



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 60 stp
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Utvikling av LC-MS- og LC-MS/MS- metoder for analyse av fosfolipider i melk

Development of LC-MS and LC-MS/MS methods for
identification of phospholipids in milk

Kristin Meland Risinggård
Master kjemi

SAMMENDRAG

Melk er den første næringen pattedyr får, og inneholder viktige næringsstoffer som proteiner, fett og laktose. Mesteparten av fett er finnes som små kuler i melken, og membranen til disse kulene sørger for at fett er delvis emulgert. En viktig komponent i membranen er fosfolipider, og innholdet av fosfolipider i melk har blitt undersøkt mange ganger tidligere med ulike teknikker.

I denne oppgaven ble LC-MS- og LC-MS/MS-metoder for analyse av 42 forskjellige fosfolipider fra fire forskjellige fosfolipidklasser i melk utviklet. Det ble etablert en rask metode for prøveopparbeidelse der melkelipidene ekstraheres med en løsning av kloroform og metanol (2:1, v/v). Fosfolipidene ble separert på en HILIC-kolonne med 5 mM vandig ammoniumacetat (A) og acetonitril med 0,1% eddiksyre (B) som mobilfaser. Det ble brukt en lineær mobilfasegradient med økning fra 2-21% A i løpet av 40 minutter.

Forut for LC-MS-analysene av melk ble en allerede etablert offline SPE-GC-MS-metode benyttet for å innhente fettsyreprofilen til de polare lipidene. Analysen viste at de mest dominerende fettsyrene var C16:0, C18:1n-9, C18:0 og C18:2n-6. De mettede fettsyrene utgjorde 61,2%, de enumettede 32,9% og de flerumettede 5,9%. Informasjonen ble brukt som støtte ved identifikasjon av fosfolipidforbindelser etter LC-MS-analyse.

Valideringen av metoden viste en matrikseffekt for de fire klassene ved 0,5 µg/mL fosfolipid på mellom 120 og 170% og 80,6 og 93,8% ved 100 µg/mL fosfolipid. Presisjonen til metoden hadde RSD under 6,5%, og carry-over ble kun observert for PC og LPC med verdier under LOQ. Interdag-variasjonen viste for melkeprøver RSD under 6,5% ved 50 og 100 µg/mL tilsatt standard. For å oppnå mindre matrikseffekt bør prøvevolumet økes.

Fosfolipidene ble detektert av en ionefelle i positiv modus, og den lave oppløsningen gjorde det nødvendig å benytte MS/MS til sikker identifikasjon. Det ble brukt multi-SIM-metoder med *m/z*-verdiene til alle ionene i analysene, og deteksjonsgrensen var 0,2 µg/mL for PC, 0,05 µg/mL for PE og 0,5 µg/mL for SM og LPC. Av de 42 fosfolipidene som ble identifisert var 67% av totalkonsentrasjonen PC, 30% SM, 1,6% PE og 0,93% LPC. De store konsentrasjonsforskjellene mellom PC, SM og PE var ikke forventet. De mest forekommende fosfolipidene var PC C16:0/C20:4, PC C16:0/C18:1, PC C16:1/C18:2 og SM C18:0/C20:0.

ABSTRACT

As the first nutrition a mammal gets, milk contains important nutrients like proteins, lipids and lactose. Most of the lipids exist as globules in the milk, and the globule membrane keeps the lipids partially emulsified. Phospholipids are an important component of the membrane, and the phospholipid content in milk has been studied using various techniques on several occasions.

A LC-MS and LC-MS/MS method for identification of 42 phospholipids from four phospholipid classes in milk was developed. A rapid sample preparation where the milk lipids were extracted by a mix of chloroform and methanol (2:1, v/v) was established. The phospholipids were separated by a HILIC column, using 5 mL aqueous ammonium acetate (A) and acetonitrile with 0.1% acetic acid (B) as mobile phases. A linear mobile phase gradient was used, increasing from 2-21% A within 40 minutes.

Prior to the LC-MS analyses of milk, an already established offline SPE-GC-MS method was used to obtain the fatty acid profile of the polar lipids. The analysis showed that the predominating fatty acids were C16:0, C18:1n-9, C18:0 and C18:2n-6. The saturated fatty acids accounted for 61.2%, the monounsaturated 32.9% and the polyunsaturated 5.9%. The information was used as a support for the phospholipid identification after accomplishing LC-MS analysis.

The method validation showed matrix effects for the four phospholipid classes between 120 and 170% at 0.5 µg/mL and 80.6 and 93.8% at 100 µg/mL. The method precision had RSD below 6.5%, and carry-over was observed only for PC and LPC with values below LOQ. The interday variation showed a RSD for milk samples below 6.5% with 50 and 100 µg/mL added standard. To obtain smaller matrix effects, the sample volume should be increased.

Phospholipids were detected by an ion trap in positive mode, because of the low resolution it was necessary to use MS/MS for reliable identification. Multi-SIM methods containing all the *m/z*-values of the ions in the analysis were used, and the detection limit was 0.2 µg/mL for PC, 0.05 µg/mL for PE and 0.5 µg/mL for SM and LPC. Of the 42 phospholipids identified, 67% of the total concentration was PC, 30 % SM, 1.6% PE and 0.93% LPC. The large concentration differences between PC, SM and PE was not expected. The most occurring phospholipids were PC C16:0/C20:4, PC C16:0/C18:1, PC C16:1/C18:2 and SM C18:0/C20:0.

FORORD

Denne oppgaven ble gjennomført fra august 2016 til mai 2017 hos forskningsgruppen for naturstoffkjemi og organisk analyse på Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Oppgaven utgjør 60 studiepoeng og er avslutningen på min mastergrad i kjemi.

Arbeidet med oppgaven har vært spennende og utfordrende, og jeg har lært mye om kromatografi og massespektrometri.

Stor takk til Dag Ekeberg, som har vært hovedveileder, og Hanne Devle, som har vært medveileder, for å ha utformet oppgaven. Takk for at dere har svart på alle mine spørsmål, kommet med mange forslag og god hjelp underveis i oppgaven, veiledet meg på lab og gitt gode tilbakemeldinger underveis i skrivearbeidet. Stor takk også til Lena Foseid for hjelp i den innledende fasen av oppgaven og for hjelp med Xcalibur.

Tusen takk til alle som har støttet og motivert meg gjennom hele studietiden.

Tusen takk, Eirik, for all støtten og alle oppmuntringene du har gitt meg, og spesielt takk for all tålmodigheten du har vist de siste månedene.

Ås, mai 2017

Kristin Meland Risinggård

INNHALDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	I
ABSTRACT	II
FORORD	III
FORKORTELSER	VI
1 INTRODUKSJON	1
1.1 Mål for oppgaven	2
2 TEORI	3
2.1 Fett i melk	3
2.1.1 Ulike klasser fosfolipider	4
2.2 Analysemetoder for fosfolipider i melk	6
2.2.1 Prøveopparbeiding av fosfolipider fra melk	6
2.2.2 Væskrokromatografi	7
2.2.3 Gasskromatografi	9
2.2.4 Massespektrometri	11
2.3 Identifisering og kvantifisering	15
3 MATERIALER OG METODER	16
3.1 Materialer og kjemikalier	16
3.2 Tillaging av løsninger	19
3.2.1 Mobilfaser	19
3.2.2 Folchs løsning	19
3.2.3 Stamlløsninger	19
3.3 Fettsyreprofil til polare lipider i melk med GC-MS	19
3.3.1 Ekstraksjon av lipider fra melk	19
3.3.2 Fastfaseekstraksjon av lipider fra melk	19
3.3.3 Derivatisering av fosfolipider til fettsyremetylestere	20
3.3.4 Analyse av fettsyremetylestere med GC-MS	20
3.4 Analyse av fosfolipider i melk med HPLC-MS	21
3.4.1 Ekstraksjon av melk	21
3.4.2 Analyse av fosfolipider i melk ved LC-MS	22
3.4.3 Validering av metoden	25
3.5 Påvirkning av dannelse av pseudomolekylære ioner	26
3.5.1 Endring av kapillærspenning	26
3.5.2 NaCl i mobilfase A	27

4	RESULTATER OG DISKUSJON	28
4.1	Fettsyreprofil til polare lipider i melk med GC-MS	28
4.2	Etablering av metode for analyse av fosfolipider i melk med LC-MS og LC-MS/MS	29
4.2.1	<i>Sikker identifikasjon</i>	29
4.2.2	<i>Validering av metoden</i>	35
4.2.3	<i>Påvirkning av dannelse av pseudomolekylære ioner</i>	40
4.3	Analyse av fosfolipider i melk med HPLC-MS	43
5	KONKLUSJON.....	48
6	VIDERE ARBEID.....	49
7	REFERANSER.....	50
V.	VEDLEGG.....	52

FORKORTELSER

CHCl ₃	kloroform
CID	collision induced dissociation (kollisjonsindusert dekomponering)
EI	elektronionisering
ELSD	evaporative light scattering detection (lysspredningsdetektor)
ESI	elektrosprayionisering
FAME	fatty acid methyl ester (fettsyremetylester)
GC	gas chromatography (gaskromatografi)
GluCer	glucosylceramide
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography (hydrofil interaksjons- væskekromatografi)
HPLC	high performance liquid chromatography
IS	internstandard
IT	ion trap (ionefelle)
LacCer	lactosylceramide
LC	liquid chromatography (væskekromatografi)
LOD	limit of detection (deteksjonsgrense)
LOQ	limit of quantification (kvantifiseringsgrense)
LPC	lysophosphatidylcholine (lysofosfatidylcholine)
<i>m/z</i>	masse/ladning
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MeOH	metanol
MFGM	milk fat globule membrane
MS	massespektrometri
NPLC	normal-phase liquid chromatography (normalfasekromatografi)
PC	phosphatidylcholine (fosfatidylcholine)
PE	phosphatidylethanolamine (fosfatidyletanolamin)
PI	phosphatidylinositol (fosfatidylinositol)
PL	phospholipid (fosfolipid)
PS	phosphatidylserine (fosfatidylserin)
PSD	post-source decay
RCF	Relative Centrifugal Force (relativ sentrifugalkraft)
RIC	relative ion chromatogram (relativt ionekromatogram)
RPLC	reversed-phase liquid chromatography (reversfasekromatografi)
RPM	revolutions per minute
RRF	relativ responsfaktor
RSD	relative standard deviation (relativt standardavvik)
RT	retensjonstid
SIM	selected ion monitoring (selektert ioneovervåkning)
SM	sphingomyelin
SPE	solid-phase extraction (fastfaseekstraksjon)
TIC	total ion chromatogram (totalt ionekromatogram)
TOF	time of flight
V	volt

1 INTRODUKSJON

Innholdet av fosfolipider i melk har blitt undersøkt mange ganger tidligere med ulike teknikker. Bitman og Wood (1990) brukte preparativ tynnsjikt-kromatografi for å dele fosfolipidene inn i klassene PE, PC, PS, PI og SM, og GC ble brukt for å identifisere fettsyrene i hver av klassene. Studien undersøkte endring av fosfolipidinnhold gjennom laktasjonsperioden. Bitman og Wood (1990) fant at gjennomsnittlig for hele perioden inneholdt melken omtrent like andeler av PE, SM og PC (ca. 30% hver) og mindre andeler av PS og PI (ca. 6% hver).

Donato et al. (2011) brukte HPLC med HILIC-kolonne for separasjon av fosfolipider. Som detektor ble både MS og ELSD brukt. Massespektrometer med ESI og IT-TOF massefilter ble brukt til strukturbestemmelse og sikker identifikasjon mens ELSD ble brukt til kvantifisering. Før analyse gjennomgikk melkeprøvene en relativt lang prøveopparbeidelse med SPE, og den kromatografiske separasjonen varte i 100 minutter. Mobilfasene som ble benyttet var (A) acetonitril og (B) acetonitril:vann (2:1, v/v), og det ble brukt et komplisert gradientprogram som startet med 100% A og endte med 100% B. Arbeidet konkluderte med at melken som ble analysert inneholdt følgende fosfolipidklasser; PE>PS>PC>SM>PI.

En metode publisert av Liu et al. (2015) brukte HPLC med HILIC-kolonne, men kun MS som detektor. Massespektrometeret var utstyrt med ESI som ionekilde og orbitrap som massefilter. Instrumentet ble benyttet både til strukturbestemmelse, sikker identifikasjon og kvantifisering. Prøveopparbeidelsen var vesentlig kortere den beskrevet av Donato et al. (2011) med kun væske-væske-ekstraksjon i to trinn, og et analyseprogram som varte i bare 45 minutter. Ammoniumacetat, 5 mM, i vann (A) og acetonitril med 0,1% maursyre (B) ble brukt som mobilfaser i et lineært gradientprogram. Denne studien identifiserte 22 fosfolipider som ikke hadde blitt rapportert tidligere, totalt 70 PL fordelt på åtte klasser. Rangeringen av PL-klassene etter innhold var som følger; SM>PE>PC>PS>PI>LacCer>GluCer>LPC.

I arbeidet med denne oppgaven var det ønskelig å ta utgangspunkt i publikasjonen til Liu et al. (2015), da dette er en rask og effektiv analysemetode. En vesentlig forskjell mellom deres metode og den analysemetoden som ble etablert i arbeidet med denne oppgaven, er at det ikke benyttes et høyt oppløsende MS-instrument. Det har derfor blitt forsøkt å ta hensyn til mulige feiltolkninger i utviklingen av denne metoden for fosfolipidanalyse ved bruk av LC-MS- og LC-MS/MS.

1.1 Mål for oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var å etablere en analysemetode for fosfolipider i melk ved bruk av LC-MS og LC-MS/MS. Metodeutviklingen omfattet også prøveopparbeiding, og metoden ble benyttet både til sikker identifikasjon og kvantifisering. Målet er at metoden skal kunne brukes videre av forskningsgruppen for analyse av melk og validering var derfor viktig for å vite hvor godt metoden er egnet. For å vise metodens potensiale ble den brukt til å analysere helmelk.

For å vite mer om hvilke resultater som kan forventes ved LC-MS-analyse, ble en allerede etablert offline SPE-GC-MS-metode (Devle et al. 2014) benyttet til å bestemme fettsyreprofilen til fosfolipider i melk før LC-MS-analysene ble gjennomført.

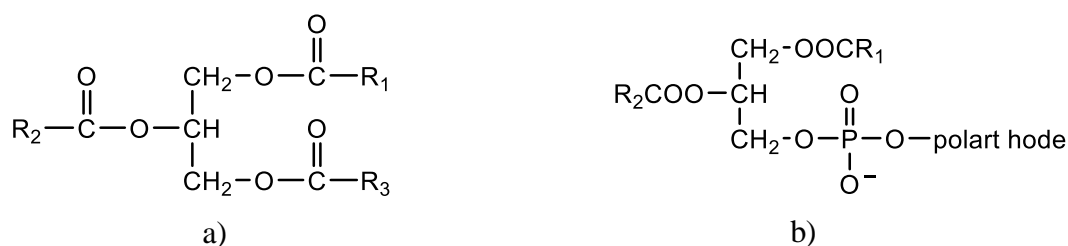
2 TEORI

2.1 Fett i melk

Som den første næringen pattedyr får, inneholder melk den energien som er nødvendig for vekst og utvikling i den første fasen av livet. Det kommer energi fra fett, mengden fett i melk fra ulike arter gjenspeiler de behovene arten har i sitt miljø (Fox et al. 2015). Kumelk inneholder normalt mellom 3,5 og 4,7% fett og er en kompleks blanding av naturlig forekommende fett, der omtrent 400 fettsyrer er identifisert (Fox & McSweeney 2006).

Melkefett består i hovedsak av triglyserider, 98,3% (v/v) (Fox & McSweeney 2006), og mindre mengder diglyserider, monoglyserider, frie fettsyrer, fosfolipider og steroler, og finnes i melk som fettkuler. Disse kulene inneholder 95% (vekt) av lipidene i melk, og er omgitt av en membran som gjør det mulig for det upolare fett å være emulgert i melken som består av omtrent 87% vann (kumelk) (Fox et al. 2015). Membranen, kalt MFGM (milk fat globule membrane), består hovedsakelig av proteiner og lipider, lipidene er for det meste fosfolipider og triglyserider (Fox & McSweeney 2006).

Triglyserider består av en glyserolenhet der hver hydroksylgruppe er forestret med en fettsyre, Figur 2.1 a). Omtrent 0,8% (v/v) av fett i kumelk er fosfolipider, 60-65% av disse er å finne i MFGM som inneholder et sted mellom 15-30% fosfolipider. De resterende fosfolipidene finnes i den vandige fasen. Strukturen deres er viktig for den amfifile funksjonen til membranen, fosfolipider er glyserolestere med to upolare «haler» og et polart «hode» (Fox & McSweeney 2006), se Figur 2.1 b).



Figur 2.1 Generell struktur av a) triglyserid og b) fosfolipid

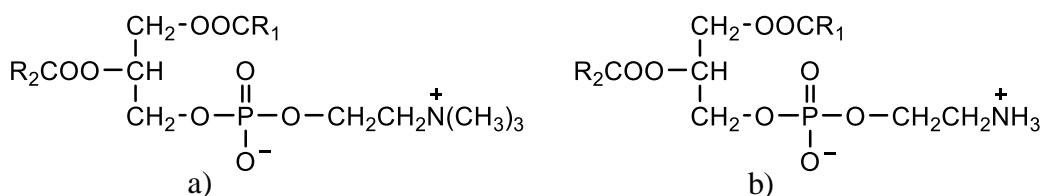
Ved prosesseringen av melken til ulike meieriprodukter fordeles fosfolipidene annerledes enn de nøytrale lipidene. Dette er fordi fosfolipidene bundet til MFGM følger med de nøytrale lipidene under separasjonen, og ender opp i fløten. Fosfolipidene i den vandige fasen forblir i skummetmelken slik at det forholdsvis blir en større andel fosfolipider i skummetmelk enn i fløte. Det samme gjelder også for fordelingen i smør og kjernemelk (Fox et al. 2015).

2.1.1 Ulike klasser fosfolipider

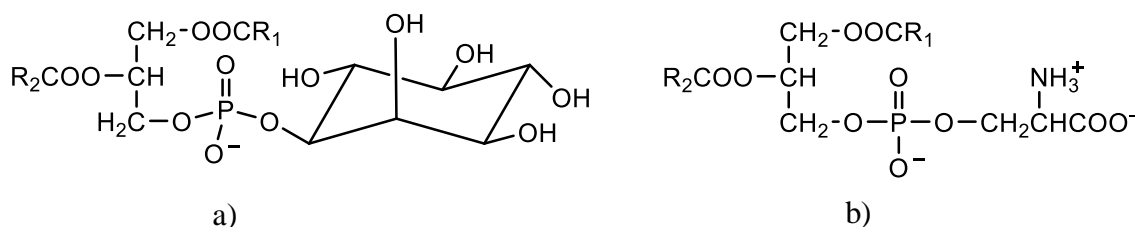
Fosfolipider blir i utgangspunktet delt inn i klasser etter strukturen til det polare hodet, men også forbindelser ulike fra den generelle strukturen (se Figur 2.1), men med lignende egenskaper, blir inkludert (Fox & McSweeney 2006).

2.1.1.1 Glyserofosfolipider

Fosfatidylcholine (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylserin (PS) og lysosfosfatidylcholine (LPC) inngår i klassen glyserofosfolipider, og har alle en glyserolenhet. PC og PE er blant de mest forekommende fosfolipidene i melk, mens PI, PS og LPC finnes i mindre mengder (Fox & McSweeney 2006). Strukturene er som vist i Figur 2.2, Figur 2.3 og Figur 2.4.



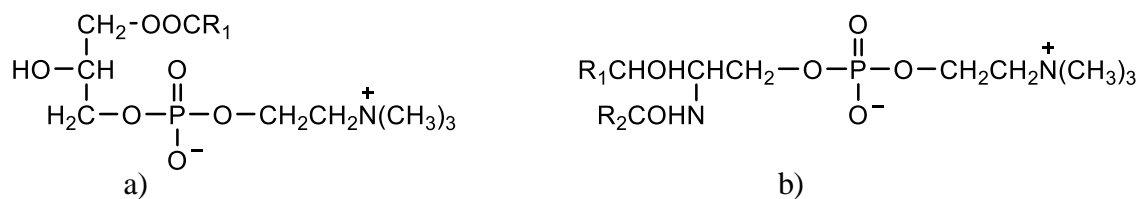
Figur 2.2 a) PC b) PE



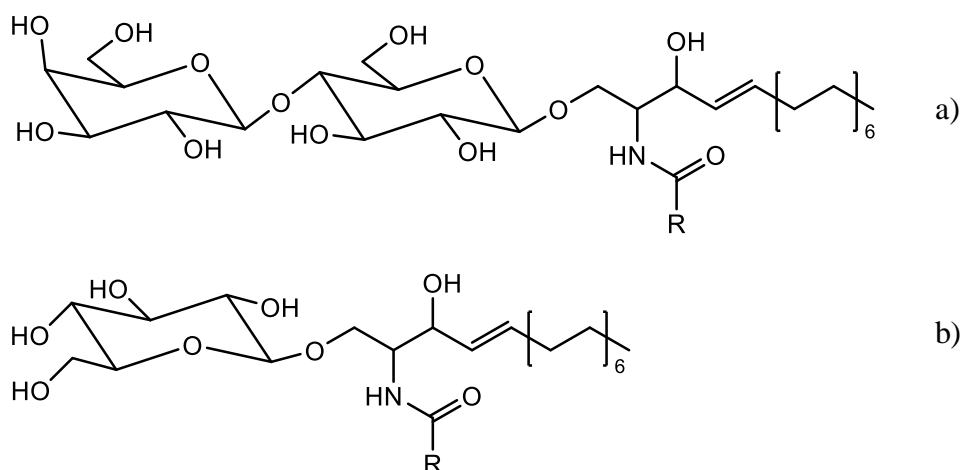
Figur 2.3 a) PI b) PS

2.1.1.2 Sphingolipider

Sphingomyelin (SM), laktosylceramid (LacCer) og glukosylceramid (GluCer) er sphingolipider, LacCer og GluCer inngår i underklassen nøytrale glykosphingolipider (Christie 2013). SM er blant de mest forekommende fosfolipidene i melk, mens LacCer og GluCer finnes i små mengder (Fox & McSweeney 2006). Strukturene er vist i Figur 2.4 og Figur 2.5.



Figur 2.4 a) LPC b) SM



Figur 2.5 a) LacCer b) GluCer

2.1.1.3 Nomenklatur

Fosfolipidene navnesettes på ulike måter, for eksempel ved å bruke de systematiske navnene (IUPAC), numeriske navn eller forenklete varianter av systematiske navn. Sistnevnte tar i bruk fettsyrenes trivialnavn og klassens navn, og de numeriske navnene angir med det første tallet antall karbonatomer og med det andre antall dobbeltbindinger. Et eksempel på ulike måter å navngi et fosfolipid fra klassen fosfatidylcholine vises i Tabell 2.1.

Tabell 2.1 Eksempel på ulike navnemåter av fosfolipider

Navnetype	Navn
Systematisk navn (IUPAC)	(2R)-2-(Palmitoyloxy)-3-(tetradecanoyloxy)propyl 2-(trimethylammonio)ethyl phosphate
Numerisk navn	PC C14:0/C16:0
Forenklet systematisk navn	1-myristoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

2.2 Analysemetoder for fosfolipider i melk

2.2.1 Prøveopparbeiding av fosfolipider fra melk

2.2.1.1 Væske-væske-ekstraksjon

Ekstraksjon er en separasjonsteknikk som benytter seg av at løste stoffer har ulik evne til å fordele seg mellom to ikke blandbare faser. Fordelingen av analytt skjer ved at miljøet rundt analytten endres, og det dannes en likevekt mellom de to fasene. Når likevekten har funnet sted separeres de to fasene, for eksempel ved sentrifugering. Analytten vil favorisere den fasen den er mest løselig i. Etter separasjon fjernes fasen analytten er overført til, den andre fasen kastes eller ekstraheres videre. Ved væske-væske-ekstraksjon er begge de to fasene væsker, fasen som opprinnelig inneholdt analytten kalles raffinat og væsken som analytt overføres til kalles ekstraksjonsmiddel (Hage & Carr 2011).

2.2.1.2 Fastfaseekstraksjon

Fastfaseekstraksjon (solid-phase extraction, SPE) er en ekstraksjonsmetode som bruker adsorpsjon som separasjonsmekanisme (Hage & Carr 2011). Ved prøveopparbeiding kan SPE brukes til å oppkonsentrere og rense prøven ved at analytten adsorberes på en fast fase mens urenheter elueres ut, eller motsatt. Separasjon av ulike analytter fra samme prøve kan også gjøres med SPE (Miller 2009).

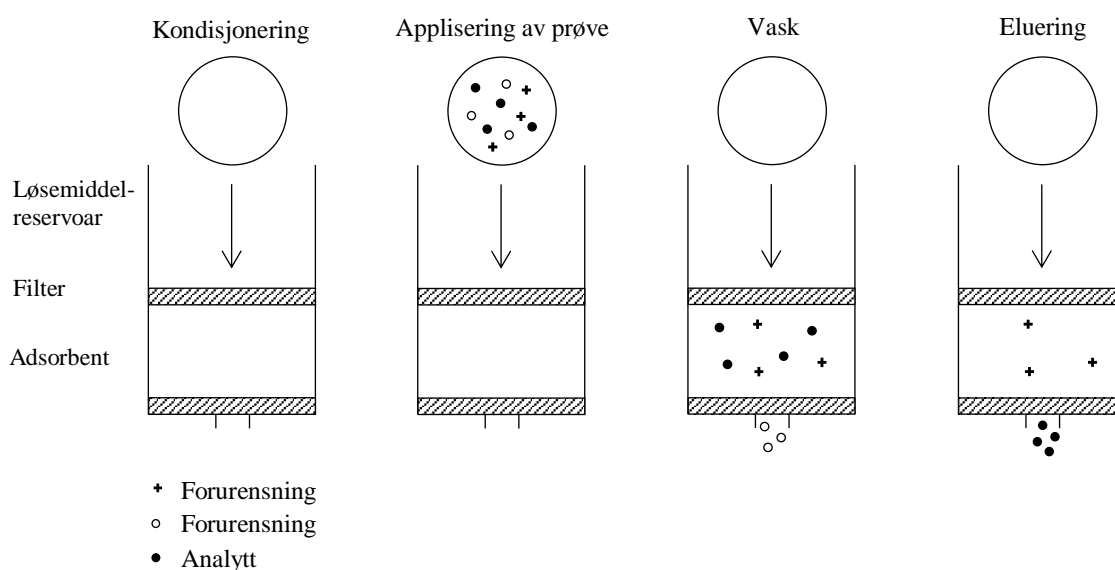
SPE bygger på enkle prinsipper, og med ferdigpakkede engangskolonner, med homogent pakket adsorbent, er resultatene reproducerbare. Kolonnene består av et løsemiddelreservoar, adsorbent og filter over og under adsorbenten, se Figur 2.6. Mengden adsorbent velges ut fra mengden analytt i prøven, og er ofte silikabasert. Det dannes kovalente bindinger mellom silikapartiklene og ulike funksjonelle grupper for å gi adsorbentene forskjellige egenskaper.

De fire trinnene i SPE vises i Figur 2.6; kondisjonering, prøveapplisering, vask og eluering. Ved disse trinnene brukes ulike løsemidler med forskjellige egenskaper. Under kondisjoneringen blir adsorbenten mer tilgjengelig for analytten fordi de funksjonelle gruppene folder seg ut, dette gjør også kolonnen mer reproducerbar. Ved vask fjernes forurensninger fra analytten før analytten elueres ut.

Det er tre hovedmekanismer for separasjon i SPE – normalfase-, revers fase- og ionebytte-ekstraksjon. Ved normalfaseekstraksjon er den faste fasen polar og mobilfasen upolar. Hvorvidt

analyttmolekylene adsorberes på overflaten til kolonnematerialet eller elueres ut av kolonnen bestemmes av affiniteten analytten og løsemiddelet har til kolonnematerialet. De tilgjengelige bindingspunktene på kolonnematerialet blir okkupert av den forbindelsen som har størst affinitet.

Når det er analytten som har størst affinitet til kolonnematerialet, har den retensjon til kolonnen. Ved normalfaseekstraksjon dannes det polare interaksjoner, bla. hydrogenbindinger og dipol-dipol-interaksjoner. Ved eluering brytes de polare interaksjonene fordi elueringsmiddelet har høyere affinitet til adsorbenten enn analytten. Dermed mister analyttmolekylene plassene sine på adsorbentoverflaten og kommer ut av kolonnen (Simpson & Van Horne 1993).



Figur 2.6 Prinsipp for fastfaseekstraksjon

2.2.2 Væskekromatografi

Kromatografi er et viktig analytisk verktøy som kan separere svært like forbindelser og dermed analysere komplekse kjemiske blandinger. Teknikken ble beskrevet av den russiske botanikeren Mikhail S. Tswett i 1903, som brukte teknikken til å separere plantepigmenter. Forbindelsene separeres etter fordelingen mellom to faser, en stasjonær og en mobil, i væskekromatografi (LC) er den mobile fasen en væske. Separasjonen skjer når en forbindelse har sterkere interaksjoner til den stasjonære fasen enn en annen, og dermed bruker lengre tid på å vandre gjennom det kromatografiske systemet. I væskekromatografi kan det kromatografiske systemet bestå av plane overflater eller kolonner med stasjonærfase. Ved hjelp av en detektor i enden av det kromatografiske systemet, presenteres den kromatografiske separasjonen med en graf av

Teori

den målte responsen som funksjon av tiden brukt til eluering. Denne grafen kalles et kromatogram, og tiden som brukes før eluering kalles retensjonstid (Hage & Carr 2011).

For å separere forbindelser i en prøve med væskechromatografi, må prøven være løselig i en væske. I LC-teknikken utviklet av Tswett ble en kolonne pakket med store partikler brukt, og mobilfasen gikk gjennom systemet ved hjelp av tyngdekraften. Moderne væskechromatografi er såkalt «high-performance», HPLC. Det benyttes mindre partikler ved HPLC enn tradisjonell LC, derfor må det brukes høyere trykk for å drive mobilfasen gjennom systemet. For å oppnå god separasjon endres ofte sammensetningen av mobilfasen gjennom analysen, dette kalles gradienteluering (Hage & Carr 2011).

Prinsippet for SPE og HPLC har store likhetstrekk, og kolonnematerialene kan brukes i begge teknikkene. Den store forskjellen mellom SPE og HPLC ligger i styrken til interaksjonene mellom analytt og stasjonærfase. I SPE er interaksjonene sterke, det er enten retensjon eller ikke. Ved HPLC er interaksjonene svakere og analytten migrerer gradvis gjennom kolonnen (Turner 2016).

Separasjonen av forbindelser i LC skjer med ulike teknikker. I adsorpsjonschromatografi skjer separasjonen på bakgrunn av adsorpsjonen til stasjonærfasens overflate, og i ionebytterchromatografi separeres forbindelsene på grunn av adsorpsjon til ionebytterseter på stasjonærfasens overflate. I eksklusjonschromatografi separeres forbindelsene etter analyttens størrelsesforskjell, der mindre molekyler hindres mer enn de større. Affinitetschromatografi baserer seg på interaksjoner som er biologiske relaterte, som enzyms substratbinding. Fordelingschromatografi separerer etter fordelingen mellom mobilfasen (væske) og stasjonærfasen, og det finnes to hovedtyper innen denne teknikken der forskjellen er polariteten til stasjonærfasen. Normalfasechromatografi (NPLC) bruker polar stasjonærfase som kan danne hydrogenbindinger eller dipol-interaksjoner til analyttene, og er den opprinnelige teknikken. Mobilfasen er mindre polar, upolare væsker er svake mobilfaser mens polare væsker er sterke. Reversfasechromatografi (RPLC) er motsatsen til NPLC og bruker upolar stasjonærfase (Hage & Carr 2011).

Hydrofil interaksjonsvæskechromatografi (Hydrophilic interaction liquid chromatography HILIC) er en teknikk som fra 2003 har hatt stor økning i bruk. Vanligvis karakteriseres HILIC som en NPLC-variant, men den bruker elementer fra flere andre teknikker; stasjonærfasen er polar slik som i NPLC, mobilfasene likner mobilfasene brukt i RPLC og ladede forbindelser kan separeres slik som i ionebytterchromatografi (Buszewski & Noga 2012). HILIC egner seg

godt til å separere polare og hydrofile forbindelser, en gruppe som ikke lar seg separere så godt av NPLC og RPLC. Polare og hydrofile forbindelser retarderer dårlig med RPLC, og NPLC er et lite miljøvennlig valg som bruker store mengder organiske løsemidler og løser polare og hydrofile forbindelser dårlig (Appelblad et al. 2008).

Mobilfaser brukt i HILIC-analyser inneholder et polart organisk løsemiddel som er blandbart med vann og en liten andel vann. Det er også vanlig å tilsette et tilleggsstoff i mobilfasen, dette hjelper med å kontrollere pH og ionestyrke. (Buszewski & Noga 2012). En typisk mobilfase for HILIC-kolonner kan for eksempel inneholde 40-97% acetonitril i vann eller buffer. Dette gjør at ved bruk av HILIC kan et massespektrometer brukes som detektor. Bruk av HILIC fremfor RPLC kan gi 10-1000 ganger økt sensitivitet for hydrofile forbindelser (Appelblad et al. 2008). Ved gradienteluering starter analysen med en liten andel vann i mobilfasen som øker gjennom analysen (Buszewski & Noga 2012).

En anerkjent teori for separasjon i HILIC går ut på at mobilfasen lager et væskelag som inneholder mye vann på overflaten til stasjonærfasen. Dette gjør at det foregår væske-væske-ekstraksjon mellom dette hydrofile laget og mobilfasen. Mekanismen for separasjon likevel uklar, én teori går ut på at analytten fordeles mellom mobil- og stasjonærfasen, en annen at analytten adsorberer på stasjonærfasens overflate og en tredje at mobilfasetilsetningen adsorberes på overflaten til stasjonærfasen og at analytten fordeles inn i dette adsorberte laget (Buszewski & Noga 2012).

2.2.3 Gasskromatografi

I gasskromatografi (GC) er mobilfasen en gass, og forbindelser som skal separeres må være flyktige og termisk stabile. Ved å derivatisere forbindelser kan de bli tilstrekkelig flyktige og termisk stabile, en måte er å fjerne polare grupper og erstatte dem med mindre polare grupper (Hage & Carr 2011).

Mobilfasen kalles ofte bæregass fordi den har lite å si for analyttenes retensjon, og er ofte en inert gass som for eksempel helium, nitrogen eller argon. Kolonnene er enten pakket med stasjonærfase eller har kolonnematerialet på den indre kolonneveggen (Hage & Carr 2011). Faktorene som påvirker retensjon er flyktighet, temperatur og interaksjon med stasjonærfasen. Dersom analytten er veldig flyktig, vil den holde seg i mobilfasen og dermed ha liten retensjon. Temperaturen påvirker flyktigheten, derfor er kolonnen i en gasskromatograf plassert i en

Teori

kolonneovn som regulerer temperaturen. Temperaturen endres ofte underveis i analysen, og tilsvarer gradientelueringen i LC (Hage & Carr 2011).

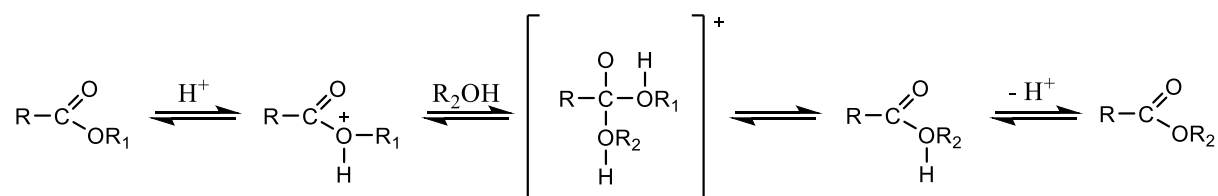
2.2.3.1 Dannelse av fettsyremetylestere

Fettsyrer er lite flyktige, og må derfor derivatiseres for å kunne bli analysert med GC-MS. Dette kan gjøres ved å forestre fettsyrer med alkohol ved hjelp av en syre som katalysator. Fettsyren blir protonert og det blir dannet et oksoniumion som Figur 2.7 viser. Dette reagerer med alkoholen og danner et mellomprodukt, som etter tap av et proton danner fettsyreesteren (Christie 2011).



Figur 2.7 Syrekatalysert forestring av fettsyre

Omestring kan gjøres på samme måte, se Figur 2.8 (Christie 2011).



Figur 2.8 Syrekatalysert omestring av lipid

I begge tilfellene er det viktig for utbyttet av reaksjonen at det er et overskudd av alkoholen tilstede, dette for å forskyve likevekten mot høyre etter Le Châteliers prinsipp (Christie 2011).

Til forestring eller omestring kan Lewis-syren bortrifluorid som bortrifluoridkompleks i metanol (BF₃-MeOH) brukes, best resultater oppnås med 12-14% BF₃-MeOH (Christie 2011).

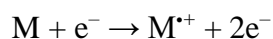
2.2.4 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en teknikk som identifiserer molekyler basert på deres masse. Molekylene gjøres om til gassfaseioner som separeres og analyseres basert på masse og ladning. Et massespektrometer består av en injektor, ionekilde, massefilter, detektor og et databehandlingssystem. Molekylene ioniseres i ionekilden. Når analytten ioniseres blir den ladet, det gir molekylionet som kan brytes opp i biter som kalles fragmentioner (Hage & Carr 2011). I massefilteret separeres de ut fra masse-til-ladning-ratio (m/z) før de detekteres av detektoren som sender signal til databehandlingssystemet. Resultatet er et massespektrum, med intensitet av ioner som funksjon av m/z .

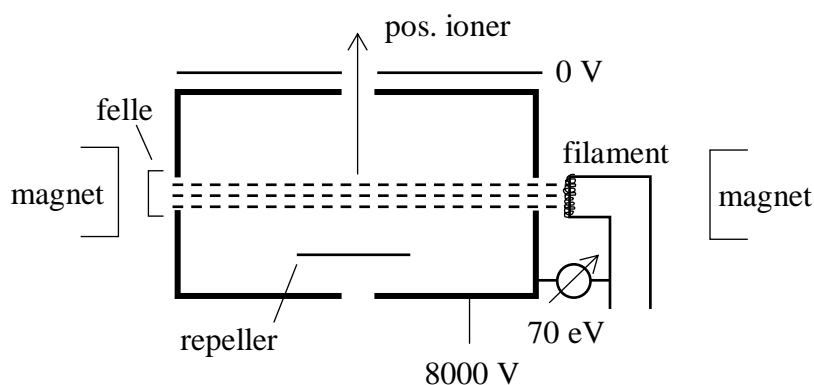
Massespektrometeret kan brukes både som en generell og en veldig selektiv detektor, i full-scan-modus er den en generell detektor som kan detektere mange forbindelser i en analyse. I den selektive modusen, SIM (selected ion monitoring), detekteres kun noen få utvalgte ioner. Ved å bruke SIM oppnås lav deteksjonsgrense fordi at det er mer tid til å hente signal fra analytten og fordi det allerede er kjent hvilke forbindelser som skal analyseres (Hage & Carr 2011).

