. (2002). Lipid, FA and sterol composition of New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*) and Tasmanian blue mussel (*Mytilus edulis*). *Lipids*, 37 (6): 587-595.
35. Murphy, K. J., Mann, N. J. & Sinclair, A. J. (2003). Fatty acid and sterol composition of frozen and freeze-dried New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna Canaliculus*) from three sites in New Zealand. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 12 (1): 50-60.
36. Napolitano, G. E., MacDonald, B. A., J., T. R. & Ackman, R. G. (1992). Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Plactopecten magellanicus*) from different habitats. *Marine Biology*, 113: 71-76.
37. NDLA. (2016). *Kamskjell, Bilde*. <http://ndla.no/nb/node/3719>: Norsk Sjømatråd.
38. NMBU. (2013). *M-AL 10: Bestemmelse av fettløselige marine algetoksiner i skjell vha. HPLC med massespektrometrisk deteksjon*: Institutt for Mattrygghet og Infeksjonsbiologi (MatInf).

39. Passi, S., Cataudella, S., Di Marco, P., De Simone, F. & Rastrelli, L. (2002). Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different mediterranean marine species of fish and shellfish. *J Agric Food Chem*, 50: 7314-7322.
40. Shumway, S. E., Barter, J. & Sherman-Caswell, S. (1990). Auditing the impact of toxic algal blooms on oysters. *Environmental Auditor*, 2 (1): 41-56.
41. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography*. 3. utg.: John Wiley & Sons.
42. Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T. & Yamasaki, M. (1996). Interference of free fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins. *Lipids*, 31 (6): 641-645.
43. Suzuki, T., Ota, H. & Yamasaki, M. (1999). Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon*, 37: 187-198.
44. Suzuki, T. & Mitsuya, T. (2001). Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Pactinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 39: 905-908.
45. Suzuki, T., Igarashi, T., Ichimi, K., Watai, M., Suzuki, M., Ogiso, E. & Yasumoto, T. (2005). Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science*, 71: 948-955.
46. Svensson, S. & Forlin, L. (2004). Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology*, 66 (4): 405-418.
47. Takai, A., Biajolan, C., Troschka, M. & Rüegg, J. C. (1987). Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *Federation of European Biochemical Societies*, 217 (1): 81-84.
48. Takai, A. (1988). Protein phosphatase inhibition and muscle contractile effects. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 9: 563-565.
49. Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G. & Yasumoto, T. (1992). Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. *Biochemical Journal*, 284: 539-544.
50. Torgersen, T. (2008). *Characterization of fatty acid esters of lipophilic algal toxins, and studies of level and profiles in three marine species*: Norwegian School of Veterinary Science, Department of Food Safety and Infection Biology. 69 s.
51. Torgersen, T., Lindegarh, S., Ungfors, A. & Sandvik, M. (2008a). Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part I: brown crab (*Cancer pagurus*). *Toxicon*, 52 (3): 407-417.

52. Torgersen, T., Miles, C. O., Rundberget, T. & Wilkins, A. L. (2008b). New esters of okadaic acid in seawater and blue mussels (*Mytilus edulis*). *J Agric Food Chem*, 56 (20): 9628-9635.
53. Torgersen, T., Sandvik, M., Lundve, B. & Lindegarth, S. (2008c). Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part II: Blue mussels (*Mytilus edulis*) and flat oyster (*Ostrea edulis*). *Toxicon*, 52: 418-427.
54. Torgersen, T., Wilkins, A. L., Rundberget, T. & Miles, C. O. (2008d). Characterization of fatty acid esters of okadaic acid and related toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Norway. *Rapid communications in mass spectrometry*, 22: 1127-1136.
55. Toyofuku, H. (2006). Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin*, 52: 1735-1745.
56. Vale, P. & Sampayo, M. A. M. (1999). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37: 1109-1121.
57. Vale, P. & Sampayo, M. A. M. (2002). Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS - a widespread phenomenon. *Toxicon*, 40: 33-42.
58. Vale, P. (2006). Detailed profiles of 7-O-acyl esters in plankton and shellfish from the Portuguese coast. *Journal of Chromatography A*, 1128 (1-2): 181-188.
59. Vale, P. (2010). Profiles of fatty acids and 7-O-acyl okadaic acid esters in bivalves: can bacteria be involved in acyl esterification of okadaic acid? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 151: 18-24.
60. Van den Top, H. J., Gerssen, A. & van Egmond, H. P. (2011). Quantitative determination of marine lipophilic toxins in shellfish using LC-MS/MS - International validation study - final report: RIKILT Institute of Food Safety. 69 s.
61. Van Egmond, H. P., Van Apeldoorn, M. E. & Speijers, G. J. A. (2004). *Marine biotoxins*: FAO Food and Nutrition Paper. 287 s.
62. Yanagi, T., Murata, M., Torigoe, K. & Yasumoto, T. (1989). Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (2): 525-529.
63. Yasumoto, T., Oshima, Y. & Yamaguchi, M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Tohoku District. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44 (11): 1249-1255.
64. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. K. & Clardy, J. (1985). Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41 (6): 1019-1025.
65. Zandee, D. I., Kluytmans, J. H., Zurburg, W. & Pieters, H. (1980). Seasonal variation in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gemetogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research*, 14 (1): 1-29.

66. Zenz, R. (2016). *Blåskjell, Bilde*. <https://snl.no/bl%C3%A5skjell>: Store Norske Leksikon.
67. Zingone, A. & Enevoldsen, H. O. (2000). The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management*, 43: 725-748.

8 Vedlegg

8.1 Vedlegg 1: Prøveoversikt

Tabell 8.1: Prøveoversikt. Prøvene er oppgitt med art, lokalitet for uttak av prøven, og år og ukenummer for uttak. Algelaboratoriets prøvenummer er oppgitt for å sikre sporbarhet i ettertid. Prøver merket med * er ikke-toksiske prøver.

Navn	Art	Lokalitet	År og ukenr	Algelaboratoriets prøvenr.
B-1423 Viganeset	Blåskjell	Viganeset	U1423	AL14-00327
B-1437	Blåskjell	Kaldvellfjorden	U1437	AL14-00600
Kaldvellfjorden				
B-1544 Langholmen	Blåskjell	Langholmen	U1544	AL15-00765
B-1543 Langholmen	Blåskjell	Langholmen	U1543	AL15-00747
B-1528 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1528	AL15-00469
B-1530 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1530	AL15-00517
B-1532 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1532	AL15-00538
B-1534 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1534	AL15-00576
B-1536 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1536	AL15-00612
B-1538 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1538	AL15-00656
B-1540 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1540	AL15-00703
B-1542 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1542	AL15-00727
B-1544 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1544	AL15-00755
B-1546 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1546	AL15-00787
B-1548 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1548	AL15-00811
B-1550 Flødevigen	Blåskjell	Flødevigen	U1550	AL15-00843
B-1443 Rundhaugen	Blåskjell	Rundhaugen	U1443	AL14-00751
B-1540 Møriholmen*	Blåskjell	Møriholmen	U1540	AL15-00694*
B-1540 Kjørem*	Blåskjell	Innhered og Fosen	U1540	AL15-00699*
B-1540 Skulgambukt*	Blåskjell	Skulgambukt	U1540	AL15-00702*
K-1424 Dyrøy	Kamskjell	Dyrøy	U1424	AL14-00340
K-1206 Fluarholmen	Kamskjell	Fluarholmen	U1206	AL12-00034
K-1422 Horsvær*	Kamskjell	Horsvær	U1422	AL14-00308*
K-1422 Svinøya*	Kamskjell	Svinøya	U1422	AL14-00309*
O-1423 Viganeset	O-skjell	Viganeset	U1423	AL14-00329
O-1535 Viganeset	O-skjell	Viganeset	U1535	AL15-00601
O-1418 Bergen*	O-skjell	Bergen H-68	U1418	AL14-00224*
O-1423 Bergen*	O-skjell	Bergen og Omland	U1423	AL14-00324*
Ø-1542 Langholmen	Østers	Langholmen	U1542	AL15-00732
Ø-1543 Langholmen	Østers	Langholmen	U1543	AL15-00748
Ø-1437	Østers	Kaldvellfjorden	U1437	AL14-00601
Kaldvellfjorden				
Ø-1541 Langholmen*	Østers	Langholmen	U1541	AL15-00711*
Ø-1539 Rogøysund*	Østers	Rogøysund	U1539	AL15-00675*

8.2 Vedlegg 2: Rådata for undersøkelse av hydrolyse

Tabeller med data fra undersøkelse av hydrolyse

Tabell 8.2: Konsentrasjon av DTX-3-toksiner bestemt ved hydrolyse hvor tiden før tilsatt HCl varierer. Resultatene viser konsentrasjon av DTX-3 fra OA, DTX-3 fra DTX-1 og total DTX-3. Toksinkonsentrasjonen er oppgitt i μg toksin/kg skjellmat (S) Hver variabel er målt i tre replikater ($n=3$), med unntak av målingen ved 1440 minutter, som er utført i seks replikater ($n=6$). Resultatene er fremstilt i figur 4.1.