2.2.4.1 Ionisering

Det finnes mange teknikker som brukes til å ionisere molekyler i MS, noen av disse er elektronionisering (EI), kjemisk ionisering, laserdesorpsjon, matriksassistert laserdesorpsjon-ionisering og elektrospayionisering (ESI). Ioniseringsteknikker kan beskrives som harde eller myke, avhengig av hvor mye molekylet fragmenteres. EI er en hard ioniseringsteknikk der molekylene som skal ioniseres er inni ionekilden og treffes av elektroner som løsriver fra filamentet. Disse akselereres inn i ionekilden ved hjelp av spenningsforskjell mellom filamentet og resten av ionekilden, og følgende reaksjon skjer (Hoffmann & Stroobant 2007):

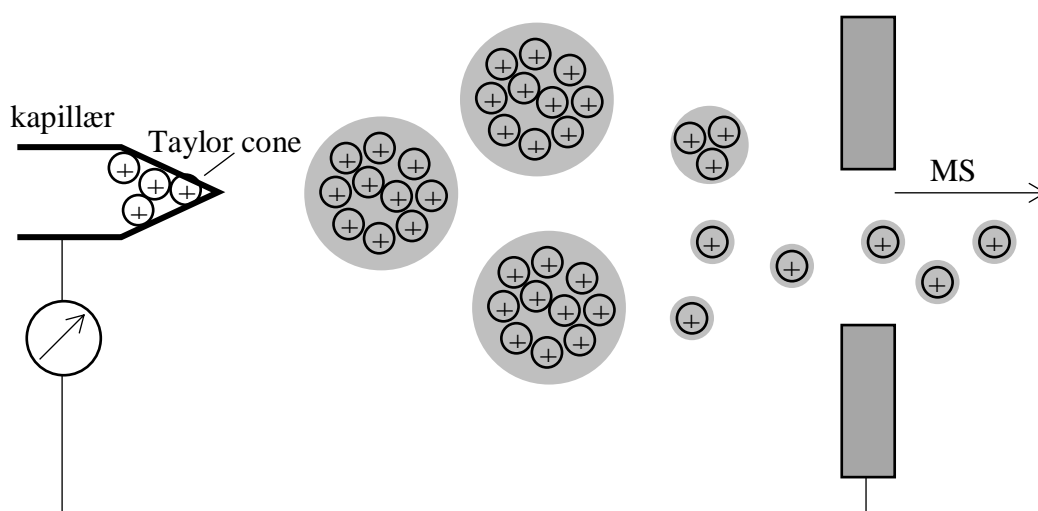


Ionene passerer en spalte og fortsetter til massefilteret. Magnetene plassert på hver side av ionekilden, se Figur 2.9, sørger for at elektronbanen ikke er rett. Dette gjør at elektronene vandrer lengre, og det blir større sannsynlighet for kollisjon mellom elektroner og molekyler. Kollisjonene fører til at bevegelsesenergi overføres til indre energi, derfor fragmenterer molekylionet ofte før det forlater ionekilden. Molekyler som er flyktige kan ioniseres med EI, og den store graden av fragmentering gjør at molekylionet ikke alltid er synlig (Miller 2009).



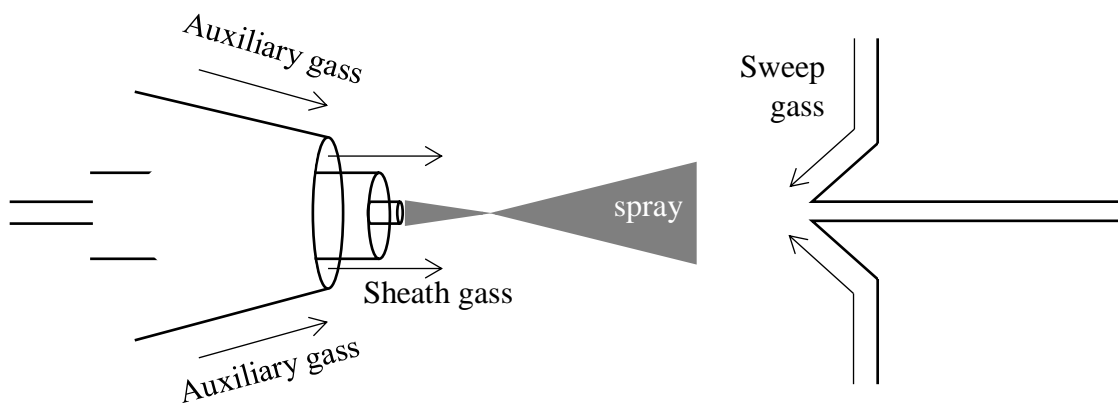
Figur 2.9 Skisse av en ionekilde hvor elektronionisering benyttes

ESI er en myk ioniseringsteknikk som foregår ved atmosfærisk trykk der prøven, i et løsningsmiddel, pumpes gjennom en kapillær som er påført stor spenning. Spenningen fører til at væskens overflate blir ladet og stikker ut av kapillærtuppen, denne spissen kalles en «Taylor cone», se Figur 2.10. Væsken i Taylor cone frigjøres når coulombfrastøtningen overgår overflatespenningen. Det finnes flere mekanismer som forklarer hvordan de ladede dråpene ender opp som ladede analyttmolekyler, blant annet coulombeksplosjon og «ion evaporation». Coulombeksplosjon går ut på at ladningen i dråpen øker når løsningsmiddelet fordamper slik at dråpen deler seg til mindre dråper helt frem til den kun består av et enkelt ion. Ion evaporation-mekanismen forutsetter at ionene frigjøres fra dråpen når overflatespenningen overgås av coulombfrastøtningen fordi løsningsmiddelet fordamper. Ionene fortsetter videre inn i MS-instrumentet (Cech & Enke 2001).



Figur 2.10 Elektrosprayionisering

Nitrogengass brukes som hjelpemiddel i ESI-kammeret, og gass som tilføres fra ulike vinkler hjelper på ulike måter. Sheath gass brukes for å finfordele væsken når den kommer ut av kapillæren, og tilføres langs kapillærens akse. Auxiliary gass fokuserer sprayen og gjør det lettere for løsningsmiddelet å fordampe, den tilføres med en vinkel som vist i Figur 2.11. Sweep gass forhindrer at annet materiale enn ionene kommer videre inn i massespektrometeret (Thermo Scientific Training Institute).



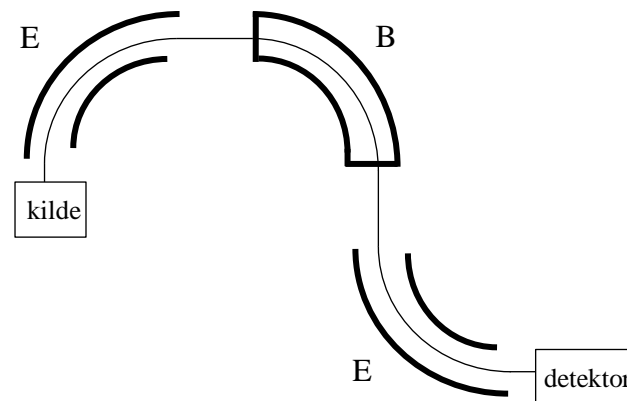
Figur 2.11 Nitrogengass i ESI-kammeret

2.2.4.2 Massefiltre

Det finnes mange ulike massefiltre, noen av dem brukes også i kombinasjon med hverandre. Kvadrupolen består av fire parallelle rør det er koblet spenning til, to og to motstående rør har samme ladning og spenningen kan varieres. Ionene separeres fordi stabiliteten til ionenes kurs i vekslende elektriske felt er ulik, og spenningen endres slik at kun en bestemt masse kan passere rørene. I en orbitrap går ionene i bane mellom en ytre og indre elektrode, dette massefilteret oppnår høy oppløsning. Time-of-Flight, eller TOF, separerer ionene etter tiden de bruker på å sveve gjennom et rør. Ionene blir akselerert likt av et elektrisk felt, men bruker ulik tid på samme distanse avhengig av m/z . I Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) fanges ioner i en sirkulær bane i et magnetisk felt. Et skiftende elektrisk felt med samme frekvenser som magnetfeltet eksiterer ioner som har elektroner med riktig energi. Disse ionene øker hastigheten og radiusen i den sirkulære banen blir større. Etter deteksjon behandles dataene med fouriertransformasjon for å gi et MS-spekter (Hoffmann & Stroobant 2007).

Magnetiske og elektromagnetiske filtre baserer seg på at banen til ioner bøyes av i et magnetfelt. For å komme gjennom magnetfeltet må sentrifugalkraften være lik magnetens kraft, dermed vil en gitt styrke på magnetfeltet kun slippe gjennom ioner med en bestemt m/z -verdi. Når ionene

forlater ionekilden skal de ha lik kinetisk energi, men dette er i praksis ikke tilfellet. Derfor får ioner med lik masse ulik bane gjennom det magnetiske feltet og registreres med litt ulik masse. Dette forhindres ved at ionene først passerer gjennom et elektrostatiske filter som kun slipper gjennom ioner med en bestemt kinetisk energi. Et oppsett med tre filtre vises i Figur 2.12, her fokuseres ionene først gjennom et elektrostatiske filter (E), så gjennom et magnetisk filter (B) og ytterligere et elektrostatiske filter til slutt (Hoffmann & Stroobant 2007).

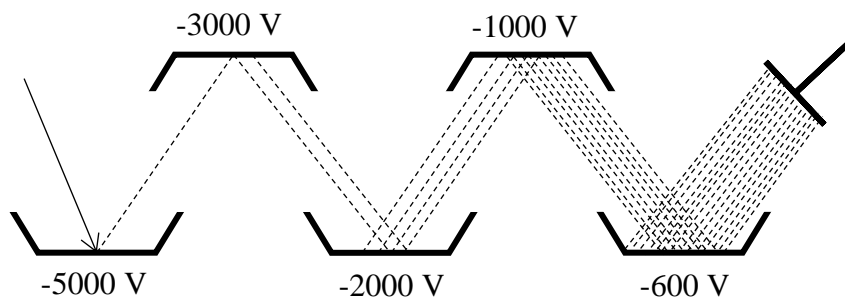


Figur 2.12 Sektorinstrument med EBE-geometri

Ionefellen (IT) bruker samme prinsipp som kvadrupolen, men fanger ionene mellom elektrodene. Det finnes to ulike utforminger av ionefellen, 3D og 2D. I 3D-fellen fanges ionene mellom en ringelektrode og en øvre og nedre elektrode. Ionene beveger seg i rommet og blir påvirket av den varierende spenningen, ved riktig spenning blir ioner med en gitt m/z -verdi kastet ut av fellen og detektert. I 2D-fellen er det fire parallelle rør (som i kvadrupolen) og elektroder på hver ende som fanger ionene. Også her kastes ionene med gitt m/z -verdi ut når spenningen gir ustabile svingninger (Hoffmann & Stroobant 2007).

2.2.4.3 Detektor

Ionene som har passert massefilteret detekteres av detektoren som genererer en elektrisk strøm proporsjonal til mengden ioner. Elektronmultiplikatoren er en type detektor der ioner fra massefilteret kolliderer med første dynode, og det emitteres elektroner. Disse frastøtes dynoden som har et negativt potensial, og kolliderer med neste dynode som gir flere elektroner, se Figur 2.13. Strømmen som dannes måles og tolkes av en datamaskin.



Figur 2.13 Elektronmultiplikator

2.3 Identifisering og kvantifisering

Sikker identifikasjon av forbindelser analysert ved hjelp av en kromatografisk metode der MS brukes som detektor kan gjøres på ulike måter. Dersom retensjonstiden til et stoff er kjent for det gjeldende systemet, kan dette hjelpe for identifikasjonen. For å finne RT til en forbindelse kan denne i ren form (kjøpt standard) analyseres med samme betingelser som de ukjente forbindelsene. Blandinger av flere kjente forbindelser kan også brukes. Til videre identifisering kan massespekteret brukes, for eksempel ved å sammenligne dette med spektra i et søkbart bibliotek. Dersom biblioteksøket viser høy grad av likhet mellom spekteret til den ukjente forbindelsen og en kjent forbindelse i biblioteket, kan dette sammen med RT brukes som sikker identifikasjon.

Dersom biblioteksøk ikke er en mulighet, kan fragmenteringsspektra benyttes. Fragmenteringsspekter kan innhentes ved å gjennomføre collision induced dissociation-analyse (CID). Å ha en mistanke om hvilken forbindelse det ønskes å bekrefte at er tilstede er en fordel, fragmenteringsspekteret brukes da sammen med molekylstrukturen for å forklare fragmenter i spekteret med mulige brudd i molekylstrukturen.

For kvantifisering av forbindelser kan det benyttes en ekstern standardkurve, denne lages ved å analysere kjente mengder av forbindelsen og lage en kurve med kjent konsentrasjon som funksjon av toppareal. Ved hjelp av kurven og arealet til forbindelsen av ukjent konsentrasjon beregnes konsentrasjonen. En internstandard kan også benyttes til kvantifisering. Da tilsettes en kjent forbindelse med kjent konsentrasjon prøven før opparbeiding og etter analysen brukes arealet til forbindelsen med kjent konsentrasjon, den kjente konsentrasjonen og arealet til forbindelsen med ukjent konsentrasjon til å beregne den ukjente konsentrasjonen, se formel (1) og (2).

3 MATERIALER OG METODER

3.1 Materialer og kjemikalier

Melken brukt i denne oppgaven er helmelk fra TINE SA kjøpt i matbutikk og oppbevart i fryser frem til bruk.

De følgende tabellene, Tabell 3.1, Tabell 3.2, Tabell 3.3 og Tabell 3.4 gir oversikt over kjemikalier, forbruksmateriell og utstyr, fosfolipidstandarder og instrumenter brukt i oppgaven.

Tabell 3.1 Kjemikalier benyttet i oppgaven

Produkt	Produsent	Renhet	CAS-nr.
Acetonitril	Sigma-Aldrich	CHROMASOLV® for HPLC $\geq 99,9\%$	75-05-8
Acetonitril med 0,1% eddiksyre	Honeywell Riedel-de Haen™ VWR	LC-MS CHROMASOLV® $\geq 99,5\%$ HiPerSolv CHROMANORM for LC/MS	
Eddiksyre (LC)	Sigma-Aldrich	Eluent additive for LCMS	64-19-7
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich	$\geq 98\%$	631-61-8
Kloroform	Sigma-Aldrich	CHROMASOLV® for HPLC $\geq 99,9\%$	67-66-3
Metanol	Sigma-Aldrich	CHROMASOLV® for HPLC $\geq 99,9\%$	67-56-1
Dietyleter	Sigma-Aldrich	$\geq 99,8\%$	60-29-7
Eddiksyre	Sigma-Aldrich	96%	64-19-7
Heptan	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$	142-82-5
Isopropanol	VWR Chemicals	$\geq 99,0\%$	67-63-0
Nitrogen	AGA	5.0	7727-37-9
Helium	AGA	99,9999%	7740-59-7
FAME-mix	Restek®	*	

* Food Industry FAME Mix, 30 mg/mL i diklormetan

Tabell 3.2 Forbruksmateriell og utstyr benyttet i oppgaven

Produkt	Navn	Produsent	Spesifikasjoner
Eppendorfrør	Eppendorf Tube®	Eppendorf	5,0 mL
Pasteurpipette	Disposable Glass Pasteur Pipettes	VWR International	150 mm
Pasteurpipette	Disposable Glass Pasteur Pipettes	VWR International	230 mm
Veieskip	Aluminium mikroveieskål	VWR International	Oval, (12×4×2,7) mm
Blåkorkrør	CELLSTAR® Polypropylene	Greiner Bio-One Int. GmbH	50 mL, 15 mL
GC-rør	Krympehetterør	VWR International	1,5 mL, 11,6×32 mm
GC-rør, lokk	Krympehette i alu. m/septum	VWR International	11 mm
LC-rør	Rør med korte gjenger	VWR International	1,5 mL, 11,6×32 mm
LC-rør, lokk	Skrulokk PP blå	VWR International	1 mm
Varmeblokk	Dri-Block® DB-3	Techne®	279 × 260 × 105mm
Inndampingsstativ	Pierce Reacti-Vap™ III	Thermo Scientific	
Glassrør m/gjenger	Screwthread tubes	DURAN®	GL 14
Kork til glassrør	Cap	DURAN®	GL 14
Blåkorkflasker		Diverse*	50-1000 mL
Ristebord	Orbital shaker	Biosan	PSU-10i
Vannbad	No 1004	GFL	
Whirlmixer	Yellowline TTS 2	IKA®-Werke	
SPE-kolonner	Bond Elut NH ₂	Agilent	500 mg, 3 mL
SPE-lokk		Gilson	Til 3 mL kolonne
Mikrovekt	CP2P	Sartorius	
Analysevekt	Sartorius	Sartorius	
Sentrifuge	5430 R	Eppendorf	
Sentrifuge	EBA 20	Hettich®	
Hamiltonsprøyte	Microliter Syringe	Hamilton®	10 µL
Hamiltonsprøyte	Microliter Syringe	Hamilton®	50 µL
Hamiltonsprøyte	Gastight Syringe	Hamilton®	100 µL
Hamiltonsprøyte	Microliter Syringe	Hamilton®	500 µL
Hamiltonsprøyte	Gastight Syringe	Hamilton®	2,5 mL
Automatpipette	Finnpipette™ F2	Thermo Scientific	100-1000 µL

* Duran®, Boro, VWR Collection, Fisherbrand™

Tabell 3.3 Fosfolipidstandarder benyttet i oppgaven

Klasse	Trivialnavn	Fettsyrer	Produsent	Renhet	CAS-nr.
PC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	18:0/18:0	Sigma-Aldrich	99%	813-94-4
PC	1,2-dinonadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	19:0/19:0	Larodan AB	99%	95416-27-6
PC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	16:0/16:0	Fluka	≥99%	63-89-8
PE	1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	12:0/12:0	Larodan AB	99%	37-1220-9
PE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	16:0/16:0	Larodan AB	99%	923-61-5
LPC	1-Heptadecanoyl-2-Hydroxy- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	17:0	Avanti Polar Lipids, Inc.	>99% *	50930-23-9
SM	N-hexanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine	18:1/6:0	Sigma-Aldrich	≥ 98,0%	182493-45-4
PI	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoinositol (Ammonium Salt)	16:0/16:0	Avanti Polar Lipids, Inc.	>99%	34290-57-8
PS	1,2-Diheptadecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho-L-Serine] (Sodium Salt)	17:0/17:0	Avanti Polar Lipids, Inc.	>99%	799268-51-2

* kan inneholde opptil 10% 2-LPC-isomer

Tabell 3.4 Instrumenter med tilbehør benyttet i oppgaven

Produkt	Navn	Produsent
HPLC	Dionex UltiMate 3000	Thermo Scientific
HPLC-kolonne	Ascentis [®] Express HILIC, (150×2,1) mm, 2,7 μm partikkelstørrelse	Sigma-Aldrich/Supelco
MS	LTQ XL [™] Linear Ion Trap Mass Spectrometer	Thermo Scientific
Programvare	Xcalibur [™] Software	Thermo Scientific
Programvare	Chromeleon Xpress	Thermo Scientific
Programvare	LTQ Tune Plus	Thermo Scientific
GC	Agilent 6890N Series	Agilent Technologies
GC Autosampler	COMBI PAL	CTC Analytics AG
GC-kolonne	Rtx-2330, 60 m, 0,25 mmID, 0,2 μm filmtykkelse	Restek [®]
MS	Micromass [®] AutoSpec Ultima [™] NT	Waters
Programvare	MassLynx [™] 4.0	Micromass Ltd.
Programvare	NIST MS Search 2.2	NIST MS Data Center
SPE-robot	GX-274 ASPEC [™]	Gilson [®]
SPE programvare	Trilution [®] LH	Gilson [®]

3.2 Tillaging av løsninger

3.2.1 Mobilfaser

Mobilfase A, 5 mM ammoniumacetat, ble laget ved å løse ammoniumacetat i Milli-Q-vann. Mobilfase B, acetonitril med 0,1% eddiksyre (v/v), ble i det innledende arbeidet blandet på laboratoriet men etter hvert kjøpt ferdig blandet.

3.2.2 Folchs løsning

Folchs løsning ble laget ved å blande kloroform og metanol 2:1 (v/v).

3.2.3 Stammløsninger

Stammløsninger av fosfolipidene listet i Tabell 3.3 ble laget ved å veie inn ønsket mengde på mikrovækt, overføre dette kvantitativt til målekolbe med ønsket volum og løse dette i kloroform med 10% metanol (v/v). Stammløsningene ble oppbevart i LC-rør ved -20 °C. Lavere konsentrasjoner av standardene ble laget som fortyninger av stammløsningene. Til disse fortyningene ble det brukt kloroform, og Hamilton-sprøyter ble brukt for å overføre nøyaktig volum.

3.3 Fettsyreprofil til polare lipider i melk med GC-MS

3.3.1 Ekstraksjon av lipider fra melk

Ekstraksjon av lipider fra melk ble gjennomført som beskrevet av Devle et al. (2014), med kun små endringer. Melkeprøven, 1,0 mL melk, ble i et 50 mL blåkorkrør tilsatt 20 mL CHCl_3 :MeOH (2:1, v/v) og 100 μL 1,0 mg/mL stammløsning av PC C19:0/C19:0 som internstandard. Prøven ble lagt horisontalt på ristebord og ristet ved 350 RPM i 20 minutter. 4 mL NaCl-løsning (0,9%) ble tilsatt prøven før sentrifugering ved 20 °C i 10 min med 1000 RCF (Eppendorf Centrifuge 5430 R). Den organiske fasen ble overført til reagensrør og inndampet ved 40 °C med N_2 -gass. Lipidene ble løst igjen i 1,0 mL kloroform og overført til GC-rør før SPE.

3.3.2 Fastfaseekstraksjon av lipider fra melk

Fastfaseekstraksjon ble gjennomført med SPE-robot, hvor det ble benyttet ferdigpakke kolonner med lokk. Prøvene ble plassert i roboten, kolonnene på sin plass og reagensrør under

Materialer og metoder

dem, tre rør for hver kolonne. Det ble pumpet 20 mL isopropanol gjennom instrumentet før kromatografering for å fjerne luftbobler (5 mL gjennom hver slange). Isopropanolen ble ikke ført gjennom kolonnene, men rett til avfall. Selve SPE-prosedyren ble utført av roboten som var programmert med følgende betingelser: Kondisjonering av kolonnene med 7,5 mL heptan, applisering av prøvene (500 µL), eluering av de nøytrale lipidene med 5,0 mL kloroform, eluering av frie fettsyrer med 5,0 mL dietyleter:eddiksyre (98:2) og eluering av polare lipider med 5,0 mL metanol. Fraksjonen med polare lipider ble inndampet med N₂-gass ved 40 °C.

3.3.3 Derivatisering av fosfolipider til fettsyremetylestere

Ekstraktet med polare lipider ble reløst i 1,0 mL 14%-løsning av bortrifluorid-metanol, og etter 90 minutter i vannbad ved 100 °C ble 1,0 mL heptan tilsatt. Etter blanding ble rørene satt til henstand noen minutter for å skille fasene, den organiske fasen (heptanlaget) ble overført til GC-rør som ble oppbevart ved -20 °C fram til analyse med GC-MS.

3.3.4 Analyse av fettsyremetylestere med GC-MS

Analyse av FAME ble utført med GC-MS. Prøvene ble injisert i en splittinjektor med splittratio 1:10, injeksjonsvolumet var 1,0 µL. Bæregassen var helium og gjennomstrømningshastigheten var 1,0 mL/min. Kolonnens temperaturprogram startet på 65 °C og etter tre minutter steg temperaturen 40 °C/min opp til 150 °C. Etter 13 minutter økte temperaturen 2 °C/min opp til 151 °C, og etter ytterligere 20 minutter fortsatte temperaturen å stige 2 °C/min opp til 230 °C. 10 minutter senere økte temperaturen 50 °C/min opp til 240 °C. Den totale analysetiden var 92 minutter. Videre ble prøven ionisert i en EI-ionekilde som produserte elektroner med energi på 70 eV. Massefilteret i MS-instrumentet var trippelsektor med EBE-geometri hvor masseområdet var satt til m/z 40 til 600.

Fettsyrene ble identifisert ved hjelp av bibliotekssøk (NIST MS Search 2.2) og ved sammenlikning av retensjonstider med FAME-mix med 38 ulike FAMEer inklusiv C19:0-standard som ble tilsatt i tillegg. Kvantifiseringen ble gjort med internstandard og relative responsfaktorer. Internstandard var C19:0 og de relative responsfaktorene ble hentet fra Devle et al. (2009) sitt arbeid. Konsentrasjonen ble beregnet med Formel (1),

$$[\text{FAME}] = \frac{A(\text{FAME}) \cdot [\text{IS}]}{A(\text{IS}) \cdot \text{RRF}} \quad (1)$$

der [FAME] og [IS] er konsentrasjonen til henholdsvis den aktuelle FAME og internstandard, A (FAME) og A (IS) er arealet til henholdsvis den aktuelle FAME og internstandard. RRF er den relative responsfaktoren tilhørende de respektive FAMEene.

3.4 Analyse av fosfolipider i melk med HPLC-MS

3.4.1 Ekstraksjon av melk

Ekstraksjon av lipider fra melk ble gjennomført som beskrevet av Liu et al. (2015), med noen få endringer. For hver prøve ble det i et 5 mL eppendorfrør med 0,5 mL melk og 0,5 mL Milli-Q-vann tilsatt 4 mL CHCl₃:MeOH (2:1, v/v). Internstandarder ble tilsatt prøvene før de ble lagt horisontalt på ristebord for risting ved 450 RPM i 10 min, Tabell 3.5 viser mengdene tilsatt internstandard. Prøvene ble sentrifugert i 10 minutter ved 6000 RPM (3461 RCF) (EBA Hettich®). Den organiske fasen ble overført til glassrør, vannfasen ble overført til nye eppendorfrør og ekstrahert igjen med 2 mL CHCl₃:MeOH (2:1, v/v). De organiske fasene ble samlet og sentrifugert ved 1500 RPM (216 RCF) i 10 minutter. Lipidekstraktet ble overført til LC-rør, to rør for hver prøve. Pasteurpipette ble brukt til overføringen, og lipidekstraktet ble hentet fra bunnen av glassrøret. Begge LC-rørene ble oppbevart i fryser fram til analyse, kun ett ble brukt til analyse mens ett ble beholdt som reserve.

Tabell 3.5 Mengde tilsatt internstandard for hver klasse. Konsentrasjonen viser konsentrasjon i 0,5 mL melk.

Standard	Konsentrasjon [mg/mL]	Mengde
PC C18:0/C18:0	0,008	4,0 µL av 1,0 mg/mL
PE C12:0/C12:0	0,003	3,0 µL av 0,5 mg/mL
SM C18:1/C6:0	0,003	6,0 µL av 0,5 mg/mL
LPC C17:0	0,0006	6,0 µL av 0,05 mg/mL

3.4.2 Analyse av fosfolipider i melk ved LC-MS

Den benyttede LC-MS-metoden for separasjon og deteksjon av fosfolipider er basert på publikasjonen til Liu et al. (2015). Fosfolipidene ble separert på en Ascentis Express HILIC-kolonne, 150 mm lang, indre diameter 2,1 mm og partikkelstørrelse 2,7 μm . Temperaturen i autosampleren ble holdt på 10 °C, i kolonnerommet 30 °C. Mobilfasene A og B (se avsnitt 3.2.1 *Mobilfaser*) strømmet gjennom HPLC-systemet med en hastighet på 0,4 mL/min med en lineær økning fra 2-21% A i løpet av 40 min. Prøvene ble injisert etter 5 minutter kondisjonering, injeksjonsvolumet var 5,0 μL .

Prøven ble ionisert i en elektropray-kilde med kapillærtemperatur på 300 °C. Gjennomstrømningen av sheath, auxiliary og sweep gass ble holdt ved henholdsvis 40, 15 og 8 arbitrary units. Kildespenningen var 4,2 kV og tube lense-spenningen 30 V. Massespektrometeret ble brukt i positiv modus, og både scan-, SIM- og CID-metoder ble benyttet. I scanmodus var masseområdet m/z 100-1000, SIM-metodene inneholdt alle m/z -verdiene til fosfolipidenes protonerte molekylioner.

Melkeprøvene ble analysert med fire multi-SIM-metoder som til sammen inneholdt m/z til de ionene som ble rapportert av Liu et al. (2015) og m/z til internstandardenes protonerte molekylioner, MH^+ . Multi-SIM-metodene ble delt inn i tidssegmenter etter retensjonstidene til de ulike klassene, og for hvert tidssegment ble det lagt inn ti masser. Det ble brukt fire SIM-metoder fordi programvaren maksimalt tillot ti ioner i hvert tidssegment, og retensjonstiden til forbindelser både fra SM- og PC-klassen var så lik at de ikke kunne deles i ulike tidssegmenter. De totalt 30 forbindelsene fra SM- og PC-klassen sammen med de tilhørende internstandardene som eluerte i det samme tidssegmentet ble derfor fordelt på fire SIM-metoder. En oversikt over de fire multi-SIM-metodene vises i Tabell 3.6. Alle tidssegmentene ble fylt opp med 10 masser slik at massespektrometeret hadde lik tid til å se etter hvert ion.

Tabell 3.6 Ionene i de fire multi-SIM-metodene. Ionene uten navn (-) er fyllmasser for å oppnå 10 masser i hvert segment. m/z viser teoretisk verdi.

Tids-segment	Tid [min]	PL	Formel	Fettsyre	m/z	Ion	RT [min]			
2.1, 2.2, 2.3, 2.4	9-17	PE	C ₂₉ H ₅₈ NPO ₈	C12:0/C12:0	580,40	[M+H] ⁺	15,08			
			C ₃₇ H ₇₂ NPO ₈	C14:0/C18:1	690,51	[M+H] ⁺	14,29			
			C ₃₉ H ₇₄ NPO ₈	C16:0/C18:2	716,52	[M+H] ⁺	14,12			
			C ₃₉ H ₇₆ NPO ₈	C16:0/C18:1	718,54	[M+H] ⁺	14,10			
			C ₄₁ H ₇₄ NPO ₈	C16:0/C20:4	740,52	[M+H] ⁺	14,09			
			C ₄₁ H ₇₆ NPO ₈	C18:1/C18:2	742,54	[M+H] ⁺	13,90			
			C ₄₁ H ₇₈ NPO ₈	C18:1/C18:1	744,55	[M+H] ⁺	13,86			
			C ₄₁ H ₈₀ NPO ₈	C18:0/C18:1	746,57	[M+H] ⁺	13,91			
			-	-	692,30	-	-			
			-	-	750,00	-	-			
4.1	19-30	SM	C ₂₉ H ₅₉ N ₂ PO ₆	C18:1/C6:0	563,42	[M+H] ⁺	27,17			
			C ₃₇ H ₇₅ N ₂ PO ₆	C18:1/C14:0	675,54	[M+H] ⁺	25,27			
			C ₃₇ H ₇₇ N ₂ PO ₆	C16:0/C16:0	677,56	[M+H] ⁺	24,78			
			C ₃₈ H ₇₇ N ₂ PO ₆	C18:1/C15:0	689,56	[M+H] ⁺	25,12			
			C ₃₉ H ₇₉ N ₂ PO ₆	C18:1/C16:0	703,57	[M+H] ⁺	24,97			
			C ₃₉ H ₈₁ N ₂ PO ₆	C18:0/C16:0	705,59	[M+H] ⁺	24,63			
			C ₄₃ H ₈₇ N ₂ PO ₆	C18:1/C20:0	759,64	[M+H] ⁺	21,31			
			C ₄₃ H ₈₉ N ₂ PO ₆	C18:0/C20:0	761,65	[M+H] ⁺	21,26			
			C ₄₄ H ₈₉ N ₂ PO ₆	C18:1/C21:0	773,65	[M+H] ⁺	24,19			
			C ₄₄ H ₉₁ N ₂ PO ₆	C18:0/C21:0	775,67	[M+H] ⁺	21,21			
			4.2	19-30		C ₂₉ H ₅₉ N ₂ PO ₆	C18:1/C6:0	563,42	[M+H] ⁺	27,17
						C ₄₅ H ₈₉ N ₂ PO ₆	C16:1/C24:1	785,65	[M+H] ⁺	21,10
						C ₄₅ H ₉₁ N ₂ PO ₆	C18:1/C22:0	787,67	[M+H] ⁺	21,05
						C ₄₅ H ₉₃ N ₂ PO ₆	C18:0/C22:0	789,68	[M+H] ⁺	21,07
C ₄₆ H ₉₁ N ₂ PO ₆	C18:1/C23:1	799,67				[M+H] ⁺	22,16			
C ₄₆ H ₉₃ N ₂ PO ₆	C18:1/C23:0	801,68				[M+H] ⁺	23,98			
C ₄₆ H ₉₅ N ₂ PO ₆	C18:0/C23:0	803,70				[M+H] ⁺	20,97			
C ₄₇ H ₉₃ N ₂ PO ₆	C18:1/C24:1	813,68				[M+H] ⁺	21,15			
C ₄₇ H ₉₅ N ₂ PO ₆	C18:1/C24:0	815,70				[M+H] ⁺	23,88			
-	-	852,00				[M+H] ⁺	-			
4.3	19-25,5	PC	C ₄₄ H ₈₈ NPO ₈	C18:0/C18:0	790,63	[M+H] ⁺	21,16			
			C ₃₆ H ₇₂ NPO ₈	C14:0/C14:0	678,51	[M+H] ⁺	22,06			
			C ₃₈ H ₇₆ NPO ₈	C14:0/C16:0	706,54	[M+H] ⁺	21,78			
			C ₃₉ H ₇₈ NPO ₈	C16:0/C15:0	720,55	[M+H] ⁺	21,66			
			C ₄₀ H ₇₈ NPO ₈	C16:0/C16:1	732,55	[M+H] ⁺	21,48			
			C ₄₀ H ₈₀ NPO ₈	C16:0/C16:0	734,57	[M+H] ⁺	21,52			
			C ₄₂ H ₇₈ NPO ₈	C16:1/C18:2	756,55	[M+H] ⁺	21,54			
			C ₄₂ H ₈₀ NPO ₈	C16:0/C18:2	758,57	[M+H] ⁺	21,31			
			C ₄₂ H ₈₂ NPO ₈	C16:0/C18:1	760,59	[M+H] ⁺	21,27			
			C ₄₂ H ₈₄ NPO ₈	C16:0/C18:0	762,60	[M+H] ⁺	21,32			
			4.4	19-25,5		C ₄₄ H ₈₈ NPO ₈	C18:0/C18:0	790,63	[M+H] ⁺	21,16
						C ₄₄ H ₈₀ NPO ₈	C16:0/C20:4	782,57	[M+H] ⁺	21,31
C ₄₄ H ₈₂ NPO ₈	C18:1/C18:2	784,59				[M+H] ⁺	21,36			
C ₄₄ H ₈₄ NPO ₈	C18:1/C18:1	786,60				[M+H] ⁺	21,07			
C ₄₄ H ₈₆ NPO ₈	C18:0/C18:1	788,62				[M+H] ⁺	21,09			
-	-	734,50				[M+H] ⁺	-			
-	-	801,00				[M+H] ⁺	-			
-	-	803,00				[M+H] ⁺	-			
-	-	805,00	[M+H] ⁺	-						
-	-	807,00	[M+H] ⁺	-						

Fortsettelse Tabell 3.6 Ionene i de fire multi-SIM-metodene. Ionene uten navn (-) er fyllmasser for å oppnå 10 masser i hvert segment. m/z viser teoretisk verdi.

Tids-segment	Tid [min]	PL	Formel	Fettsyre	m/z	Ion	RT [min]
5.3,	25,5-29	LPC	C ₂₅ H ₅₂ NPO ₇	C17:0	510,36	[M+H] ⁺	26,92
5.4			C ₂₄ H ₅₀ NPO ₇	C16:0	496,34	[M+H] ⁺	27,18
			C ₂₆ H ₄₈ NPO ₇	C18:3	518,32	[M+H] ⁺	27,17
			C ₂₆ H ₅₀ NPO ₇	C18:2	520,34	[M+H] ⁺	27,07
			C ₂₆ H ₅₂ NPO ₇	C18:1	522,36	[M+H] ⁺	26,80
			C ₂₆ H ₅₄ NPO ₇	C18:0	524,37	[M+H] ⁺	26,65
			-	-	530,00	[M+H] ⁺	-
			-	-	532,00	[M+H] ⁺	-
			-	-	534,00	[M+H] ⁺	-
			-	-	536,00	[M+H] ⁺	-

3.4.2.1 Identifikasjon og kvantifisering

Fosfolipidene ble identifisert ved sammenligning av retensjonstid mellom ukjent forbindelse og standard og ved MS/MS (CID). Det ble kun brukt én standard for hver klasse av ressursmessige årsaker. Ved CID-analyse ble det brukt ulik spenning for å oppnå fragmentering av de forskjellige forbindelsene. Til CID-analysene ble det brukt en melkeprøve til de mest forekommende forbindelsene, og en konsentrert melkeprøve til de mindre forekommende forbindelsene. Denne ble opparbeidet som beskrevet i avsnitt 3.4.1, men det totale lipidekstraktet ble dampet ned før det ble reløst i 1,0 mL Folchs løsningsmiddel. For hver forbindelse ble det gjennomført CID-analyse, det ble også gjennomført CID-analyser av de rene standardene. Fragmenteringene som fremkom av CID-spekteret til en forbindelse ble sammenlignet med fragmenteringene til standarden fra samme klasse, molekylstrukturen ble også brukt for å forklare fragmenteringene.

Ved kvantifisering ble Xcalibur™ Software benyttet til å integrere toppene til forbindelsene. Disse arealene ble importert til Excel og konsentrasjoner beregnet med formel (2),

$$[\text{PL}] = \frac{A(\text{PL}) \cdot [\text{IS}]}{A(\text{IS})} \quad (2)$$

der [PL] og [IS] er konsentrasjonen til henholdsvis det aktuelle fosfolipidet og internstandard og A (PL) og A (IS) er arealet til henholdsvis det aktuelle fosfolipidet og internstandard.

For å sikkert kunne bestemme at de forbindelsene som ble beregnet til å være under LOQ eller LOD faktisk var til stede, og hvor høy forekomsten var innen klassen, ble den oppkonsentrerte prøven reløst i 1,0 mL Folchs løsningsmiddel også analysert med multi-SIM-metodene.

3.4.3 Validering av metoden

Den etablerte metoden ble validert for vise hvor godt den er egnet. De følgende parameterne ble benyttet for å evaluere metoden; deteksjonsgrense (LOD), kvantifikasjonsgrense (LOQ), lineært område, matrikseffekt, carry-over, metodepresisjon og -nøyaktighet og inter-dag-variasjoner.

3.4.3.1 LOD, LOQ og lineært område

Til arbeidet med LOD, LOQ og lineært område ble det brukt fire standarder som representerte klassene PE, PC, LPC og SM.¹ Verdiene for LOD og LOQ ble besluttet å tilsvare den laveste konsentrasjonen som gir et signal/støy-forhold lik henholdsvis 10 og 30, og ble bestemt ved å analysere ulike konsentrasjoner av standardene. De ulike konsentrasjonene ble laget som fortyninger av stamløsninger.

Verdiene for signal/støy-forholdene ble satt til 10 og 30, og ikke 3 og 10 som er det normale, fordi topper med $S/N = 3$ ikke var tydeligere enn toppene fra støy. Det ville derfor ikke vært mulig å bestemme ved hvilke konsentrasjon den aktuelle standarden hadde $S/N = 3$. For LOQ ble S/N -verdien satt til 3 ganger større enn 10, tilnærmet det samme forholdet som mellom 3 og 10.

Det lineære området ble funnet ved å lage fortyninger av standardene fra LOQ og opp til en verdi som omtrent tilsvare det dobbelte av konsentrasjonen til den mest forekommende forbindelsen i klassen, se Tabell 3.7.

Tabell 3.7 Konsentrasjoner brukt for å bekrefte det lineære området.

PL	Konsentrasjon 1 [µg/mL]	Konsentrasjon 2 [µg/mL]	Konsentrasjon 3 [µg/mL]	Konsentrasjon 4 [µg/mL]
PC	0,4	5	50	100
PE	0,1	1	10	-
SM	0,9	7	50	80
LPC	0,7	1	5	-

¹ PE C12:0/C12:0, PC C18:0/C18:0, SM C18:1/C6:0, LPC C17:0

3.4.3.2 Matrikseffekt, carry-over, metodepresisjon og -nøyaktighet og interdag-variasjoner

Ni melkeprøver ble opparbeidet som beskrevet i avsnittet 3.4.1 *Ekstraksjon av melk*, men internstandard ble ikke tilsatt og 1,0 mL av lipidekstraktet ble overført til LC-rør med Hamilton-sprøyte. Til hvert LC-rør ble det tilsatt standard slik at tre melkeprøver inneholdt lav konsentrasjon av standarder (0,5 µg/mL), tre inneholdt middels konsentrasjon av standarder (50 µg/mL) og tre inneholdt høy konsentrasjon av standarder (100 µg/mL). Standardene tilsatt var PE C12:0/C12:0, SM C18:1/C6:0, LPC C17:0 og PC C18:0/C18:0. Alle prøvene ble dampet inn med N₂-gass før de ble reløst i 1,0 mL CHCl₃:MeOH (2:1, v/v).

Tre LC-rør ble tilsatt 1,0 mL CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) og samme mengde av standardene som melkeprøvene (0,5, 50 og 100 µg/mL). Disse ble også dampet inn med N₂-gass og reløst i 1,0 mL CHCl₃:MeOH (2:1, v/v).

Alle de tolv prøvene ble analysert med LC-MS som beskrevet i avsnittet 3.4.2 *Analyse av fosfolipider i melk*, men en forenklet variant av multi-SIM-metoden ble benyttet. Denne inneholdt massene til standardene som ble benyttet. Melkeprøvene ble injisert og analysert en gang hver. Prøvene med standard i løsemiddel ble injisert og analysert fem ganger for hver konsentrasjon for å kunne bestemme presisjon og nøyaktighet. Presisjon gir et mål på hvor like målingene er, nøyaktighet viser hvor godt målingene stemmer med en kjent verdi. Etter siste injeksjon av den høyeste konsentrasjonen ble CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) injisert og analysert to ganger for å kunne undersøke carry-over. Sammenligning mellom arealene til melkeprøver og løsningsmiddel med standarder ble brukt til å finne matrikseffekt.

Etter tolv dager ble ni melkeprøver og tre prøver med standard i løsningsmiddel opparbeidet på samme måte og analysert med LC-MS for å kunne bestemme interdag-variasjon.

3.5 Påvirkning av dannelse av pseudomolekylære ioner

I det innledende arbeidet ble det observert at fosfolipidene forelå både som MH⁺ og MNa⁺. Det ble derfor forsøkt på to ulike måter å påvirke dannelsen av MNa⁺ for å oppnå høyere intensitet.

3.5.1 *Endring av kapillærspenning*

Kapillærspenningen ble variert fra 10-50 V i 10 V intervaller, dette for å undersøke om dannelsen av MNa⁺ foregår inne i massespektrometeret. Standardene PC C18:0/C18:0, PC C16:0/C16:0, PE C12:0/C12:0 og PE C16:0/C16:0 med konsentrasjon 0,2 mg/mL ble analysert

i scanmodus. For sammenligning av intensitet av MH^+ og MNa^+ ble summen av MS-spektrene ved kromatogramtoppens halve høyde benyttet.

3.5.2 *NaCl i mobilfase A*

I 250 mL av bufferen (mobilfase A) ble tilsatt 100 μ L 1 M NaCl-løsning, dette for å undersøke om dannelsen av MNa^+ foregår i HPLC-kolonnen. Standardene PE C16:0/C16:0 og PC C16:0/C16:0 ble fortynnet til 0,2 mg/mL og analysert i scanmodus.

4 RESULTATER OG DISKUSJON

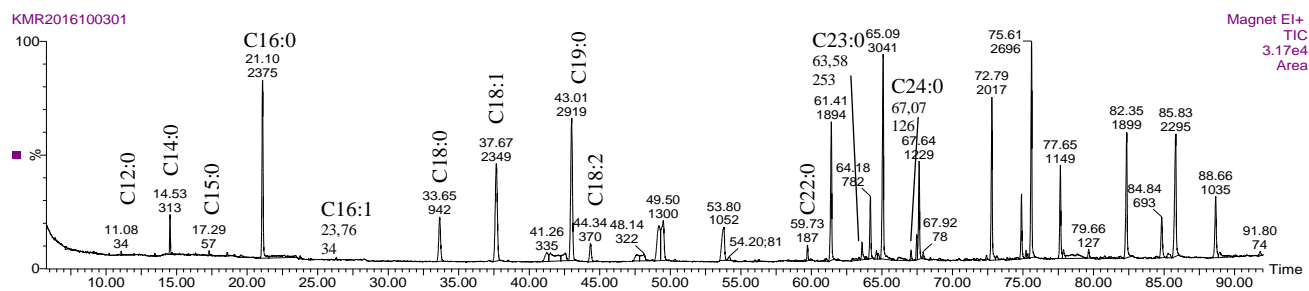
4.1 Fettsyreprofil til polare lipider i melk med GC-MS

Til å identifisere fettsyrene som finnes i de polare lipidene til melk ble GC-MS brukt. Fettsyrene ble identifisert som FAMEer, og det er forventet at de samme fettsyrene vil finnes i fosfolipidene identifisert i LC-MS-analysen. Fettsyreprofilen vil dermed bidra til identifisering av fosfolipider med LC-MS.

Fettsyreprofilen til de polare lipidene i melken benyttet i denne oppgaven, bestemt med GC-MS, viste at C16:0, C18:1 og C18:0 og C18:2 finnes størst konsentrasjon. De mettede fettsyrene utgjør 61,2%, enumettede 32,2% og flerumettede 5,9%, se Tabell 4.1. Kromatogrammet fra analysen vises i Figur 4.1, en større utgave av kromatogrammet er i vedlegg A.

Tabell 4.1 Fettsyreprofil til fosfolipider i melk, n = 1. Det første tallet i kolonnen «FAME» viser antall C i fettsyren, det andre antall dobbeltbindinger.

Retensjonstid [min]	FAME	Konsentrasjon [$\mu\text{g/mL}$]
11,08	C12:0	12,4
14,53	C14:0	106
17,29	C15:0	16,1
21,10	C16:0	744
23,76	C16:1n-7 cis	9,84
33,65	C18:0	270
37,67	C18:1n-9 cis	696
44,34	C18:2n-6 trans	126
59,73	C22:0	54,2
63,58	C23:0	74,1
67,07	C24:0	36,2



Figur 4.1 Kromatogram fra fettsyreanalyse, fosfolipider i melk

Alle FAME identifisert ble også rapportert i publikasjonen av Devle et al. (2014), som i tillegg også identifiserte C10:0 og C17:0. Det ble både av Devle et al. (2014) og i denne oppgaven benyttet melk fra samme leverandør. At de to nevnte FAME ikke ble identifisert i arbeidet med denne oppgaven kan skyldes variasjoner i melken, selv om samme leverandør ble benyttet. Detaljer i fettsyreprofilen i melk endres gjennom laktasjonsperioden (Bitman & Wood 1990), fôrsammensetning har også betydning (Liu et al. 2015). Russo et al. (2013) rapporterte i sin publikasjon om 47 FAMEer fra polare lipider i rå melk, og 42 FAMEer fra polare lipider i pasteurisert melk. Det opplyses ikke om hvorvidt melken er homogenisert. Fra den pasteuriserte melken ble 19 av FAMEene ikke identifisert i arbeidet med denne oppgaven, og inkluderer spesielt medium lange fettsyrer, og en- og flerumettede fettsyrer med karbonkjede på 20-22. Innholdet av den sistnevnte gruppen er svært lavt (0,03-0,22%), dette kombinert med større melkeprøve kan være årsaken til at disse fettsyrene ikke ble identifisert i dette arbeidet. Fettsyrene med størst utbredelse i publikasjonen til Russo et al. (2013) er C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1. Dette stemmer godt med resultatene fra dette arbeidet, men større mengder C18:2 ble identifisert i arbeidet med denne oppgaven enn i Russo et al. (2013) sin publikasjon.

Forsøket ble kun gjennomført en gang, for større sikkerhet for de kvantitative resultatene, burde minst tre gjentakelser av forsøket blitt gjennomført. Fettsyrene som ble identifisert er for det meste lange fettsyrer, dette kan forklares med fosfolipidenes amfifile funksjon. De lange fettsyrene blir den upolare motsatsen til de polare hodegruppene, fettsyrelengden er dermed som forventet.

4.2 Etablering av metode for analyse av fosfolipider i melk med LC-MS og LC-MS/MS

4.2.1 Sikker identifikasjon

Høyt oppløsende MS er med på å sikre identifisering av analytt. Det massespektrometeret som ble benyttet i eksperimentene i arbeidet med denne oppgaven er lavtoppløsende og derfor brukes kollisjonsindusert dekomponering for å sikre identifisering utover å bruke molekylmassen til de protonerte molekylionene. Det er ønskelig at både foreldreionet og en tilstrekkelig mengde med produksjoner er tilstede i kollisjonsspektra.

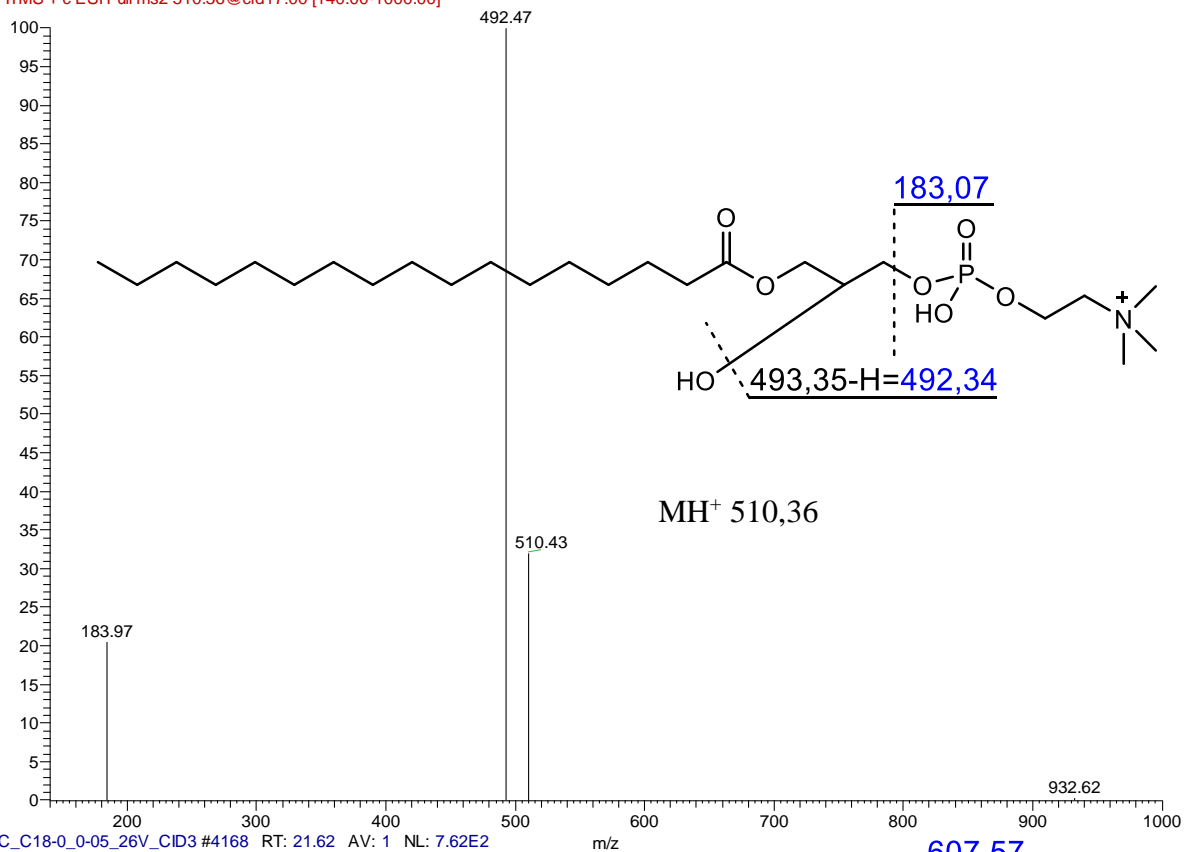
Analysene med CID av standardene gav spektrene som vises i Figur 4.2 og Figur 4.3, bruddene som vises i strukturformlene forklarer fragmentene i CID-spektrene. Fra spektrene kan det trekkes ut informasjon om typiske fragmenter for de ulike klassene. For LPC er tap av H₂O og

Resultater og diskusjon

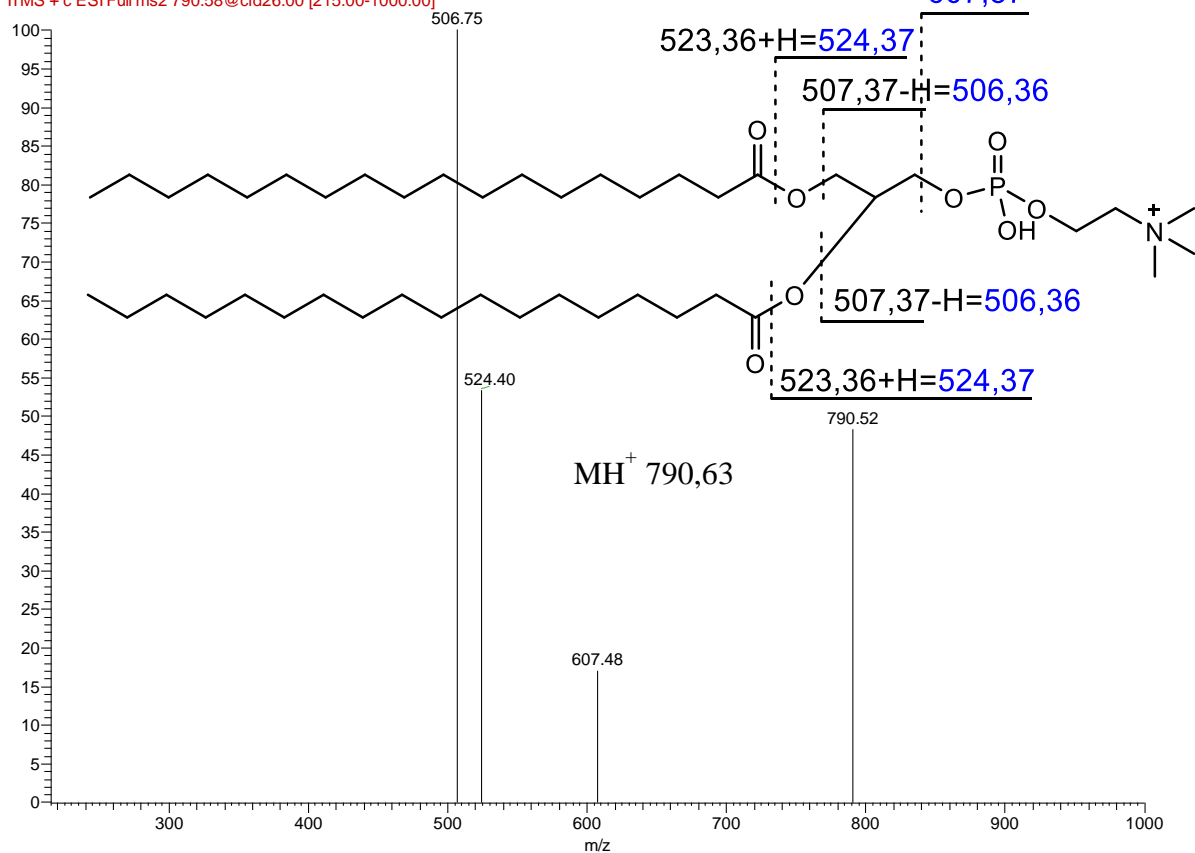
bindingsbrudd som gir m/z 183 typisk, og for PC er tap av m/z 183 og brudd som gir tap av fettsyrene, enten hele fettsyren eller ved siden av karbonylkarbonet, typisk. For PE er tap av H_2O , m/z 141 og fettsyrene typisk, og for SM er tap av H_2O og brudd som gir m/z 183 typisk. Fragmenteringene for alle de fire klassene (ikke tap av H_2O) stemmer overens med publikasjonen til Walczak et al. (2016), og Pulfer og Murphy (2003) beskriver fragmenteringen av PC, SM og PE.

Strukturformler som forklarer fragmentene i tilhørende CID-spekter for ett fosfolipid fra hver klasse vises i Figur 4.4 og Figur 4.5. Fragmenteringspektra for de øvrige fosfolipidene vises i vedlegg D.

LPC_C17-0_0-05_17V_CID #5347 RT: 27.01 AV: 1 NL: 2.35E5
 F: ITMS + c ESI Full ms2 510.36@cid17.00 [140.00-1000.00]



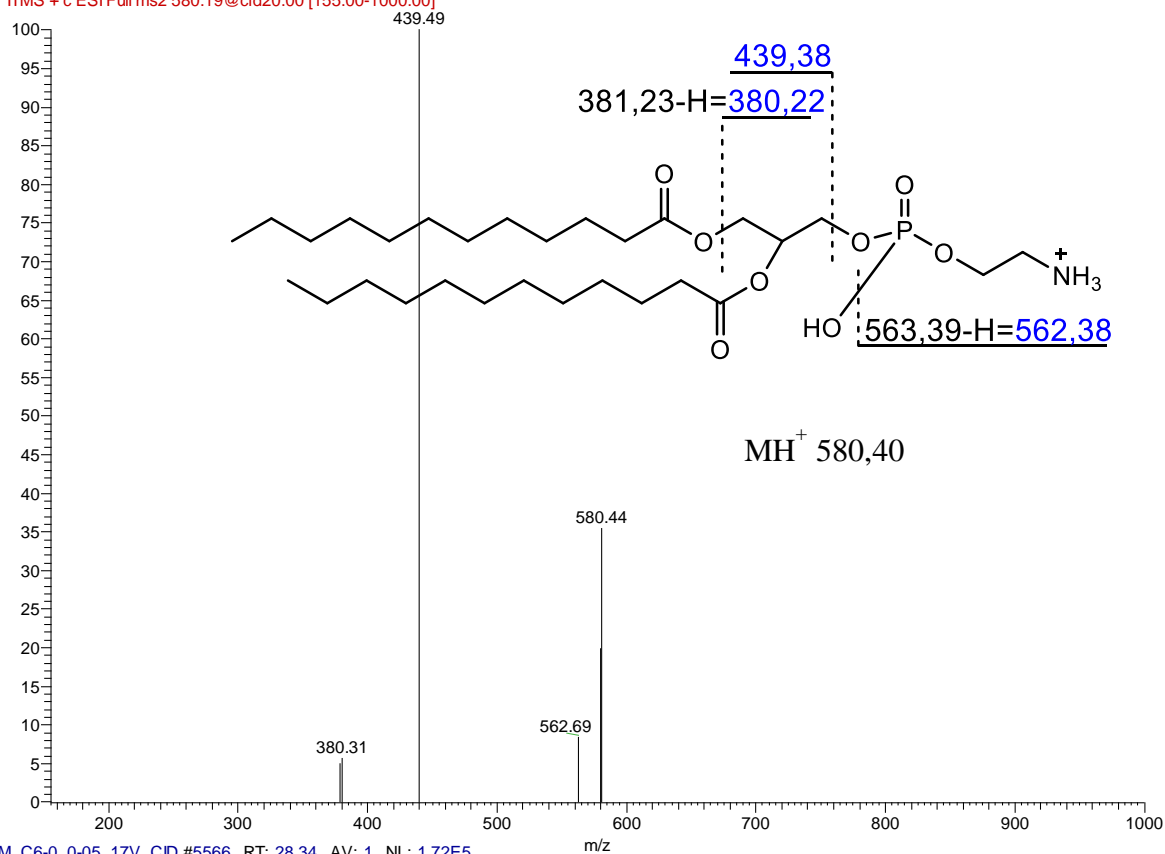
PC_C18-0_0-05_26V_CID3 #4168 RT: 21.62 AV: 1 NL: 7.62E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 790.58@cid26.00 [215.00-1000.00]



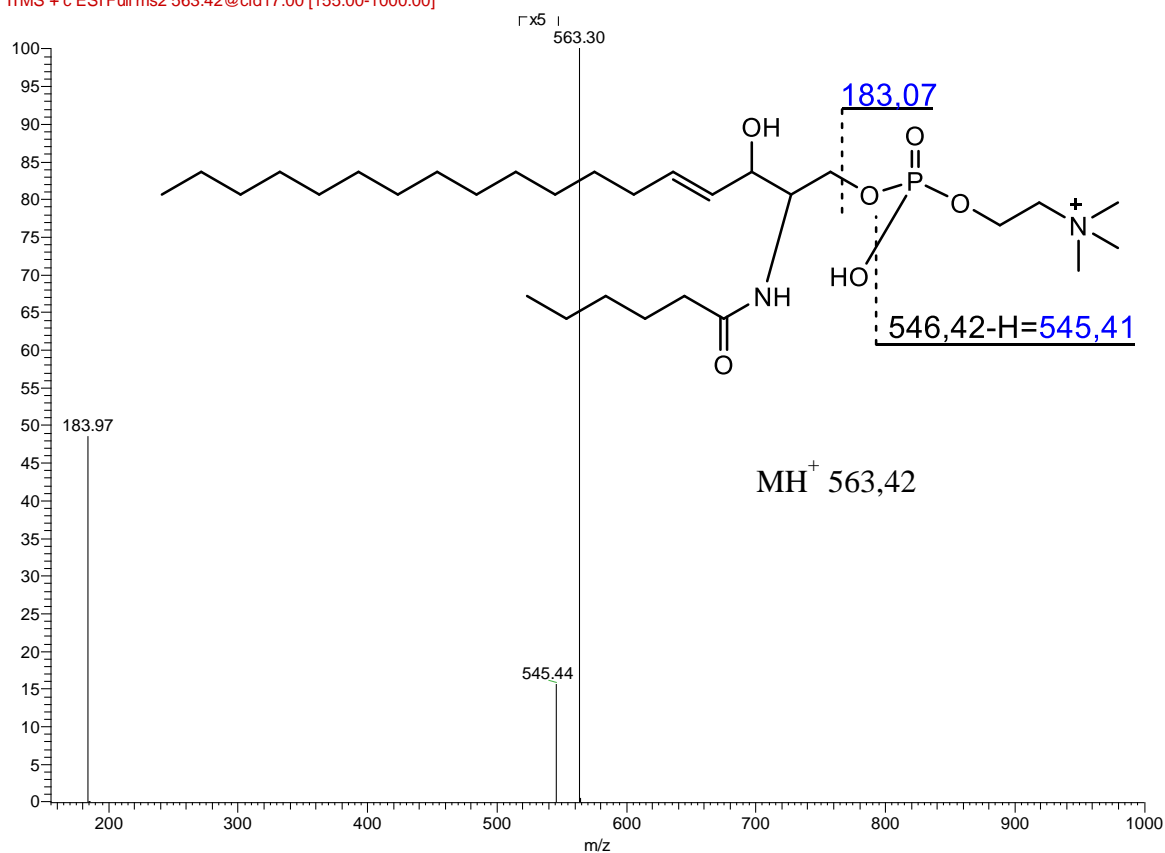
Figur 4.2 CID-spekter og struktur for standardene LPC C17:0 (øverst) og PC C18:0/C18:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Resultater og diskusjon

PE_C12-0_0-05_1_CID #3102 RT: 15.89 AV: 1 NL: 6.94E1
F: ITMS + c ESI Full ms2 580.19@cid20.00 [155.00-1000.00]

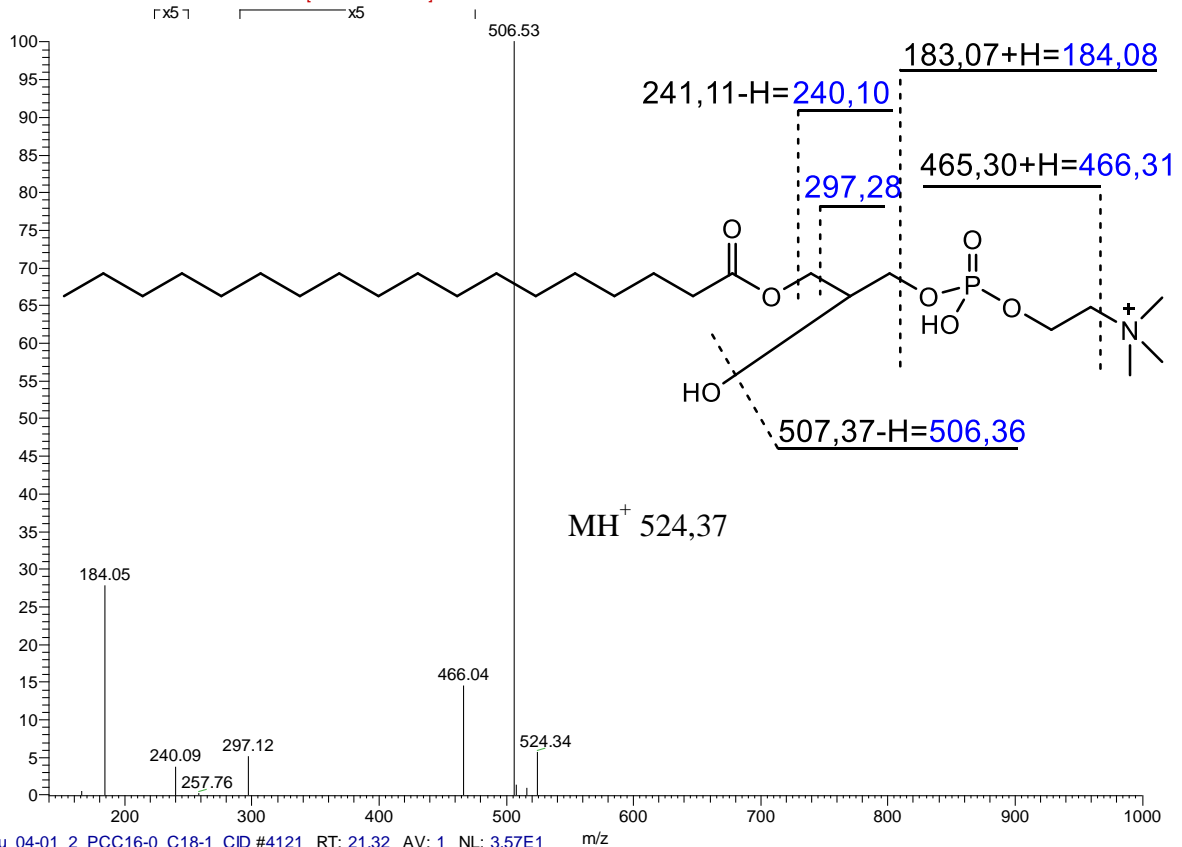


SM_C6-0_0-05_17V_CID #5566 RT: 28.34 AV: 1 NL: 1.72E5
F: ITMS + c ESI Full ms2 563.42@cid17.00 [155.00-1000.00]

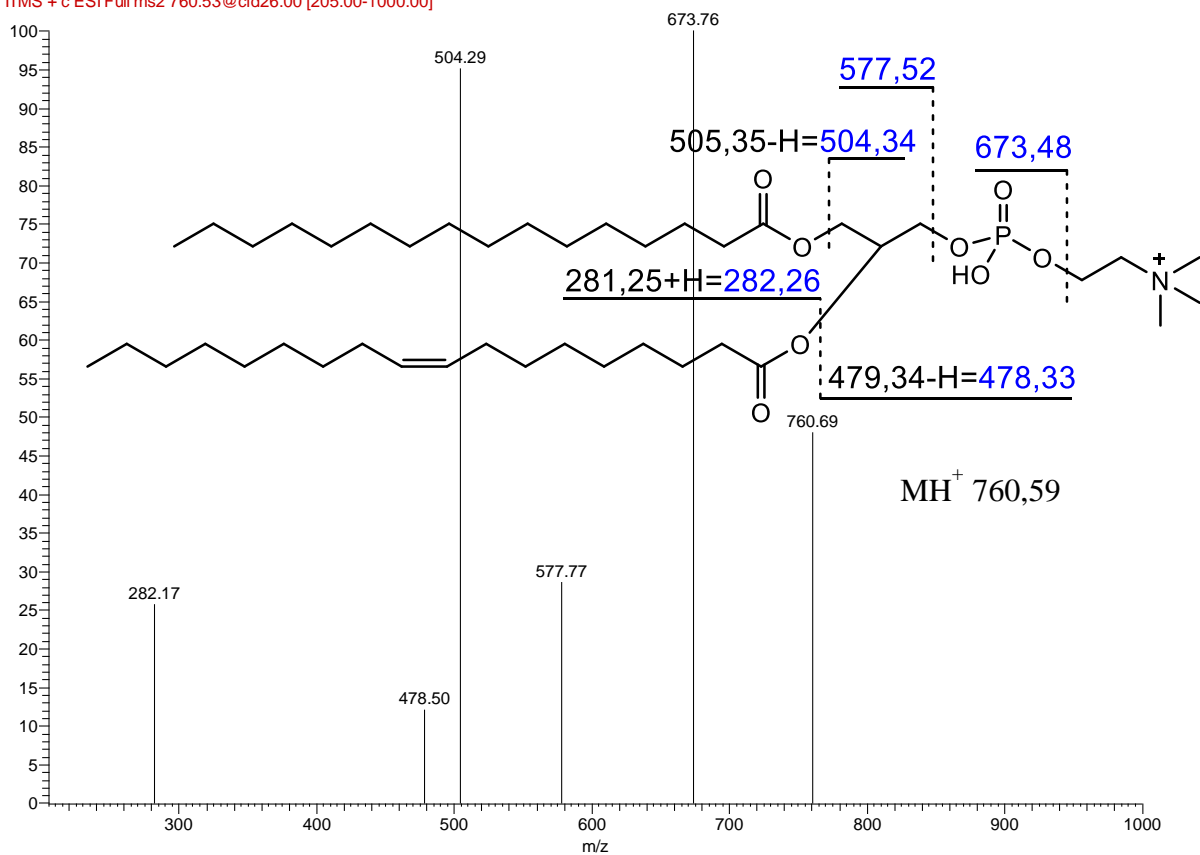


Figur 4.3 CID-spekter og struktur for standardene PE C12:0/C12:0 (øverst) og SM C6:0/C18:1 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Liu_07-02_1_LPCC18-0_17CID #5295 RT: 26.64 AV: 1 NL: 9.18E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 524.37@cid17.00 [140.00-1000.00]



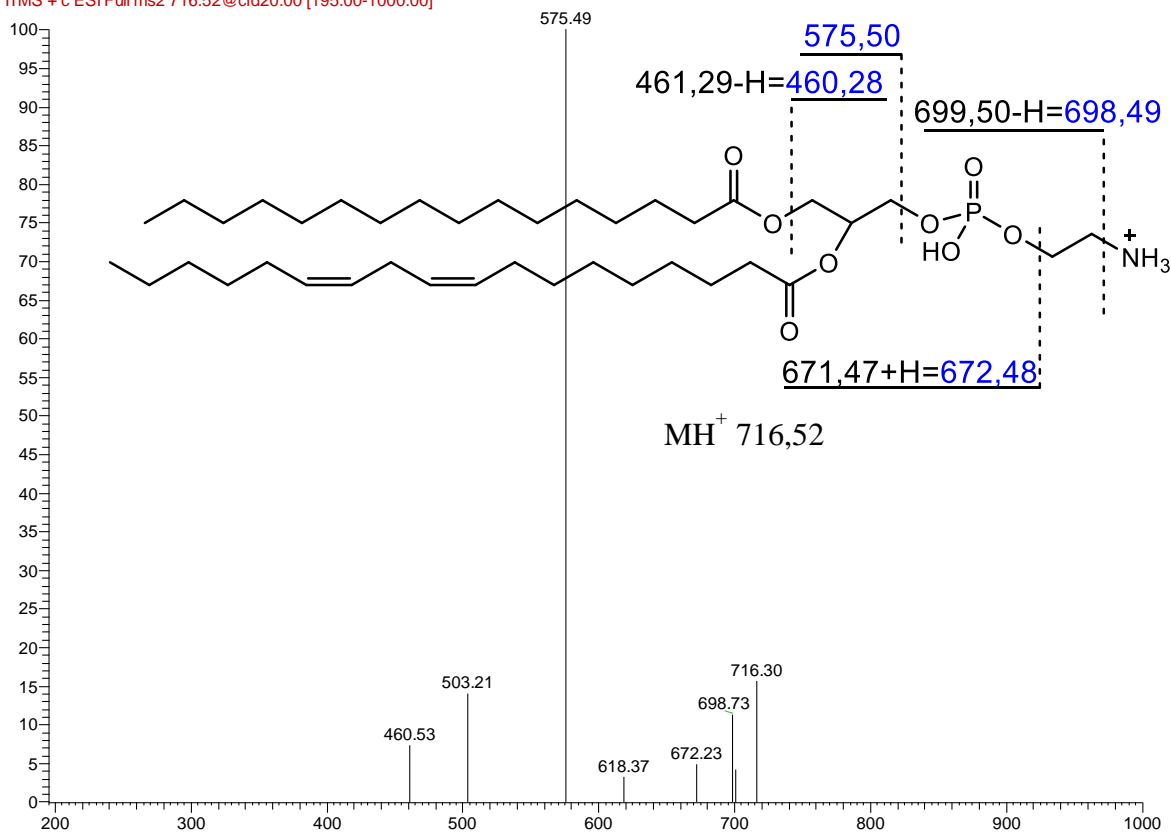
Liu_04-01_2_PCC16-0_C18-1_CID #4121 RT: 21.32 AV: 1 NL: 3.57E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 760.53@cid26.00 [205.00-1000.00]



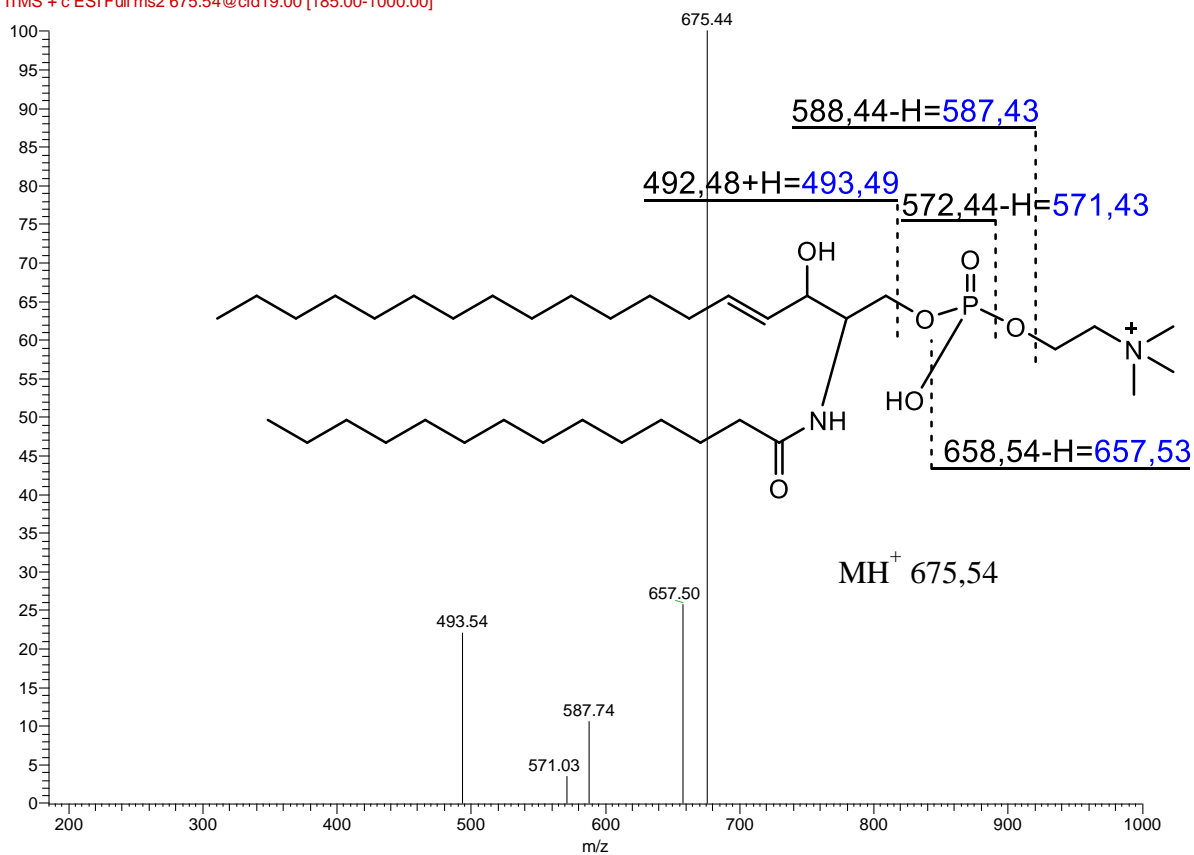
Figur 4.4 CID-spekter og struktur for LPC C18:0 (øverst) og PC C16:0/C18:1 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Resultater og diskusjon

Liu_07-02_1_PEC16-0_C18-2_20CID #2772 RT: 14.19 AV: 1 NL: 1.16E2
F: ITMS + c ESI Full ms2 716.52@cid20.00 [195.00-1000.00]



Liu_07-02_1_SMC18-1_C14-0_19CID_170331102634 #5216 RT: 26.49 AV: 1¹/NL: 9.37E1
F: ITMS + c ESI Full ms2 675.54@cid19.00 [185.00-1000.00]



Figur 4.5 CID-spekter og struktur for PE C16:0/C18:2 (øverst) og SM C18:1/C14:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Alle CID-spektrene som er oppgitt i oppgaven, med sine m/z for fragmenteringer og protonerte molekylioner, bekrefter de antatte strukturene og alle fosfolipidene er dermed sikkert identifisert. Det var nødvendig å benytte noe ulike kollisjonsspenningspenninger for å oppnå tilstrekkelig fragmentering av forbindelsene samtidig som m/z -verdien til MH^+ var synlig i spekteret. For fosfolipider innen samme klasse var variasjonen 0-4 V (med unntak av PC-standard), og mellom de ulike klassene var variasjonen 0-6 V. Variasjonen anses som så liten at den ikke tas hensyn til.