Minutter	DTX-3 fra OA	RSD	DTX-3 fra DTX-1	RSD	Total DTX-3	RSD
	$[\mu\text{g}/\text{kg S}]$	$[\%]$	$[\mu\text{g}/\text{kg S}]$	$[\%]$	$[\mu\text{g}/\text{kg S}]$	$[\%]$
10	1607	6	1088	22	2695	13
15	1618	4	1060	20	2678	11
20	1661	1	1197	3	2858	2
30	1697	2	1162	8	2859	5
45	1574	10	938	29	2512	17
60	1608	4	1259	14	2867	8
90	1745	8	1277	20	3022	13
120	1629	4	1113	10	2742	6
150	1622	3	1151	7	2773	5
180	1585	7	1117	16	2702	11
300	1576	4	1026	8	2602	5
1440	1574	4	1498	36	3072	19

Tabell 8.3: Konsentrasjon i løsninger målt ved titrering hver måned i 6 måneder. Konsentrasjonene er grafisk fremstilt i figur 4.2.

Løsninger	09.15	10.15	11.15	12.15	01.16	02.16	03.16
	$[M]$	$[M]$	$[M]$	$[M]$	$[M]$	$[M]$	$[M]$
HCl i 100% H ₂ O	2,50	2,53	2,53	2,53	2,58	2,67	2,61
HCl i 100% MeOH	2,50	2,52	2,52	2,48	2,51	2,63	2,69
NaOH i 100% H ₂ O	2,49	2,43	2,52	2,47	2,53	2,53	2,61
NaOH i 80% MeOH	2,51	2,53	2,67	2,66	2,82	2,97	
NaOH i 100% MeOH	2,51	2,52	2,50	2,70	2,87	3,09	

8.3 Vedlegg 3: Konsentrasjon av OA-gruppetoksiner

Tabell 8.4: Konsentrasjon av OA-gruppetoksiner bestemt før og etter hydrolyse av blåskjellprøver fra Flødevigen og i blåskjell fra tre lokaliteter som ikke inneholdt toksiske skjell i henhold til tidligere analyse ved Algelaboratoriet. Ikke-toksiske prøver er merket med *. Konsentrasjon av OA, DTX-1 og DTX-2 er beregnet fra skjellmateriale som ikke er hydrolysert. Konsentrasjon av DTX-3 er beregnet fra skjellmateriale som har vært gjennom hydrolyse. Konsentrasjon av toksiner er oppgitt i μg toksin/kg skjellmat (S). Algelaboratoriets metode M-AL 10 har en nedre kvantifiseringsgrense på $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ S for total toksinkonsentrasjon.

Prøve	OA [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-3 fra OA [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-3 fra DTX-1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-3 fra DTX-2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	Total toksin [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	Total DTX-3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	Andel DTX-3 [%]
B-1528 Flødevigen	5	14	0	0	3	3	24	17	71
B-1530 Flødevigen	11	18	1	2	17	4	53	24	46
B-1532 Flødevigen	19	28	1	2	32	7	89	37	41
B-1534 Flødevigen	16	19	2	1	43	9	90	29	32
B-1536 Flødevigen	8	5	1	0	26	0	41	5	12
B-1538 Flødevigen	378	460	5	0	134	5	984	466	47
B-1540 Flødevigen	561	214	6	0	369	46	1190	260	22
B-1542 Flødevigen	259	177	3	0	388	38	865	215	25
B-1544 Flødevigen	248	176	2	0	1052	98	1576	274	17
B-1546 Flødevigen	127	104	2	0	803	167	1203	271	23
B-1548 Flødevigen	49	25	0	0	614	0	688	25	4
B-1550 Flødevigen	64	60	0	0	820	208	1153	268	23
B-1540 Møriholmen*	1	1	2	0	0	0	4	1	20
B-1540 Kjørem*	0	1	1	0	0	0	2	1	33
B-1540 Skulgambukt*	0	6	0	1	1	0	8	7	88

D

Tabell 8.5: Konsentrasjon av OA-gruppetoksiner bestemt før og etter hydrolyse av skjellprøver fra blåskjell, kamskjell, O-skjell og østers. Tabellen inneholder prøver som ble bestemt både som toksiske og ikke-toksiske av Algelaboratoriet. Ikke-toksiske prøver er merket med *. Konsentrasjon av OA, DTX-1 og DTX-2 er beregnet fra skjellmateriale som ikke er hydrolysert. Konsentrasjon av DTX-3 er beregnet fra skjellmateriale som har vært gjennom hydrolyse. Konsentrasjon av toksiner er oppgitt i μg toksin/kg skjellmat (S). Algelaboratoriets metode M-AL 10 har en nedre kvantifiseringsgrense på 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ S for total toksinkonsentrasjon.

Prøve	OA [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-3 fra OA [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-3 fra DTX-1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	DTX-3 fra DTX-2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	Total toksin [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	Total DTX-3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ S]	Andel DTX-3 [%]
B-1544 Langholmen	119	122	0	0	514	44	798	166	21
B-1543 Langholmen	120	117	0	0	408	47	693	164	24
B-1443 Rundhaugen	565	754	3575	142	0	0	5037	896	18
B-1423 Viganeset	3	1	49	0	0	1	54	2	4
B-1437 Kaldvellfjorden	5	4	103	0	2	1	116	5	4
K-1424 Dyrøy	1	15	3	5	0	16	42	37	89
K-1206 Fluarholmen	1	7	0	0	1	4	13	11	85
K-1422 Horsvær*	0	1	0	0	0	0	0	1	100
K-1422 Svinøya*	0	1	0	0	0	0	0	1	100
O-1423 Viganeset	4	3	92	0	0	0	99	3	3
O-1535 Viganeset	3	7	91	0	1	2	104	9	9
O-1418 Bergen*	2	4	12	0	0	0	18	4	22
O-1423 Bergen*	3	3	13	0	0	0	19	3	16
Ø-1542 Langholmen	2	16	0	0	1	10	29	26	90
Ø-1543 Langholmen	3	31	0	0	1	23	58	54	93
Ø-1437 Kaldvellfjorden	1	4	18	85	0	0	108	89	82
Ø-1541 Langholmen*	2	9	0	2	0	5	18	16	89
Ø-1539 Rogøysund*	1	4	0	0	1	4	10	8	80

8.4 Vedlegg 4: DTX-3-profiler

DTX-3-profiler bestemt ved ny metode for bestemmelse av ulike DTX-3-toksiner

Tabell 8.6: Gjennomsnittlig prosentandel DTX-3 fra OA og DTX-3 fra DTX-1 bestemt i prøve B-1443 Rundhaugen (n=12)