Walczak et al. (2016) benyttet post-source decay fragmentering (PSD) som bidrag til å identifisere fosfolipider detektert med MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization). Fragmenteringene i deres spektre stemmer overens med de fragmenteringer som er fått i de ulike klassene i denne oppgaven, hvilket styrker identifikasjonen.

4.2.2 Validering av metoden

Valideringen av metoden gav informasjon om hvor godt egnet den er til analyse av fosfolipider i melk. Analysen av melk som ble gjennomført benyttes for å bedømme hvilken betydning resultatene av valideringen har for melkeprøver, resultater fra analyse av fosfolipider i melk følger i avsnitt 4.3.

Det lineære området, LOD og LOQ ble bestemt som beskrevet i avsnitt 3.4.3 *Validering av metoden*, resultatene er presentert i Tabell 4.2. Den øvre grensen til det lineære området ble ikke undersøkt, det vites derfor ikke om det er linearitet for høyere konsentrasjoner enn de oppgitte.

Tabell 4.2 LOD, LOQ, lineært område. R^2 -verdien gir et mål på graden av linearitet i det lineære området. $n = 3$

PL	Kvantifiseringsion	LOD [$\mu\text{g/mL}$]	LOQ [$\mu\text{g/mL}$]	Lineært område [$\mu\text{g/mL}$]	R^2
PC	MH^+	0,2	0,4	0,4-100	0,9870
PE	MH^+	0,05	0,1	0,1-10	0,9979
SM	MH^+	0,5	0,9	0,9-80	0,9999
LPC	MH^+	0,5	0,7	0,7-5	0,9989

Deteksjonsgrensen for PE er en tidel av deteksjonsgrensene for SM og LPC, og en fjerdedel av deteksjonsgrensen for PC. Den lave deteksjonsgrensen kan skyldes at PE i større grad blir

Resultater og diskusjon

ionisert enn de tre andre klassene og at de pseudomolekylære ionene hovedsakelig foreligger på én form, protonerte molekyllioner. For en gitt konsentrasjon vil S/N-verdien da bli høyere for PE enn andre fosfolipider, og det vil være mulig å detektere lavere konsentrasjoner. Med R^2 mellom 0,9870 og 0,9999 er det høy grad av linearitet i det lineære området til alle de fire klassene, men PC skiller seg ut med den laveste R^2 -verdien. Siden det mest forekommende fosfolipidet tilhører PC, ble et større område undersøkt for linearitet for denne klassen enn de andre klassene. Dette kan være årsaken til lavere R^2 -verdi, og dersom det samme datagrunnlaget brukes til å beregne R^2 for et mindre område (5-100), forbedres R^2 til 0,9988.

Det var kun PC og LPC som viste så stor grad av carry-over at toppene lot seg identifisere i kromatogrammene, resultatene vises i Tabell 4.3.

Tabell 4.3 Carry-over ved injeksjon av Folchs løsningsmiddel etter injeksjon av standard i løsningsmiddel, 100 $\mu\text{g/mL}$, $n = 1$.

Standard	Injeksjon nr.	Konsentrasjon [$\mu\text{g/mL}$]	% carry-over
PE C12:0/C12:0	1	-	0
	2	-	0
PC C18:0/C18:0	1	0,27	0,27
	2	0,14	0,14
LPC C17:0	1	0,043	0,043
	2	0,0099	0,0099
SM C18:1/C6:0	1	-	0
	2	-	0

Verdiene for carry-over er svært lave, og det er kun for PC ved første injeksjon verdien er over deteksjonsgrensen. Ingen av verdiene er dermed egentlig kvantifiserbare, og egentlig er det kun PC ved første injeksjon som kan detekteres. Prøven injisert før injeksjon av løsemiddel, hadde konsentrasjon 100 $\mu\text{g/mL}$. Dette er nesten det dobbelte av konsentrasjonen til den mest forekommende forbindelsen analysene gjennomført i denne oppgaven viser (avsnitt 4.3). Det regnes derfor med at det etter melkeprøver er enda lavere carry-over-verdier.

Fra sammenligning av arealene til melkeprøver og løsningsmiddel med standarder ble det beregnet matrikseffekt for de tre konsentrasjonene av tilsatt standard, Tabell 4.4. Resultatene er basert på gjennomsnittsverdien av de tre melkeprøvene for hver konsentrasjon og gjennomsnittsverdien til de fem injeksjonene av hver konsentrasjon av standard i løsemiddel.

Tabell 4.4 Matrikseffekt, ved avvik fra 100% påvirker prøvematriksen beregningen av konsentrasjon av analytt. n = 3 og 5, tre melkeprøver og fem injeksjoner av standard i løsemiddel.

	Matrikseffekt [%]		
	0,5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
PE	170	123	80,6
PC	136	119	82,5
LPC	127	109	93,8
SM	120	110	86,3

Matrikseffekten beskriver hvor stor betydning prøvematriksen har for beregningen av konsentrasjon av analytt, 100% forteller at matriks ikke har noe effekt. I denne metoden overestimeres analyttinnholdet i en prøve ved lav konsentrasjon, og ved høy konsentrasjon underestimeres analyttinnholdet. Fosfolipidene i melkeprøvene analysert i denne oppgaven har konsentrasjon mellom 0,24 og 57 µg/mL, og konsentrasjonsmedianen er 3,8 µg/mL (se avsnitt 4.3). For å ikke feilestimere konsentrasjonen av fosfolipider på grunn av matrikseffekten, bør prøvenes konsentrasjon økes til en analyttkonsentrasjon tilsvarende noe over 50 µg/mL. De store konsentrasjonsforskjellene mellom de ulike analyttene vil gjøre det nødvendig å analysere to ulike konsentrasjoner av hver prøve (en fortykning av opprinnelig prøve), eller bruke faktoren for matrikseffekt til korreksjon av konsentrasjon.

Liu et al. (2015) undersøkte matrikseffekt ved hjelp av en litt annen metode, men kom frem til verdier mellom 105 og 119% for de samme fosfolipidklassene. Deres konklusjon var at matrikseffekten ikke var signifikant for de fosfolipidene med matrikseffekt mellom 105 og 111%, mens for LPC (119%) gav matriksen en liten forhøyelse i antall observerte ioner. Denne konklusjonen støtter bemerkningene over, og endringer må gjøres for å oppnå troverdige resultater.

Variasjonen i arealene til toppene til hver standard ble brukt til å beregne presisjonen til metoden, resultatene er presentert i Tabell 4.5. Hver av de tre konsentrasjonene til standardene ble injisert fem ganger, og det relative standardavviket uttrykt i prosent (% RSD) ble beregnet etter formel (3). En % RSD-verdi nær 0 viser liten variasjon i toppareal.

Resultater og diskusjon

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3)$$

der SD er standardavviket beregnet ved hjelp av formel (4) og \bar{x} er gjennomsnittet beregnet etter formel (5).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (4)$$

der prøve x_i er målt N ganger.

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (5)$$

Tabell 4.5 Presisjon av topparealet til standard i løsemiddel, $n = 5$.

	Variasjon toppareal [% RSD]		
	0,5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
PE	1,6	6,2	2,6
PC	1,8	6,3	2,7
LPC	2,3	3,1	2,6
SM	5,1	4,2	1,7

Resultatene for presisjon er tilfredsstillende, og viser RSD under 6,5%. Det kan dermed antas at det ikke forekommer variasjon i topparealene på grunn av instrumentet underveis i en analyseserie.

Til beregning av nøyaktighet ble arealene fra de fem injeksjonsreplikatenes av hver standard brukt. Det ble laget standardkurver til hver av standardene basert på gjennomsnittsverdiene til arealene for hver konsentrasjon og den kjente konsentrasjonsverdien, kurven ble tvunget gjennom origo. Standardkurvens likning ble brukt til å beregne konsentrasjon, og beregnet og kjent verdi ble sammenlignet, se Tabell 4.6. Graden av standardkurvenes linearitet, presentert som R^2 -verdier, var for PE 0,9664, PC 0,9810, LPC 0,9964 og SM 0,9987.

Tabell 4.6 Nøyaktighet, % forskjell mellom beregnet og kjent konsentrasjon. Avvik fra 100 betyr at nøyaktigheten ikke er optimal. n = 5.

	Nøyaktighet [%]		
	0,5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
PE	28	80	107
PC	-291	85	105
SM	120	101	100
LPC	127	94	102

De lite gode verdiene for 0,5 µg/mL-prøven skyldes at kurven ble tvunget gjennom origo. Ved å gjøre dette, ble færre beregnede analyttinnhold negative, men beregningen av konsentrasjonen til 0,5 µg/mL-prøven ble påvirket i stor grad. For å hindre dette, bør standardkurven lages for et større konsentrasjonsområde. Resultatene som vises i Tabell 4.6 viser også at konsentrasjonen av melkeprøver bør økes, ved høyere konsentrasjon er nøyaktigheten bedre. Det er ikke sikkert dette gjelder dersom det brukes en standardkurve for et større konsentrasjonsområde.

Liu et al. (2015) undersøkte nøyaktigheten til deres metode, og fikk verdier mellom 92 og 102% for de samme fosfolipidklassene. Det kommer ikke tydelig fram av publikasjonen hvordan beregningen av konsentrasjonen for å sammenligne med den virkelige verdien er utført, men selv ved 0,1 µg/mL er nøyaktigheten svært god. Dette viser at det bør være mulig å bedre nøyaktigheten for metoden utviklet i denne oppgaven, men oppsettet for forsøket bør endres som beskrevet over.

Til beregning av interdag-variasjon ble arealene fra analysene utført med tolv dagers mellomrom sammenlignet, se Tabell 4.7. Arealene ble ikke sammenlignet direkte, men ved å sammenligne forhold mellom faste klasser, for eksempel ble $\frac{PE_{\text{dag 1}}}{PC_{\text{dag 1}}}$ sammenlignet med $\frac{PE_{\text{dag 2}}}{PC_{\text{dag 2}}}$.

Tabell 4.7 Interdag-variasjon, sammenligning av toppareal for prøver opparbeidet og analysert med 12 dagers mellomrom. n = 3 for melk og n = 5 for løsemiddel.

		Variasjon toppareal [% RSD]		
		0,5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
PE	Melk	21	5,4	4,8
	Løsemiddel	12	6,2	7,9
PC	Melk	17	5,3	4,8
	Løsemiddel	12	6,5	8,0
SM	Melk	5,7	2,3	0,095
	Løsemiddel	4,5	5,6	8,0
LPC	Melk	6,2	1,4	6,2
	Løsemiddel	5,1	4,0	11

Interdag-variasjonen er for det meste størst for prøven med lavest konsentrasjon, særlig for melkeprøven. For de to høyeste konsentrasjonene er RSD under 6,5% for melkeprøvene, og under 11% for standard i løsemiddel. Dette er tilfredsstillende lav variasjon, men også dette valideringspunktet viser at høyere konsentrasjon av melkeprøve er å foretrekke.

4.2.3 Påvirkning av dannelse av pseudomolekylære ioner

Dannelsen av ioner er viktig for metodens følsomhet og robusthet, dersom alle molekyllionene kan påvirkes til å foreligge på én pseudomolekylær form vil LOD senkes. Påvirkning av dannelsen av ionene kan skje før eller i massespektrometeret. Hvilket pseudomolekylært ion som dannes vil avhenge av matriksen analyttene befinner seg i. Dersom en protondonor er tilstede (f.eks. vann) kan MH^+ dannes og dersom ioner som Na^+ , Ag^+ og K^+ er tilstede kan addukter dannes. Kapillærspenningen i elektrosprøyen kan påvirke den kinetiske energien til ionene og dermed påvirke om MH^+ eller et annet addukt dannes.

4.2.3.1 Endring av kapillærspenning

Analysene med varierende kapillærspenning har lite variasjon og ingen trender som viser økning av $[MNa^+]$ ved økende spenning, se kolonnen $I[H^+]:I[Na^+]$ i Tabell 4.8.

Tabell 4.8 Fosfatidylcholin (PC) C18:0, PC C16:0, fosfatidyletanolamin (PE) C16:0 og PE C12:0 analysert ved ulike kapillærspenninger. I[H⁺]:I[Na⁺] viser forholdet mellom toppen til MH⁺ og MNa⁺ i MS-spekteret. n = 1

Fosfolipid	RT [min]	Kapillærspenning [V]	Areal	I[H ⁺]:I[Na ⁺]
PC C18:0	19,90	10	2612286	100:95
	19,94	20	2451980	100:98
	19,89	30	2327460	100:101
	19,91	40	2309044	100:99
	19,94	50	2241540	100:99
PC C16:0	20,28	10	5138225	100:80
	20,31	20	5048470	100:80
	20,32	30	4889334	100:76
	20,33	40	4525846	100:78
	20,37	50	4386429	100:80
PE C16:0	12,87	10	14328167	100:4
	12,96	20	13796091	100:5
	12,95	30	13467393	100:4
	13,09	40	13164202	100:4
	13,00	50	11143680	100:3
PE C12:0	13,51	10	21019488	100:2
	13,67	20	19874573	100:2
	13,64	30	19010744	100:2
	13,77	40	17706593	100:2
	13,72	50	14666359	100:2

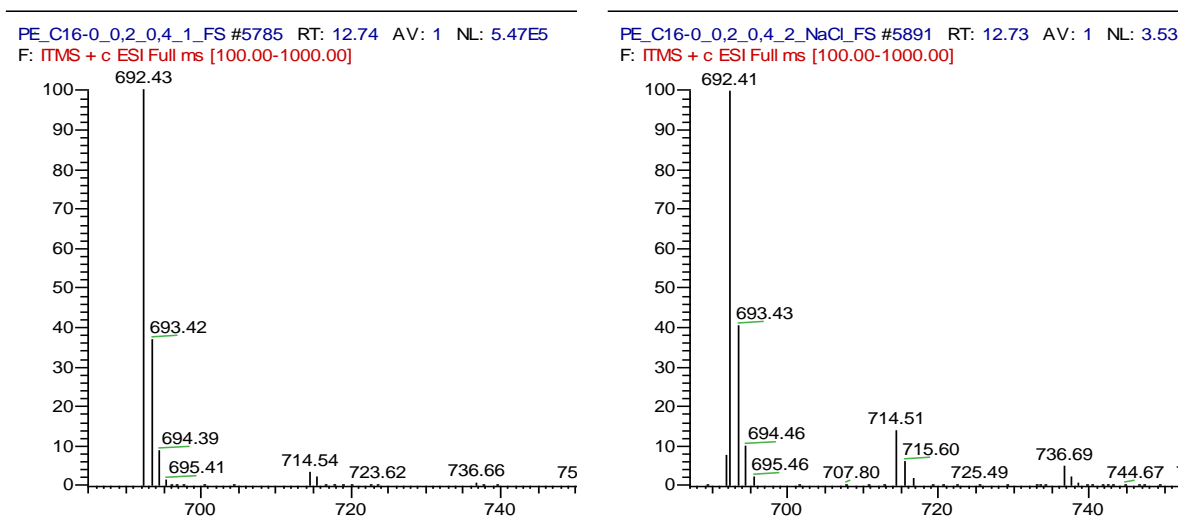
Det relativt konstante forholdet mellom [H⁺] og [Na⁺] ved økende kapillærspenning viser at MNa⁺ ikke dannes i massespektrometeret. Forsøk for å påvirke MNa⁺-dannelsen må derfor fokusere på dannelse i LC-kolonnen.

4.2.3.2 NaCl i mobilfase A

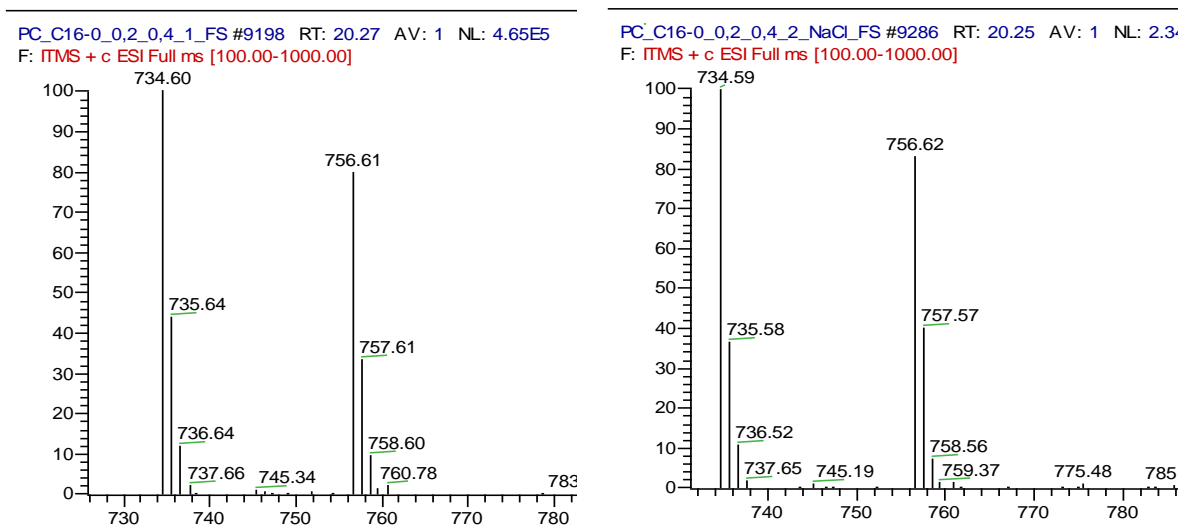
Analysene av PE C16:0/C16:0 med mobilfase A tilsatt NaCl-løsning viste en liten økning MNa⁺, fra omtrent 5% til omtrent 15%, se Figur 4.6. Det ble ikke observert like stor økning av

Resultater og diskusjon

MNa⁺ i analysene av PC C16:0/C16:0, som i utgangspunktet hadde mye mer MNa⁺ enn PE C16:0/C16:0, se Figur 4.7.



Figur 4.6 MS-spekter for PE uten (venstre) og med (høyre) NaCl i bufferen. MH⁺ er 692,4 og MNa⁺ er 714,5.



Figur 4.7 MS-spekter for PC uten (venstre) og med (høyre) NaCl i bufferen. MH⁺ er 734,6 og MNa⁺ er 756,6.

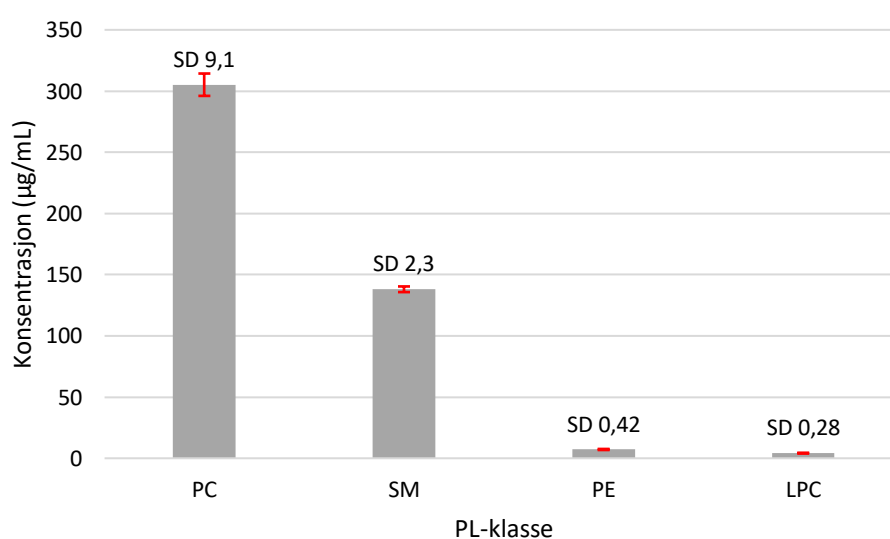
Økningen av MNa⁺ for PE antyder at større tilgjengelighet av Na⁺ kan påvirke dannelsen av Na-addukt, og dermed gi mulighet for høyere intensitet dersom alle ionene kan påvirkes til å foreligge på MNa⁺-form. At økningen av MNa⁺ for PC er mye mindre, kan skyldes forskjeller mellom de to ulike hodegruppene, slik at PC trenger høyere konsentrasjon Na⁺ for å vise samme økning. At det i utgangspunktet er mye mer MNa⁺ for PC kan også ha innvirkning på økningen.

For å oppnå målet om høyere intensitet ved at alle ionene foreligger på MNa^+ -form, må høyere konsentrasjoner av NaCl benyttes. Det må også gjøres forsøk med fosfolipider fra andre klasser for å undersøke om disse påvirkes av økningen av NaCl.

I kromatogrammene vises MH^+ og MNa^+ i samme topp, dette stemmer dårlig med de øvrige resultatene. Dersom Na-addukt dannes før og under separasjonen i kolonnen, bør dette påvirke retensjonstiden slik at kromatogrammet viser to toppler. Fordi dette ikke vises, men de øvrige resultatene antyder dannelse før massespektrometeret, kan det ikke konstateres om MNa^+ dannes før eller i massespektrometeret før flere forsøk er gjennomført.

4.3 Analyse av fosfolipider i melk med HPLC-MS

Den etablerte metoden ble benyttet til å analysere melkeprøver for å vise at den kan identifisere og kvantifisere et stort antall fosfolipider i melk. Fire prøver ble opparbeidet og analysert, resultatene som presenteres i Tabell 4.9 viser gjennomsnittsverdiene av konsentrasjonen og retensjonstiden til hvert enkelt fosfolipid. Verdiene for relativ forekomst, både innen klassen og totalt av klassen er også basert på gjennomsnittsverdiene. Hver prøve ble injisert fire ganger for å gjennomføre de fire multi-SIM-metodene, dette medførte at fosfolipidene i klassene PC og SM ble detektert i én injeksjon, for LPC ble fosfolipidene detektert i to injeksjoner og for PE ble fosfolipidene detektert i alle de fire injeksjonene. All data ble brukt til å beregne gjennomsnittsverdiene. Det totale innholdet av fosfolipider i hver klasse er presentert i Figur 4.8.



Figur 4.8 Totalt innhold av fosfolipider i melk i hver klasse, n = 4.

Tabell 4.9 Fosfolipider i melk. *m/z* viser teoretisk verdi. *n* = 4

PL	Formel	Fettsyre	<i>m/z</i>	Relativ forekomst innen klassen [%]	Kons. [$\mu\text{g/mL}$]	RT [min]
PE	$\text{C}_{37}\text{H}_{72}\text{NPO}_8$	C14:0/C18:1	690,51	3,4	$0,24 \pm 0,05$	14,29
	$\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{NPO}_8$	C16:0/C18:2	716,52	5,9	$0,42 \pm 0,03$	14,12
	$\text{C}_{39}\text{H}_{76}\text{NPO}_8$	C16:0/C18:1	718,54	4,6	$0,33 \pm 0,04$	14,10
	$\text{C}_{41}\text{H}_{74}\text{NPO}_8$	C16:0/C20:4	740,52	13	$0,97 \pm 0,11$	14,09
	$\text{C}_{41}\text{H}_{76}\text{NPO}_8$	C18:1/C18:2	742,54	9,1	$0,66 \pm 0,07$	13,90
	$\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{NPO}_8$	C18:1/C18:1	744,55	50	$3,6 \pm 0,4$	13,86
	$\text{C}_{41}\text{H}_{80}\text{NPO}_8$	C18:0/C18:1	746,57	14	$0,99 \pm 0,11$	13,91
Relativ forekomst av klassen (%)				1,6		
SM	$\text{C}_{37}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C14:0	675,54	0,89	$1,2 \pm 0,2$	25,27
	$\text{C}_{37}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{PO}_6$	C16:0/C16:0	677,56	0,74	$1,03 \pm 0,15$	24,78
	$\text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C15:0	689,56	0,95	$1,3 \pm 0,5$	25,12
	$\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C16:0	703,57	6,2	$8,54 \pm 0,15$	24,97
	$\text{C}_{39}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:0/C16:0	705,59	0,65	$0,9 \pm 0,2$	24,63
	$\text{C}_{43}\text{H}_{87}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C20:0	759,64	7,3	$10,0 \pm 0,2$	21,31
	$\text{C}_{43}\text{H}_{89}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:0/C20:0	761,65	28	$38,5 \pm 1,0$	21,26
	$\text{C}_{44}\text{H}_{89}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C21:0	773,65	2,9	$4,0 \pm 0,2$	24,19
	$\text{C}_{44}\text{H}_{91}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:0/C21:0	775,67	1,4	$2,0 \pm 0,2$	21,21
	$\text{C}_{45}\text{H}_{89}\text{N}_2\text{PO}_6$	C16:1/C24:1	785,65	12	$16,2 \pm 0,6$	21,10
	$\text{C}_{45}\text{H}_{91}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C22:0	787,67	17	$22,8 \pm 0,6$	21,05
	$\text{C}_{45}\text{H}_{93}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:0/C22:0	789,68	9,3	$12,8 \pm 0,5$	21,07
	$\text{C}_{46}\text{H}_{91}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C23:1	799,67	3,0	$4,2 \pm 0,5$	22,16
	$\text{C}_{46}\text{H}_{93}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C23:0	801,68	2,0	$2,8 \pm 0,4$	23,98
	$\text{C}_{46}\text{H}_{95}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:0/C23:0	803,70	0,37	<LOQ	20,97
	$\text{C}_{47}\text{H}_{93}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C24:1	813,68	7,2	$9,9 \pm 1,6$	21,15
	$\text{C}_{47}\text{H}_{95}\text{N}_2\text{PO}_6$	C18:1/C24:0	815,70	0,99	$1,36 \pm 0,06$	23,88
Relativ forekomst av klassen (%)				30		
PC	$\text{C}_{36}\text{H}_{72}\text{NPO}_8$	C14:0/C14:0	678,51	0,92	$2,8 \pm 0,4$	22,06
	$\text{C}_{38}\text{H}_{76}\text{NPO}_8$	C14:0/C16:0	706,54	4,6	14 ± 2	21,78
	$\text{C}_{39}\text{H}_{78}\text{NPO}_8$	C16:0/C15:0	720,55	1,4	$4,3 \pm 0,8$	21,66
	$\text{C}_{40}\text{H}_{78}\text{NPO}_8$	C16:0/C16:1	732,55	3,3	$10,1 \pm 1,3$	21,48
	$\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NPO}_8$	C16:0/C16:0	734,57	7,1	22 ± 3	21,52
	$\text{C}_{42}\text{H}_{78}\text{NPO}_8$	C16:1/C18:2	756,55	13	$39,6 \pm 1,6$	21,54
	$\text{C}_{42}\text{H}_{80}\text{NPO}_8$	C16:0/C18:2	758,57	6,6	20 ± 2	21,31
	$\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NPO}_8$	C16:0/C18:1	760,59	17	50 ± 5	21,27
	$\text{C}_{42}\text{H}_{84}\text{NPO}_8$	C16:0/C18:0	762,60	4,2	$12,7 \pm 0,9$	21,32
	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NPO}_8$	C16:0/C20:4	782,57	19	57 ± 4	21,31
	$\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{NPO}_8$	C18:1/C18:2	784,59	8,8	27 ± 2	21,36
	$\text{C}_{44}\text{H}_{84}\text{NPO}_8$	C18:1/C18:1	786,60	9,6	29 ± 3	21,07
	$\text{C}_{44}\text{H}_{86}\text{NPO}_8$	C18:0/C18:1	788,62	5,2	$16,0 \pm 1,4$	21,09
	Relativ forekomst av klassen (%)				67	

LPC	C ₂₄ H ₅₀ NPO ₇	C16:0	496,34	35	1,5 ± 0,2	27,18
	C ₂₆ H ₄₈ NPO ₇	C18:3	518,32	25	1,05 ± 0,12	27,17
	C ₂₆ H ₅₀ NPO ₇	C18:2	520,34	5,7	<LOD	27,07
	C ₂₆ H ₅₂ NPO ₇	C18:1	522,36	25	1,05 ± 0,15	26,80
	C ₂₆ H ₅₄ NPO ₇	C18:0	524,37	9,3	<LOD	26,65
Relativ forekomst av klassen (%)				0,93		

Alle fettsyrene funnet med GC-MS bekreftes av LC-MS-analysen, med unntak av C12:0. Det ble også funnet ytterligere seks fettsyrer med LC-MS; C18:3, C20:4, C20:0, C21:0, C23:1 og C24:1. At det ikke ble funnet fosfolipid med C12:0 i LC-MS-analysen kan skyldes at kun fire fosfolipidklasser ble undersøkt. Dersom fosfolipid fra en annen enn disse klassene inneholder C12:0, vil C12:0 bli funnet med GC-MS men ikke med LC-MS-teknikken. Dette gjelder også for de fettsyrene som ble identifisert med GC-MS, men i lav konsentrasjon med LC-MS.

Det var kun 1-2 fosfolipider som inneholdt hver av de seks fettsyrene som kun ble funnet ved LC-MS. Med en konsentrasjon for lav til at de i scanmodus kunne identifiseres ville dette forklare hvorfor de ikke ble funnet med GC-MS. For C20:4, C20:0 og C24:1 stemmer dette imidlertid ikke, da konsentrasjonen av hver av fosfolipidene som inneholder disse fettsyrene er sammenlignbar med verdiene for fettsyrer identifisert med GC-MS.

Fordi de mest polare forbindelsene elueres mot slutten av analysen ved bruk av HILIC, var det ventet at elueringsrekkefølgen av de fire fosfolipidklassene fra start til slutt ville være: LPC, SM, PC og PE. LC-MS-analyse viste derimot at PE eluerte først, forbindelser fra PC og SM nærmest samtidig og LPC sist. I publikasjonen til Liu et al. (2015) ble det rapportert at elueringsrekkefølgen var PC, PE, SM og LPC. Både PC, LPC og SM har den samme hodegruppen, cholin, og deres polare overflateareal er ganske likt, Tabell 4.10. Den uventede elueringsrekkefølgen kan skyldes at forskjellene er for små til å kunne predikere rekkefølgen. Den uventet tidlige elueringen av PE er vanskelig å forklare, men dersom det dannes interaksjon mellom det primære aminet og O⁻ i fosfatgruppen kan retensjonstiden påvirkes. I arbeidet til Liu et al. (2015) ble det benyttet maursyre som tilsetningsstoff i mobilfase B, mens det i dette arbeidet ble benyttet eddiksyre. Maursyre har lavere pK_a-verdi enn eddiksyre, og er dermed en sterkere syre, noe som påvirker protoneringen av forbindelser. Dette kan forklare forskjellen i elueringsrekkefølge mellom disse to arbeidene.

Tabell 4.10 Polart overflateareal for fosfolipider fra klassene PE, PC, LPC og SM

Fosfolipid	Topological Polar Surface Area [Å²/molekyl]
PE C18:0/C18:0	134,38 ¹
PC C18:0/C18:0	111,19 ²
SM C18:1/C18:0	107,92 ³
LPC C18:0	105,12 ⁴

¹ (LMSD: LIPID MAPS structure database 2017c), ² (LMSD: LIPID MAPS structure database 2017b),

³ (LMSD: LIPID MAPS structure database 2017d), ⁴ (LMSD: LIPID MAPS structure database 2017a)

Analyseresultatene viser at 1,6% av fosfolipidene i melk tilhører PE, 30% SM, 67% PC og 0,93% LPC. Fra litteraturen var det forventet omtrent likt innhold av PE, PC og SM, og mindre mengder av de øvrige klassene (Contarini & Povolo 2013; Fox & McSweeney 2006; Liu et al. 2015). De store forskjellene kan skyldes melken som er brukt i analysene, ulik forbehandling av melken (pasteurisering, homogenisering og fettredusering) vil gi ulike utgangspunkt. Likevel er avvikene så store at det er naturlig å anta at prøveopparbeidelsen eller metoden brukt til analyse er årsaken. Det er særlig det svært lave innholdet av PE som gjør det naturlig å anta at prøveopparbeidelsen eller LC-MS-analysen ikke er optimal. Dersom fosfolipidene degraderes i løpet av prøveopparbeidelsen, eller adsorberes til overflaten av glassutstyret, vil ikke resultatene gjenspeile det virkelige innholdet i melk.

Det relative innholdet av fosfolipider innen hver klasse ble også undersøkt av Liu et al. (2015). For klassene PE og LPC stemmer det mest forekommende fosfolipidet innen klassen rapportert av Liu et al. (2015) overens med resultatene i denne oppgaven. Andelen er ikke lik i de to studiene, men i begge tilfellene peker disse fosfolipidene seg ut som hovedkomponentene. For klassene SM og PC er de mest forekommende fosfolipidene i publikasjonen til Liu et al. (2015) de nest mest forekommende fosfolipidene i denne oppgaven. For de øvrige forbindelsene er det lite overensstemmelse mellom det relative innholdet. Blant annet rapporterer Liu et al. (2015) at det relative innholdet av SM C18:0/C20:0 er 3,4%, mens det i denne oppgaven ble funnet å være det mest forekommende fosfolipidet innen klassen (28%). Dette kan, i tillegg til de årsaker som allerede er nevnt, skyldes at melken er levert av forskjellige kuraser.

Multi-SIM-metoden inneholder ikke ioner fra klassene PS, PI, LacCer og GluCer. Det ble forsøkt å analysere standard av PS og PI med LC-MS-systemet, men dette gav ikke forventede resultater. Standarden av PS viste ingen retensjon på kolonnen, det ble antatt at flere endringer

måtte gjøres med det kromatografiske systemet og PS ble derfor utelatt fra den videre metodeutviklingen. Både TIC-, RIC- og SIM-kromatogram og massespektre vises i vedlegg B. Standarden av PI gav en bred topp i kromatogrammet i scanmodus og enda bredere topp i SIM, men forbindelser fra PI-klassen ble ikke funnet i melkeprøve. I vedlegg C vises TIC- og SIM-kromatogram med massespektre. På grunn av den unormalt brede toppen og problemet med å finne PI-forbindelser i melkeprøven, ble PI utelatt fra metoden. Endringer i det kromatografiske systemet vil forhåpentligvis gi smalere topper og dermed lettere deteksjon av PI-forbindelser. Klassene LacCer og GluCer ble ikke inkludert i metoden fordi det av ressursmessige årsaker ikke ble anskaffet standarder av disse.

Ved beregning av konsentrasjonen til fosfolipidene ble det ikke brukt relativ responsfaktor, og det ble kun benyttet en internstandard for hver klasse. Det er dermed ikke tatt hensyn til muligheten for ulik instrumentrespons for ulike fosfolipider innen samme klasse. Selv om det antas at fosfolipider med samme hodegruppe ikke vil ha store responsforskjeller, vil ulik lengde og umettethet av fettsyrene kunne gi variasjoner. Det bør derfor tas hensyn til instrumentrespons. Det finnes ikke tilgjengelig standarder for alle fosfolipidene identifisert i denne oppgaven, for å forbedre kvantifiseringen ved å korrigere for ulik instrumentrespons må en annen teknikk enn RRF benyttes.

I Myers et al. (2011) sin publikasjon anbefales det å benytte flere internstandarder med ulik lengde og umettethet for hver klasse, gjerne fire, men for lysolipider er to tilstrekkelig. Muligheten for å bruke multippel regresjon for hver klasse, der blant annet lengden til fettsyren og antall dobbeltbindinger er faktorer, legges også frem. Responsen for hvert fosfolipid kan da beregnes. Koivusalo et al. (2001) anbefaler i sin publikasjon å bruke minimum tre internstandarder for hver klasse, både mettede og umettede. Ved valg av antall internstandarder bør informasjon om hvilke fettsyrer som er tilstede brukes, dersom det i en klasse er liten spredning i fettsyrelengden vil det ikke være behov for like mange internstandarder.

5 KONKLUSJON

I denne oppgaven ble det utviklet LC-MS- og LC-MS/MS-metoder for analyse av fosfolipider fra fire klasser i melk. Det ble benyttet en rask prøveopparbeidelse med ekstraksjon der Folchs løsningsmiddel ble brukt.

Totalt 42 fosfolipider fra melk ble identifisert. Separasjonen av fosfolipider innen samme klasse, og separasjonen av klassene SM og PC, var marginal på HILIC-kolonnen. Ved å benytte de enkelte fosfolipidenes m/z -verdi i en multi-SIM-metode ble likevel hver forbindelse identifisert og kvantifisert på en pålitelig måte.

Det ble innhentet CID-spektre for alle forbindelsene, og fragmenteringene i disse bekreftet strukturene og gav dermed sikker identifikasjon av alle fosfolipidene. LOD ble bestemt til å være 0,05-0,5 $\mu\text{g/mL}$ og LOQ 0,1-0,9 $\mu\text{g/mL}$. Lineært område for PC var 0,4-100 $\mu\text{g/mL}$, for PE 0,1-10 $\mu\text{g/mL}$, for SM 0,9-80 $\mu\text{g/mL}$ og for LPC 0,7-5 $\mu\text{g/mL}$.

Analysen av helmelk viste metoden i bruk, og i melken fordelte de fire undersøkte fosfolipidklassene seg på en uventet måte; 67% PC, 30% SM, 1,6% PE og 0,93% LPC. De store forskjellene mellom andel av PC, PE og SM var uventet sammenlignet med litteraturen. Mengden av de ulike fosfolipidene varierte mellom 0,24 og 57 $\mu\text{g/mL}$. Blant de mest forekommende fettsyrene, både identifisert som hele fosfolipider med LC-MS og som FAMEer med GC-MS, er C16:0, C18:1, C18:0 og C18:2.

Valideringen viste at det i metoden er høy matrikseffekt ved lave konsentrasjoner av analytt, og at prøvekonsentrasjonen derfor bør økes. Valideringen viste også god presisjon og lav carry-over. Metoden må utvikles videre, spesielt med tanke på kvantifisering og prøvemengde.

6 VIDERE ARBEID

Metoden utviklet i denne oppgaven er ikke ferdig, og bør utvikles videre for å gi kunne gi ytterligere og mer presis informasjon. Som tilleggsstoff i mobilfase B ble det i denne oppgaven brukt eddiksyre, det bør forsøkes å bytte til maursyre for å undersøke om dette har effekt for elueringsrekkefølgen. Det bør også gjøres forsøk der det blant annet endres på faktorer som mobilfase, mobilfasegradient og -hastighet for å forsøke å inkludere PI og PS i metoden. For å inkludere ytterligere flere forbindelser i metoden, kan også standarder av LacCer og GluCer anskaffes.

For bedre kvantifisering kan flere internstandarder fra hver klasse tas i bruk, og for å oppnå høyere intensitet kan det gjennomføres flere forsøk der målet er å få ionene til å foreligge på én pseudomolekylær form. Det kan for eksempel forsøkes med høyere konsentrasjoner av NaCl, men også med andre ioner som Ag^+ .

Den viktigste forbedringen av metoden vil være å øke konsentrasjonen til melkeprøvene, dette vil gjøre matrikseffekten mye mindre signifikant slik at feilestimering av resultatene unngås. Konsentrasjonsøkningen kan gjøres ved å øke volumet av ekstrahert melk eller ved inndamping og reløsning i lavere volum.

For å forbedre valideringen av metoden, kan større konsentrasjonsområder undersøkes for linearitet. Bedre beregning av nøyaktighet vil gi et mer troverdig inntrykk av metoden, og kan beregnes som beskrevet i avsnitt 4.2.2, eller ved å bruke to fosfolipider fra samme klasse som det er naturlig å tro at har små responsforskjeller.

7 REFERANSER

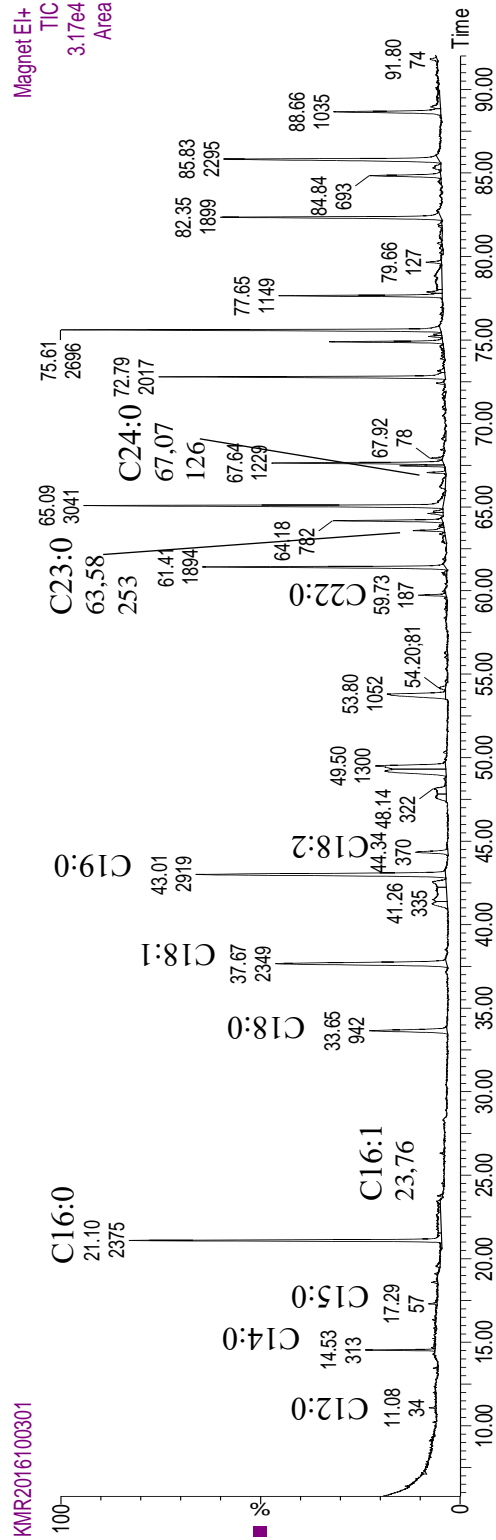
- Appelblad, P., Jonsson, T., Pontén, E., Viklund, C. & Jiang, W. (2008). *A Practical Guide to HILIC*. 1. utg. Umeå, Sverige: Merck SeQuant AB.
- Bitman, J. & Wood, D. L. (1990). Changes in Milk-Fat Phospholipids during Lactation. *Journal of Dairy Science*, 73 (5): 1208-1216.
- Buszewski, B. & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (1): 231-247.
- Cech, N. B. & Enke, C. G. (2001). *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*, 20. New York. 362-387 s.
- Christie, W. W. (2011). *Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis*. Dundee, Skottland. Tilgjengelig fra: <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40374> (lest 15.04.17).
- Christie, W. W. (2013). *What is a Lipid?* Dundee, Skottland. Tilgjengelig fra: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39371&navItemNumber=19200> (lest 03.11.16).
- Contarini, G. & Povolo, M. (2013). Phospholipids in Milk Fat: Composition, Biological and Technological Significance, and Analytical Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (2): 2808-2831.
- Devle, H., Rukke, E. O., Naess-Andresen, C. F., Ekeberg, D., Mondello, L., Tranchida, P. Q. & Lancas, F. (2009). A GC – magnetic sector MS method for identification and quantification of fatty acids in ewe milk by different acquisition modes. *Journal of Separation Science*, 32 (21): 3738-3745.
- Devle, H., Ulleberg, E. K., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vegarud, G. & Ekeberg, D. (2014). Reciprocal interacting effects of proteins and lipids during ex vivo digestion of bovine milk. *International Dairy Journal*, 36 (1): 6-13.
- Donato, P., Cacciola, F., Cichello, F., Russo, M., Dugo, P. & Mondello, L. (2011). Determination of phospholipids in milk samples by means of hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to evaporative light scattering and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1218 (37): 6476-6482.
- Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (2006). *Advanced Dairy Chemistry Volume 2: Lipids*. 3. utg., b. 2. Boston, MA: Springer US.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2. utg. Cham: Springer International Publishing: Cham.
- Hage, D. S. & Carr, J. D. (2011). *Analytical chemistry and quantitative analysis*. 1. utg.: Pearson Prentice Hall.
- Hoffmann, E. d. & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3. utg. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.

- Koivusalo, M., Haimi, P., Heikinheimo, L., Kostainen, R. & Sommerharju, P. (2001). Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. *Journal of Lipid Research*, 42: 663-672.
- Liu, Z. Q., Moate, P., Cocks, B. & Rochfort, S. (2015). Comprehensive polar lipid identification and quantification in milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 978: 95-102.
- LMSD: LIPID MAPS structure database. (2017a). *LPC(18:0)*. Tilgjengelig fra: <http://lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMGP01050026> (lest 28.04.17).
- LMSD: LIPID MAPS structure database. (2017b). *PC(18:0/18:0)*. Tilgjengelig fra: <http://lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMGP01010006> (lest 28.04.17).
- LMSD: LIPID MAPS structure database. (2017c). *PE(18:0/18:0)*. Tilgjengelig fra: <http://lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMGP02010097> (lest 28.04.17).
- LMSD: LIPID MAPS structure database. (2017d). *SM(18:1/18:0)*. Tilgjengelig fra: <http://lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMSP03010001> (lest 28.04.17).
- Miller, J. M. (2009). *Chromatography Concepts and Contrasts*. 2. utg. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Myers, D. S., Ivanova, P. T., Milne, S. B. & Brown, H. A. (2011). Quantitative analysis of glycerophospholipids by LC-MS: Acquisition, data handling, and interpretation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811 (11): 748-757.
- Pulfer, M. & Murphy, R. C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, 22: 332-364.
- Russo, M., Cichello, F., Ragonese, C., Donato, P., Cacciola, F., Dugo, P. & Mondello, L. (2013). Profiling and quantifying polar lipids in milk by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (13): 4617-4626.
- Simpson, N. & Van Horne, K. C. (1993). *Handbook of Sorbent Extraction Technology*. 2. utg.: Varian, Inc.
- Thermo Scientific Training Institute. *LCQ Operations Course*. Florida, USA.
- Turner, J. (2016). *SPE Method Developers' Seminar*: Phenomenex. Upublisert manuskript.
- Walczak, J., Pomastowski, P., Bocian, S. & Buszewski, B. (2016). Determination of phospholipids in milk using a new phosphodiester stationary phase by liquid chromatography-matrix assisted desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1432: 39-48.

VEDLEGG

Vedlegg A

Figur V.1 viser en forstørret utgave av kromatogram fra fettsyreanalysen av fosfolipider fra melk.



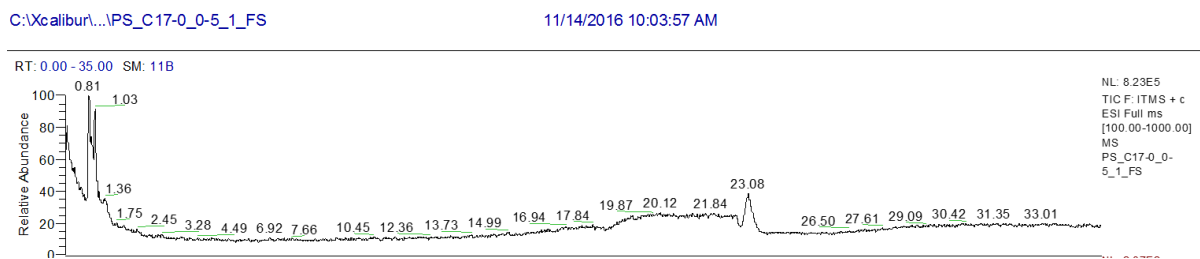
Figur V.1 Kromatogram fra fettsyreanalyse, fosfolipider i melk

Vedlegg B

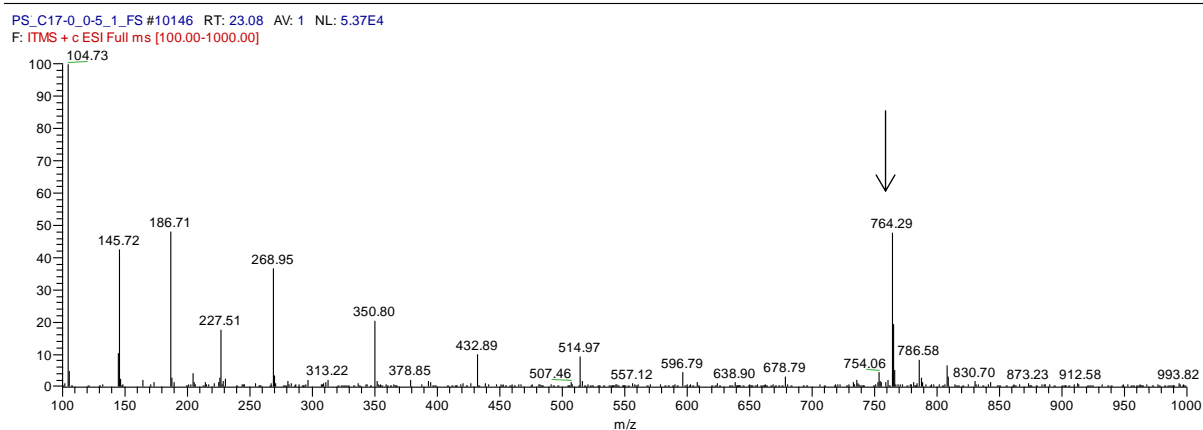
Kromatogrammer og massespektre for PS C17:0/C17:0.

Massespektrene i Figur V.3, Figur V.4 og Figur V.5 viser at den tydelige toppen fra TIC-spekteret ikke er eluering av PS C17:0/C17:0, fordi det før og etter 23,08 min er større intensitet av m/z 764,29 som er det protonerte molekylionet.

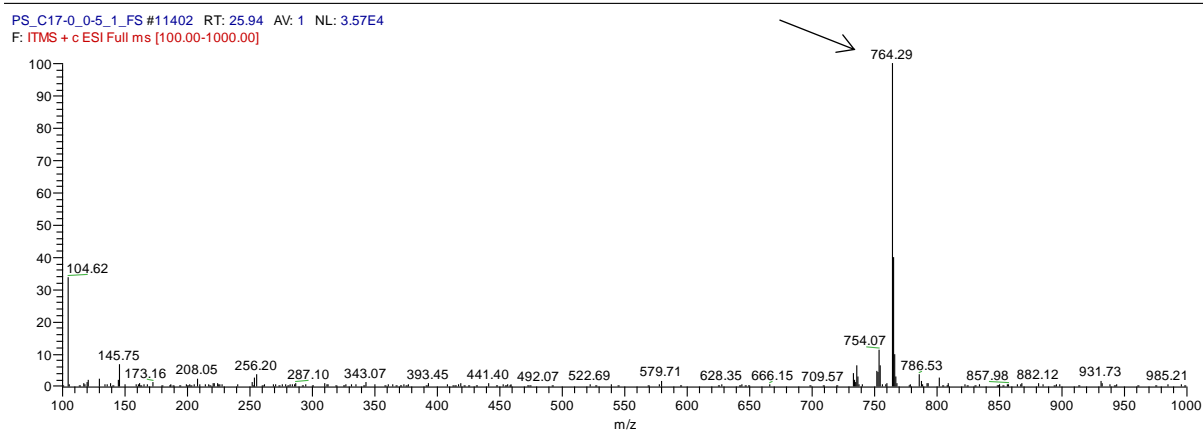
Figur V.6 og Figur V.7 viser henholdsvis RIC- og SIM-spekter av PS C17:0/C17:0.



Figur V.2 TIC av PS C17:0/C17:0, konsentrasjon 0,5 mg/mL. Den tydelige toppen har RT 23,08 min.

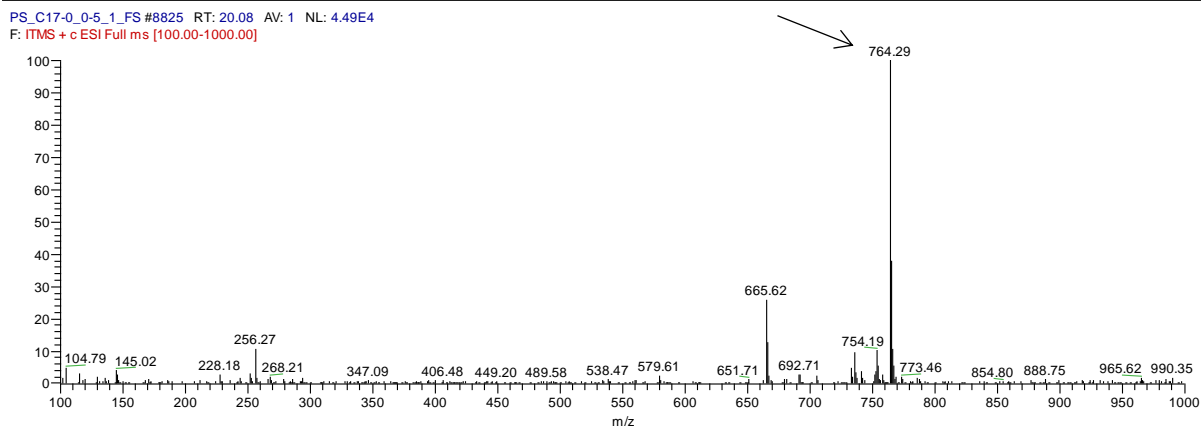


Figur V.3 MS-spekter av PS C17:0/C17:0 ved 23,08 min. Toppen merket med pil har m/z 764,29 og er MH^+ .

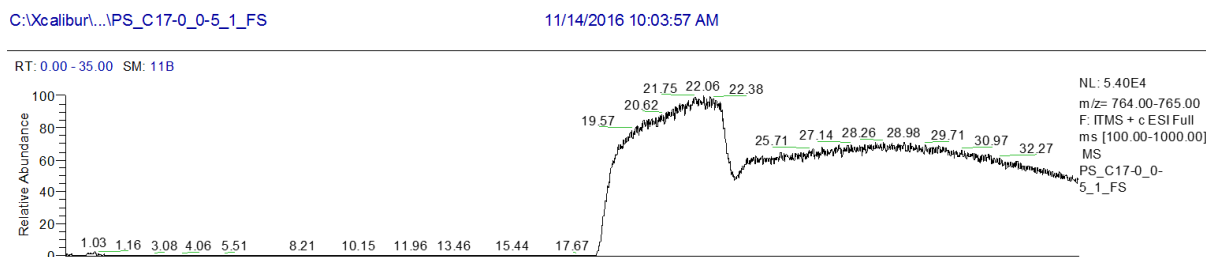


Figur V.4 MS-spekter av PS C17:0/C17:0 ved 25,94 min. Toppen merket med pil har m/z 764,29 og er MH^+ .

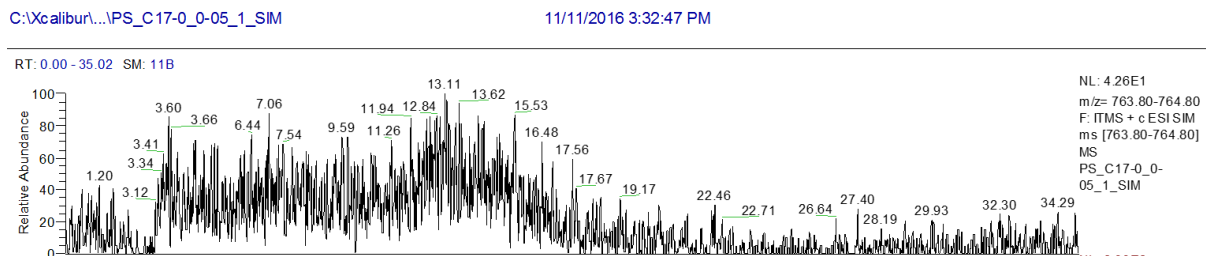
Vedlegg



Figur V.5 MS-spekter av PS C17:0/C17:0 ved 20,08 min. Toppen merket med pil har m/z 764,29 og er MH^+ .



Figur V.6 RIC av PS C17:0/C17:0, konsentrasjon 0,5 mg/mL. Masseområdet er 764,00-765,00.

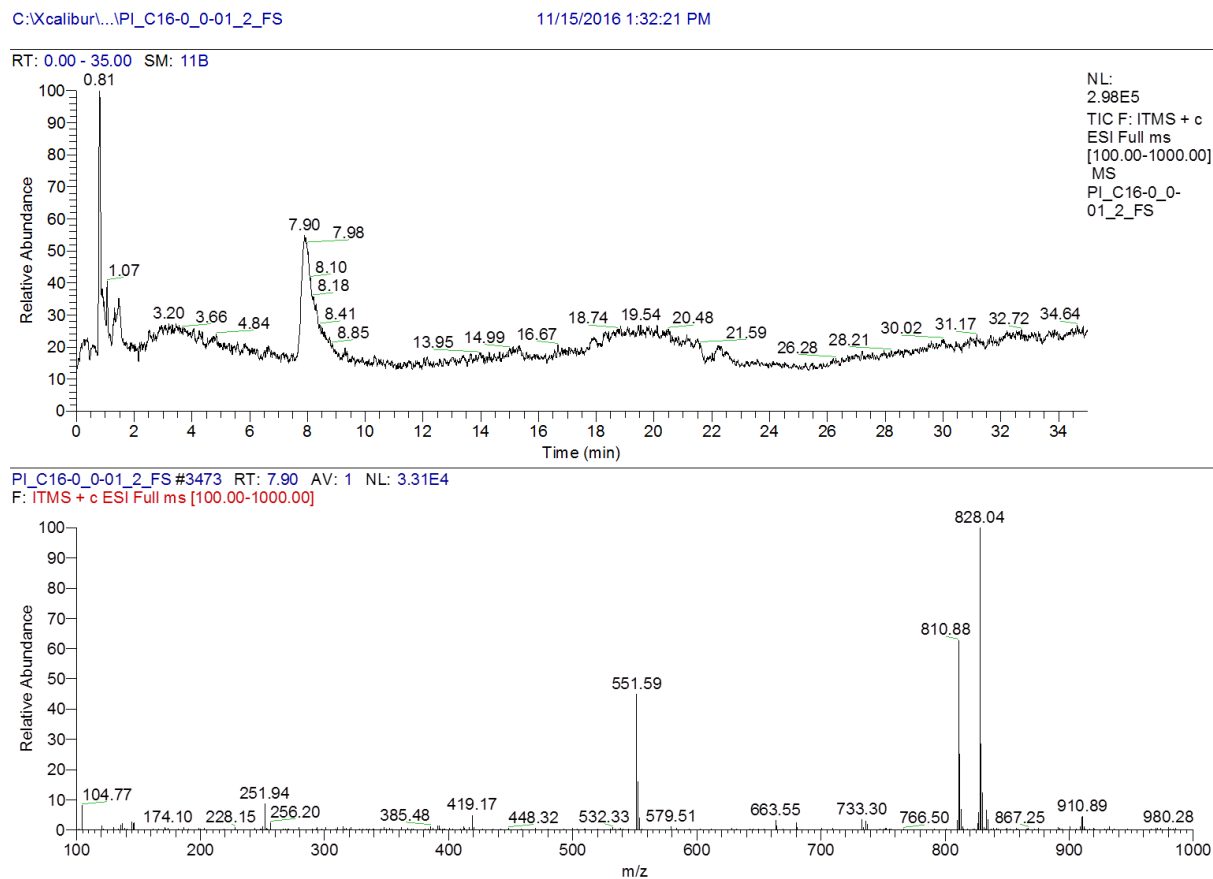


Figur V.7 SIM av PS C17:0/C17:0, konsentrasjon 0,05 mg/mL. Masseområdet er 763,80-764,80.

Vedlegg C

Kromatogrammer og massespektre for PI C16:0/C16:0.

Massespekteret i Figur V.8 viser både MH^+ -ionet (m/z 810,53) og MNH_4^+ -ionet (m/z 827,55). Kromatogrammet i samme figur viser omtrent 2 minutter bred topp. Massespekter og kromatogram fra SIM-analyse av MNH_3^+ - og MH^+ -ionet vises i henholdsvis Figur V.9 og Figur V.10. I SIM-analysene er toppen i kromatogrammet omtrent 10 minutter bred.

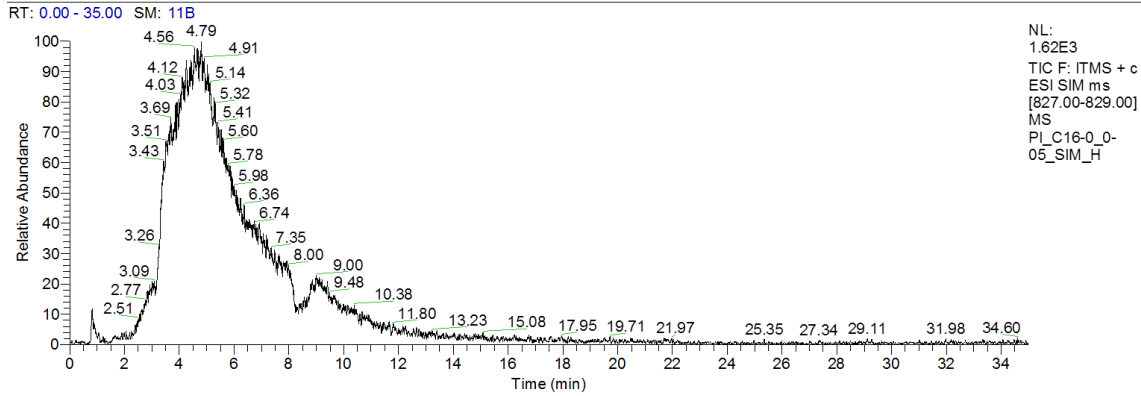


Figur V.8 Kromatogram og massespekter fra scananalyse av PI C16:0/C16:0

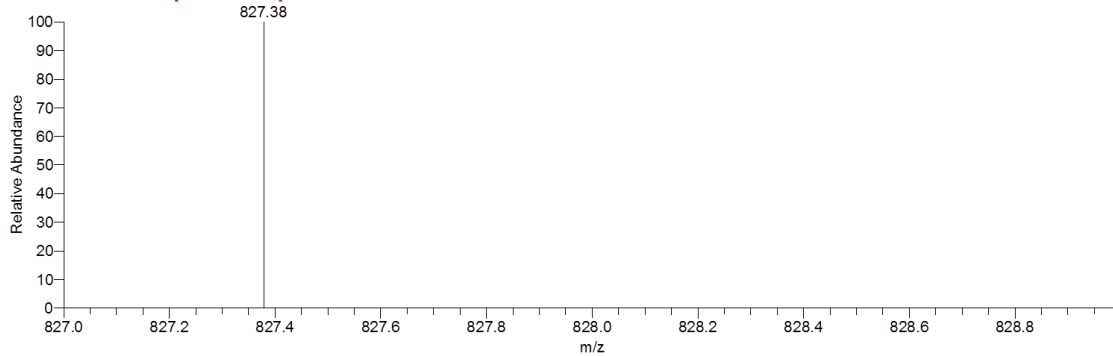
Vedlegg

C:\Xcalibur\...\PI_C16-0_0-05_SIM_H

12/13/2016 12:55:22 PM



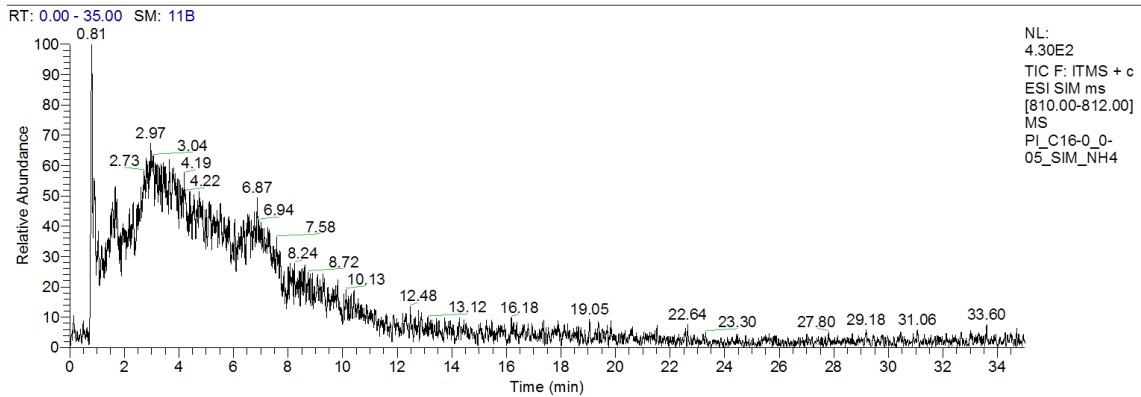
PI_C16-0_0-05_SIM_H #1875 RT: 4.78 AV: 1 NL: 1.49E3
F: ITMS + c ESI SIM ms [827.00-829.00]



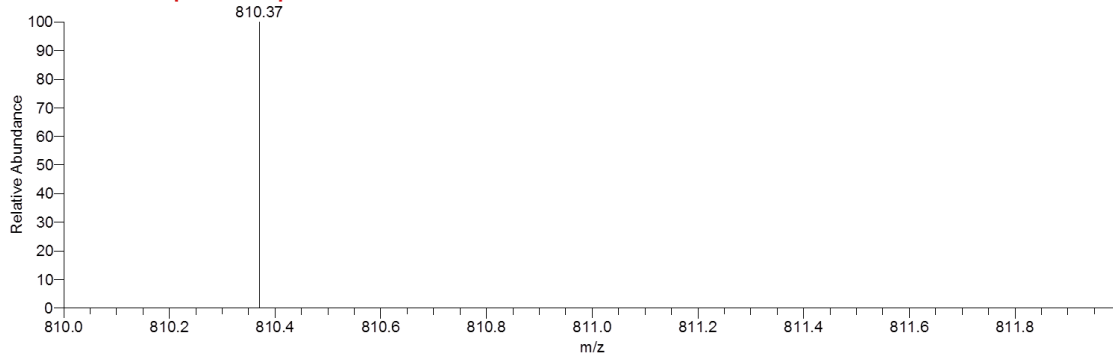
Figur V.9 Kromatogram og massespekter fra SIM-analyse av MNH_4^+ -ionet til PI C16:0/C16:0

C:\Xcalibur\...\PI_C16-0_0-05_SIM_NH4

12/13/2016 1:36:06 PM



PI_C16-0_0-05_SIM_NH4 #1112 RT: 2.97 AV: 1 NL: 3.15E2
F: ITMS + c ESI SIM ms [810.00-812.00]

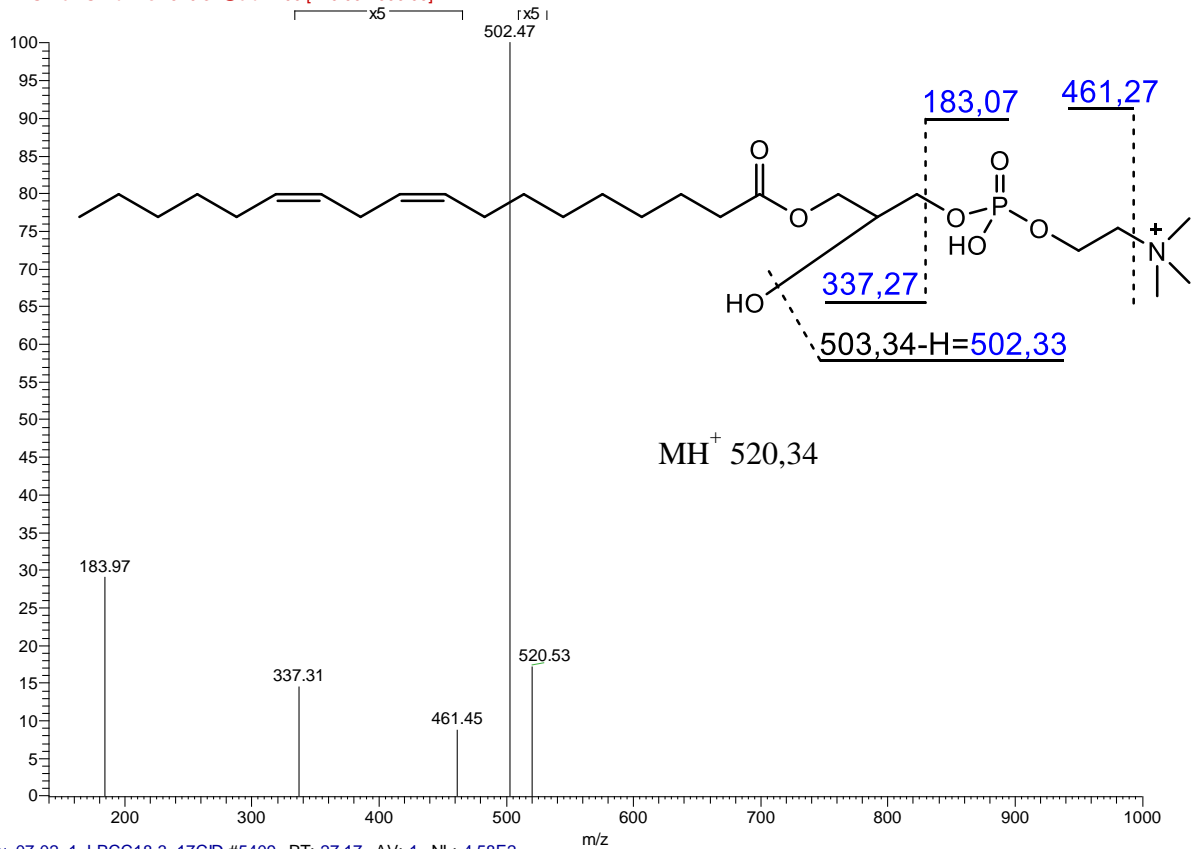


Figur V.10 Kromatogram og massespekter fra SIM-analyse av MH^+ -ionet til PI C16:0/C16:0

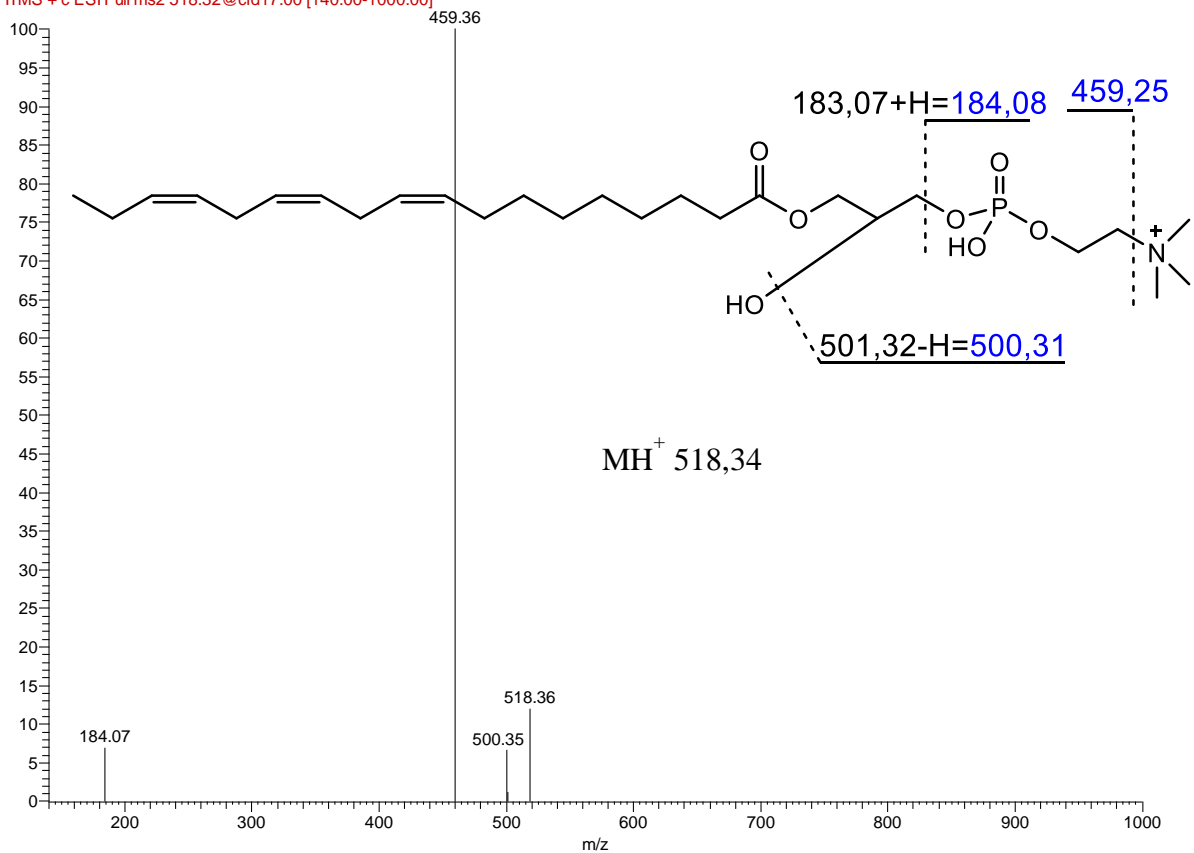
Vedlegg D

Fragmenteringsspektra for fosfolipider. Spekter for fosfolipider fra klassen LPC vises i Figur V.11 til Figur V.12, Figur V.13 til Figur V.18 for klassen PC, Figur V.19 til Figur V.21 for klassen PE og Figur V.22 til Figur V.29 for klassen SM.