DTX-3	Profil [%]	SD [%]	RSD	DTX-3	Profil [%]	SD [%]	RSD
OA C14:0	5,15	1,23	23,82	DTX-1 C14:0	4,47	1,04	23,35
OA C15:0	1,99	0,68	33,99	DTX-1 C15:0	1,88	0,24	12,62
OA C16:0	48,19	8,46	17,55	DTX-1 C15:1	1,17	0,54	45,82
OA C16:1	13,40	4,12	30,75	DTX-1 C16:0	42,35	5,35	12,64
OA C17:0	4,11	0,86	20,89	DTX-1 C16:1	17,32	2,89	16,70
OA C17:1	2,43	0,42	17,40	DTX-1 C16:4	1,02	0,37	36,03
OA C18:0	4,68	2,75	58,78	DTX-1 C17:0	2,56	0,77	30,13
OA C18:1	10,82	2,31	21,36	DTX-1 C17:1	2,20	0,50	22,47
OA C18:2	2,80	0,65	23,34	DTX-1 C18:0	4,66	1,61	34,46
OA C18:4	2,38	0,69	28,83	DTX-1 C18:1	9,13	1,95	21,34
OA C20:1	1,67	0,37	22,21	DTX-1 C18:2	2,36	0,36	15,36
OA C20:2	9,46	2,13	22,51	DTX-1 C18:4	3,32	1,29	38,85
OA C20:3	1,07	0,00	0,11	DTX-1 C20:1	2,49	1,01	40,66
OA C20:5	1,85	0,66	35,60	DTX-1 C20:2	5,55	1,57	28,33
OA C22:6	2,64	0,91	34,44	DTX-1 C20:5	1,59	0,42	26,24
				DTX-1 C22:6	2,44	0,72	29,49

⌈ Tabell 8.7: Prosentandel av ulike DTX-3 fra OA i blåskjellprøver (n=2). Andelen er oppgitt i prosent med standardavvik. Hvis et toksin ikke er funnet i prøven er det merket «I.D» for ikke detektert.

DTX-3	B-1543		B-1544		B-1538		B-1540		B-1542		B-1544		B-1546		B-1548		B-1550	
	Langholmen Profil	SD	Langholmen Profil	SD	Flødevigen Profil	SD	Flødevigen Profil	SD	Flødevigen Profil	SD	Flødevigen Profil	SD	Flødevigen Profil	SD	Flødevigen Profil	SD	Flødevigen Profil	SD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
OA 14:0	8,00	1,48	6,79	0,72	4,54	0,06	6,28	2,67	5,28	0,85	6,33	0,30	I.D	-	8,10	0,37	8,44	0,45
OA 15:0	1,72	0,32	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	1,96	0,89	I.D	-	I.D	-	I.D	-
OA 16:0	44,52	1,01	44,23	3,38	53,88	1,08	58,15	4,72	51,19	0,53	39,73	1,22	71,29	4,06	48,66	0,79	41,11	2,28
OA 16:1	11,52	0,20	16,48	1,86	7,55	0,20	9,70	1,51	8,25	1,63	12,49	0,89	15,61	2,62	11,71	1,05	19,08	1,96
OA 17:0	2,13	0,64	I.D	-	4,94	1,28	5,09	0,90	2,99	0,64	2,76	0,64	I.D	-	I.D	-	I.D	-
OA 17:1	1,39	0,30	I.D	-	2,16	0,61	2,97	0,09	1,90	0,26	1,82	0,49	I.D	-	I.D	-	I.D	-
OA 18:0	2,60	0,04	3,46	0,15	3,81	0,03	5,99	1,07	2,93	0,61	2,13	0,04	I.D	-	I.D	-	I.D	-
OA 18:1	8,00	1,02	8,92	3,21	10,20	1,33	11,83	2,40	11,13	0,22	10,15	0,13	13,10	6,68	10,06	1,24	8,72	1,35
OA 18:2	4,65	0,17	5,36	2,26	2,54	0,14	I.D	-	2,90	0,50	4,37	0,59	I.D	-	I.D	-	5,27	0,82
OA 18:4	5,15	1,05	5,62	1,97	1,58	0,55	I.D	-	2,69	0,03	5,16	0,95	I.D	-	11,27	2,77	6,53	0,88
OA 20:1	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-
OA 20:2	3,75	0,11	5,73	1,47	2,88	0,07	I.D	-	4,71	1,45	6,53	0,03	I.D	-	I.D	-	4,74	0,35
OA 20:3	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-	I.D	-
OA 20:5	2,68	0,27	I.D	-	2,23	0,62	I.D	-	1,40	0,27	2,38	0,40	I.D	-	4,53	0,99	I.D	-
OA 22:6	3,90	0,03	3,42	0,13	3,70	0,53	I.D	-	4,63	-	4,19	0,57	I.D	-	5,68	1,55	6,11	0,13

8.5 Vedlegg 5: Fettsyreprofil for alle prøver

Tabell 8.8 – 8.14: Oversikt over andelen fettsyrer i alle prøver.

Fettsyreprofilen til prøvene er listet opp i tabeller på nedenfor. Hver fettsyre er oppgitt med hvor stor prosentandel de utgjør av fettsyrene som er bestemt ved integrasjon av kromatogram fra GC-MS. Oppgitte prosentandel er gjennomsnittet av to opparbeidede replikater, med to injeksjonsparalleller hver (n=4) og er oppgitt med standardavviket (SD) i parentes.

Fettsyrer med S/N mindre enn 12 blir regnet som ikke detektert, og er merket med ingen deteksjon (I.D).

Prøver som kun er opparbeidet i én omgang, og har to injeksjonsparalleller (n=2) er merket med *.

Tabell 8.8: Fettsyreprofil for prøver av blåskjell.