Liu_07-02_1_LPCC18-2_17CID #5379 RT: 27.04 AV: 1 NL: 4.27E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 520.34@cid17.00 [140.00-1000.00]



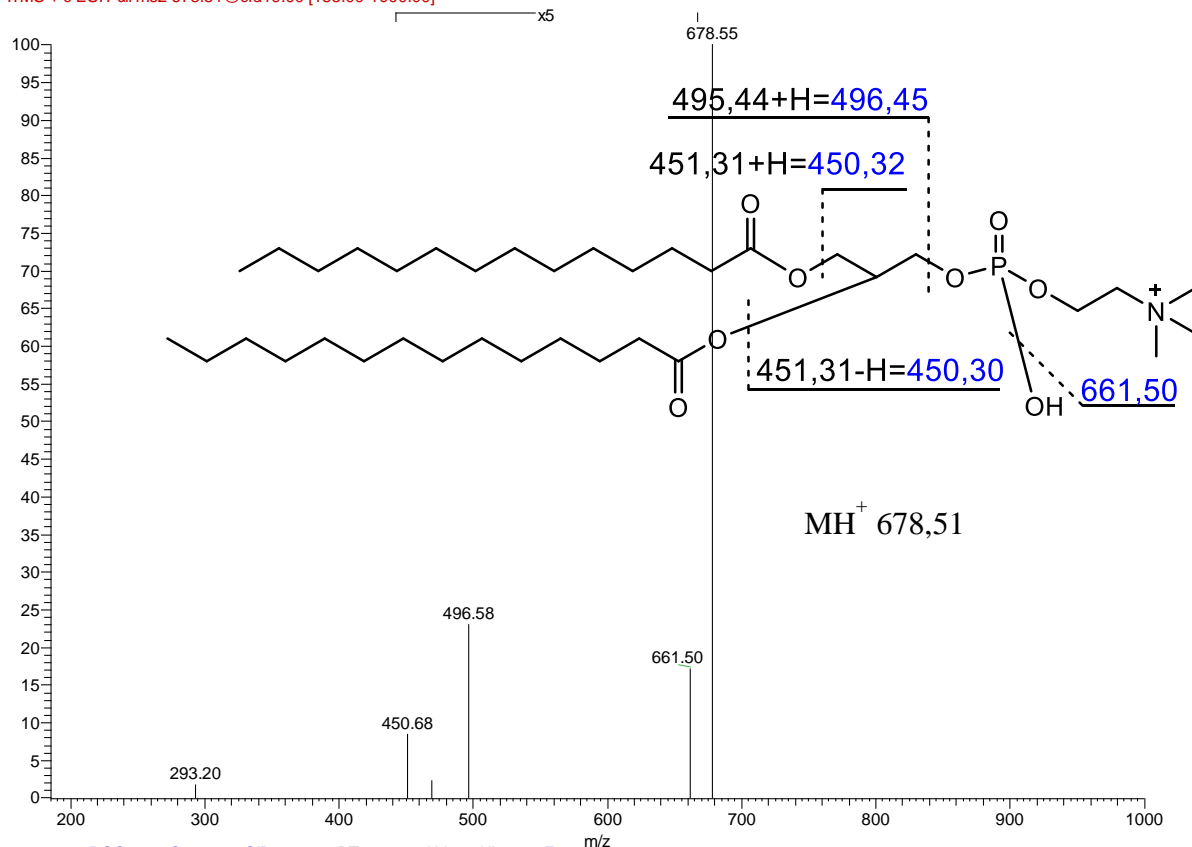
Liu_07-02_1_LPCC18-3_17CID #5409 RT: 27.17 AV: 1 NL: 4.58E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 518.32@cid17.00 [140.00-1000.00]



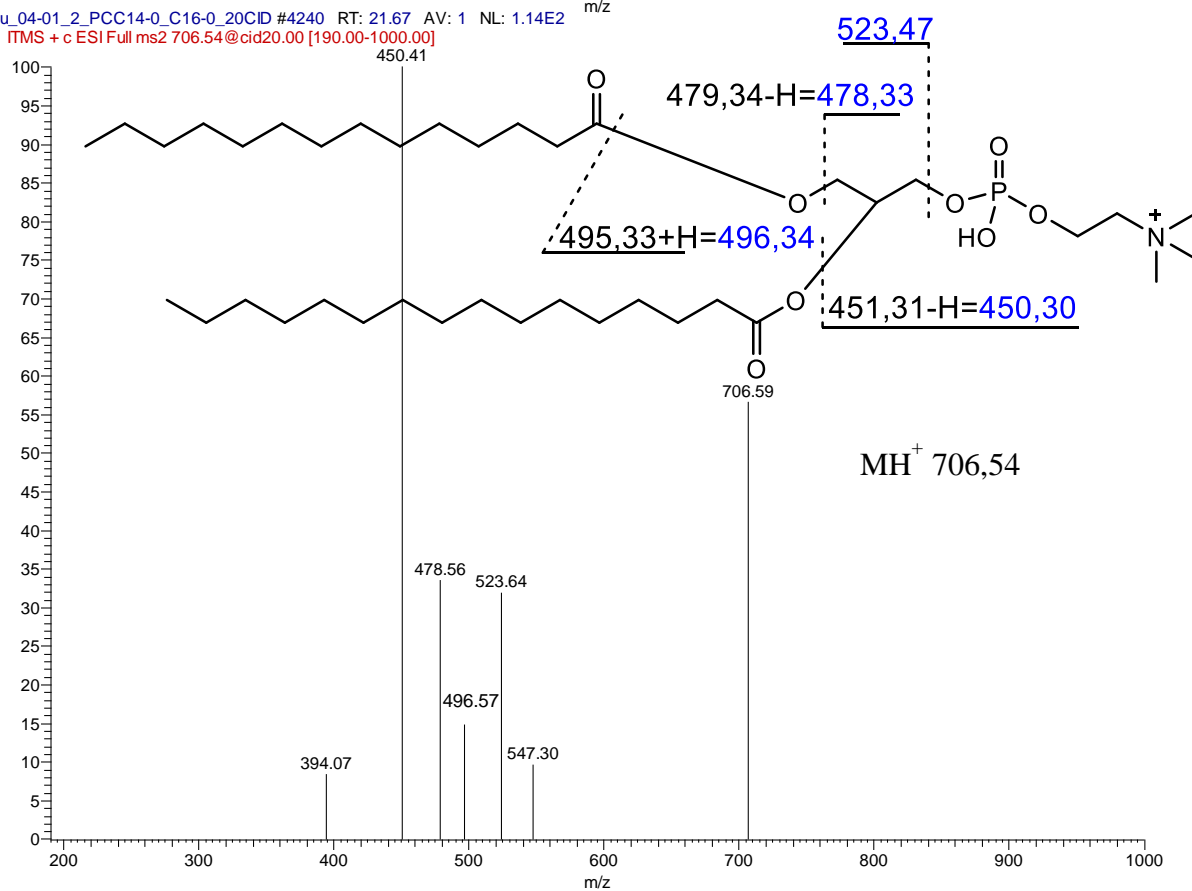
Figur V.12 CID-spekter og struktur for LPC C18:2 (øverst) og LPC C18:3 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_07-02_1_PCC14-0_C14-0_19CID #4347 RT: 22.08 AV: 1 NL: 9.19E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 678.51@cid19.00 [185.00-1000.00]

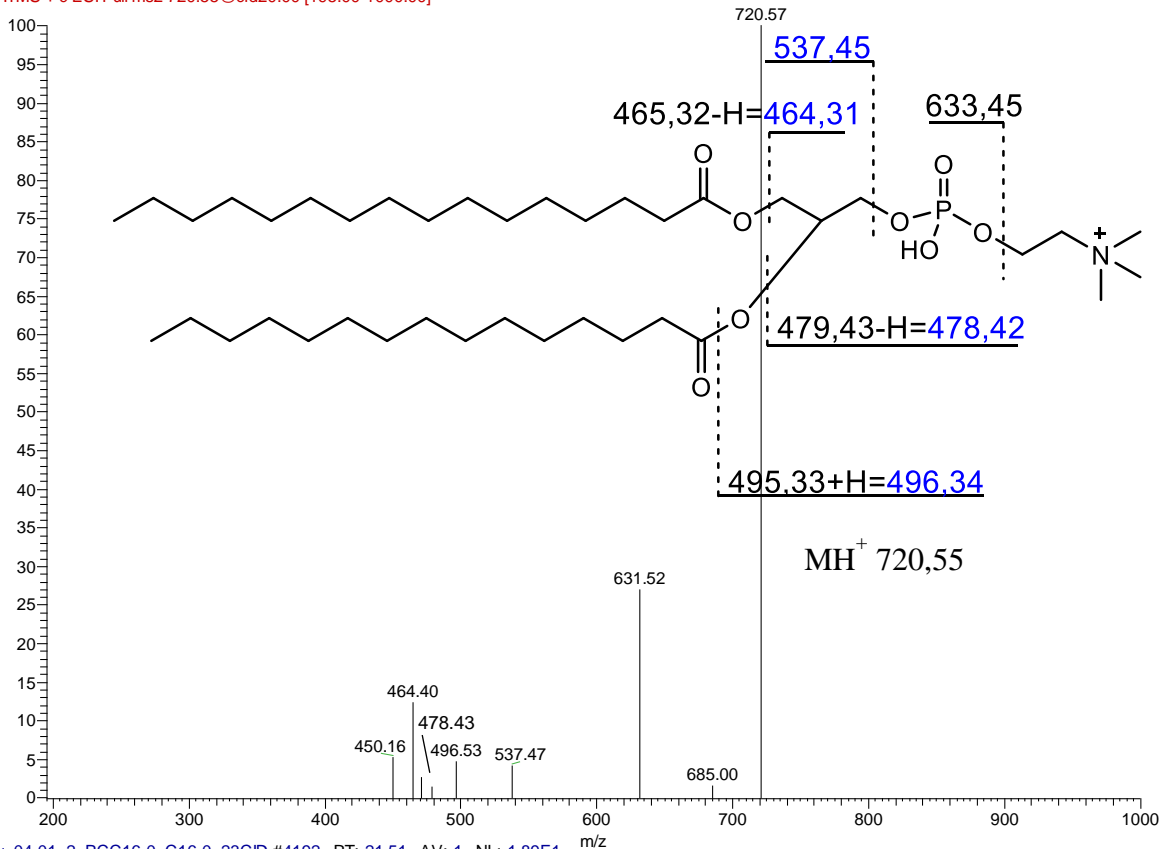


Liu_04-01_2_PCC14-0_C16-0_20CID #4240 RT: 21.67 AV: 1 NL: 1.14E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 706.54@cid20.00 [190.00-1000.00]

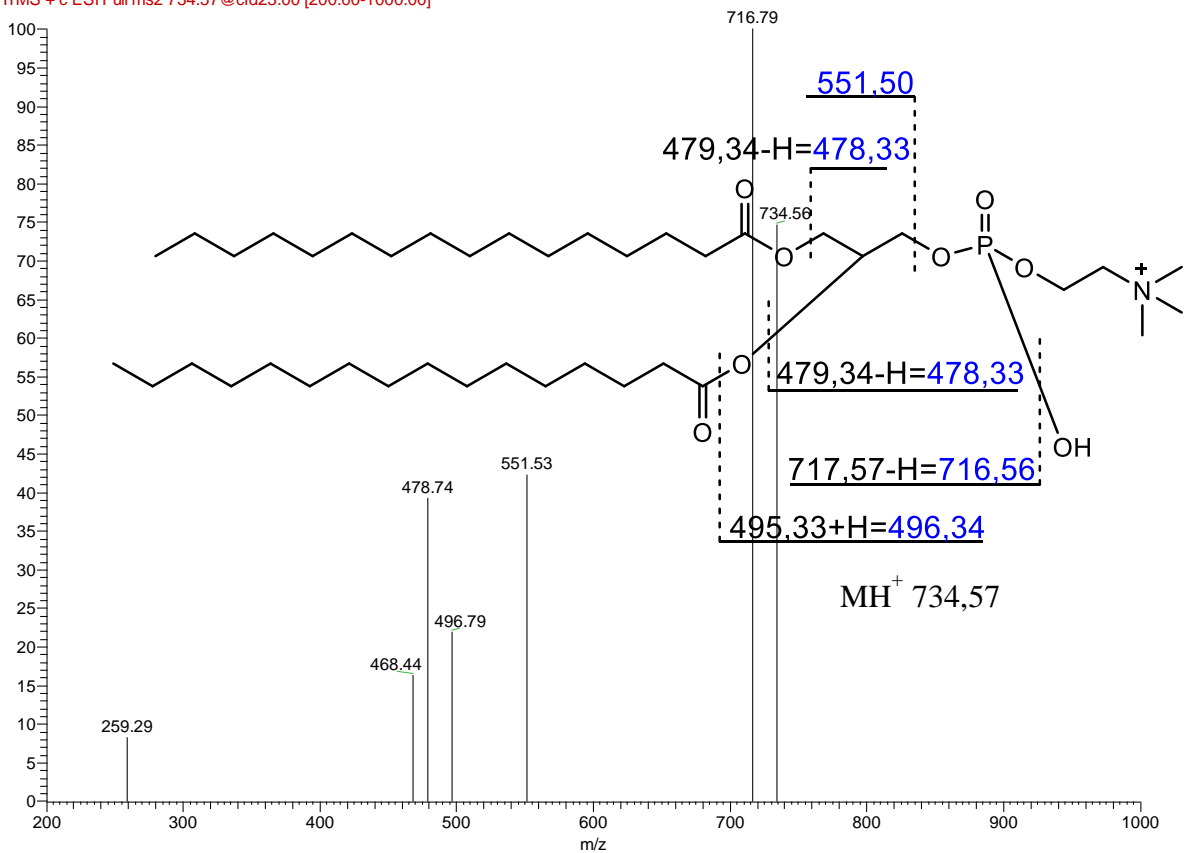


Figur V.13 CID-spekter og struktur for PC C14:0/C14:0 (øverst) og PC C14:0/C16:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Liu_07-02_1_PCC16-0_C15-0_20CID #4575 RT: 23.43 AV: 1 NL: 2.65E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 720.55@cid20.00 [195.00-1000.00]



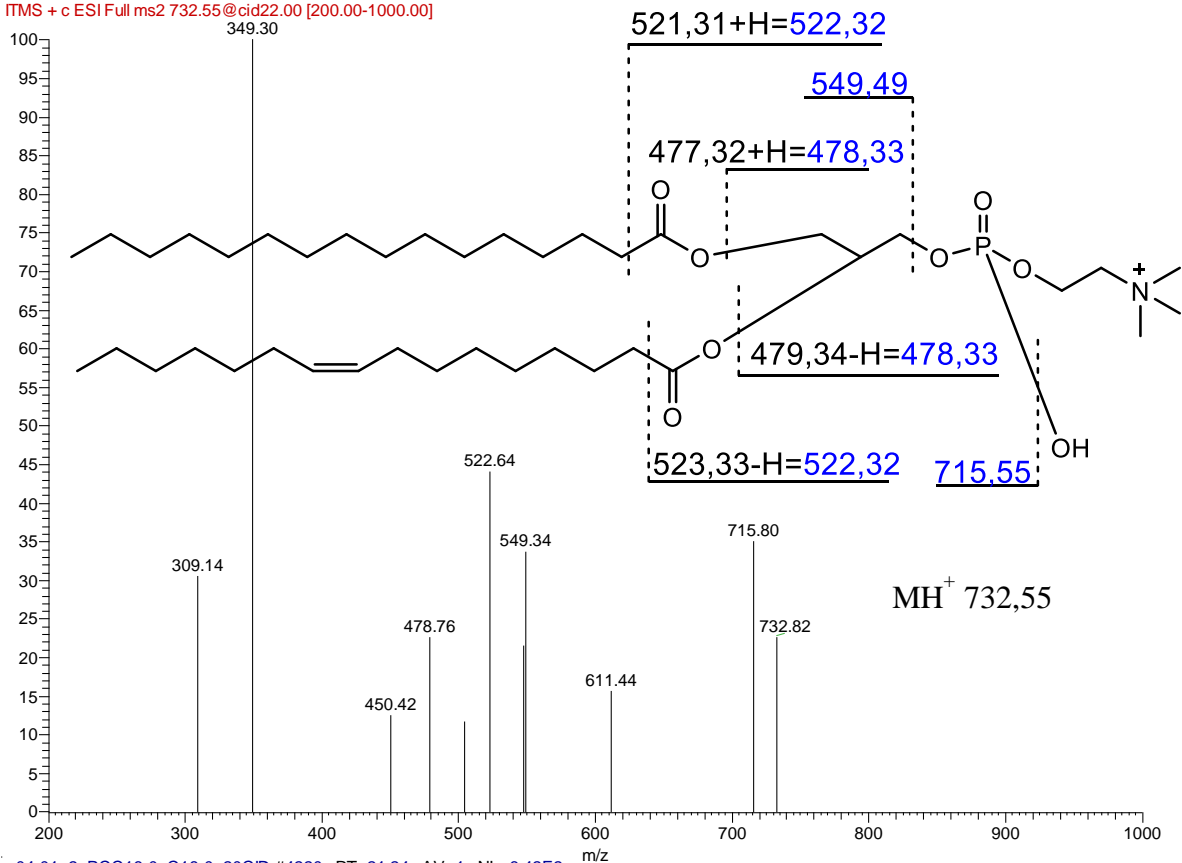
Liu_04-01_2_PCC16-0_C16-0_23CID #4192 RT: 21.51 AV: 1 NL: 1.89E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 734.57@cid23.00 [200.00-1000.00]



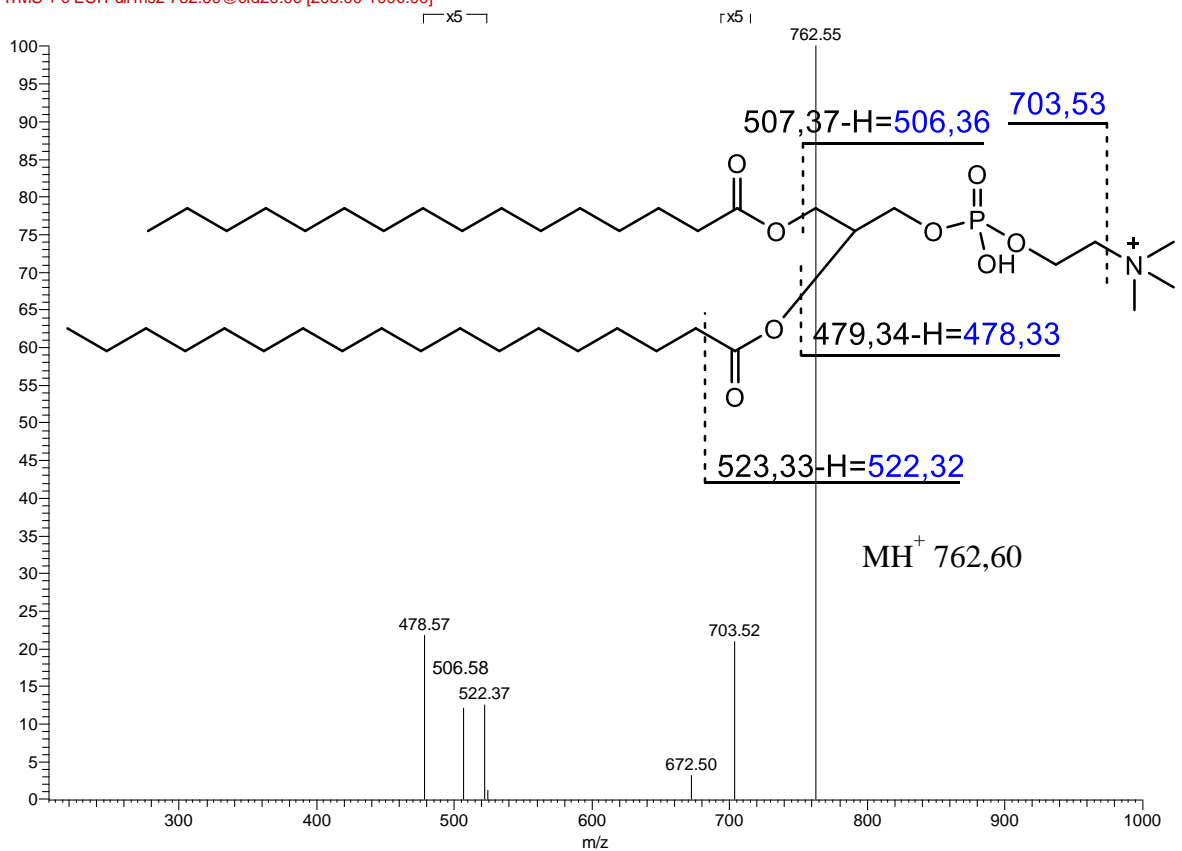
Figur V.14 CID-spekter og struktur for PC C16:0/C15:0 (øverst) og PC C16:0/C16:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liù_07-02_1_PCC16-0_C16-1_22CID #4181 RT: 21.44 AV: 1 NL: 8.02E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 732.55@cid22.00 [200.00-1000.00]

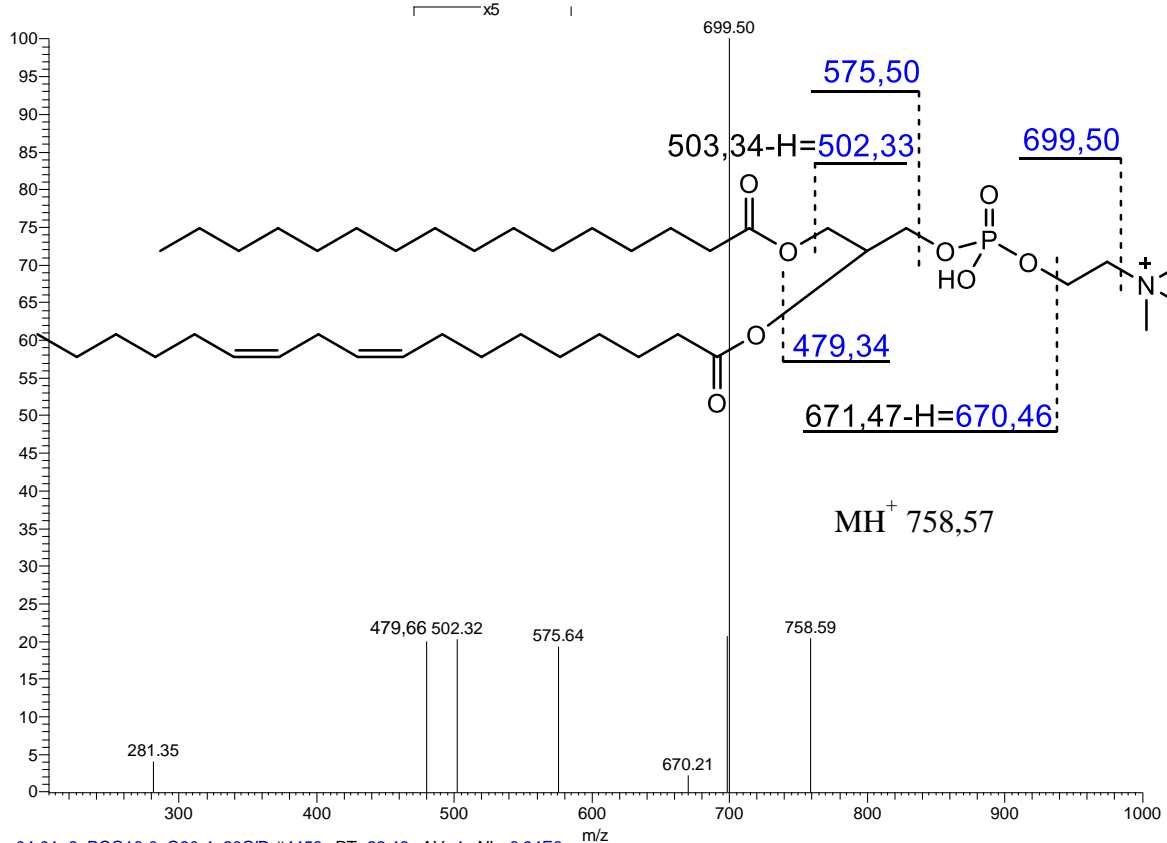


Liù_04-01_2_PCC16-0_C18-0_20CID #4220 RT: 21.24 AV: 1 NL: 6.42E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 762.60@cid20.00 [205.00-1000.00]

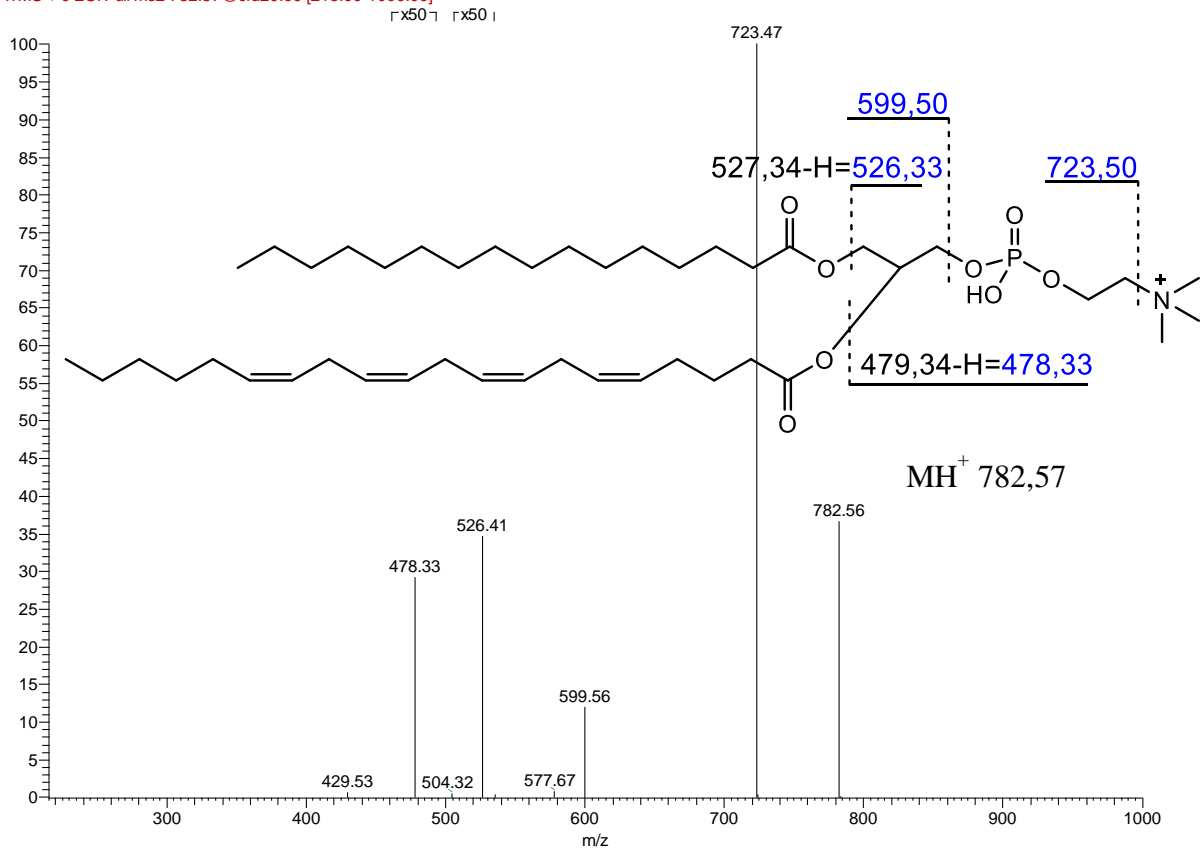


Figur V.15 CID-spekter og struktur for PC C16:0/C16:1 (øverst) og PC C16:0/C18:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Liu_04-01_2_PCC16-0_C18-2_20CID #4292 RT: 21.56 AV: 1 NL: 2.52E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 758.57@cid20.00 [205.00-1000.00]



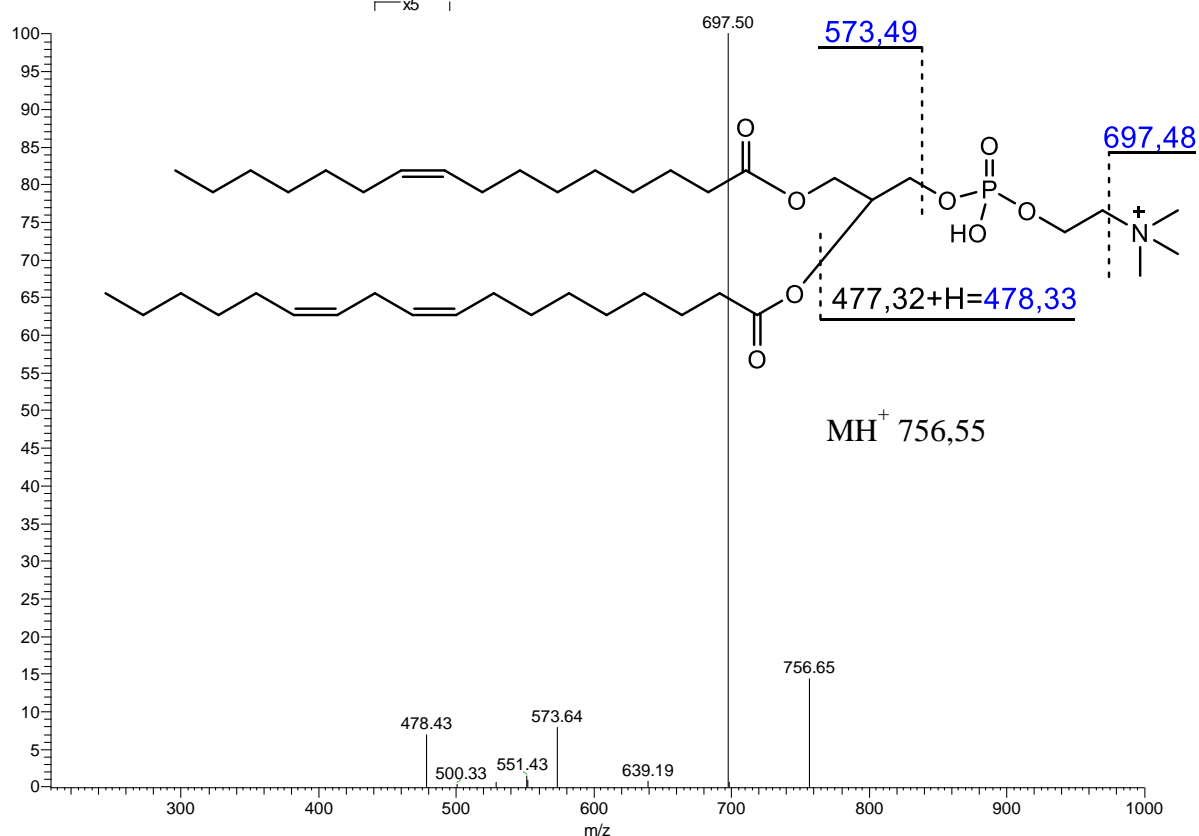
Liu_04-01_2_PCC16-0_C20-4_20CID #4458 RT: 22.48 AV: 1 NL: 6.94E3
 F: ITMS + c ESI Full ms2 782.57@cid20.00 [215.00-1000.00]



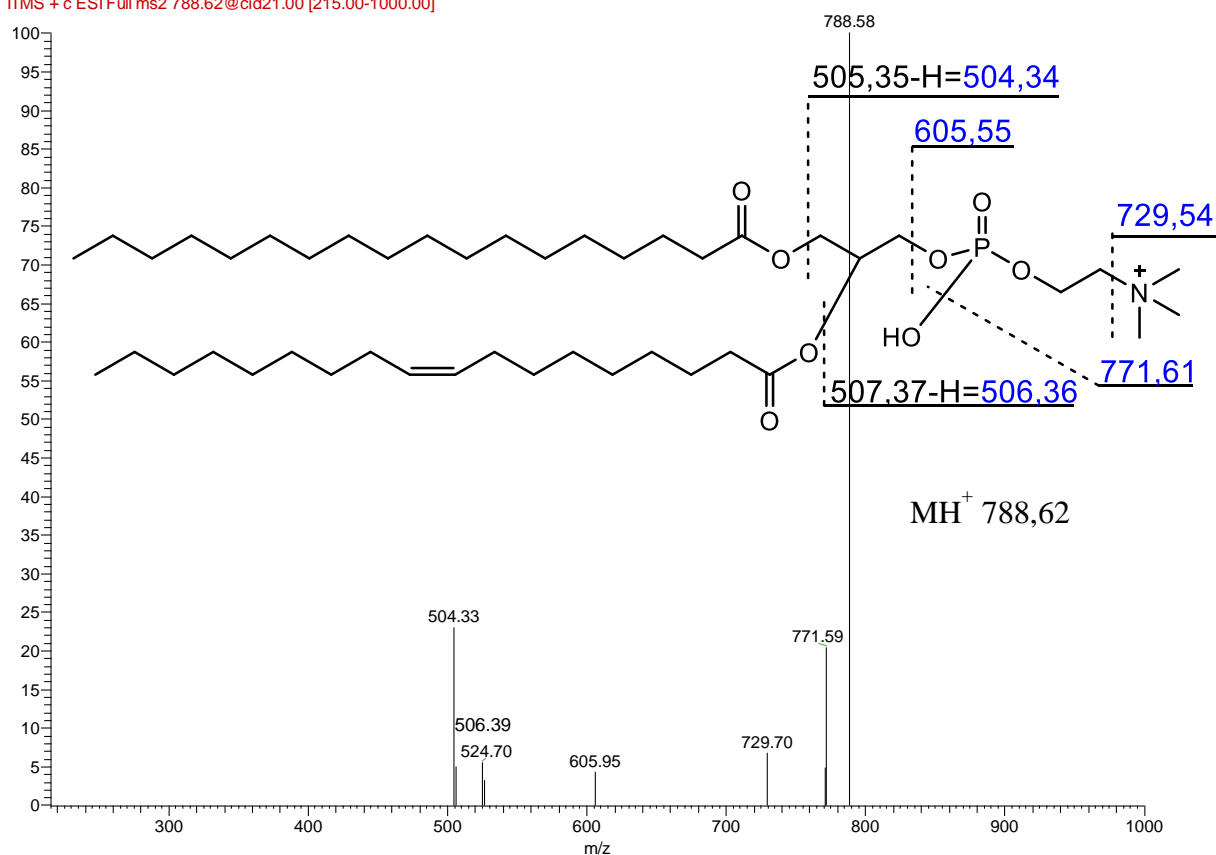
Figur V.16 CID-spekter og struktur for PC C16:0/C18:2 (øverst) og PC C16:0/C20:4 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_04-01_2_PCC16-1_C18-2_20CID #4280 RT: 21.50 AV: 1 NL: 5.23E3
 F: ITMS + c ESI Full ms2 756.55@cid20.00 [205.00-1000.00]

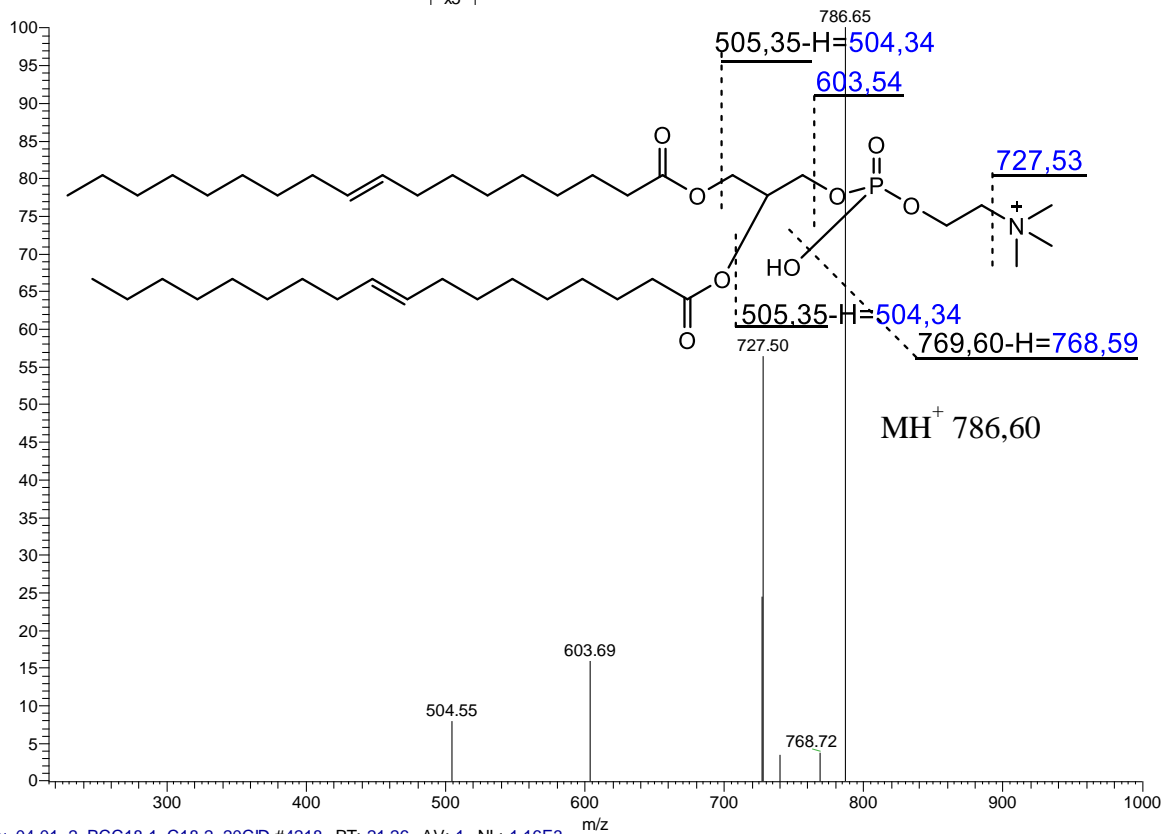


Liu_07-02_1_PCC18-0_C18-1_21CID #4180-4182 RT: 21.05-21.06 AV: 3 NL: 3.09E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 788.62@cid21.00 [215.00-1000.00]

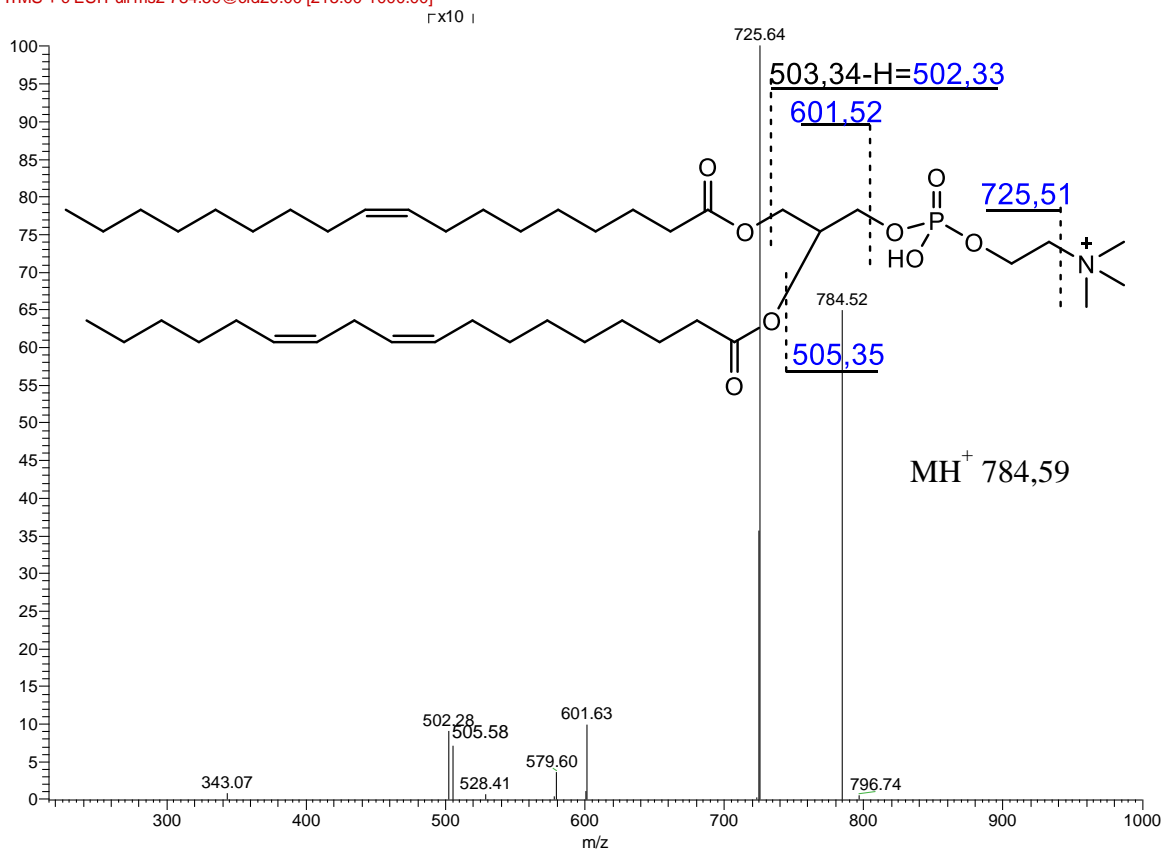


Figur V.17 CID-spekter og struktur for PC C16:0/C18:2 (øverst) og PC C16:0/C20:4 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Liu_04-01_2_PCC18-1_C18-1_20CID #4220 RT: 21.24 AV: 1 NL: 1.66E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 786.60@cid20.00 [215.00-1000.00]