Fettsyre	B-1528 Flødevigen	B-1530 Flødevigen	B-1532 Flødevigen	B-1534 Flødevigen*	B-1536 Flødevigen
C12:0	0,067 (0,001)	I.D	I.D	I.D	I.D
C14:0	3,006 (0,050)	3,455 (0,063)	3,261 (0,070)	3,253 (0,014)	2,850 (0,030)
C13:0 4,8,12 trimetyl	0,517 (0,010)	1,092 (0,021)	1,166 (0,015)	1,056 (0,005)	1,333 (0,027)
C14:0 13-metyl	0,063 (0,001)	0,088 (0,002)	0,077 (0,007)	0,074 (0,003)	0,097 (0,002)
C14:0 12-metyl	0,105 (0,002)	I.D	I.D	I.D	I.D
C15:0	0,748 (0,031)	0,747 (0,022)	0,729 (0,014)	0,807 (0,017)	0,934 (0,010)
C15:0 14-metyl	0,158 (0,003)	0,133 (0,002)	0,132 (0,014)	0,138 (0,005)	0,168 (0,003)
C16:0	23,520 (0,543)	22,395 (0,070)	22,380 (0,409)	21,637 (0,572)	20,094 (0,393)
C16:1 cis 7	0,122 (0,003)	0,135 (0,003)	0,141 (0,010)	0,134 (0,005)	0,147 (0,013)
C16:0 15-metyl	I.D	0,441 (0,019)	0,493 (0,036)	0,473 (0,050)	0,623 (0,008)
C16:1 cis 9	9,807 (0,226)	6,248 (0,088)	7,066 (0,308)	6,266 (0,338)	4,228 (0,082)
C16:1 cis 11	0,418 (0,011)	0,433 (0,007)	0,361 (0,045)	0,387 (0,054)	0,431 (0,015)
C17:0	0,979 (0,013)	0,833 (0,014)	0,782 (0,064)	0,897 (0,049)	1,258 (0,023)
C16:2 trans 9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:0	4,102 (0,061)	3,482 (0,049)	3,402 (0,104)	3,550 (0,019)	4,107 (0,085)
C18:1 trans 5 og cis 6	0,142 (0,003)	0,208 (0,003)	0,224 (0,033)	0,228 (0,015)	0,177 (0,004)
C18:1 cis 9	2,589 (0,044)	2,507 (0,030)	2,397 (0,145)	2,252 (0,086)	2,120 (0,026)
C18:1 cis 11	2,168 (0,045)	2,281 (0,017)	2,285 (0,141)	2,334 (0,050)	2,158 (0,036)
C18:1 cis 13	0,168 (0,106)	0,179 (0,003)	0,154 (0,029)	0,172 (0,019)	0,150 (0,007)
C16:4 cis 6,9,12,15	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C19:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:2 cis 9,12	1,490 (0,016)	1,915 (0,014)	1,587 (0,102)	1,703 (0,049)	1,736 (0,015)
C18:2 cis 11,14	0,160 (0,004)	0,149 (0,002)	0,141 (0,021)	0,159 (0,011)	I.D
C19:1 trans 10	0,130 (0,001)	0,095 (0,003)	0,099 (0,020)	0,120 (0,010)	0,167 (0,002)
C18:3 cis 6,9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:0	I.D	I.D	I.D	I.D	0,145 (0,005)
C18:3 cis 9,12,15	1,309 (0,009)	1,553 (0,013)	1,211 (0,090)	1,452 (0,051)	1,451 (0,024)
C20:1 cis 5	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:1 cis 9	1,174 (0,009)	1,490 (0,017)	1,465 (0,116)	1,739 (0,026)	2,425 (0,028)
C20:1 cis 11	3,608 (0,049)	3,127 (0,031)	3,150 (0,124)	3,142 (0,058)	4,161 (0,033)
C20:1 cis 13	0,985 (0,018)	0,633 (0,414)	0,892 (0,083)	0,913 (0,050)	0,942 (0,005)
C18:4 cis 6,9,12,15	3,059 (0,053)	2,392 (1,028)	2,495 (0,077)	2,826 (0,080)	1,995 (0,055)
C20:2 trans 8,11	2,169 (0,033)	2,449 (0,301)	2,162 (0,086)	2,465 (0,059)	3,066 (0,018)
C20:2 trans 11,14	0,432 (0,012)	0,941 (0,945)	0,444 (0,047)	0,532 (0,036)	0,674 (0,003)
C20:2 cis 11,13	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:2 cis 11,14	0,709 (0,009)	0,735 (0,018)	0,648 (0,064)	0,707 (0,051)	0,745 (0,005)
C20:3 cis 5,11,14	0,393 (0,012)	0,412 (0,012)	0,340 (0,037)	0,408 (0,029)	0,315 (0,203)
C20:3 cis 8,11,14	0,061 (0,002)	I.D	I.D	I.D	I.D
C22:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 5,8,11,14	1,787 (0,028)	1,581 (0,020)	1,493 (0,105)	1,563 (0,064)	2,842 (0,080)
C22:1 cis 13	0,048 (0,005)	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 8,11,14,17	0,263 (0,002)	0,262 (0,006)	0,221 (0,022)	0,247 (0,019)	0,176 (0,002)
C22:2 cis 5,13	0,504 (0,006)	0,457 (0,013)	0,348 (0,055)	0,484 (0,033)	0,559 (0,009)
C22:2 cis 13,16	1,712 (0,016)	1,716 (0,026)	1,715 (0,124)	2,021 (0,059)	2,645 (0,039)
C20:5 cis 5,8,11,14,17	12,692 (0,418)	11,881 (0,070)	12,525 (0,355)	11,676 (0,191)	10,437 (0,285)
C21:5 cis 6,9,12,15,18	0,479 (0,018)	0,489 (0,015)	0,455 (0,029)	0,493 (0,024)	0,481 (0,014)
C22:5 cis 4,7,10,13,16	0,272 (0,004)	0,264 (0,007)	0,249 (0,018)	0,276 (0,022)	0,405 (0,010)
C22:5 cis 7,10,13,16,19	0,884 (0,023)	0,888 (0,013)	0,845 (0,050)	0,907 (0,042)	1,037 (0,026)
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	17,003 (0,471)	21,913 (0,139)	22,465 (1,445)	22,508 (0,664)	22,718 (0,421)

Tabell 8.9: Fettsyreprofil for prøver av blåskjell.

Fettsyre	B-1538 Flødevigen	B-1540 Flødevigen	B-1542 Flødevigen	B-1544 Flødevigen	B-1546 Flødevigen
C12:0	I.D	I.D	I.D	0,060 (0,001)	0,073 (0,002)
C14:0	3,132 (0,051)	2,950 (0,017)	4,155 (0,208)	5,160 (0,056)	4,633 (0,048)
C13:0 4,8,12 trimetyl	2,284 (0,025)	2,251 (0,016)	2,293 (0,120)	2,110 (0,015)	2,280 (0,022)
C14:0 13-metyl	0,165 (0,004)	0,149 (0,003)	0,144 (0,023)	0,102 (0,002)	0,106 (0,002)
C14:0 12-metyl	I.D	I.D	I.D	0,101 (0,003)	0,098 (0,005)
C15:0	0,851 (0,014)	0,801 (0,019)	0,923 (0,166)	0,731 (0,011)	0,765 (0,016)
C15:0 14-metyl	0,135 (0,002)	0,144 (0,002)	0,134 (0,011)	0,116 (0,004)	0,132 (0,005)
C16:0	21,357 (0,265)	20,796 (0,078)	21,705 (0,637)	19,927 (0,322)	19,418 (0,252)
C16:1 cis 7	0,117 (0,010)	0,173 (0,017)	0,133 (0,012)	0,133 (0,006)	0,142 (0,029)
C16:0 15-metyl	0,614 (0,009)	I.D	0,485 (0,028)	I.D	0,323 (0,024)
C16:1 cis 9	3,927 (0,051)	4,406 (0,020)	4,569 (0,099)	6,130 (0,266)	5,531 (0,107)
C16:1 cis 11	0,426 (0,008)	0,459 (0,005)	0,412 (0,007)	0,378 (0,006)	0,400 (0,006)
C17:0	1,087 (0,011)	0,947 (0,006)	0,819 (0,019)	0,592 (0,010)	0,621 (0,019)
C16:2 trans 9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:0	3,468 (0,040)	3,089 (0,024)	2,816 (0,044)	2,328 (0,028)	2,477 (0,035)
C18:1 trans 5 og cis 6	0,125 (0,006)	0,154 (0,003)	0,177 (0,005)	0,195 (0,004)	0,173 (0,002)
C18:1 cis 9	2,357 (0,050)	2,655 (0,009)	2,956 (0,056)	3,582 (0,032)	3,272 (0,083)
C18:1 cis 11	2,198 (0,016)	2,308 (0,020)	2,021 (0,014)	1,908 (0,025)	1,905 (0,019)
C18:1 cis 13	0,091 (0,012)	0,109 (0,018)	I.D	0,096 (0,006)	0,095 (0,003)
C16:4 cis 6,9,12,15	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C19:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:2 cis 9,12	1,539 (0,010)	1,730 (0,012)	2,127 (0,026)	2,733 (0,046)	2,506 (0,051)
C18:2 cis 11,14	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C19:1 trans 10	0,224 (0,006)	0,193 (0,001)	0,148 (0,002)	0,111 (0,001)	0,102 (0,004)
C18:3 cis 6,9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:0	I.D	0,111 (0,004)	I.D	0,102 (0,002)	0,090 (0,006)
C18:3 cis 9,12,15	1,650 (0,020)	1,892 (0,013)	1,650 (0,019)	1,359 (0,009)	1,299 (0,021)
C20:1 cis 5	0,151 (0,005)	I.D	I.D	0,172 (0,007)	0,133 (0,005)
C20:1 cis 9	1,915 (0,026)	1,555 (0,010)	1,410 (0,010)	1,212 (0,007)	1,200 (0,031)
C20:1 cis 11	3,637 (0,029)	3,175 (0,028)	2,967 (0,012)	2,628 (0,008)	2,812 (0,040)
C20:1 cis 13	0,644 (0,007)	0,637 (0,004)	0,488 (0,008)	0,486 (0,009)	0,509 (0,008)
C18:4 cis 6,9,12,15	2,914 (0,034)	3,351 (0,040)	3,873 (0,093)	5,308 (0,064)	5,310 (0,056)
C20:2 trans 8,11	2,509 (0,009)	2,542 (0,019)	2,615 (0,020)	2,695 (0,033)	2,746 (0,042)
C20:2 trans 11,14	0,575 (0,012)	0,614 (0,008)	0,530 (0,006)	0,490 (0,007)	0,469 (0,012)
C20:2 cis 11,13	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:2 cis 11,14	0,510 (0,008)	0,545 (0,007)	0,513 (0,007)	0,630 (0,010)	0,636 (0,025)
C20:3 cis 5,11,14	0,272 (0,004)	0,323 (0,004)	0,384 (0,008)	0,585 (0,010)	0,530 (0,021)
C20:3 cis 8,11,14	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C22:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 5,8,11,14	2,792 (0,040)	2,289 (0,017)	1,932 (0,048)	1,377 (0,017)	1,499 (0,019)
C22:1 cis 13	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 8,11,14,17	0,142 (0,001)	I.D	0,151 (0,005)	0,163 (0,004)	0,181 (0,005)
C22:2 cis 5,13	0,390 (0,006)	0,422 (0,006)	0,418 (0,006)	0,505 (0,015)	0,482 (0,017)
C22:2 cis 13,16	2,273 (0,020)	2,064 (0,021)	1,965 (0,031)	1,783 (0,045)	1,795 (0,042)
C20:5 cis 5,8,11,14,17	10,188 (0,161)	10,335 (0,024)	9,252 (0,372)	8,168 (0,108)	8,989 (0,237)
C21:5 cis 6,9,12,15,18	0,527 (0,017)	0,568 (0,006)	0,533 (0,017)	0,580 (0,012)	0,595 (0,019)
C22:5 cis 4,7,10,13,16	0,400 (0,011)	0,378 (0,007)	0,294 (0,012)	0,231 (0,008)	0,233 (0,009)
C22:5 cis 7,10,13,16,19	0,848 (0,009)	0,833 (0,009)	0,719 (0,031)	0,710 (0,017)	0,683 (0,019)
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	23,566 (0,126)	25,052 (0,086)	24,289 (0,516)	24,320 (0,086)	24,754 (0,117)

Tabell 8.10: Fettsyreprofil for prøver av blåskjell.

Fettsyre	B-1548 Flødevigen	B-1550 Flødevigen	B-1544 Langholmen	B-1543 Langholmen	B-1443 Rundhaugen
C12:0	I.D	0,060 (0,001)	0,125 (0,004)	0,148 (0,002)	0,045 (0,002)
C14:0	4,105 (0,022)	3,596 (0,025)	4,818 (0,020)	5,209 (0,044)	3,242 (0,013)
C13:0 4,8,12 trimetyl	2,728 (0,010)	1,854 (0,012)	1,468 (0,039)	1,690 (0,004)	1,443 (0,016)
C14:0 13-metyl	I.D	0,019 (0,004)	0,082 (0,002)	0,083 (0,001)	0,143 (0,002)
C14:0 12-metyl	I.D	0,095 (0,002)	0,087 (0,004)	0,071 (0,003)	0,105 (0,001)
C15:0	0,766 (0,008)	0,775 (0,010)	0,779 (0,030)	0,762 (0,013)	0,762 (0,018)
C15:0 14-metyl	I.D	0,137 (0,003)	0,104 (0,003)	0,095 (0,002)	0,169 (0,0004)
C16:0	19,655 (0,215)	19,083 (0,279)	20,563 (0,474)	20,839 (0,161)	22,099 (0,392)
C16:1 cis 7	0,131 (0,004)	0,176 (0,002)	0,127 (0,009)	0,119 (0,003)	0,146 (0,018)
C16:0 15-metyl	0,326 (0,008)	0,362 (0,013)	I.D	I.D	I.D
C16:1 cis 9	4,845 (0,035)	6,179 (0,063)	7,391 (0,292)	7,276 (0,165)	8,025 (0,051)
C16:1 cis 11	0,374 (0,002)	0,440 (0,013)	0,384 (0,026)	0,385 (0,004)	0,866 (0,032)
C17:0	0,643 (0,010)	0,675 (0,006)	0,613 (0,026)	0,619 (0,012)	0,603 (0,013)
C16:2 trans 9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:0	2,683 (0,028)	2,257 (0,106)	2,319 (0,003)	2,398 (0,017)	2,320 (0,019)
C18:1 trans 5 og cis 6	0,139 (0,007)	0,204 (0,004)	0,242 (0,009)	0,191 (0,002)	0,232 (0,005)
C18:1 cis 9	3,176 (0,045)	3,326 (0,038)	3,125 (0,040)	2,826 (0,028)	2,804 (0,024)
C18:1 cis 11	1,777 (0,017)	2,085 (0,023)	2,066 (0,026)	1,882 (0,006)	2,600 (0,023)
C18:1 cis 13	I.D	0,135 (0,008)	0,136 (0,022)	0,120 (0,002)	0,267 (0,008)
C16:4 cis 6,9,12,15	I.D	I.D	I.D	0,112 (0,002)	I.D
C19:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:2 cis 9,12	2,356 (0,015)	2,491 (0,060)	2,436 (0,044)	2,236 (0,020)	2,062 (0,020)
C18:2 cis 11,14	I.D	0,085 (0,004)	0,098 (0,002)	I.D	0,098 (0,005)
C19:1 trans 10	I.D	0,135 (0,003)	0,101 (0,004)	0,081 (0,001)	0,116 (0,004)
C18:3 cis 6,9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:0	I.D	0,068 (0,002)	I.D	0,087 (0,002)	I.D
C18:3 cis 9,12,15	1,153 (0,012)	1,407 (0,020)	1,441 (0,037)	1,312 (0,010)	1,241 (0,015)
C20:1 cis 5	I.D	0,108 (0,002)	0,110 (0,012)	I.D	I.D
C20:1 cis 9	1,147 (0,006)	1,167 (0,013)	1,181 (0,020)	1,080 (0,011)	1,263 (0,008)
C20:1 cis 11	3,117 (0,024)	2,650 (0,036)	2,564 (0,024)	2,319 (0,024)	3,014 (0,036)
C20:1 cis 13	0,429 (0,003)	0,543 (0,005)	0,698 (0,012)	0,646 (0,005)	0,958 (0,010)
C18:4 cis 6,9,12,15	4,193 (0,051)	4,600 (0,030)	4,481 (0,019)	4,371 (0,026)	3,557 (0,051)
C20:2 trans 8,11	3,098 (0,028)	2,796 (0,028)	2,164 (0,027)	1,874 (0,008)	2,218 (0,040)
C20:2 trans 11,14	0,494 (0,010)	0,521 (0,005)	0,437 (0,013)	0,389 (0,002)	0,573 (0,011)
C20:2 cis 11,13	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:2 cis 11,14	0,588 (0,018)	0,686 (0,005)	0,743 (0,022)	0,656 (0,012)	0,829 (0,023)
C20:3 cis 5,11,14	0,563 (0,008)	0,642 (0,003)	0,459 (0,027)	0,367 (0,003)	0,478 (0,011)
C20:3 cis 8,11,14	I.D	I.D	0,057 (0,005)	I.D	0,053 (0,003)
C22:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 5,8,11,14	1,523 (0,018)	1,244 (0,019)	1,201 (0,028)	1,196 (0,022)	1,362 (0,025)
C22:1 cis 13	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 8,11,14,17	0,155 (0,005)	0,201 (0,005)	0,200 (0,012)	0,200 (0,003)	0,216 (0,008)
C22:2 cis 5,13	0,530 (0,002)	0,503 (0,005)	0,385 (0,013)	0,318 (0,003)	0,347 (0,012)
C22:2 cis 13,16	1,954 (0,013)	1,682 (0,014)	1,633 (0,015)	1,568 (0,015)	1,758 (0,015)
C20:5 cis 5,8,11,14,17	10,536 (0,087)	9,937 (0,121)	11,406 (0,092)	12,464 (0,037)	10,171 (0,048)
C21:5 cis 6,9,12,15,18	0,575 (0,010)	0,438 (0,290)	0,530 (0,021)	0,518 (0,006)	0,438 (0,015)
C22:5 cis 4,7,10,13,16	0,230 (0,007)	0,259 (0,007)	0,286 (0,010)	0,271 (0,005)	0,306 (0,016)
C22:5 cis 7,10,13,16,19	0,721 (0,009)	0,737 (0,006)	0,733 (0,012)	0,699 (0,006)	0,667 (0,016)
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	25,285 (0,052)	25,643 (0,252)	22,223 (0,188)	22,521 (0,150)	22,405 (0,118)

Tabell 8.11: Fettsyreprofil for prøver av blåskjell.

Fettsyre	B-1423 Viganeset*	B-1437 Kaldvellfjorden	B-1540 Møriholmen	B-1540 Kjørem	B-1540 Skulgambukt
C12:0	0,111 (0,002)	I.D	I.D	0,031 (0,004)	0,050 (0,001)
C14:0	5,702 (0,008)	4,850 (0,110)	3,541 (0,257)	3,310 (0,058)	4,307 (0,020)
C13:0 4,8,12 trimetyl	1,346 (0,028)	1,171 (0,030)	1,273 (0,126)	1,291 (0,033)	1,617 (0,027)
C14:0 13-metyl	I.D	0,073 (0,002)	0,074 (0,020)	I.D	I.D
C14:0 12-metyl	0,058 (0,001)	0,065 (0,002)	0,058 (0,019)	I.D	I.D
C15:0	0,473 (0,001)	0,758 (0,010)	0,650 (0,098)	0,521 (0,070)	0,576 (0,007)
C15:0 14-metyl	0,065 (0,010)	0,115 (0,003)	0,145 (0,033)	0,105 (0,036)	0,107 (0,004)
C16:0	15,645 (0,075)	20,690 (0,150)	19,037 (1,104)	17,889 (0,647)	16,891 (0,106)
C16:1 cis 7	0,104 (0,002)	0,198 (0,004)	0,224 (0,041)	0,157 (0,022)	0,126 (0,004)
C16:0 15-metyl	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C16:1 cis 9	17,869 (0,019)	8,317 (0,218)	9,002 (0,477)	8,291 (0,247)	13,649 (0,134)
C16:1 cis 11	0,348 (0,001)	0,508 (0,010)	0,414 (0,061)	0,304 (0,029)	0,375 (0,015)
C17:0	0,502 (0,003)	0,992 (0,014)	0,781 (0,089)	0,629 (0,053)	0,517 (0,016)
C16:2 trans 9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:0	2,954 (0,029)	3,246 (0,078)	2,774 (0,273)	2,700 (0,102)	2,480 (0,087)
C18:1 trans 5 og cis 6	0,135 (0,0003)	0,276 (0,008)	0,257 (0,083)	0,184 (0,034)	0,173 (0,002)
C18:1 cis 9	1,908 (0,004)	3,119 (0,052)	2,907 (0,247)	1,970 (0,073)	1,889 (0,033)
C18:1 cis 11	2,849 (0,080)	2,502 (0,029)	2,891 (0,242)	2,870 (0,127)	2,736 (0,035)
C18:1 cis 13	0,145 (0,002)	0,205 (0,008)	0,214 (0,052)	0,136 (0,030)	0,149 (0,010)
C16:4 cis 6,9,12,15	0,488 (0,002)	I.D	0,083 (0,024)	0,083 (0,020)	0,376 (0,012)
C19:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:2 cis 9,12	1,239 (0,003)	3,053 (0,057)	2,214 (0,215)	1,730 (0,128)	1,283 (0,018)
C18:2 cis 11,14	0,226 (0,003)	0,099 (0,004)	0,182 (0,048)	0,185 (0,039)	0,188 (0,006)
C19:1 trans 10	0,093 (0,001)	0,105 (0,003)	0,083 (0,028)	I.D	I.D
C18:3 cis 6,9,12	0,092 (0,002)	I.D	0,065 (0,020)	I.D	I.D
C20:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:3 cis 9,12,15	0,763 (0,002)	1,877 (0,030)	2,907 (0,235)	2,584 (0,160)	1,259 (0,009)
C20:1 cis 5	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:1 cis 9	0,817 (0,008)	1,616 (0,011)	1,091 (0,165)	0,895 (0,035)	1,078 (0,012)
C20:1 cis 11	2,588 (0,008)	3,347 (0,063)	2,839 (0,256)	2,410 (0,105)	2,632 (0,033)
C20:1 cis 13	1,527 (0,005)	0,856 (0,002)	1,047 (0,132)	1,231 (0,087)	0,957 (0,013)
C18:4 cis 6,9,12,15	2,618 (0,0004)	3,283 (0,018)	4,580 (0,229)	5,155 (0,113)	3,702 (0,014)
C20:2 trans 8,11	1,764 (0,012)	2,589 (0,048)	2,032 (0,161)	1,789 (0,145)	2,451 (0,014)
C20:2 trans 11,14	0,653 (0,002)	0,562 (0,003)	0,651 (0,075)	0,648 (0,049)	0,682 (0,012)
C20:2 cis 11,13	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:2 cis 11,14	0,534 (0,015)	0,921 (0,009)	0,767 (0,119)	0,729 (0,081)	0,451 (0,008)
C20:3 cis 5,11,14	0,184 (0,002)	0,494 (0,010)	0,346 (0,074)	0,307 (0,053)	0,230 (0,010)
C20:3 cis 8,11,14	0,117 (0,005)	I.D	0,088 (0,026)	0,071 (0,021)	0,087 (0,006)
C22:0	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 5,8,11,14	1,373 (0,012)	1,193 (0,051)	1,884 (0,188)	1,761 (0,197)	1,591 (0,029)
C22:1 cis 13	0,095 (0,001)	I.D	I.D	I.D	0,289 (0,012)
C20:4 cis 8,11,14,17	0,354 (0,0004)	0,220 (0,002)	0,465 (0,084)	0,347 (0,062)	0,326 (0,030)
C22:2 cis 5,13	0,275 (0,0003)	0,460 (0,002)	0,256 (0,069)	0,202 (0,045)	0,332 (0,009)
C22:2 cis 13,16	2,068 (0,006)	1,828 (0,014)	1,938 (0,220)	1,817 (0,147)	1,785 (0,020)
C20:5 cis 5,8,11,14,17	20,650 (0,062)	8,971 (0,065)	15,378 (1,158)	17,671 (0,873)	19,662 (0,219)
C21:5 cis 6,9,12,15,18	0,518 (0,009)	0,374 (0,005)	0,452 (0,214)	0,616 (0,094)	0,669 (0,015)
C22:5 cis 4,7,10,13,16	0,213 (0,002)	0,373 (0,009)	0,289 (0,151)	0,243 (0,046)	0,134 (0,007)
C22:5 cis 7,10,13,16,19	0,713 (0,014)	0,632 (0,012)	0,651 (0,280)	0,918 (0,135)	0,788 (0,011)
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	9,823 (0,242)	20,065 (0,307)	15,473 (3,875)	18,221 (0,730)	13,405 (0,130)

Tabell 8.12: Fettsyreprofil for prøver av kamskjell.

Fettsyre	K-1206 Fluarholmen*	K-1424 Dyrøy	K-1422 Horsvær	K-1422 Svinøya
C12:0	I.D	I.D	I.D	I.D
C14:0	3,388 (0,066)	6,846 (0,034)	7,221 (0,076)	5,020 (0,062)
C13:0 4,8,12 trimetyl	1,152 (0,023)	1,494 (0,012)	1,023 (0,012)	1,292 (0,022)
C14:0 13-metyl	0,178 (0,003)	0,084 (0,005)	0,071 (0,001)	0,102 (0,003)
C14:0 12-metyl	I.D	I.D	0,082 (0,002)	0,084 (0,002)
C15:0	1,110 (0,001)	0,620 (0,005)	0,655 (0,007)	0,776 (0,018)
C15:0 14-metyl	0,206 (0,004)	I.D	0,067 (0,002)	0,105 (0,004)
C16:0	23,382 (0,095)	24,460 (0,169)	22,380 (0,209)	22,811 (0,367)
C16:1 cis 7	0,211 (0,0005)	0,108 (0,010)	0,105 (0,003)	0,165 (0,006)
C16:0 15-metyl	0,732 (0,014)	I.D	I.D	0,353 (0,010)
C16:1 cis 9	2,041 (0,038)	21,358 (0,065)	21,178 (0,138)	8,927 (0,082)
C16:1 cis 11	0,624 (0,017)	0,456 (0,005)	0,413 (0,004)	0,476 (0,015)
C17:0	2,157 (0,008)	0,723 (0,009)	0,801 (0,012)	1,350 (0,041)
C16:2 trans 9,12	I.D	0,393 (0,010)	I.D	I.D
C18:0	8,844 (0,084)	4,646 (0,081)	4,254 (0,106)	5,665 (0,167)
C18:1 trans 5 og cis 6	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:1 cis 9	4,139 (0,034)	1,779 (0,056)	2,214 (0,032)	2,938 (0,088)
C18:1 cis 11	2,718 (0,005)	5,200 (0,027)	0,082 (0,039)	3,523 (0,045)
C18:1 cis 13	I.D	0,103 (0,001)	0,082 (0,003)	0,210 (0,011)
C16:4 cis 6,9,12,15	I.D	0,484 (0,004)	0,280 (0,002)	0,249 (0,006)
C19:0	I.D	I.D	I.D	0,064 (0,005)
C18:2 cis 9,12	1,287 (0,010)	2,779 (0,026)	3,020 (0,021)	2,219 (0,050)
C18:2 cis 11,14	I.D	0,223 (0,005)	0,123 (0,002)	0,213 (0,007)
C19:1 trans 10	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:3 cis 6,9,12	I.D	0,168 (0,010)	0,162 (0,013)	0,083 (0,007)
C20:0	0,208 (0,010)	I.D	0,068 (0,001)	0,063 (0,004)
C18:3 cis 9,12,15	1,419 (0,032)	0,794 (0,007)	1,002 (0,004)	1,444 (0,031)
C20:1 cis 5	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:1 cis 9	0,248 (0,004)	0,190 (0,002)	0,142 (0,002)	0,169 (0,005)
C20:1 cis 11	1,915 (0,005)	0,809 (0,023)	1,009 (0,007)	1,469 (0,055)
C20:1 cis 13	0,431 (0,003)	1,152 (0,021)	0,675 (0,010)	0,762 (0,026)
C18:4 cis 6,9,12,15	3,468 (0,006)	3,099 (0,073)	3,776 (0,061)	5,985 (0,023)
C20:2 trans 8,11	0,318 (0,005)	0,237 (0,002)	0,235 (0,002)	0,271 (0,007)
C20:2 trans 11,14	0,043 (0,001)	0,180 (0,002)	0,094 (0,001)	I.D
C20:2 cis 11,13	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:2 cis 11,14	0,559 (0,010)	0,656 (0,006)	0,531 (0,002)	0,765 (0,017)
C20:3 cis 5,11,14	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:3 cis 8,11,14	I.D	0,103 (0,001)	0,100 (0,001)	0,111 (0,004)
C22:0	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 5,8,11,14	4,053 (0,029)	0,887 (0,011)	1,696 (0,022)	1,944 (0,025)
C22:1 cis 13	I.D	I.D	0,081 (0,006)	0,103 (0,016)
C20:4 cis 8,11,14,17	0,431 (0,024)	0,385 (0,012)	0,392 (0,002)	0,656 (0,015)
C22:2 cis 5,13	I.D	I.D	I.D	I.D
C22:2 cis 13,16	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:5 cis 5,8,11,14,17	9,424 (0,108)	10,736 (0,142)	9,740 (0,127)	11,396 (0,234)
C21:5 cis 6,9,12,15,18	0,825 (0,010)	0,540 (0,005)	0,544 (0,003)	0,762 (0,020)
C22:5 cis 4,7,10,13,16	0,787 (0,012)	0,114 (0,002)	0,192 (0,004)	0,270 (0,006)
C22:5 cis 7,10,13,16,19	0,660 (0,003)	0,359 (0,009)	0,420 (0,008)	0,451 (0,291)
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	23,041 (0,114)	7,835 (0,167)	11,494 (0,249)	16,651 (0,545)

Tabell 8.13: Fettsyreprofil for prøver av O-skjell.

Fettsyre	O-1423 Viganeset	O-1535 Viganeset	O-1418 Bergen	O-1423 Bergen
C12:0	0,062 (0,002)	0,022 (0,001)	I.D	0,042 (0,001)
C14:0	5,113 (0,174)	2,787 (0,062)	4,806 (0,182)	4,564 (0,146)
C13:0 4,8,12 trimetyl	2,528 (0,055)	1,399 (0,028)	2,125 (0,091)	1,789 (0,047)
C14:0 13-metyl	I.D	I.D	I.D	I.D
C14:0 12-metyl	I.D	I.D	I.D	I.D
C15:0	0,337 (0,011)	0,414 (0,010)	0,415 (0,027)	0,434 (0,017)
C15:0 14-metyl	0,087 (0,005)	0,094 (0,002)	0,119 (0,008)	0,114 (0,004)
C16:0	21,789 (0,471)	19,002 (0,261)	22,778 (0,899)	23,033 (0,882)
C16:1 cis 7	0,076 (0,003)	0,068 (0,002)	0,097 (0,005)	0,091 (0,007)
C16:0 15-metyl	I.D	I.D	I.D	I.D
C16:1 cis 9	15,208 (0,382)	11,699 (0,145)	15,449 (0,475)	15,029 (0,425)
C16:1 cis 11	0,367 (0,012)	0,353 (0,005)	0,339 (0,015)	0,372 (0,014)
C17:0	0,506 (0,013)	0,650 (0,009)	0,634 (0,035)	0,676 (0,022)
C16:2 trans 9,12	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:0	3,774 (0,038)	3,806 (0,036)	3,828 (0,196)	4,296 (0,157)
C18:1 trans 5 og cis 6	I.D	0,107 (0,003)	0,076 (0,004)	0,091 (0,002)
C18:1 cis 9	1,046 (0,033)	1,077 (0,060)	1,143 (0,056)	1,001 (0,031)
C18:1 cis 11	4,697 (0,103)	6,890 (0,161)	3,655 (0,117)	4,199 (0,114)
C18:1 cis 13	0,132 (0,003)	0,179 (0,004)	0,114 (0,006)	0,137 (0,007)
C16:4 cis 6,9,12,15	0,522 (0,009)	0,207 (0,003)	0,478 (0,021)	0,363 (0,018)
C19:0	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:2 cis 9,12	2,011 (0,016)	1,362 (0,016)	2,644 (0,067)	2,546 (0,067)
C18:2 cis 11,14	0,360 (0,006)	0,520 (0,004)	0,315 (0,006)	0,362 (0,006)
C19:1 trans 10	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:3 cis 6,9,12	0,129 (0,004)	I.D	0,147 (0,010)	0,150 (0,011)
C20:0	0,069 (0,002)	0,094 (0,002)	0,071 (0,006)	0,102 (0,005)
C18:3 cis 9,12,15	1,049 (0,023)	0,994 (0,012)	0,918 (0,048)	0,919 (0,033)
C20:1 cis 5	I.D	I.D	I.D	
C20:1 cis 9	0,520 (0,010)	1,329 (0,026)	0,828 (0,025)	0,853 (0,020)
C20:1 cis 11	1,880 (0,026)	2,258 (0,047)	2,375 (0,097)	2,176 (0,067)
C20:1 cis 13	2,744 (0,046)	3,820 (0,095)	2,299 (0,108)	2,546 (0,086)
C18:4 cis 6,9,12,15	3,784 (0,215)	2,026 (0,058)	3,260 (0,181)	3,032 (0,214)
C20:2 trans 8,11	0,396 (0,009)	0,573 (0,005)	0,436 (0,008)	0,415 (0,004)
C20:2 trans 11,14	0,253 (0,003)	0,612 (0,009)	0,280 (0,009)	0,301 (0,007)
C20:2 cis 11,13	0,111 (0,002)	0,268 (0,004)	0,125 (0,006)	0,140 (0,004)
C20:2 cis 11,14	0,229 (0,007)	0,237 (0,002)	0,247 (0,012)	0,274 (0,007)
C20:3 cis 5,11,14	I.D	I.D	I.D	0,063 (0,001)
C20:3 cis 8,11,14	0,090 (0,001)	0,086 (0,003)	I.D	0,076 (0,004)
C22:0	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:4 cis 5,8,11,14	1,010 (0,033)	1,270 (0,035)	1,275 (0,082)	1,311 (0,068)
C22:1 cis 13	0,091 (0,004)	0,104 (0,004)	I.D	0,074 (0,003)
C20:4 cis 8,11,14,17	0,330 (0,013)	0,355 (0,017)	0,285 (0,017)	0,328 (0,020)
C22:2 cis 5,13	0,354 (0,007)	0,765 (0,014)	0,621 (0,019)	0,584 (0,018)
C22:2 cis 13,16	1,332 (0,011)	2,717 (0,045)	2,021 (0,058)	1,796 (0,039)
C20:5 cis 5,8,11,14,17	18,645 (0,604)	21,410 (0,448)	16,997 (1,284)	16,784 (1,114)
C21:5 cis 6,9,12,15,18	0,571 (0,031)	0,671 (0,025)	0,674 (0,051)	0,715 (0,051)
C22:5 cis 4,7,10,13,16	0,168 (0,011)	0,149 (0,005)	0,088 (0,007)	I.D
C22:5 cis 7,10,13,16,19	0,618 (0,023)	1,083 (0,010)	0,942 (0,046)	0,942 (0,047)
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	7,009 (0,325)	8,541 (0,217)	7,096 (0,549)	7,285 (0,451)

Tabell 8.14: Fettsyreprofil for prøver av østers

Fettsyre	Ø-1542	Ø-1543	Ø-1437	Ø-1541	Ø-1539
	Langholmen	Langholmen	Kaldvellfjorden	Langholmen	Rogøysund
C12:0	0,058 (0,002)	0,052 (0,001)	I.D	0,084 (0,001)	I.D
C14:0	4,935 (0,041)	4,876 (0,164)	5,257 (0,023)	5,274 (0,019)	4,424 (0,077)
C13:0 4,8,12 trimetyl	0,608 (0,010)	0,636 (0,015)	0,598 (0,003)	0,671 (0,008)	0,516 (0,008)
C14:0 13-metyl	0,397 (0,006)	0,401 (0,011)	0,392 (0,004)	0,388 (0,009)	0,298 (0,007)
C14:0 12-metyl	0,098 (0,003)	0,090 (0,002)	0,087 (0,002)	0,085 (0,003)	0,084 (0,006)
C15:0	1,216 (0,012)	1,107 (0,036)	1,152 (0,011)	1,119 (0,023)	1,133 (0,034)
C15:0 14-metyl	0,280 (0,011)	0,239 (0,004)	0,239 (0,007)	0,200 (0,019)	0,235 (0,011)
C16:0	21,752 (0,234)	23,092 (0,866)	24,116 (0,230)	22,571 (0,606)	21,601 (0,801)
C16:1 cis 7	0,167 (0,002)	0,147 (0,005)	0,199 (0,015)	0,151 (0,003)	0,673 (0,022)
C16:0 15-metyl	0,680 (0,017)	0,583 (0,013)	0,636 (0,005)	0,575 (0,015)	0,568 (0,020)
C16:1 cis 9	2,992 (0,021)	2,679 (0,042)	2,334 (0,016)	3,061 (0,019)	1,839 (0,087)
C16:1 cis 11	0,650 (0,018)	0,647 (0,013)	0,665 (0,007)	0,633 (0,007)	0,318 (0,360)
C17:0	1,828 (0,053)	1,574 (0,046)	2,083 (0,017)	1,558 (0,020)	1,978 (0,065)
C16:2 trans 9,12	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:0	5,164 (0,122)	4,924 (0,210)	5,381 (0,093)	5,022 (0,108)	6,027 (0,130)
C18:1 trans 5 og cis 6	I.D	0,062 (0,002)	I.D	0,065 (0,001)	I.D
C18:1 cis 9	3,692 (0,060)	3,551 (0,116)	4,237 (0,090)	3,461 (0,083)	4,581 (0,053)
C18:1 cis 11	2,032 (0,039)	1,679 (0,049)	1,710 (0,041)	1,859 (0,019)	1,362 (0,005)
C18:1 cis 13	0,200 (0,010)	0,199 (0,002)	0,182 (0,004)	0,193 (0,003)	0,283 (0,011)
C16:4 cis 6,9,12,15	I.D	I.D	I.D	0,070 (0,007)	I.D
C19:0	0,118 (0,004)	0,103 (0,006)	0,139 (0,003)	0,099 (0,003)	0,147 (0,008)
C18:2 cis 9,12	1,823 (0,014)	1,883 (0,015)	2,512 (0,034)	1,865 (0,023)	1,769 (0,030)
C18:2 cis 11,14	0,132 (0,004)	0,109 (0,002)	I.D	0,120 (0,006)	I.D
C19:1 trans 10	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C18:3 cis 6,9,12	0,066 (0,006)	I.D	I.D	0,063 (0,002)	I.D
C20:0	0,228 (0,008)	0,219 (0,004)	0,159 (0,002)	0,203 (0,004)	0,190 (0,014)
C18:3 cis 9,12,15	1,192 (0,011)	1,204 (0,019)	2,043 (0,034)	1,349 (0,019)	1,536 (0,048)
C20:1 cis 5	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:1 cis 9	1,094 (0,010)	1,053 (0,012)	1,464 (0,053)	1,199 (0,017)	0,936 (0,011)
C20:1 cis 11	0,553 (0,015)	0,572 (0,012)	0,744 (0,026)	0,615 (0,011)	1,225 (0,012)
C20:1 cis 13	4,646 (0,043)	4,158 (0,121)	4,058 (0,124)	4,212 (0,092)	4,665 (0,079)
C18:4 cis 6,9,12,15	2,529 (0,045)	2,513 (0,093)	2,561 (0,013)	2,493 (0,054)	2,902 (0,122)
C20:2 trans 8,11	0,084 (0,004)	0,085 (0,002)	0,098 (0,003)	0,105 (0,002)	0,125 (0,008)
C20:2 trans 11,14	0,150 (0,007)	0,156 (0,003)	0,124 (0,002)	0,168 (0,003)	0,118 (0,008)
C20:2 cis 11,13	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:2 cis 11,14	0,366 (0,017)	0,392 (0,005)	0,400 (0,007)	0,381 (0,004)	0,506 (0,013)
C20:3 cis 5,11,14	I.D	I.D	I.D	I.D	I.D
C20:3 cis 8,11,14	0,135 (0,004)	0,107 (0,006)	0,106 (0,004)	0,105 (0,003)	0,101 (0,009)
C22:0	0,103 (0,002)	0,091 (0,002)	I.D	0,087 (0,005)	I.D
C20:4 cis 5,8,11,14	1,878 (0,032)	1,501 (0,089)	1,914 (0,028)	1,520 (0,027)	1,722 (0,106)
C22:1 cis 13	0,089 (0,004)	0,081 (0,002)	I.D	0,084 (0,002)	0,116 (0,014)
C20:4 cis 8,11,14,17	0,497 (0,003)	0,498 (0,015)	0,491 (0,013)	0,494 (0,005)	0,814 (0,046)
C22:2 cis 5,13	0,698 (0,012)	0,737 (0,005)	0,889 (0,038)	0,763 (0,013)	1,281 (0,024)
C22:2 cis 13,16	3,750 (0,023)	3,307 (0,044)	3,550 (0,061)	3,462 (0,019)	3,721 (0,066)
C20:5 cis 5,8,11,14,17	13,274 (0,411)	12,980 (0,582)	9,041 (0,161)	12,857 (0,113)	11,079 (0,302)
C21:5 cis 6,9,12,15,18	0,625 (0,007)	0,576 (0,020)	0,520 (0,010)	0,556 (0,018)	0,634 (0,039)
C22:5 cis 4,7,10,13,16	0,439 (0,004)	0,393 (0,017)	0,539 (0,014)	0,387 (0,012)	0,495 (0,041)
C22:5 cis 7,10,13,16,19	0,372 (0,419)	0,737 (0,017)	0,845 (0,029)	0,713 (0,020)	0,787 (0,049)
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	18,409 (0,707)	20,004 (0,887)	18,534 (0,085)	19,063 (0,294)	19,212 (0,725)