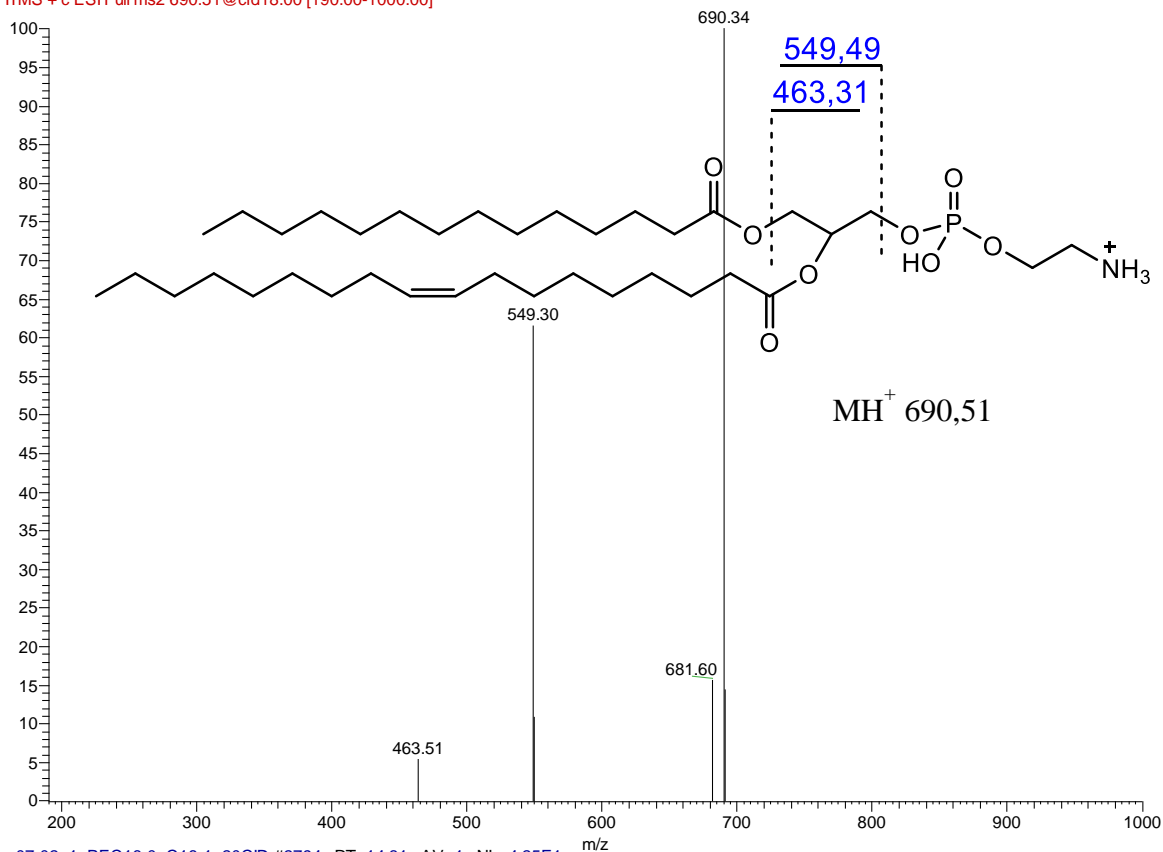
Liu_04-01_2_PCC18-1_C18-2_20CID #4218 RT: 21.26 AV: 1 NL: 1.16E3
 F: ITMS + c ESI Full ms2 784.59@cid20.00 [215.00-1000.00]



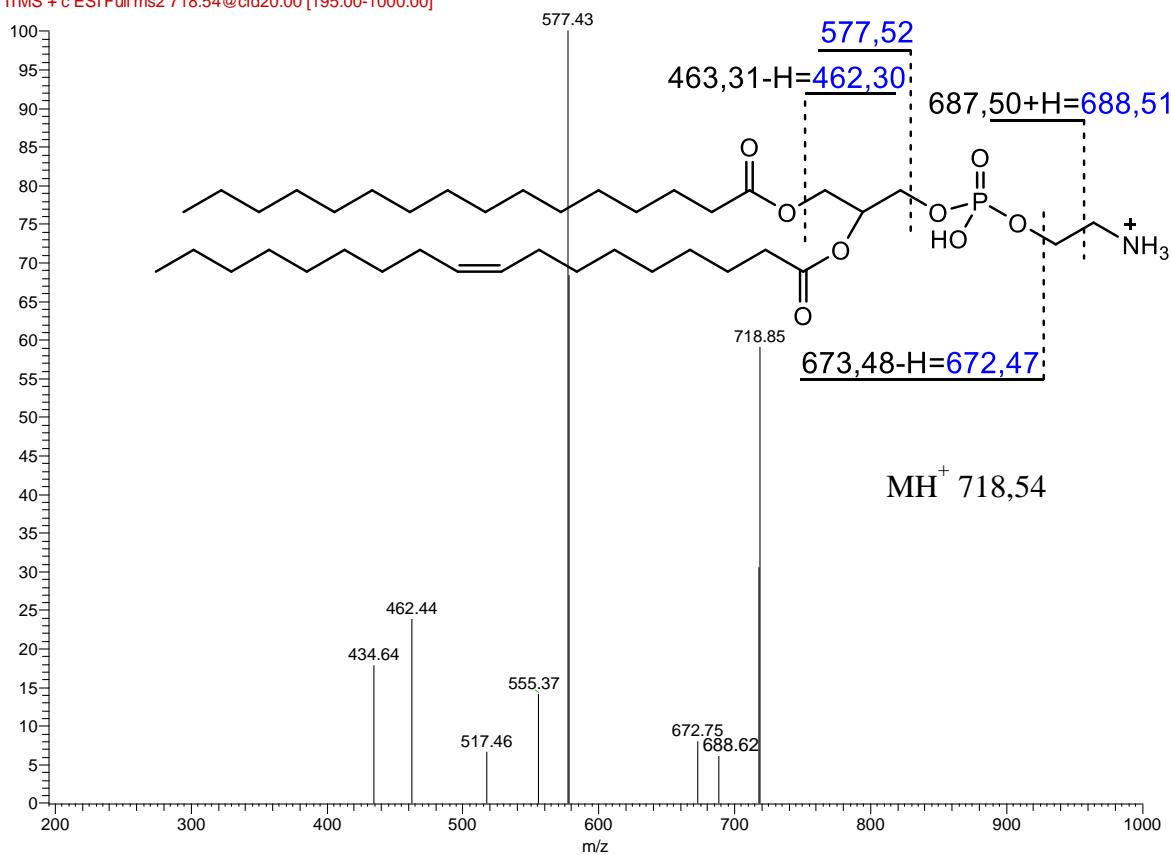
Figur V.18 CID-spekter og struktur for PC C18:1/C18:1 (øverst) og PC C18:1/C18:2 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_07-02_1_PEC14-0_C18-1_18CID #2789 RT: 14.20 AV: 1 NL: 9.23E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 690.51@cid18.00 [190.00-1000.00]

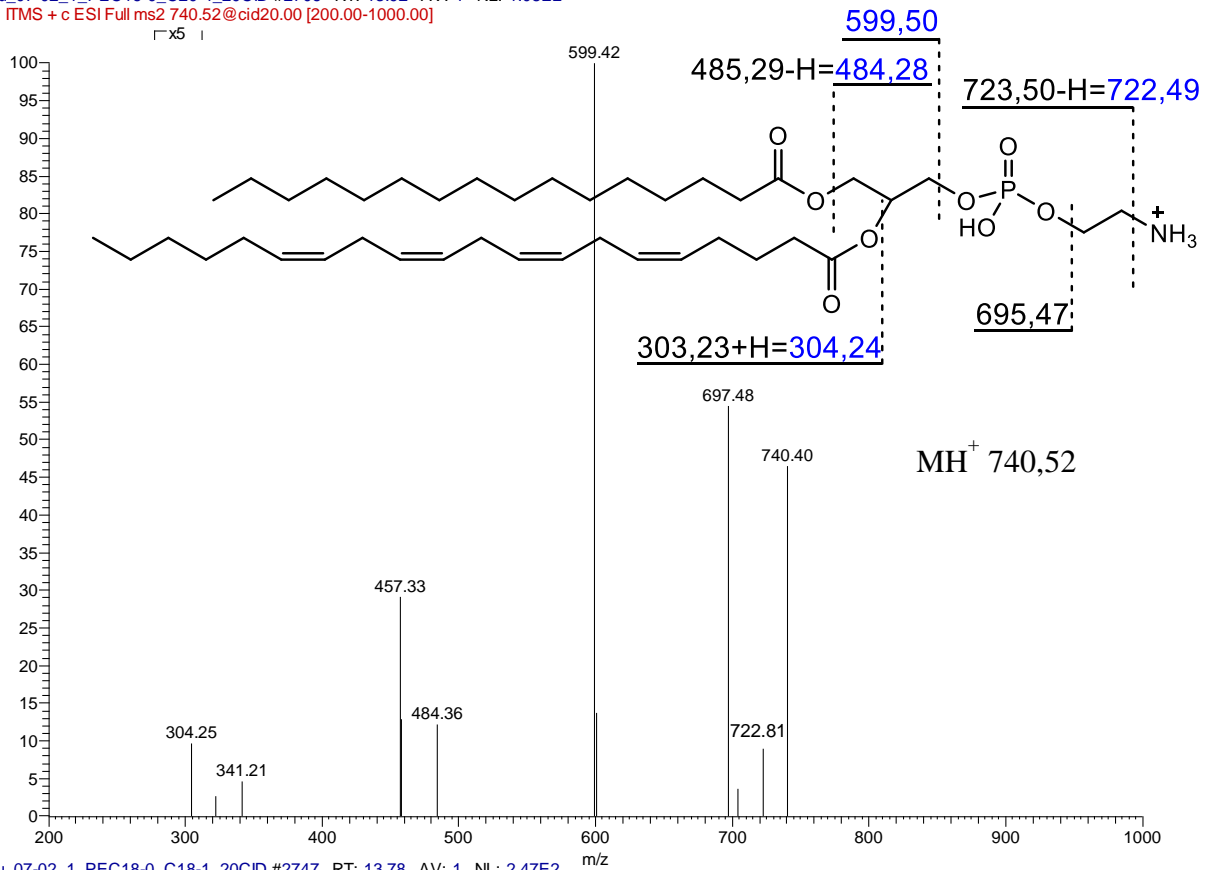


Liu_07-02_1_PEC16-0_C18-1_20CID #2794 RT: 14.31 AV: 1 NL: 4.25E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 718.54@cid20.00 [195.00-1000.00]

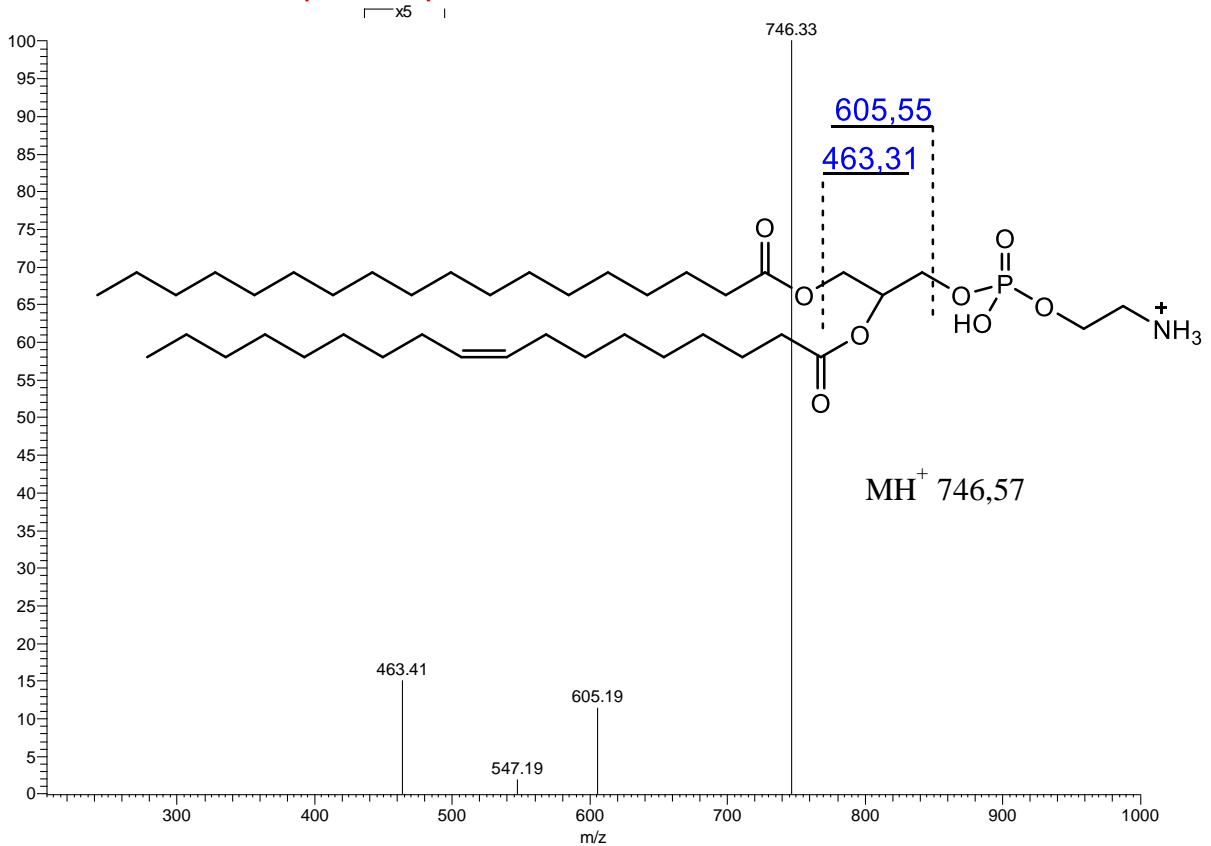


Figur V.19 CID-spekter og struktur for PE C14:0/C18:1 (øverst) og PE C16:0/C18:1 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Liu_07-02_1_PEC16-0_C20-4_20CID #2706 RT: 13.92 AV: 1 NL: 1.08E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 740.52@cid20.00 [200.00-1000.00]



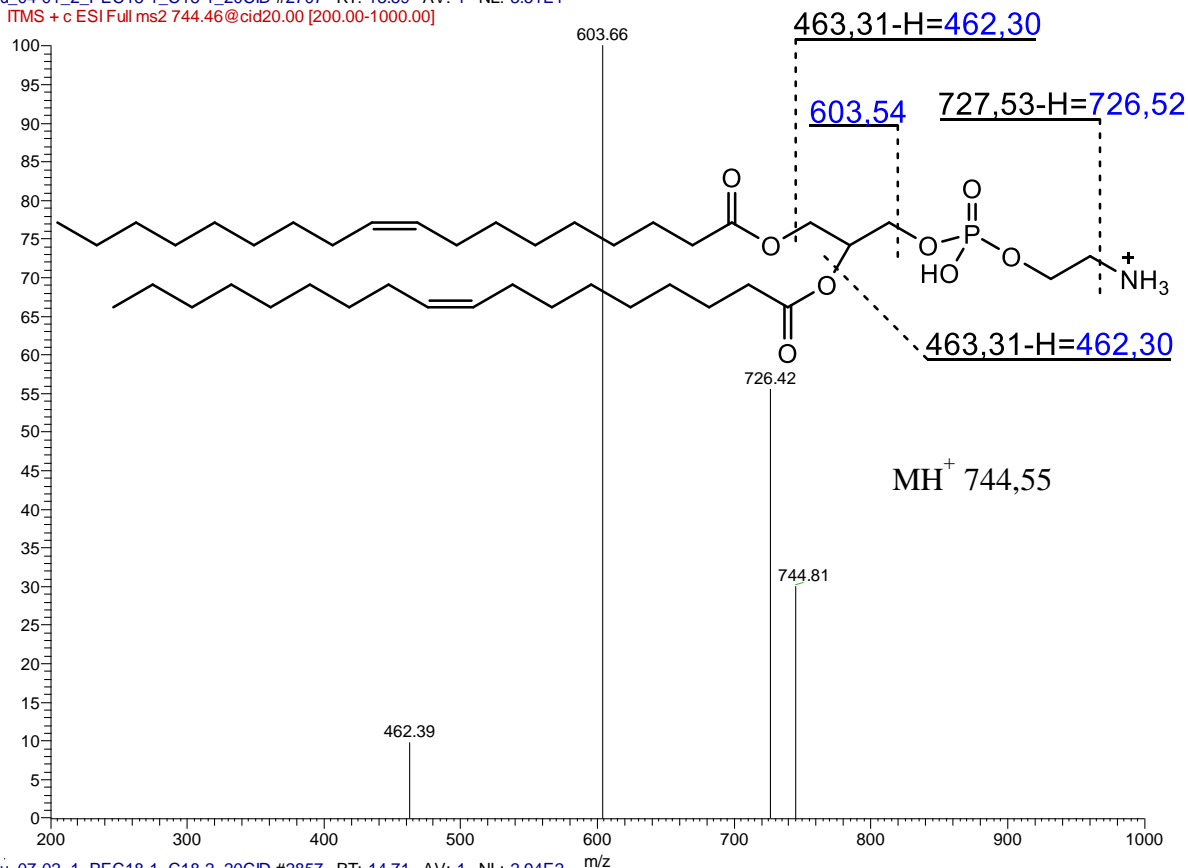
Liu_07-02_1_PEC18-0_C18-1_20CID #2747 RT: 13.78 AV: 1 NL: 2.47E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 746.57@cid18.00 [205.00-1000.00]



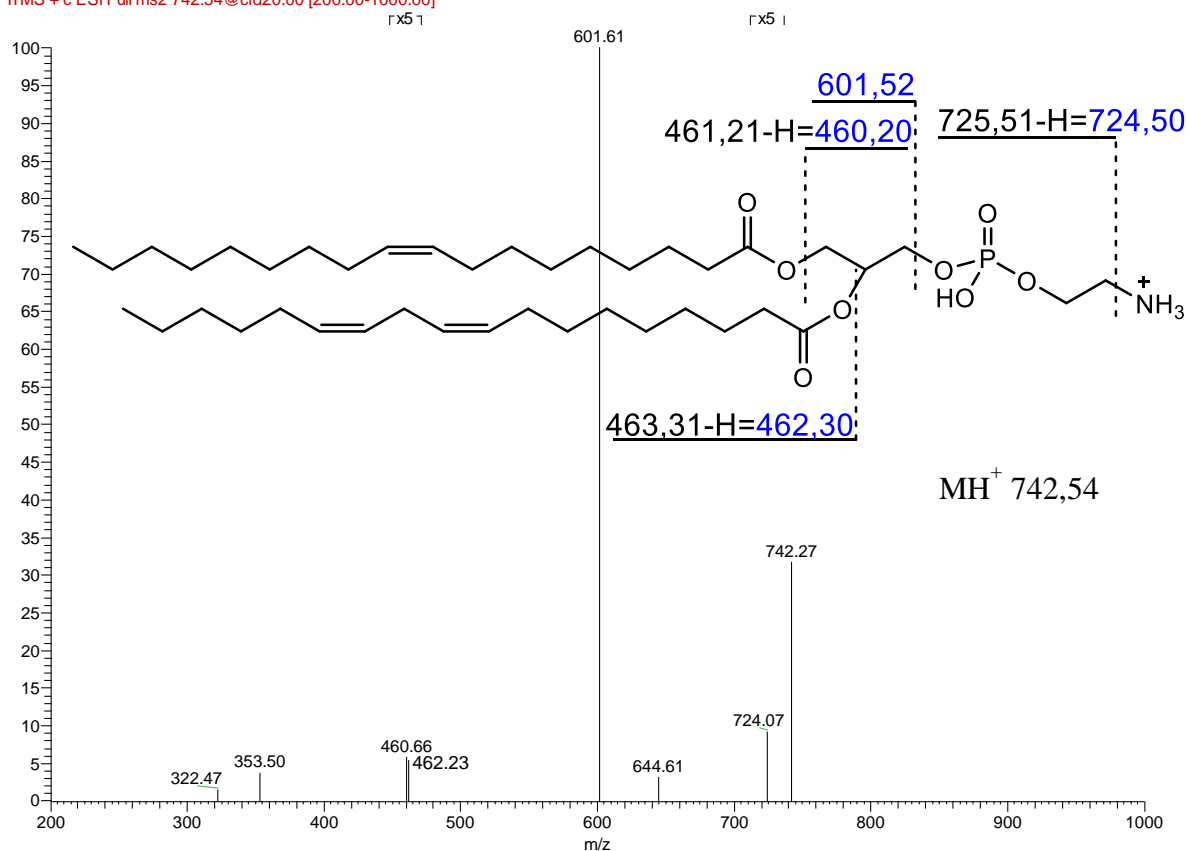
Figur V.20 CID-spekter og struktur for PE C16:0/C20:4 (øverst) og PE C18:0/C18:1 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_04-01_2_PEC18-1_C18-1_20CID #2707 RT: 13.59 AV: 1 NL: 3.51E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 744.46@cid20.00 [200.00-1000.00]

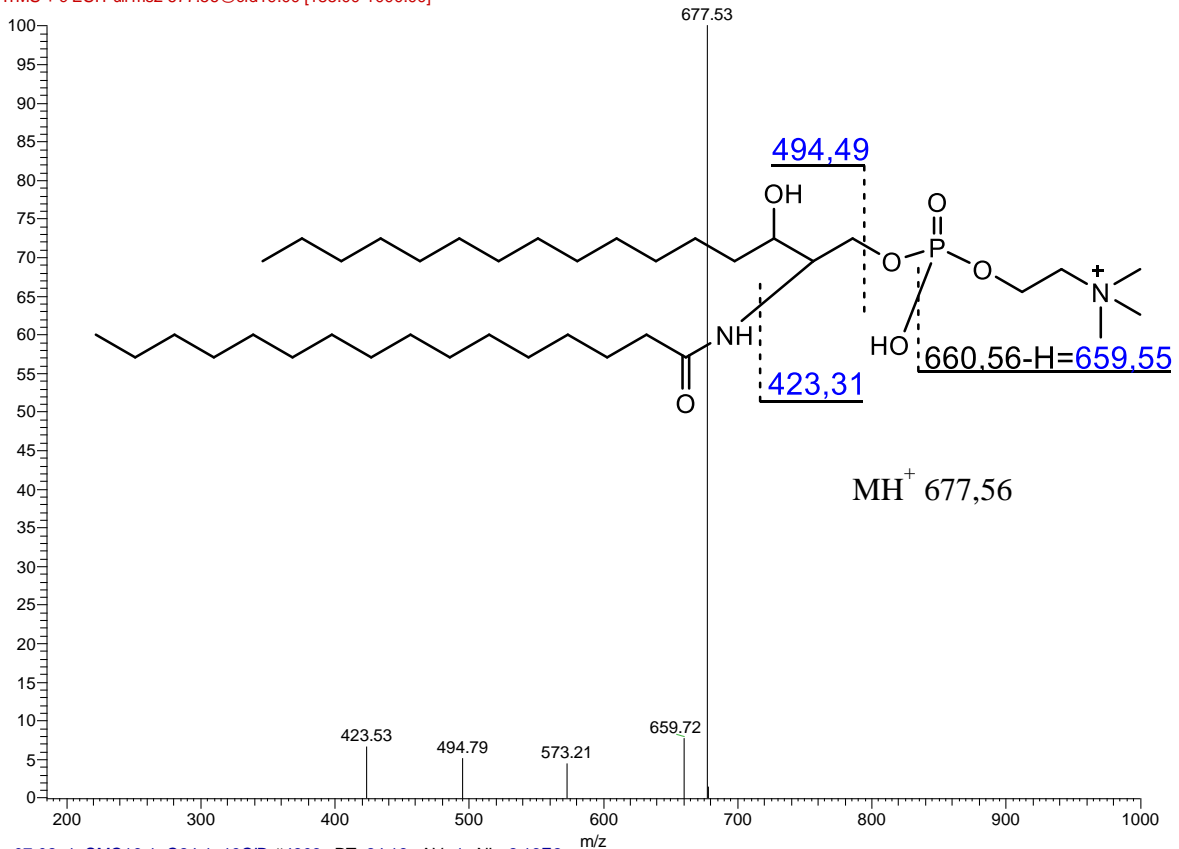


Liu_07-02_1_PEC18-1_C18-2_20CID #2857 RT: 14.71 AV: 1 NL: 2.94E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 742.54@cid20.00 [200.00-1000.00]

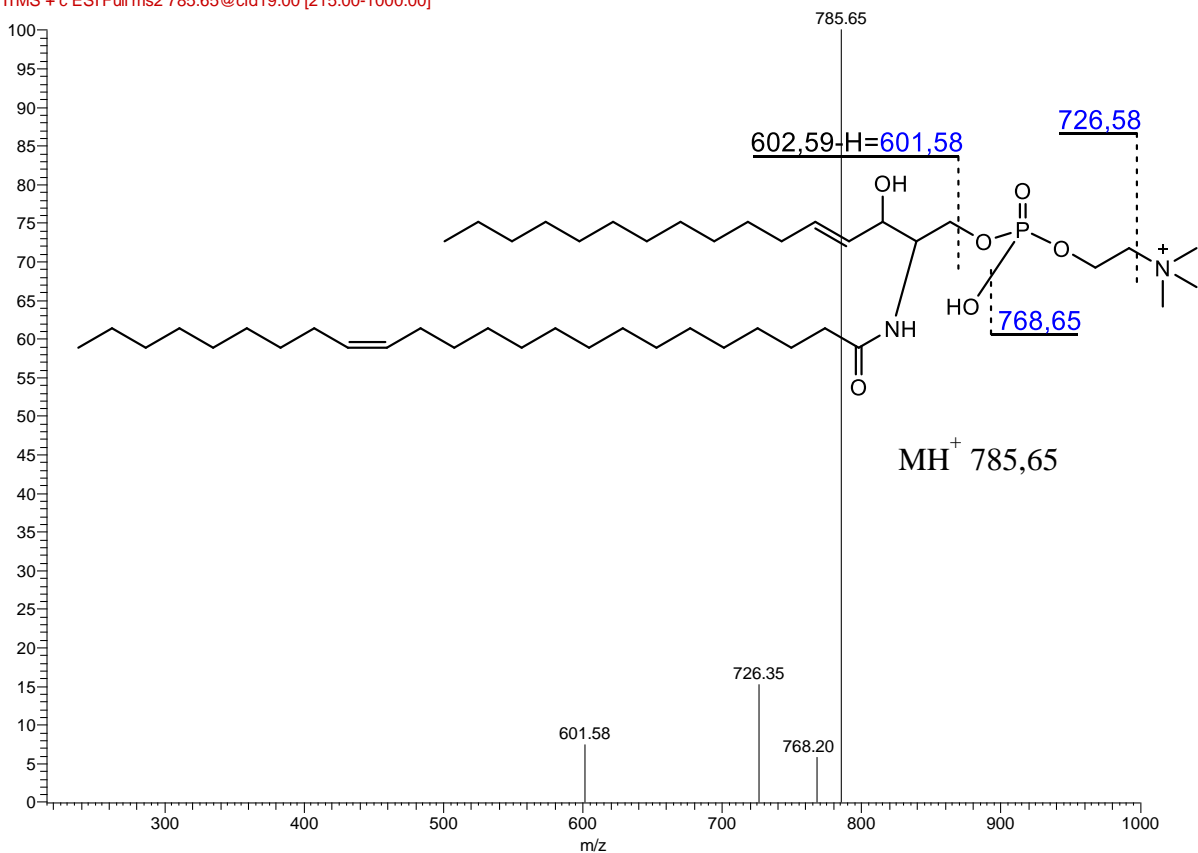


Figur V.21 CID-spekter og struktur for PE C18:1/C18:1 (øverst) og PE C18:1/C18:2 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Liu_07-02_1_SMC16-0_C16-0_19CID #4905 RT: 24.93 AV: 1 NL: 1.60E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 677.56@cid19.00 [185.00-1000.00]



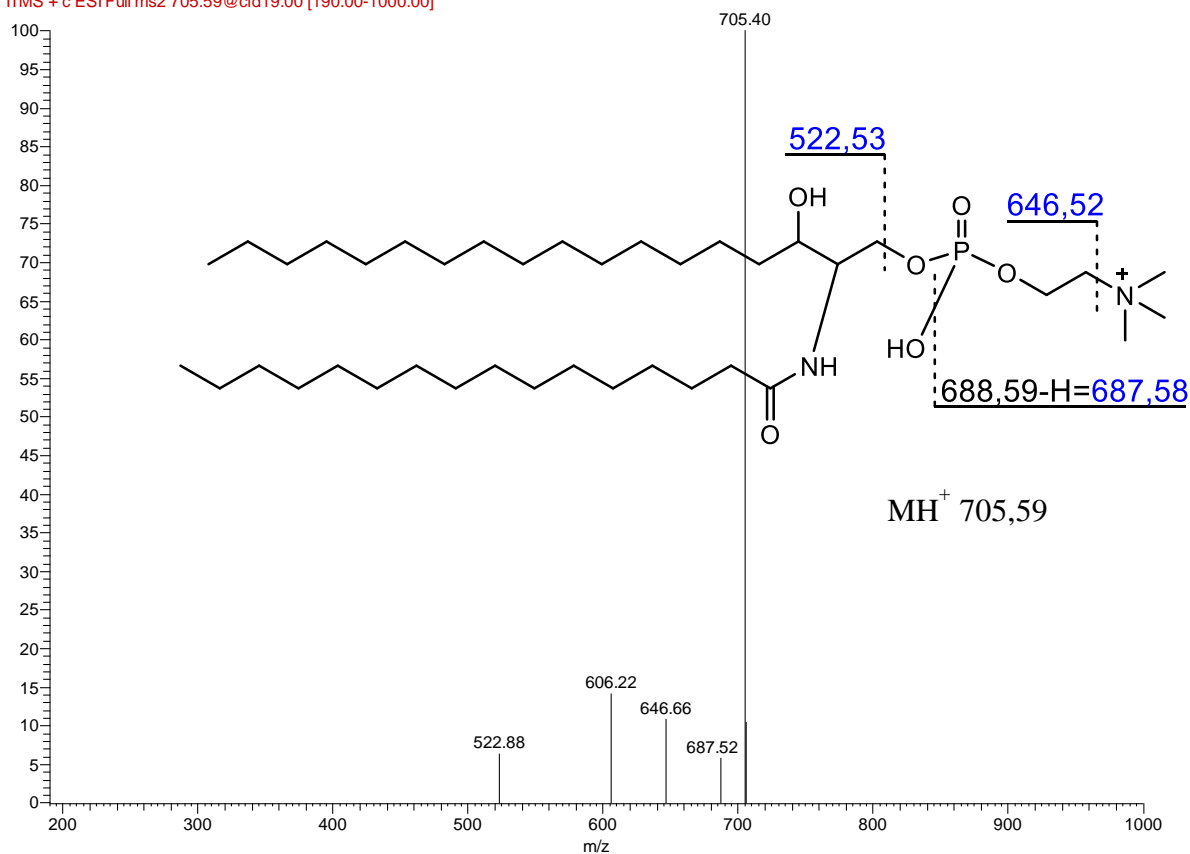
Liu_07-02_1_SMC16-1_C24-1_19CID #4803 RT: 24.18 AV: 1 NL: 2.13E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 785.65@cid19.00 [215.00-1000.00]



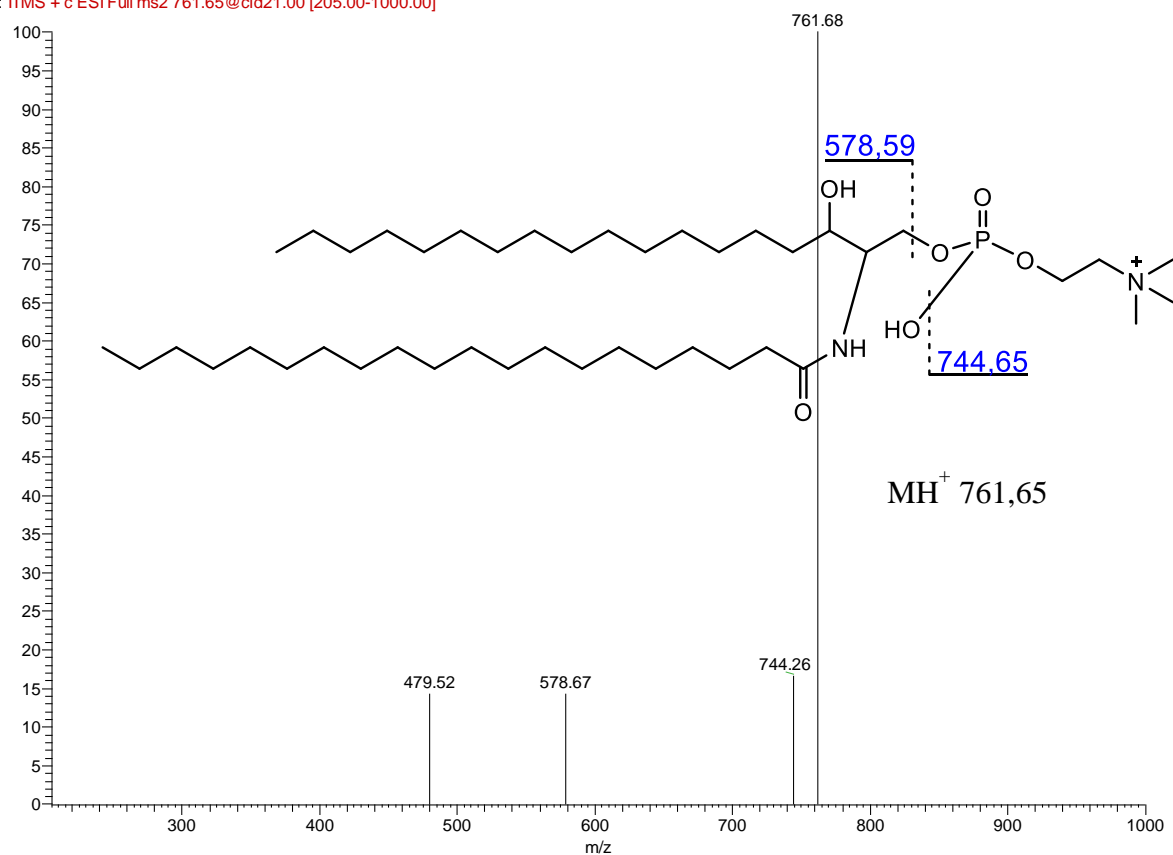
Figur V.22 CID-spekter og struktur for SM C16:0/C16:0 (øverst) og SM C16:1/C24:1 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_07-02_1_SMC18-0_C16-0_19CID #4826 RT: 24.66 AV: 1 NL: 5.22E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 705.59@cid19.00 [190.00-1000.00]

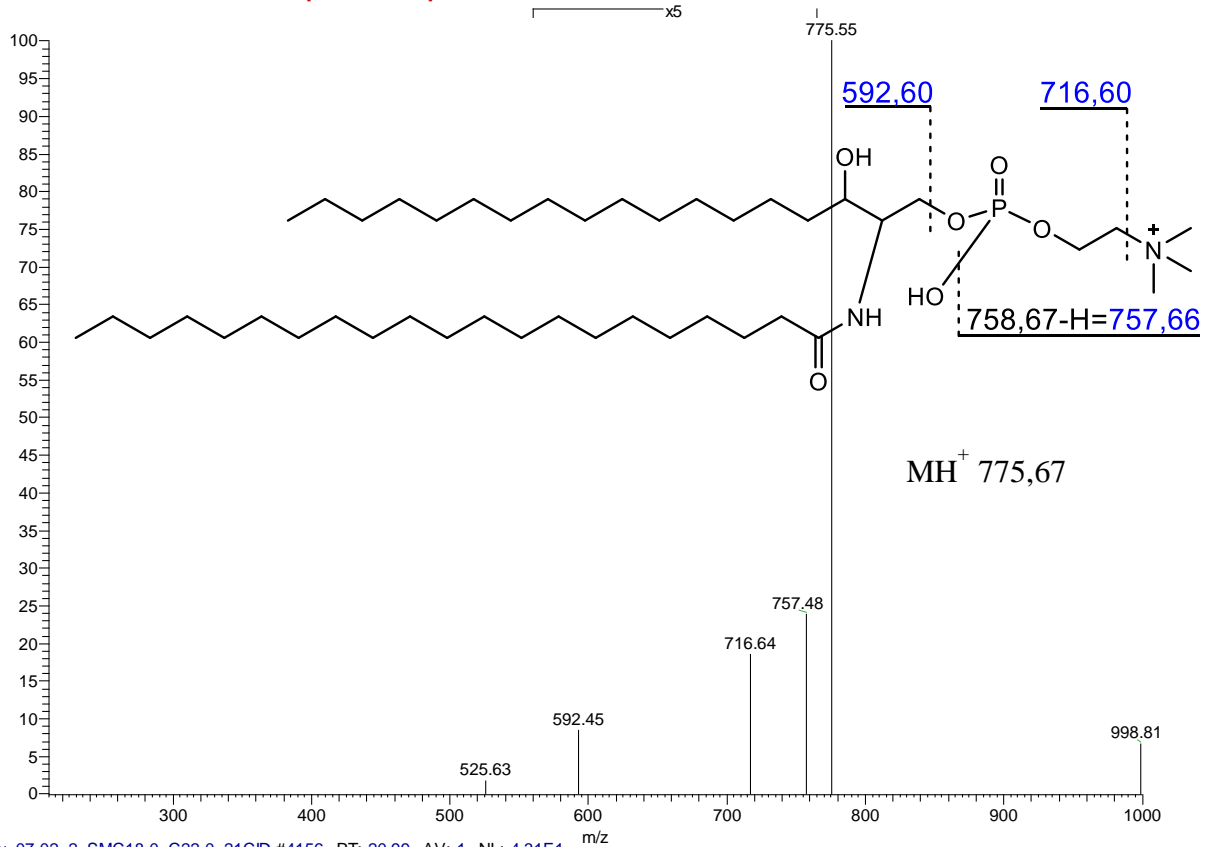


Liu_07-02_2_SMC18-0_C20-0_21CID #4222 RT: 21.24 AV: 1 NL: 5.85E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 761.65@cid21.00 [205.00-1000.00]

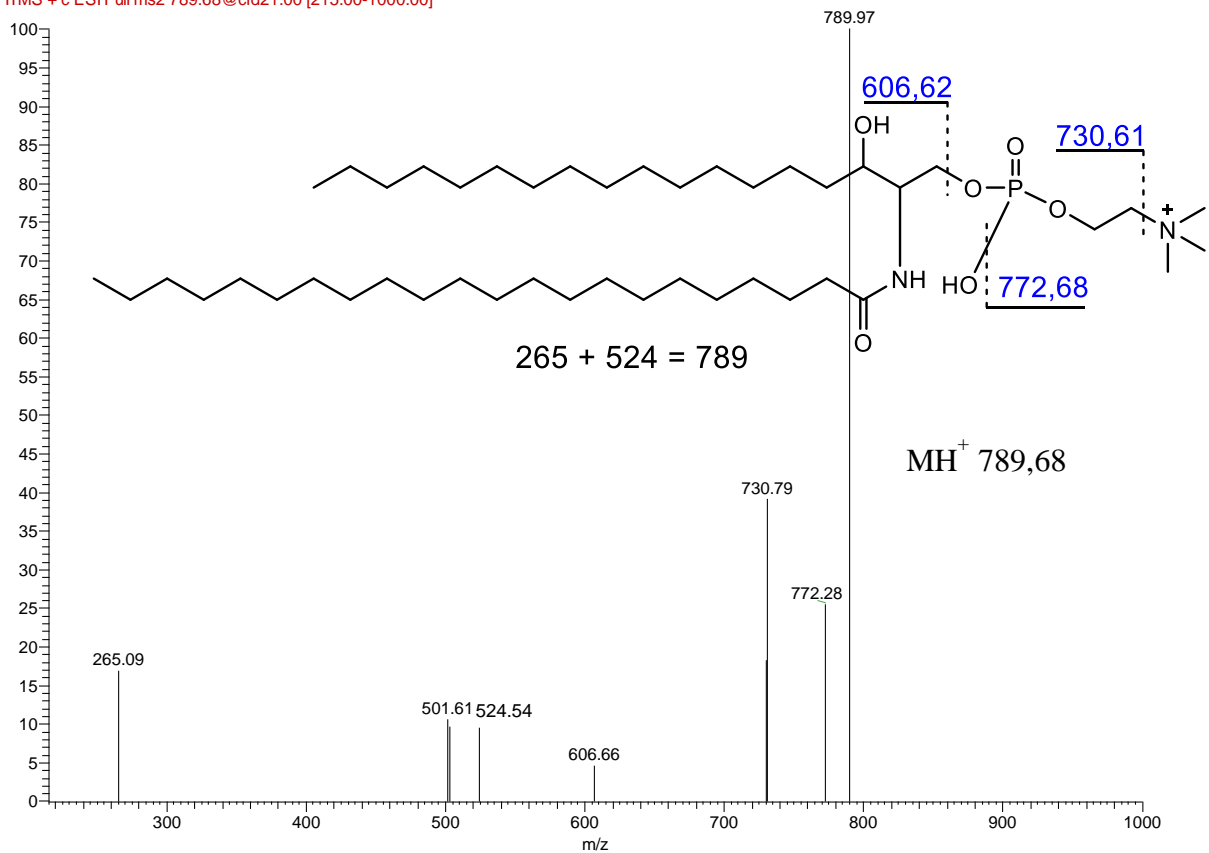


Figur V.23 CID-spekter og struktur for SM C18:0/C16:0 (øverst) og SM C18:0/C20:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

LiU_07-02_2_SMC18-0_C21-0_20CID #4501 RT: 22.69 AV: 1 NL: 1.69E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 775.67@cid20.00 [210.00-1000.00]



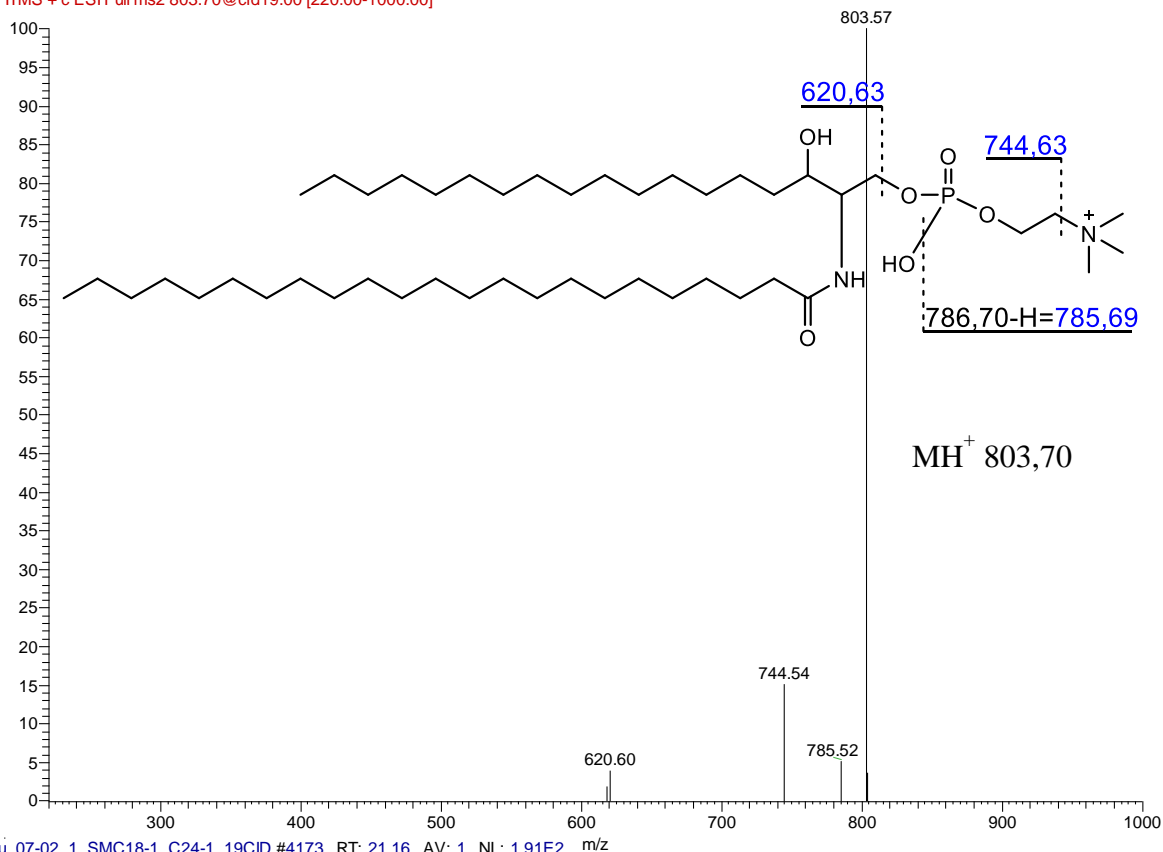
LiU_07-02_2_SMC18-0_C22-0_21CID #4156 RT: 20.99 AV: 1 NL: 4.31E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 789.68@cid21.00 [215.00-1000.00]



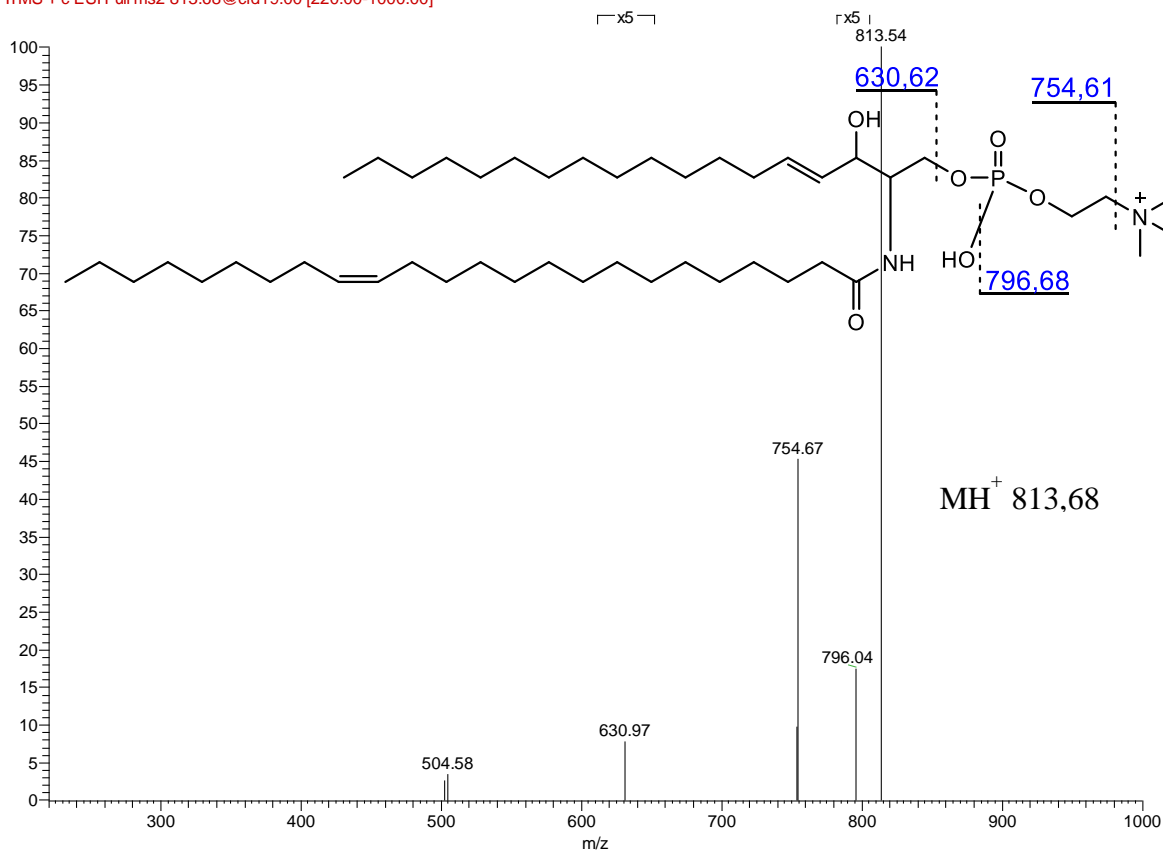
Figur V.24 CID-spekter og struktur for SM C18:0/C21:0 (øverst) og SM C18:0/C22:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_07-02_1_SMC18-0_C23-0_19CID #4179 RT: 21.15 AV: 1 NL: 1.27E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 803.70@cid19.00 [220.00-1000.00]

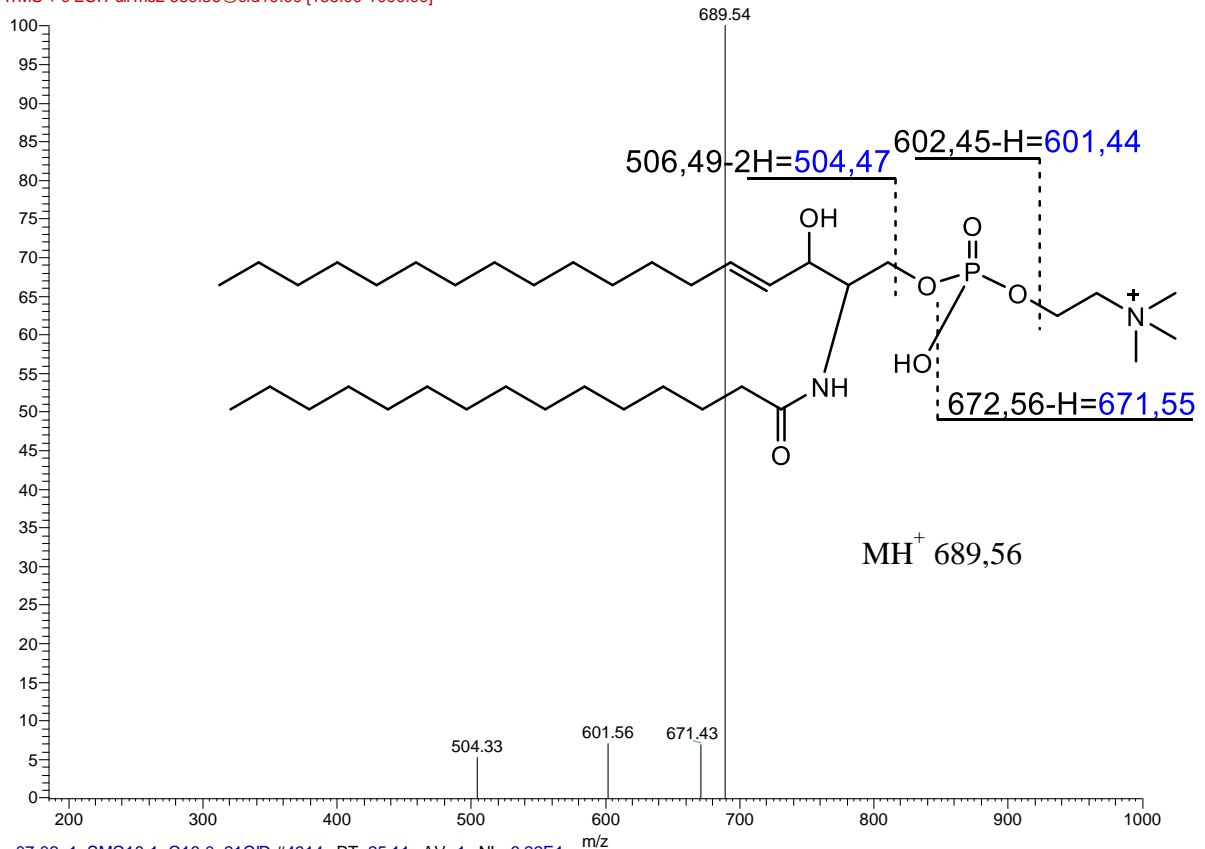


Liu_07-02_1_SMC18-1_C24-1_19CID #4173 RT: 21.16 AV: 1 NL: 1.91E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 813.68@cid19.00 [220.00-1000.00]

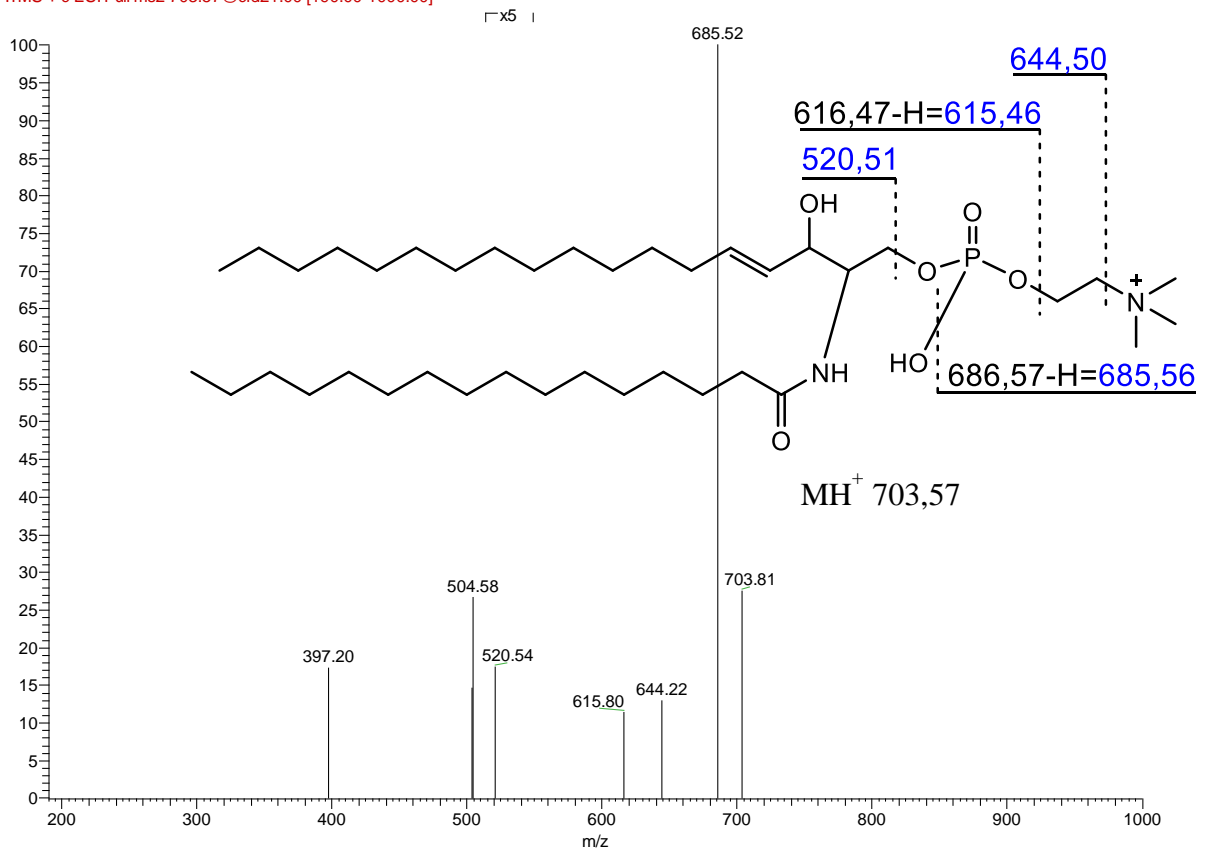


Figur V.25 CID-spekter og struktur for SM C18:0/C23:0 (øverst) og SM C18:1/C24:1 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Liu_07-02_1_SMC18-1_C15-0_19CID #4933 RT: 25.15 AV: 1 NL: 1.90E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 689.56@cid19.00 [185.00-1000.00]



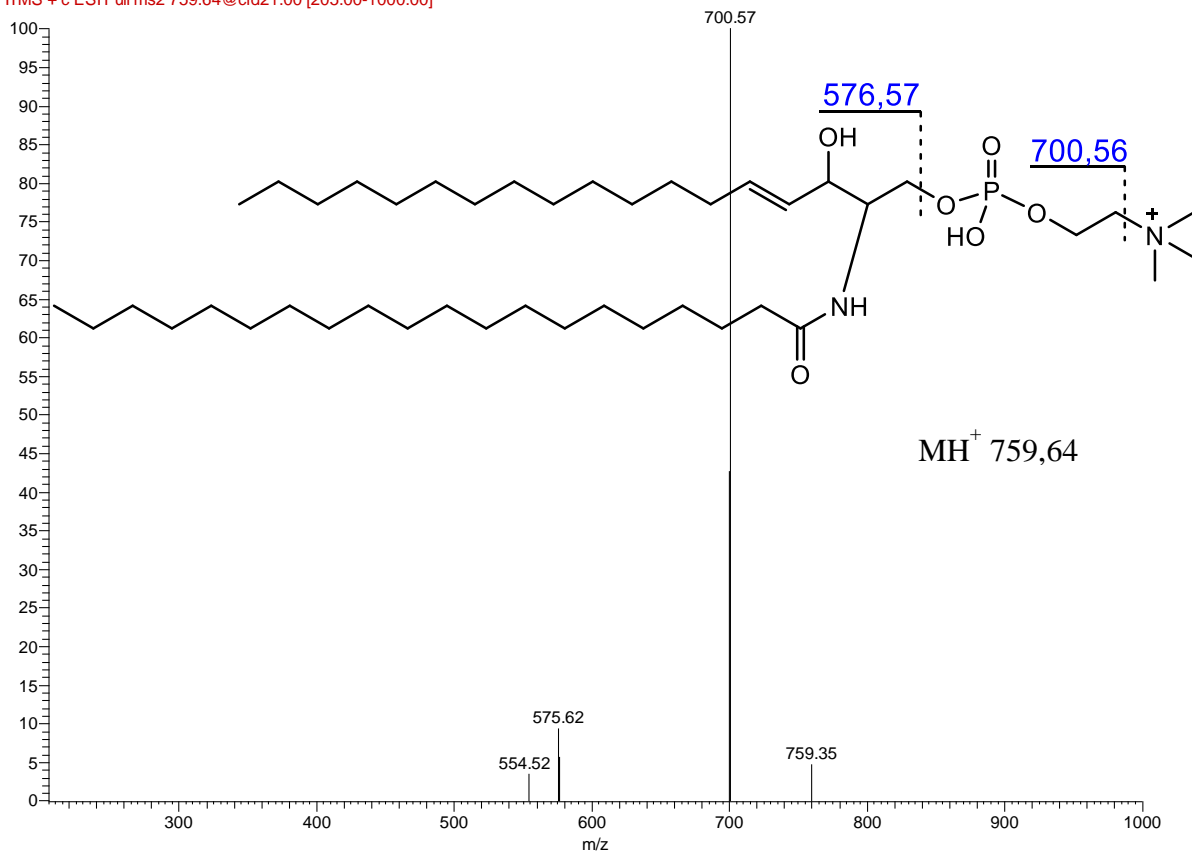
Liu_07-02_1_SMC18-1_C16-0_21CID #4914 RT: 25.11 AV: 1 NL: 6.22E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 703.57@cid21.00 [190.00-1000.00]



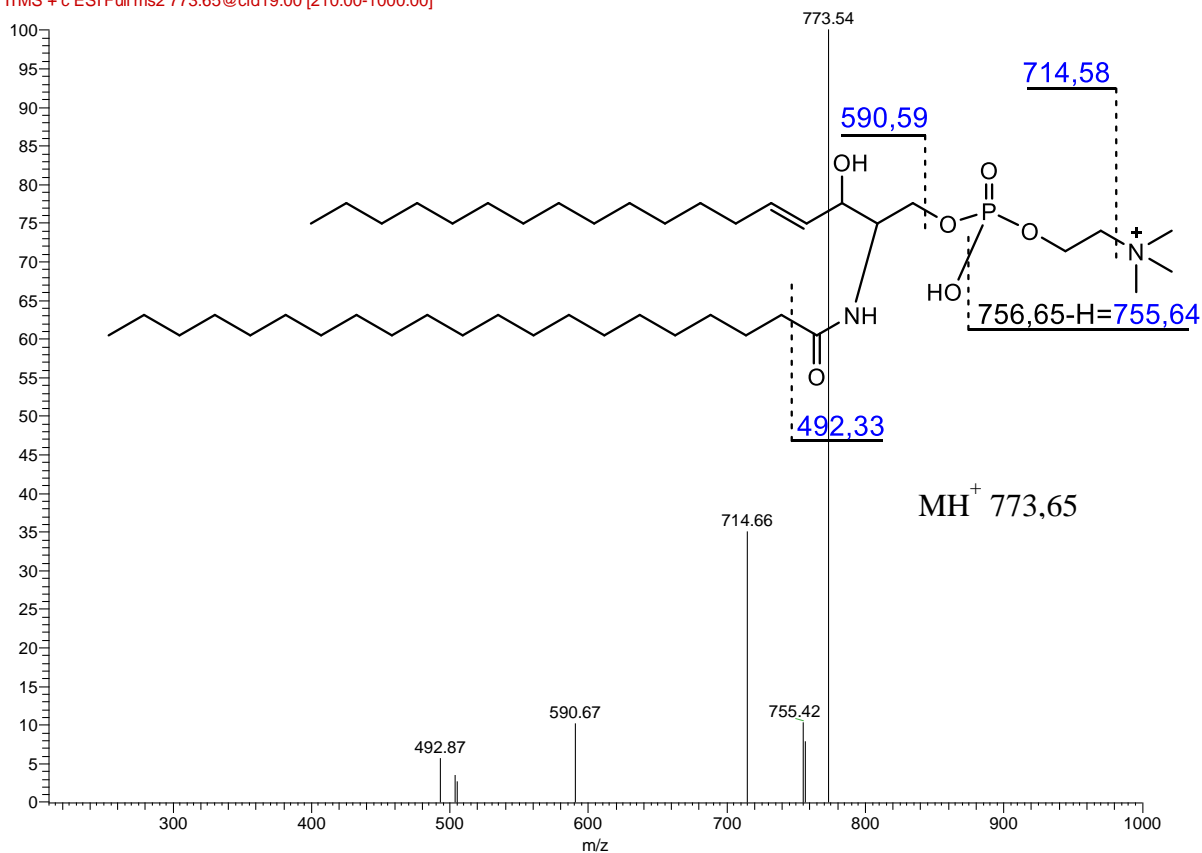
Figur V.26 CID-spekter og struktur for SM C18:1/C15:0 (øverst) og SM C18:1/C16:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_07-02_1_SMC18-1_C20-0_21CID#4326 RT: 21.69 AV: 1 NL: 1.41E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 759.64@cid21.00 [205.00-1000.00]

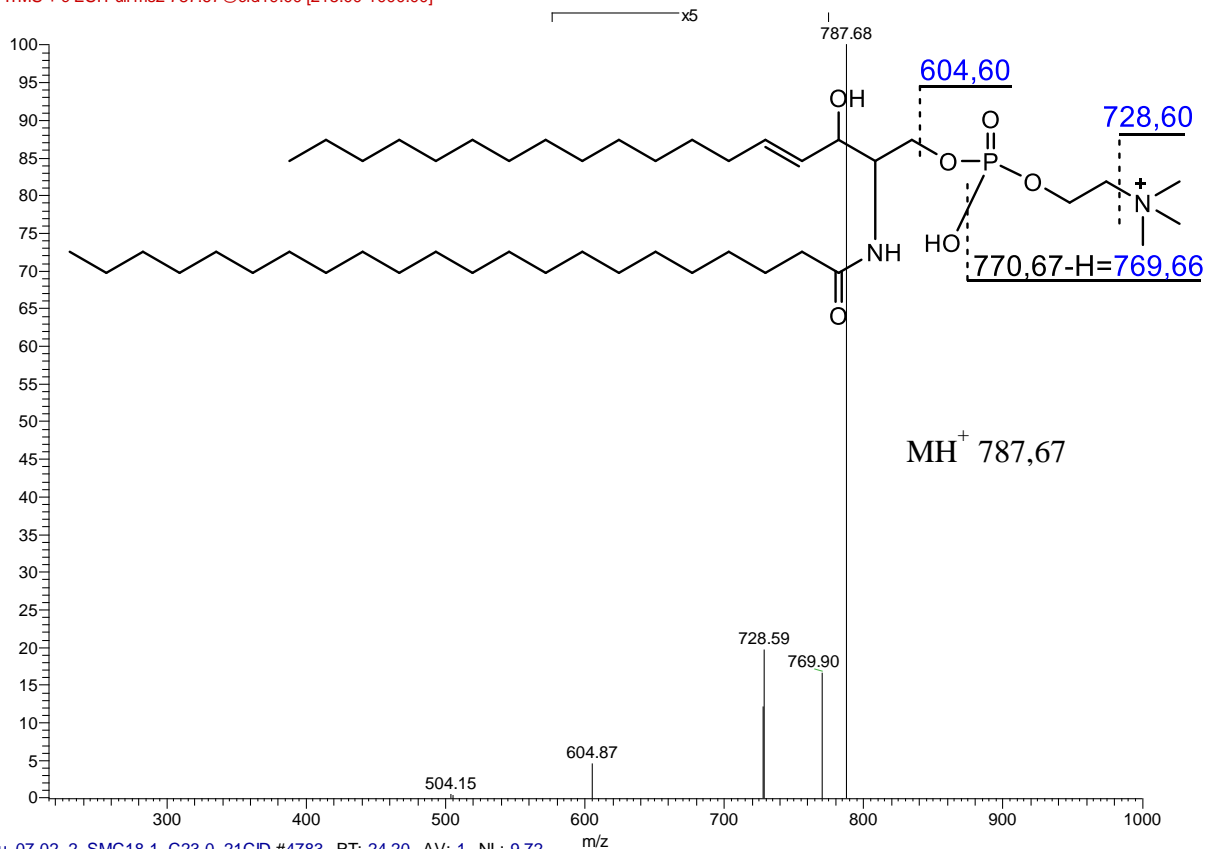


Liu_07-02_1_SMC18-1_C21-0_19CID#4263 RT: 21.49 AV: 1 NL: 1.57E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 773.65@cid19.00 [210.00-1000.00]

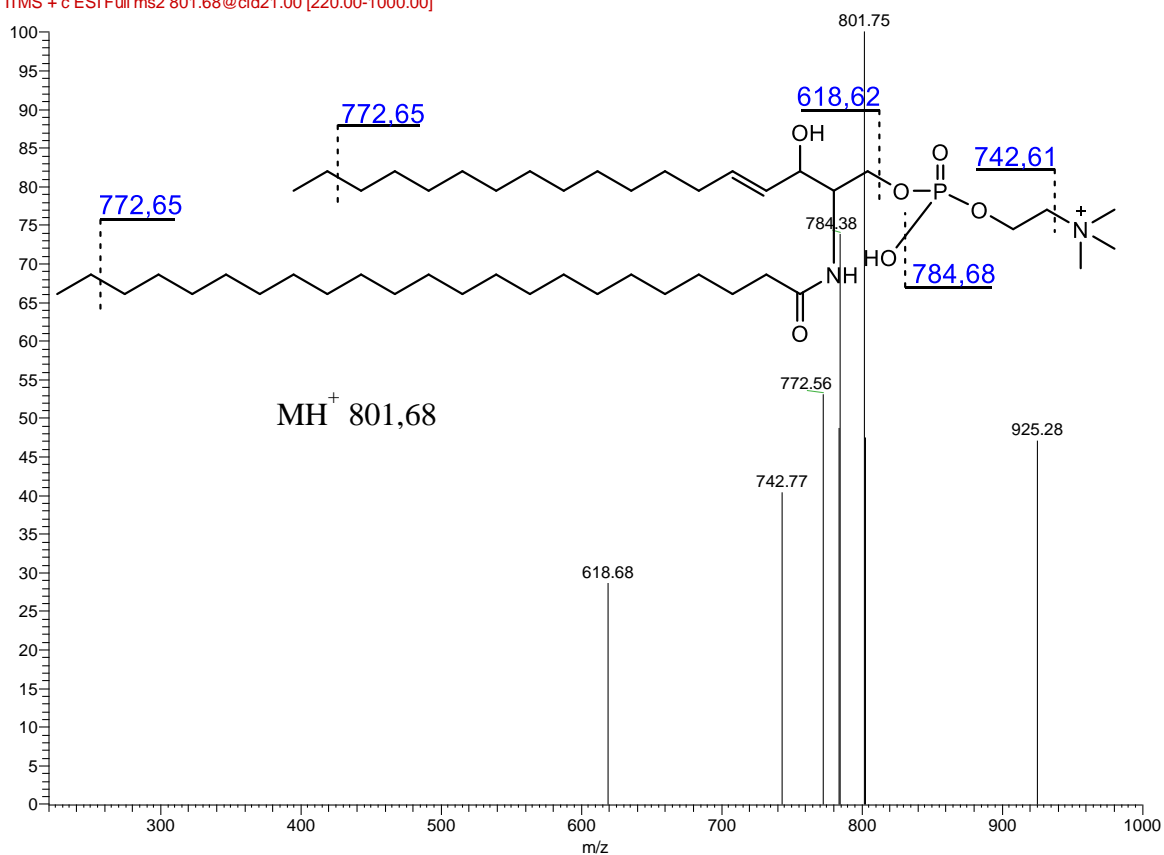


Figur V.27 CID-spekter og struktur for SM C18:1/C20:0 (øverst) og SM C18:1/C21:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

LiU_07-02_1_SMC18-1_C22-0_19CID #4255 RT: 21.38 AV: 1 NL: 7.23E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 787.67@cid19.00 [215.00-1000.00]



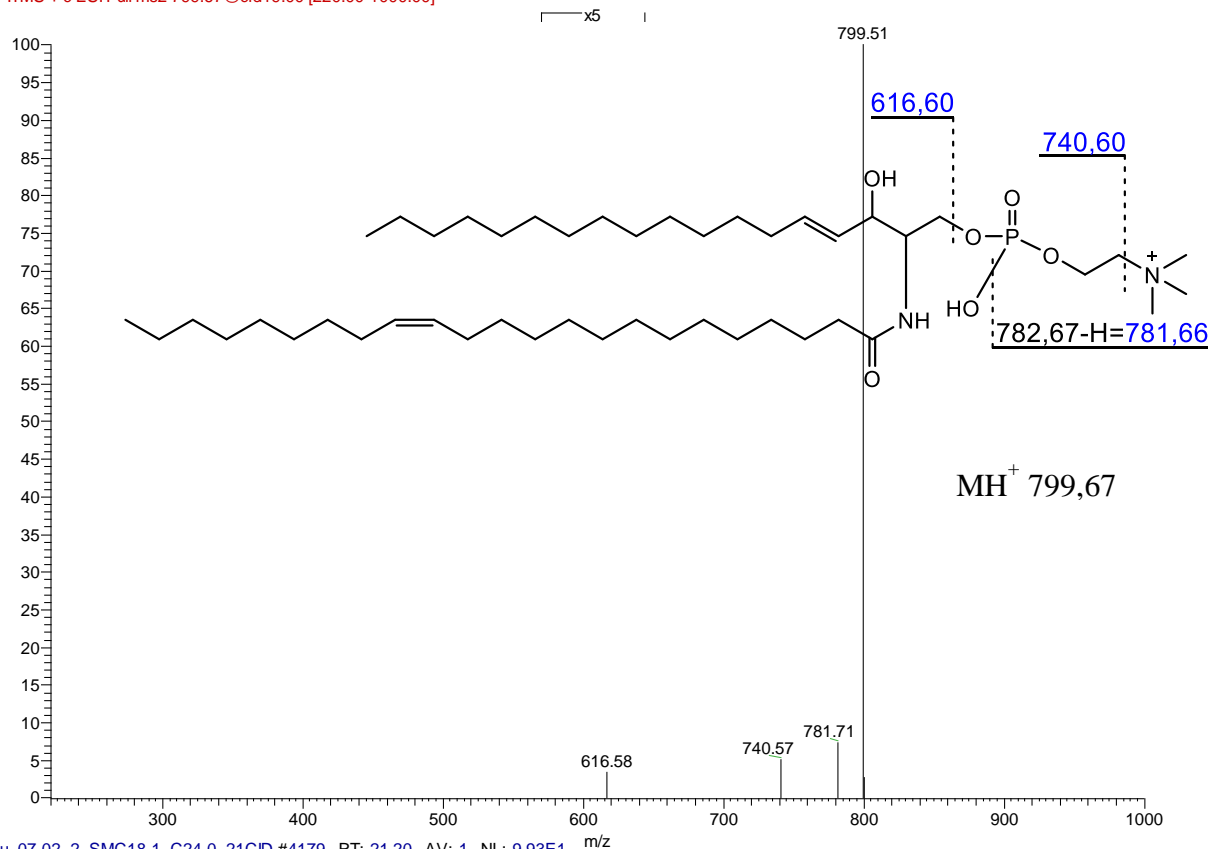
LiU_07-02_2_SMC18-1_C23-0_21CID #4783 RT: 24.20 AV: 1 NL: 9.72
 F: ITMS + c ESI Full ms2 801.68@cid21.00 [220.00-1000.00]



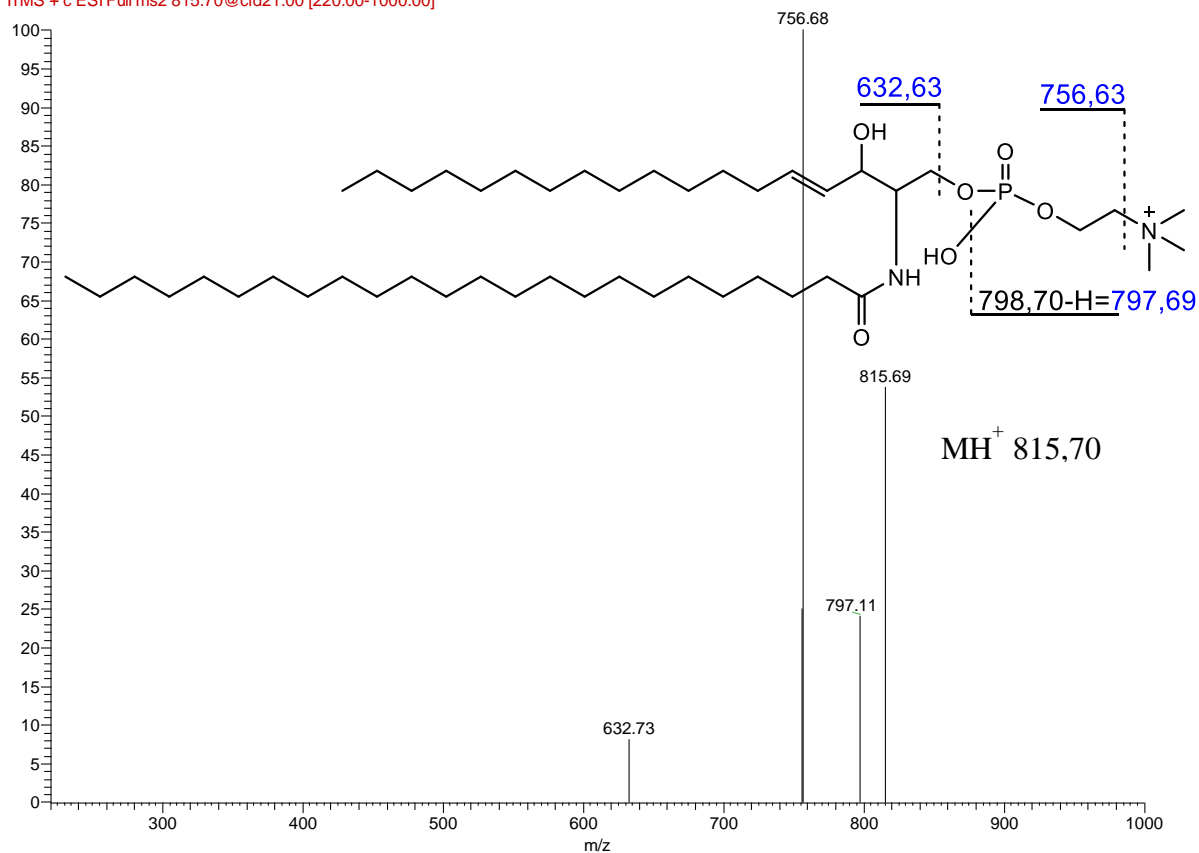
Figur V.28 CID-spekter og struktur for SM C18:1/C22:0 (øverst) og SM C18:1/C23:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.

Vedlegg

Liu_07-02_1_SMC18-1_C23-1_19CID #4751 RT: 24.02 AV: 1 NL: 2.30E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 799.67@cid19.00 [220.00-1000.00]



Liu_07-02_2_SMC18-1_C24-0_21CID #4179 RT: 21.20 AV: 1 NL: 9.93E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 815.70@cid21.00 [220.00-1000.00]



Figur V.29 CID-spekter og struktur for SM C18:1/C23:1 (øverst) og SM C18:1/C24:0 (nederst). Bruddene som vises i strukturene forklarer fragmentene i CID-spektrene.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway