



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2019 30 stp**

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Karakterisering av lipider i villaks, oppdrettslaks (*Salmo salar*) og fiskefôr med GC-MS**

Characterization of lipids in wild salmon, farmed  
salmon (*Salmo salar*) and fish feed with GC-MS

**Katarina Breivik Halvorsen**

Kjemi og bioteknologi



## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved institutt for kjemi, matvitenskap og ernæring (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven utgjør 30 poeng i masterstudiet mitt i kjemi og bioteknologi, og er utført i perioden Januar 2019 til Mai 2019. Arbeidet med oppgaven har vært utrolig lærerikt og interessant.

Først vil jeg takke min hovedveileder, Dag Ekeberg, for hjelp med utforming av oppgaven, god veiledning og råd underveis. Jeg ønsker også å takke medveileder, Hanne Devle, for god hjelp med det praktiske arbeidet og gode tilbakemeldinger. Takk til Carl Fredrik Næss-Andresen for god hjelp i skriveprosessen.

Jeg vil også takke AS Øylaks som var behjelpelige med å sende meg fiskefôr, og Finnmarksfisk AS for å skaffe meg villaks.

Jeg vil gi en stor takk til de gode venninnene jeg har fått etter å ha studert på Ås, det hadde ikke vært det samme uten dere. Sist men ikke minst vil jeg takke min familie og samboer som alltid stiller opp for meg.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, Mai 2019

Katarina Breivik Halvorsen



## Sammendrag

Hovedmålet med dette studiet var å sammenlikne fettsyresammensetningen i villaks og oppdrettslaks (*Salmo salar*). Dette sees i sammenheng med ernæringsmessige forskjeller ved inntak av disse to produktene. Vi ønsket å finne total fettsyreprofil i villaks, oppdrettslaks og fiskefôr, samt å fraksjonere lipidene i ulike lipidklasser. Fisk er for mange en viktig kilde til å få i seg viktige n-3 fettsyrer. Fiskefôret har fått mer vegetabiliske ingredienser enn før. Dette har ført til økt mengde vegetabiliske n-6 fettsyrer og mindre av de viktige marine n-3 fettsyrene i oppdrettslaks. Det var derfor interessant å se konsentrasjonsforskjeller av viktige n-3 fettsyrer i villaks og oppdrettslaks, og se hvor mye fôret påvirker fettsyrene i oppdrettslaksen.

Fettsyrene ble funnet ved hjelp av en gasskromatograf koblet sammen med et tre-sektor massespektrometer. Metoden for ekstraksjon og derivatisering av lipidene var allerede etablert og inkluderte ekstraksjon med Folchs løsning, samt derivatisering til fettsyremetylestere. Fettsyrene i villaks og oppdrettslaks ble også fraksjonert med en SPE-robot for å dele lipidene inn i nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider. Forskjeller i mengden av n-3- og n-6 fettsyrer, samt mettede fettsyrer (SFA), enumettede fettsyrer (MUFA) og flerumettede fettsyrer (PUFA) er tatt med i diskusjonen for å se på villaks og oppdrettslaks fra et helsemessig perspektiv.

Det var stor forskjell i fettinnholdet i laksen. Oppdrettslaksen (13,2%) var mye fetere enn villaksen (1,8%). Oppdrettslaksen hadde derfor også en høyere konsentrasjon av de fleste fettsyrer, der C18:1*cis*9 utgjorde hele 50% av fettsyrene i laksen. Oppdrettslaks inneholdt mer n-3 fettsyrer, men også betydelig mer n-6 fettsyrer i forhold til villaks. Både oppdrettslaks og villaks inneholdt relativt små mengder polare lipider og frie fettsyrer, men villaks hadde betydelig mer frie fettsyrer enn oppdrettslaks. Villaks og oppdrettslaks inneholdt mer MUFA og PUFA i forhold til SFA. Både villaks og oppdrettslaks inneholdt omtrent lik mengde av de to viktige marine n-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA), men villaks hadde det mest gunstige n-6/n-3 forholdet. Oppdrettslaks og fiskefôr inneholdt de samme fettsyrene og forholdet mellom fettsyrene var også relativt lik.



## Abstract

The main objective of this study was to compare the fatty acid composition of wild and farmed salmon (*Salmo salar*). This was seen in the context of nutritional differences in the use of these two products. We wanted to determine the total fatty acid profile in wild salmon, farmed salmon and fish feed, as well as to fractionate the lipids into different lipid classes. Fish is for many people an important source of the crucial n-3 fatty acids. The fish feed consists of more vegetable ingredients than before. This has led to an increase of vegetable n-6 fatty acids and less of the important marine n-3 fatty acids in farmed salmon. Therefore, it was interesting to see differences in concentration levels of n-3 fatty acids in wild and farmed salmon, and to see how much the feed affects the fatty acid profile in the farmed salmon.

The fatty acids were found by using a gas chromatograph coupled with a three-sector mass spectrometer. The method for extraction and derivatization of the lipids was previously established and included solvent extraction and derivatization into fatty acid methyl esters. The fatty acids in wild and farmed salmon were also fractionated with an SPE robot to divide the lipids into neutral lipids, free fatty acids and polar lipids. Differences in the quantity of n-3 fatty acids, n-6 fatty acids, as well as saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) are included in the discussion to look at wild and farmed salmon from a health perspective sight.

There was a big difference in fat content in salmon. The farmed salmon had a significantly higher fat content (13,2%) compared to the wild salmon (1,8%). The farmed salmon had therefore also a higher concentration of most fatty acids, where C18:1*cis*9 amounted 50% of the fatty acids in the salmon. The farmed salmon contained more n-3 fatty acids, but also significantly more n-6 fatty acids than the wild salmon. Both farmed and wild salmon contained relatively small amounts of polar lipids and free fatty acids, but the wild salmon had considerably more free fatty acids than the farmed salmon. Wild and farmed salmon contained more MUFA and PUFA compared to SFA. Both wild and farmed salmon contain approximately equal amounts of the two major marine n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), but wild salmon had the most favourable n-6/n-3 ratio. Farmed salmon and fish feed contained the same fatty acids and the ratio of the fatty acids was also relatively similar.





# Forkortelser

---

Forkortelser benyttet i oppgaven	
ALA	Alfalinolensyre
DHA	Dokosaheksaensyre
EFSA	Europeiske myndigheter for næringsmiddeltrygghet
EI	Elektronioniseringskilde
EPA	Eikosapentaensyre
FAME	Fettsyremetylester
FF	Frie fettsyrer
GC	Gasskromatografi
IS	Internstandard
LA	Linolsyre
LOD	Deteksjonsgrense
LOQ	Kvantifiseringsgrense
<i>m/z</i>	Masse/ladning
ME	Metylester
MS	Massespektrometri
MUFA	Enumettet fettsyre
NIFES	Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning
NL	Nøytrale lipider
PL	Polare lipider
PUFA	Flerumettet fettsyre
rcf	Relativ sentrifugalkraft
rpm	Runder per minutt
RRF	Relativ responsfaktor
SD	Standardavvik
SFA	Mettet fettsyre
SPE	Fast-fase ekstraksjon
TG	Triglyserid

---



# Innholdsfortegnelse

Forord .....	I
Sammendrag .....	III
Abstract .....	V
Forkortelser .....	VII
Innholdsfortegnelse .....	IX
1 Introduksjon .....	1
1.1 Mål for oppgaven .....	2
1.2 Essensielle fettsyrer .....	3
1.3 Fettinnhold i laks .....	3
1.4 Laksediett .....	4
1.4.1 Fiskefôr .....	5
2 Teori .....	7
2.1 Lipider .....	7
2.1.1 Fettsyrer .....	7
2.1.2 Triglyserider .....	8
2.1.3 Fosfolipider .....	9
2.2 Fastfase ekstraksjon .....	10
2.3 Separasjon .....	10
2.3.1 Gasskromatografi .....	10
2.3.2 Derivatisering .....	11
2.4 Massespektrometri .....	12
2.4.1 Ionisering .....	13
2.4.2 Sektorinstrument .....	14
2.4.3 Elektronmultiplikator .....	14
2.5 Kvantitativ analyse .....	14
3 Materialer og metoder .....	15
3.1 Materialer og kjemikalier .....	15
3.2 Tillaging av løsninger .....	17
3.2.1 Folchs løsning .....	17
3.2.2 NaCl-løsning (0,9%) .....	17
3.2.3 Natriummetanolat, $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$ (5,0 mg/mL) .....	17

## Innholdsfortegnelse

3.2.4 Internstandarder .....	17
3.2.5 Dietyleter:eddiksyre (98:2) .....	17
3.3 Fisk og fiskefôr .....	17
3.4 Homogenisering av prøver.....	18
3.4.1 Homogenisering av laks .....	18
3.4.2 Homogenisering av fiskefôr .....	18
3.5 Totalt fettinnhold i fiskemuskel.....	19
3.6 Total fettsyreprofil i laks.....	19
3.6.1 Ekstraksjon .....	19
3.6.2 Derivatisering av lipider .....	20
3.7 Total fettsyreprofil i fiskefôr.....	20
3.8 Fraksjonering av lipider .....	20
3.8.1 Ekstraksjon .....	20
3.8.2 Fastfase-ekstraksjon av lipidklasser .....	21
3.8.3 Omestring av nøytrale- og polare lipider .....	21
3.8.4 Forestring av frie fettsyrer .....	22
3.9 Analyse av fettsyrer med gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS).....	22
3.10 Identifisering av fettsyremetylestere.....	23
4 Resultater og diskusjon .....	25
4.1 Bestemmelse av totalt fettinnhold i laksemuskel.....	25
4.2 Bestemmelse av total fettsyreprofil i laks og fiskefôr .....	26
4.3 Sammenlikning av total fettsyreprofil i villaks og oppdrettslaks .....	27
4.4 Sammenlikning av n-3- og n-6 fettsyrer i villaks og oppdrettslaks .....	30
4.5 Sammenlikning av SFA, MUFA og PUFA i oppdrettslaks og villaks .....	31
4.6 Sammenlikning av total fettsyreprofil i oppdrettslaks og fiskefôr .....	32
4.7 Fraksjonering av lipider i laks .....	34
5 Konklusjon .....	41
6 Videre arbeid .....	43
7 Referanser.....	45
Vedlegg 1 - Internstandarder .....	A
Vedlegg 2 – Referansestandarder .....	B
Vedlegg 3 - RRF .....	D

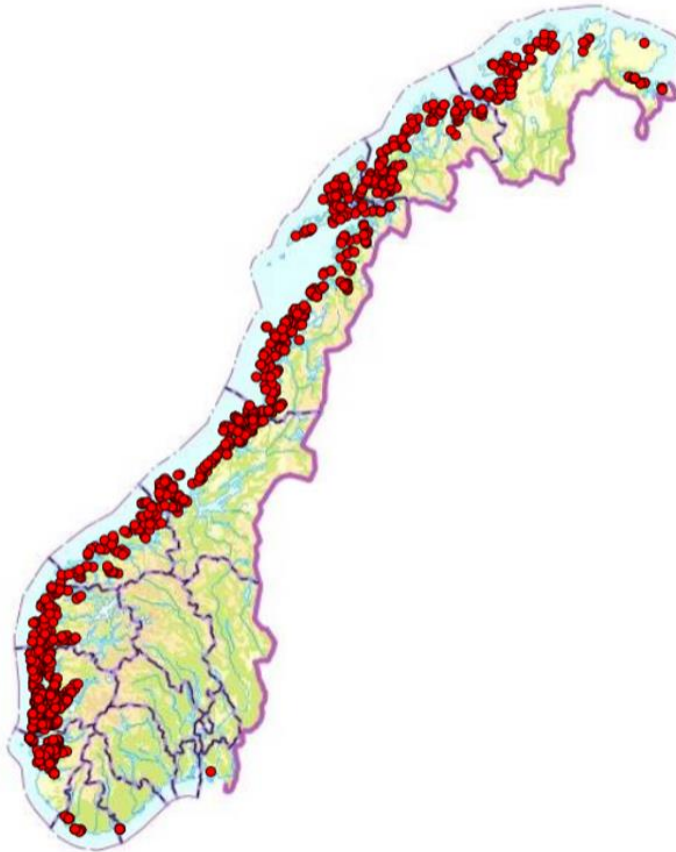
## Innholdsfortegnelse

Vedlegg 4 – Total fettsyreprofil i villaks .....	E
Vedlegg 5 – Total fettsyreprofil i oppdrettslaks.....	F
Vedlegg 6 - Total fettsyreprofil i fiskefôr .....	G
Vedlegg 7 – Fraksjonering av nøytrale lipider .....	H
Vedlegg 8 - Fraksjonering av frie fettsyrer .....	J
Vedlegg 9 – Fraksjonering av polare lipider .....	L



# 1 Introduksjon

Atlanterhavslaks (*Salmo salar*) lever i Atlanterhavet og tilstøtende elver. I Norge drives det med oppdrett av atlanterhavslaks som har blitt en viktig eksportvare. Disse oppdrettsanleggene ligger langs hele norskekysten og er illustrert i figur 1.1.



*Figur 1.1: Kart over alle oppdrettsanlegg med laks i Norge. Kartet er laget med fiskeridirektoratets egen kartløsning (Fiskeridirektoratet 2019a).*

Oppdrettslaksen kommer opprinnelig fra villaks. For rundt 40 år siden ble det samlet inn villaks fra ulike lakseelver i Norge og startet et artsprogram der det ble krysset frem egenskaper som er fordelaktig når det gjelder oppdrett (Skogheim 2018). Dette gjaldt først og fremst veksthastighet. Etter mange generasjoner i oppdrett har fisken blitt tilpasset et helt annet miljø enn villaksen. Rømt oppdrettslaks fører til genetiske innblandinger hos villaksen, og rene bestander av villaks trues (Diserud et al. 2017; Glover et al. 2011). Det er til enhver tid store

mengder oppdrettslaks på rømmen. I 2018 ble det rapportert om hele 160 000 rømte laks (Fiskeridirektoratet 2019b). Dette er en stor oppgang fra året før, da tallet på antall rømte laks bare var 16 000.

I Norge lever villaksen under et konstant press fra mange kanter. Den trues av rømt oppdrettslaks, lakselus, kraftutbygging, overfiske, sure elver, parasitter og sykdommer (Grefsrud et al. 2018; Skogheim 2018). De siste årene er antall villaks i Norge halvert. All villaksen vi har i Norge kunne fått plass i tre merder i et oppdrettsanlegg, og de blir stadig færre. I Norge arbeides det intenst for å få flere villaks til elvene, slik at de ville laksestammene ikke skal dø ut. Hvert år kommer laksen tilbake til elven de vokste opp i for å gyte. I Norge er det rundt 400 lakseelver, og det er ca. 500 000 villaks som kommer tilbake igjen til elvene hvert år (Anon 2018). Oppdrettslaks har vi derimot 300 – 400 millioner av til enhver tid (Statistisk sentralbyrå 2018).

Det er lavere konsentrasjon av n-3 fettsyrer i oppdrettslaks enn det var tidligere (Jensen et al. 2012). Før besto fôret av rundt 90% fiskemel og fiskeoljer, men i dag er dette redusert til ca. 30%, mens resten av fôret er vegetabiliske ingredienser (Ytrestøyl et al. 2015). Dette har ført til redusert mengde n-3, og økt mengde n-6 i oppdrettslaksen (Sissener 2018). Etter endring i fôrsammensetningen har mengden marine n-3 fettsyrer sunket med nesten 50% (Sprague et al. 2016). Selv om konsentrasjonen n-3 i oppdrettsfisk har gått ned, har den fortsatt en høyere konsentrasjon av n-3 enn villaks.

### 1.1 Mål for oppgaven

Flere studier (Mørkøre et al. 2014; Sprague et al. 2016) viser at det er mindre mengder av n-3 fettsyrer i oppdrettslaks enn det var tidligere og hva det er i forhold til villaks. For å studere hvordan de ulike fettsyrenivåene er i dag, skulle man i denne forskningsoppgaven bestemme total fettsyreprofil i oppdrettslaks og villaks både kvalitativt og kvantitativt. Fettet skulle også fraksjoneres i nøytrale lipider (NL), polare lipider (PL) og frie fettsyrer (FF) for å se hvordan fettsyreprofilen var i de ulike fraksjonene. Til slutt skulle man bestemme total fettsyreprofil i fôret til oppdrettslaksen, for dermed å se likhetene/forskjellene mellom fettsyrene i oppdrettslaks og maten den spiser.



Målet med oppgaven var å se på forskjell i fettmengde og fettsyreprofil i oppdrettslaks og villaks, med særlig fokus på viktige, umettede n-3- og n-6 fettsyrer. Dette ble vurdert i et helsemessig perspektiv.

### 1.2 Essensielle fettsyrer

Laks inneholder mange ulike fettsyrer, og blant de mest kjente er de viktige marine n-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA). Dette er viktige fettsyrer sett i et helsemessig perspektiv som kroppen ikke selv klarer å produsere nok av. En annen n-3 fettsyre er alfalinolensyre (ALA). Dette er en essensiell fettsyre mennesker ikke kan produsere selv, men den må inntas via kostholdet (Nelson & Cox 2017). Dersom vi spiser ALA, kan kroppen selv danne EPA og DHA. En annen essensiell fettsyre er n-6 fettsyren linolsyre (LA).

Både villaks og oppdrettslaks er en god kilde til n-3 fettsyrer (Lundebye et al. 2017). Oppdrettslaksen inneholder litt mer n-3, men inneholder også betydelig mer n-6 enn villaksen. Det er stor forskjell i forholdet mellom n-3 og n-6 i oppdrettslaks. Det er ønskelig med et lavere forhold, for å redusere risiko for kroniske sykdommer (Simopoulos 2002).

n-3 fettsyrene er viktige for oss mennesker, og er viktig for mange funksjoner i menneskekroppen som hjernen og hjertet (Connor 2000). Det er mye diskusjoner for hva som er det optimale forholdet mellom n-6 og n-3, og Helsedirektoratet har ingen eksakte anbefalinger på dette (2018). I dag får vi i oss mer n-6 enn anbefalt og vi får i oss nok n-6 igjennom kosten ellers. Det er n-3 vi trenger mer av. Eksempel på produkter i hverdagen som inneholder n-6 er kornprodukter, nøtter og planteoljer. Dette er produkter som folk flest får i seg daglig.

### 1.3 Fettinnhold i laks

En studie utført av Jensen et al. (2012) ved Universitetet i Tromsø viser at oppdrettslaksen er fettere enn villaksen. Oppdrettslaks hadde en fettandel på 12%, hvilket var dobbelt så mye som funnet i villaks.

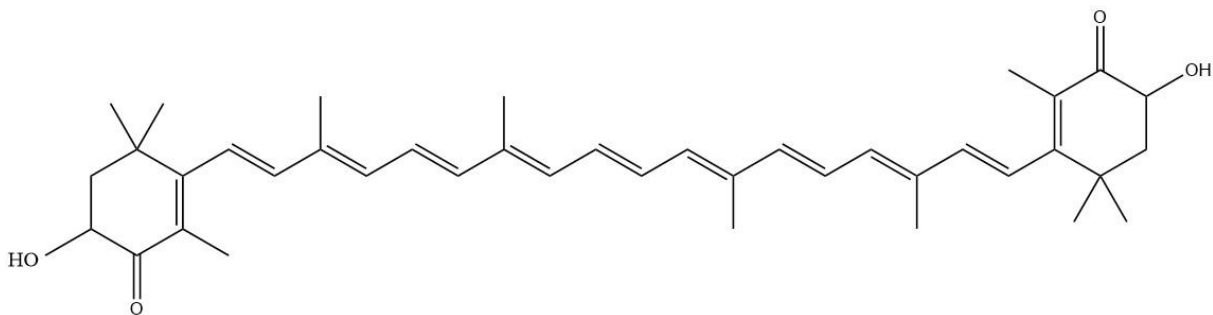
Selv om de fleste studier viser at oppdrettslaksen har mer fett enn villaksen (Jensen et al. 2012; Lundebye et al. 2017), er det andre studier som rapporterer noe annet. En studie av Blanchet et al. (2005) viser at det totale fettinnholdet er likt i oppdrettslaks og villaks (ca. 7%). Dette var

lavere for oppdrettslaksen enn forventet. Fôret til oppdrettslaksen har vært i stadig endring, og fettinnholdet i laksen kan derfor variere over tid. Siden de ulike studiene er utført en god del år fra hverandre, kan dette være en av grunnene til de avvikende resultatene.

#### 1.4 Laksediett

Laks har en kjent karakteristisk rødfarge. Villaksen får denne fargen ved å spise krill, reker og andre krepsdyr. Laks som spiser mye krepsdyr er veldig røde, mens laks som ikke spiser like mye krepsdyr blir mer blasse i fargen. Dette skyldes at krepsdyr inneholder et karotenoid som heter astaxanthin (Higuera-Ciapara et al. 2006; Mørkøre et al. 2014). Uten astaxanthin ville laksen vært hvit og grå. På grunn av ulik tilgang og inntak av krepsdyr med dette karotenoidet, er det stor forskjell i rødfargen til villaks.

Oppdrettslaks er også rød, men har ikke tilgang til krepsdyr i merdene. De blir røde fordi de får astaxanthin tilsatt i fôret. Uten rødfargen ville ikke oppdrettslaksen vært like attraktiv på markedet og derfor er ofte oppdrettslaks rødere i kjøttet enn villaks. Astaxanthin er i tillegg en kraftig antioksidant og viktig for oppdrettsnæringen for å bevare kvaliteten på fiskekjøttet (Higuera-Ciapara et al. 2006). Strukturen til astaxanthin er gitt i figur 1.2.



Figur 1.2: Strukturen til stoffet astaxanthin, som gir den karakteristiske rødfargen til laks.

### 1.4.1 Fiskefôr

Oppdrettslaksen blir fôret med pellets og er illustrert i figur 1.3. I de senere årene har andelen vegetabiliske ingredienser som planteolje og planteprotein i fôret økt (Mørkøre et al. 2014). Fôret består i dag av hele 60% vegetabiliske ingredienser. Dette fører til mindre av de viktige marine n-3 fettsyrene, og mer av de mer plantebaserte n-6 fettsyrene. I Norge er det flere ulike produsenter som lager fôr, og de har et tett oppfølgingsprogram. Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning, NIFES, har laget et program for overvåking av fiskefôr (2017) i samarbeid med Mattilsynet. De har analysert 140 prøver med fiskefôr, for å se om de overholdt regelverket. Dette regelverket endres stadig, så fiskefôret fra de ulike produsentene kontrolleres årlig. Fôret blir sjekket for uønskede stoffer som bakterier, organiske fremmedstoffer, tungmetaller og tilsetningsstoffer (Sele et al. 2018). Ved funn av verdier som overstiger grenseverdiene, blir Mattilsynet varslet.



*Figur 1.3: Fiskefôret som ble analysert i denne oppgaven.*



## 2 Teori

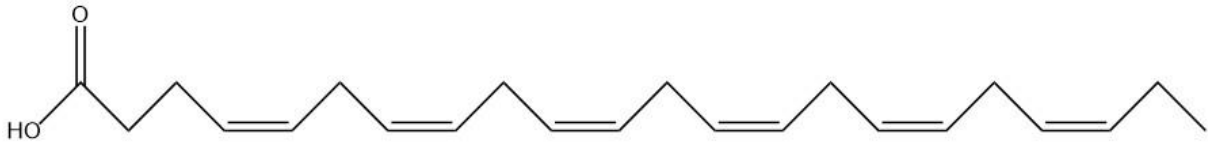
### 2.1 Lipider

Lipider har ingen eksakt definisjon, og beskrives derfor på ulike måter (Akoh & Min 2008). De fleste betegner lipider som en gruppe av naturlig forekommende forbindelser, som har til felles at de løser seg i organiske løsemidler, som kloroform, etere og alkoholer (Christie 2003). Lipider er en mangfoldig gruppe av komponenter som fettsyrer, fosfolipider, triglyserider, voks og steroler (Nelson & Cox 2017). Fett og oljer fungerer som energilager i mange organismer. Fosfolipider og steroler er viktige strukturelle komponenter i biologiske membraner, mens andre lipider har stor betydning blant annet som kofaktorer for enzymer, elektronbærere og lysabsorberende pigmenter. I mat finner vi ofte en eller flere av disse lipidforbindelsene, men i kostholdet vårt er det triglyserider og fosfolipider som er de mest omfattende og viktige lipidene vi har (Akoh & Min 2008).

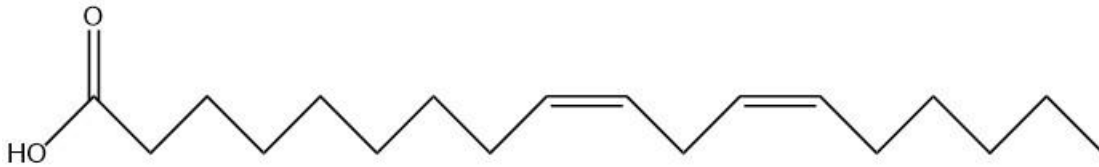
#### 2.1.1 Fettsyrer

Fettsyrer er ofte lange alifatiske kjeder koblet til en karboksylsyregruppe. Det er karboksylsyrer med hydrokarbonkjeder som består av 4 til 36 karbonatomer (Nelson & Cox 2017). Det er en metylgruppe (-CH<sub>3</sub>) i den ene enden, og en karboksylsyregruppe (-COOH) i den andre enden. Noen fettsyrer er fullstendig mettede, mens andre er umettede og består av én eller flere dobbeltbindinger. Det finnes også fettsyrer som inneholder karbonringer med tre karbonatomer, hydroksylgrupper eller forgrenede metylgrupper. Det er blant de umettede fettsyrene vi finner n-3- og n-6 fettsyrene. n-3 fettsyrer har en dobbeltbinding på det tredje karbonet i karbonkjeden på motsatt side av karboksylsyregruppen, mens n-6 har dobbeltbinding på det sjette karbonet. En illustrasjon av n-3 fettsyren DHA og n-6 fettsyren LA er gitt i henholdsvis figur 2.1 og 2.2. I laks finnes det også n-9 fettsyrer, som oljesyre (C18:1) (Sprague et al. 2016). Dette er en fettsyre som finnes naturlig i ulike dyr og vegetabiliske oljer. I laks er det i tillegg til de umettede fettsyrene også en del mettede fettsyrer som myristinsyre (C14:0), palmitinsyre (C16:0) og stearinsyre (C18:0) (Bell et al. 2002).

## Teori



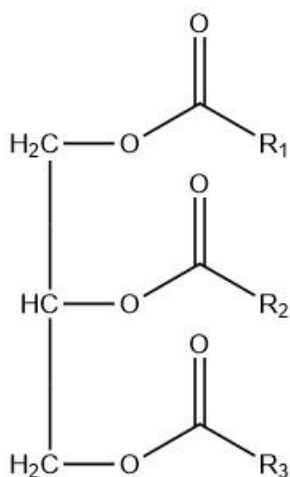
Figur 2.1: Strukturen til n-3 fettsyren dokosaheksaensyre, DHA.



Figur 2.2: Strukturen til den essensielle n-6 fettsyren linolsyre, LA.

### 2.1.2 Triglyserider

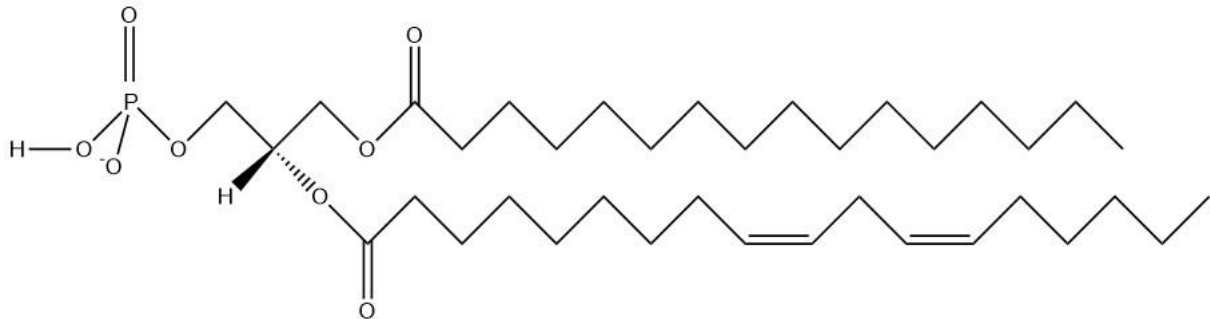
Triglyserider består av en glyseroldel, hvor hver hydroksylgruppe er forestret til en fettsyre (Christie 2003), og er illustrert i figur 2.3. Fett er ofte i fast form, mens oljer er flytende. Mens fett ofte har mettede fettsyrer, har oljer mer umettede fettsyrer med én eller flere dobbeltbindinger. Dobbeltbindingene gjør at de umettede fettsyrene ikke kan pakkes like tett. De har derfor en løsere struktur sammenliknet med mettet fett, noe som påvirker smeltepunktet. Fast fett kommer vanligvis fra animalske produkter, mens oljer ofte finnes i vegetabiliske produkter. Siden en god del av fett i laksen inneholder umettede fettsyrer vil også fett fra laks kunne ha en mer flytende konsistens.



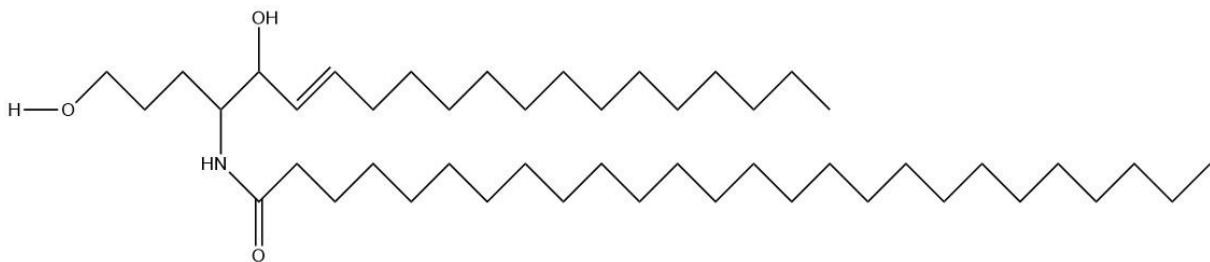
Figur 2.3: Strukturen til et triglyserid.

### 2.1.3 Fosfolipider

Fosfolipider er en viktig gruppe polare lipider. De består av langkjedede fettsyrer og en fosfatgruppe. Hodegruppen er hydrofil, mens de langkjedede fettsyrene er hydrofobe. Det finnes to grupper av fosfolipider kalt glyserofosfolipider og sphingolipider (Nelson & Cox 2017), illustrert i henholdsvis figur 2.4 og 2.5. Glyserofosfolipidene består av to langkjedede fettsyrer, en glyserol, en fosfatgruppe og et polart hode. Sphingolipider er ulike fra glyserofosfolipider ved at de ikke inneholder glyserol. De inneholder en langkjedet fettsyre, en langkjedet aminoalkohol kalt sphingosin og et polart hode. Disse fosfolipidene er viktige i cellemembranen.



Figur 2.4: Strukturen til et glyserofosfolipid, kalt fosfatidinsyre.



Figur 2.5: Strukturen til et sphingolipid, kalt ceramid.

## 2.2 Fastfase ekstraksjon

Fastfase ekstraksjon («solid phase extraction», SPE) er en prøveprepareringsmetode. Den kan brukes til å rense prøver ved at forurensinger absorberes på et fast-fase-materiale i en kolonne, mens analytten eluerer ut fra kolonnen (Miller 2005). Også det motsatte kan være tilfelle der i stedet analytten adsorberes på fast-fase-materialet, mens forurensingen elueres ut. Poenget er å få forurensingene separert fra analytten. SPE kan også brukes til å separere ulike analytter fra samme løsning. I SPE blir først kolonnen kondisjonert, før prøven appliseres. Kolonnen blir så vasket, for å fjerne forurensing. Til slutt blir det tilsatt et elueringsmiddel til kolonnen, så analytten elueres ut. I dette studiet brukes SPE til å fraksjonere lipidene i polare lipider, nøytrale lipider og frie fettsyrer.

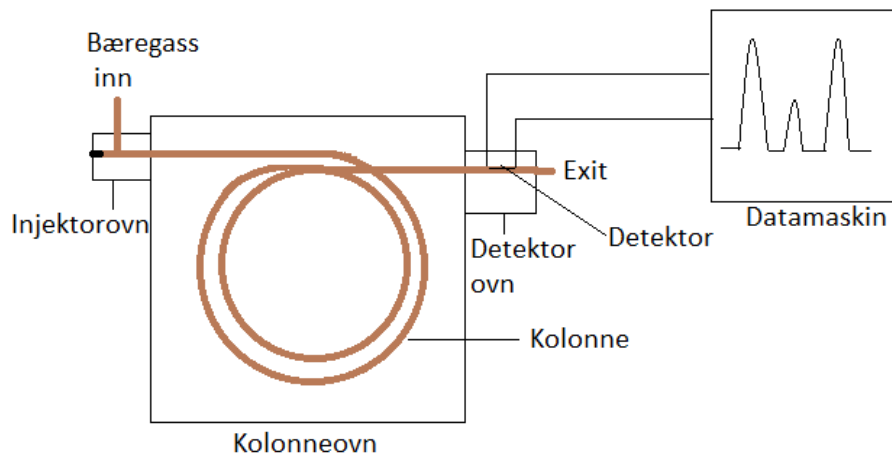
## 2.3 Separasjon

Kromatografiske prinsipper baserer seg på at ulike komponenter har ulik affinitet til stasjonær- og mobil-fase. Større forskjell mellom komponentene gir lettere separasjon. En blanding injiseres på en kolonne. Blandingen elueres med en mobilfase som enten er gass, væske eller superkritisk fluid, før komponentene elueres fra kolonnen etter en gitt tid. Stasjonærfasen er ofte en viskøs væske som ligger på faste partikler eller på kolonneveggen (Miller 2005). Mobilfasen tar med seg analytten og beveger seg gjennom kolonnen. I denne oppgaven er det gasskromatografi som skal benyttes.

### 2.3.1 Gasskromatografi

Gasskromatografi er en av de mest brukte teknikkene for kvalitative og kvantitative analyser (Skoog et al. 2014). I en gasskromatograf (GC) blir prøven fordampet og injisert på den kromatografiske kolonnen. Gass brukes som mobilfase og bærer analytten gjennom kolonnen. Det er kun flyktige komponenter eller komponenter som kan gjøres flyktige som kan analyseres på GC. Selve separasjonen skjer i kolonnen. Det er viktig at bæregassen ikke reagerer med analytt og ikke interfererer ved deteksjon. En GC består av en injektor, en kolonne og en detektor og er illustrert i figur 2.6.





Figur 2.6: Illustrasjon av en gasskromatograf, GC.

En injektor som vanligvis brukes er split/splitless-injektor. Prøven injiseres i en oppvarmet injektor. Før prøven injiseres er den vanligvis løst i et organisk løsemiddel. Typisk injeksjonsvolum er 1  $\mu\text{L}$  (Miller 2005). I en split-injektor er en forutbestemt del av prøven påført kolonnen, mens resten kastes. I en splitless-injektor er split ventilen lukket og all injisert materiale går til kolonnen. Når man bruker en splitless-injektor er det viktig at prøven er godt rensset.

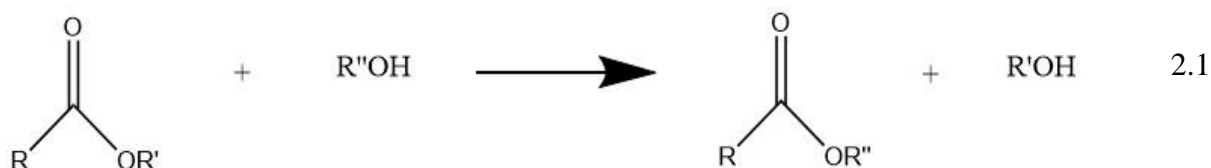
I gasskromatografi er det to generelle typer kolonner (Skoog et al. 2014). Det er pakkede kolonner og kapillærkolonner. Pakkede kolonner inneholder små partikler som enten er stasjonærfase eller dekket med det. Denne typen av kolonne gir generelt dårligere oppløsning enn kapillærkolonner (Harris 2010). Kolonnemateriale kan være glass, rustfritt stål eller aluminium. Kapillærkolonner er det som er mest vanlig i dag. Det er lange, smale kapillærer laget av smeltet silika og dekket med polymid.

### 2.3.2 Derivatisering

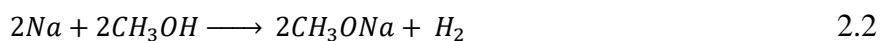
På grunn av fettsyrenes polaritet og høye kokepunkt er fettsyrer vanskelige å analysere på GC. Frie fettsyrer kan forestres, mens nøytrale- og polare lipider kan omestres. Dette gjør de mer flyktige, og dermed mer egnet for analyse på GC.

## Teori

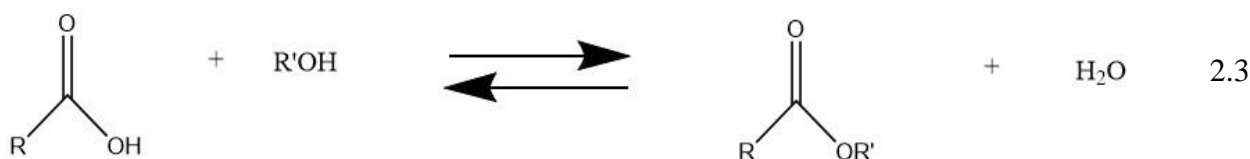
Omestring er en reaksjon der en ester reagerer med en alkohol, og danner en ny ester og alkohol. Denne reaksjonen er gitt i likning 2.1.



Det vanligste reagenset som brukes ved omestring er natriummetanolat, som dannes ved å løse metallisk natrium i metanol. Reaksjonen for dannelse av natriummetanolat er gitt i likning 2.2.

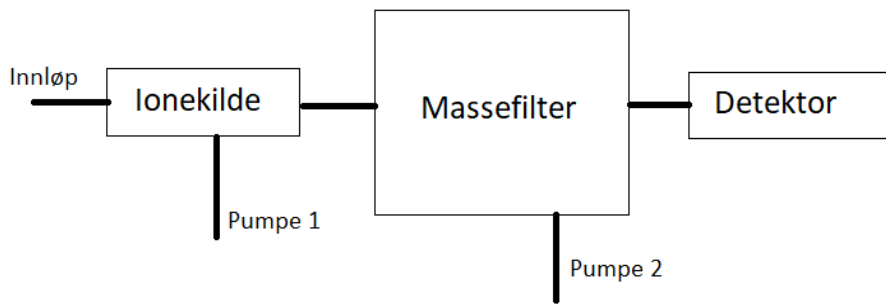


Forestring er en reaksjon der karboksylsyre reagerer med en alkohol, og danner ester og vann. Dette er en reversibel reaksjon som er gitt i likning 2.3.



## 2.4 Massespektrometri

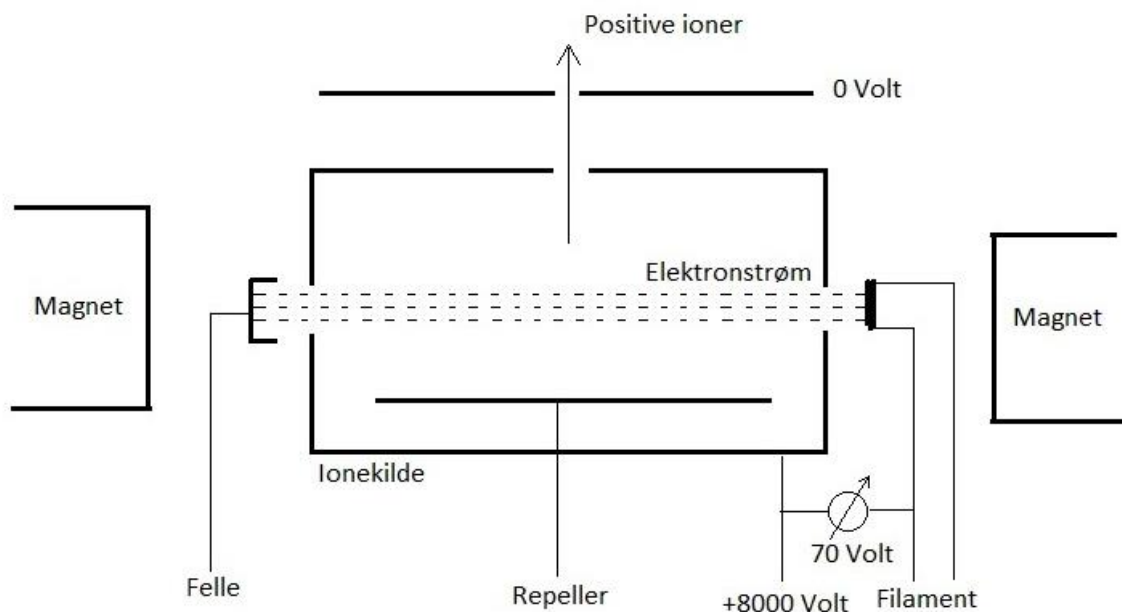
Detektoren som skal brukes i denne oppgaven er et massespektrometer (MS). Denne består av en ionekilde, et massefilter og en detektor og er illustrert i figur 2.7. Dette er et instrument som holdes under lavt trykk (vakuum) og lager ioner fra atomer og molekyler. Ionene som dannes blir separert i et massefilter basert på deres  $m/z$  verdi. Etter separasjon detekteres de av for eksempel en elektronmultiplikator. En kombinasjon av gasskromatografi og massespektrometri er kjent som GC-MS (Skoog et al. 2014).



Figur 2.7: Illustrasjon av oppsettet til et massespektrometer, MS.

### 2.4.1 Ionisering

Inne i ionekilden blir analyttmolekylene tilført energi, og danner ioner (Skoog et al. 2014). Elektroner fra et oppvarmet filament akselereres mot en anode og kolliderer med et molekyl i gassform fra den injiserte prøven. Molekylet mister et elektron og blir positivt. På hver side av elektronioniserings-kilden (EI) er det en magnet. Dette gjør at elektronene går i en sirkulær bane. Banelengden til elektronene øker, som øker sjansen for kollisjon mellom elektron og molekyl. EI induserer omfattende fragmentering, slik at molekylionet ikke alltid observeres (Hoffmann & Stoobant 2007). Illustrasjon av en EI-kilde er gitt i figur 2.8.



Figur 2.8: Illustrasjon av en EI-kilde.

### 2.4.2 Sektorinstrument

I denne oppgaven brukes et tre-sektor-instrument som massefilter i massespektrometeret. Sektorinstrumentet har en EBE geometri. Det vil si at det består av et elektrostatisk felt, et magnetfelt og til slutt et nytt elektrostatisk felt. Ionene akselereres ut av ionekilden, og inn i den elektrostatisk analysatoren (Karasek & Clement 1988). I den elektrostatisk analysatoren separeres ionene basert på deres kinetiske energi (Hoffmann & Stoobant 2007). Kun ionene med ønsket kinetisk energi vil fraktes gjennom den elektrostatisk analysatoren. Resten av ionene vil kollideres med veggene i analysatoren. Ionene fraktes så videre til magneten. Magnetten separerer ionene avhengig av deres moment (masse x ladning). Ionene med riktig moment går gjennom magneten og videre til neste elektrostatisk analysator, før de detekteres av en detektor.

### 2.4.3 Elektronmultiplikator

Elektronmultiplikator er den mest vanlige ionedetektoren. Denne brukes for å forsterke elektronstrømmen. Den primære elektronstrømmen treffer den første elektroden og frigjør sekundærelektroner fra denne (Hoffmann & Stoobant 2007). Disse elektronene akselereres så til neste elektrode i rekka på grunn av lavere potensial, og frigjør på nytt sekundærelektron osv. Det oppnås flere sekundærelektron enn innfallende primærelektron, og det blir derfor en forsterkning av elektronstrømmen.

## 2.5 Kvantitativ analyse

Intensiteten til signalet til prøven som skal analyseres sammenliknes med en referansekomponent, kalt en internstandard (IS) (Hoffmann & Stoobant 2007). Denne metoden gjør det mulig å eliminere ulike feilkilder. Det er viktig å ha en internstandard med så like kjemiske og fysiske egenskaper som analytt som mulig. Prøven skal ikke inneholde internstandard fra før, og internstandard må være tilgjengelig i ren form (Miller 2005). Internstandard tilsettes i prøven så tidlig som mulig i analysen, i samme størrelsesorden som analyttene.

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Materialer og kjemikalier

Kjemikalier, internstandarder og laboratorieutstyr som er benyttet i oppgaven er listet opp i henholdsvis tabell 3.1 og 3.2.

*Tabell 3.1: Kjemikalier og internstandarder benyttet i oppgaven for å karakterisere lipider i fisk og fiskefôr.*

Produkt:	Produsent:	Renhet:	CAS-nr.:
Bortrifluorid-metanol	Sigma Chemicals, Sveits		373-57-9
C18:1cis11	Larodan AB, Sverige	>99%	1937-63-9
C19:0 FF	Larodan AB, Sverige	99+%	10-1900-13
C19:0 PL	Larodan AB, Sverige	99%	37-1900-11
C19:0 NL/TG	Larodan AB, Sverige	99%	33-1900-13
C22:5cis7,10,13,16,19	Larodan AB, Sverige	>99%	108698-02-8
Dietyleter	Sigma-Aldrich, Polen	≥99,8%	60-29-7
Eddiksyre	VWR Chemicals, Frankrike	99,9%	64-19-7
Helium	AGA, Norge	6,0	7740-59-7
n-Heptan	Acros Organics, Belgia	99+%	142-82-5
Isopropanol	VWR Chemicals, Frankrike	100,0%	67-63-0
Kloroform	VWR Chemicals, Frankrike	100,0%	67-66-3
Metallisk natrium	Merck, Tyskland		
Metanol	VWR Chemicals, Polen	99,9%	67-56-1
Natriumklorid	VWR Chemicals, Belgia	99,9%	7647-14-5
Nitrogen	AGA, Norge	5,0	7727-37-9
R37 FAME mix	Restek, USA		

Tabell 3.2: Laboratorieutstyr benyttet i oppgaven.

Produkt:	Navn:	Produsent:	Spesifikasjoner:
Automatpipette	Finnpipette®	Labsystems	5-40 µL
Automatpipette	Finnpipette® F2	Thermo Scientific	100-1000 µL
Automatpipette	Finnpipette®	Thermo Scientific	1-5 mL
Automatpipette	Finnpipette®	Thermo Labsystems	2-10 mL
Blåkorkrør	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One	50 mL, 30 x 115 mm
Bordsentrifuge	EBA 20	Hettich®	
Derivatiseringsrør	Screwthread tubes	DURAN®	GL 14
GC-hetteglass	Crimp vial	VWR International	1,5 mL 32x11,6 mm
GC-lokk	Aluminium cap	VWR International	11 mm
Glasspipette	Disposable Glass Pasteur Pipettes	VWR International	150 mm
Hamiltonsprøyte	Microliter™ Syringes	Hamilton®	50 µL, 100 µL, 500 µL
Inndampingsstativ	Pierce Reacti-Vap™ III	Thermo Scientific	
Mikrorør	Microtubes	Axygen	1,5 mL
Mikrovekt	CP2P Sartorius	VWR International	
Milli-Q vann	Automatic Sanitization Module	Merck Millipore	230 V
Ristebrett	Orbital shaker	Biosan	PSU 10-i
Sentrifuge	Allegra™ 25R Sentrifuge	Beckman Coulter™	TS-5.1-500
Sentrifugerør	Pyrex® Glass sentrifugerør	Corning Inc.	50 mL
SPE-kolonner	Bond Elut, NH2 (aminopropyl)	Agilent Technologies	500 mg, 3 mL
SPE-lokk		Gilson	Til 3 mL kolonne
Vakuum-manifold	SPE manifold	Waters®	
Vannbad	No 1004	GFL	
Varmeblokk	Dri-Block DB-3	Techne, Cambridge	
Vekt	Extend Sartorius	VWR International	
Vortex-mikser	Yellowline TTS 2	IKA®-Werke	

## 3.2 Tillaging av løsninger

### 3.2.1 Folchs løsning

Folchs løsning består av kloroform:metanol i et forhold på 2:1. 400 mL kloroform og 200 mL metanol ble målt opp i hver sin målesylinder, og ført over i en Schott-Duran flaske (blåkork-flaske).

### 3.2.2 NaCl-løsning (0,9%)

Det ble veid ut 2,25 g NaCl og tilsatt til en 250 mL målekolbe. Målekolben ble så fylt opp til merket med milli-Q vann.

### 3.2.3 Natriummetanolat, $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$ (5,0 mg/mL)

150 mL metanol ble målt ut i en målesylinder og overført til en blåkork-flaske. Det ble så veid ut 0,75 g metallisk natrium, som deretter ble tilsatt flasken med metanol. Natrium reagerer med metanol og danner natriummetanolat.

### 3.2.4 Internstandarder

Det ble brukt internstandard av C19:0 for triglyserider, frie fettsyrer og polare lipider. De ble laget hver for seg ved å løse IS av C19:0 i kloroform til en konsentrasjon på 10 mg/mL. Internstandardene ble oppbevart i GC-vialer ved  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  frem til bruk.

### 3.2.5 Dietyleter:eddiksyre (98:2)

98 mL dietyleter og 2 mL eddiksyre ble målt opp i hver sin målesylinder og ført over i en blåkorkflaske.

## 3.3 Fisk og fiskefôr

Oppdrettslaksen var fersk og ble hentet hos Son brygge og fiskebutikk. Både oppdrettslaksen og fiskefôret kom fra oppdrettsanlegget AS Øylaks på Vestlandet. Villaksen kom fra Finnmarksfisk AS og var fanget med garn i Barentshavet. Den har vært nedfrosset ved  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  siden juni 2018.

### 3.4 Homogenisering av prøver

#### 3.4.1 Homogenisering av laks

Skinnfrie fiskefileter ble kuttet opp i mindre biter, og homogenisert med en stavmikser. Fiskemassen ble oppbevart i blåkorkrør ved -20 °C frem til ekstraksjon. Samme prosedyre ble utført for både villaks og oppdrettslaks. Illustrasjon av villaks og oppdrettslaks er gitt i henholdsvis figur 3.1 og 3.2.



*Figur 3.1: Villaksen som ble analysert i oppgaven.*



*Figur 3.2: Illustrasjon av en oppdrettslaks (Haga 2018).*

#### 3.4.2 Homogenisering av fiskefôr

Fôret var laget som pellets. Pelletene ble knust med en morter til en homogen blanding. For å holde fôret så ferskt som mulig, ble pelletene knust rett før ekstraksjon.



### 3.5 Totalt fettinnhold i fiskemuskel

Totalt fettinnhold i fisk ble bestemt ved ekstraksjon av lipidene etter Folchs metode (1957). Det ble overført 0,5 g laksemasse til et sentrifugerør. Deretter ble det tilsatt 10 mL Folchs løsning med en automatpipette, og ristet på ristebrett i 20 minutter ved 390 runder per minutt (rpm). Etter risting ble det tilsatt 2 mL NaCl-løsning (0,9%) og ristet med vortex-mikser, før rørene ble sentrifugert i 5 minutter ved 716 relativ sentrifugalkraft (rcf). Vannfasen ble fjernet, mens organisk fase ble overført til nye glassrør med en glasspipette. Prøvene ble så dampet inn med N<sub>2</sub>-gass på varmeblokk ved 40 °C. Da prøvene var nesten tørre, ble de overført til forhåndsveide mikrorør. Prøvene ble igjen dampet inn med N<sub>2</sub>-gass, før de ble satt i en vakuum-manifold i ca. tre døgn til konstant vekt ble oppnådd. Mikrorørene ble deretter veid på nytt for å finne totalt fettinnhold i lakseprøvene.

### 3.6 Total fettsyreprofil i laks

#### 3.6.1 Ekstraksjon

Ekstraksjonsprosedyren tok utgangspunkt i Folchs metode (1957). Det ble utført flere analyser for å finne riktig mengde internstandard. Det ble overført 0,5 g laksemasse til glassrør i to serier. Oversikt over mengde internstandard brukt i de ulike seriene er gitt i tabell 3.3.

Det ble tilsatt ulik mengde internstandard i villaksen for å kunne kvantitere alle forbindelsene i kromatogrammet. Det er av betydning at topparealet til den tilsatte internstandard er i samme størrelsesorden som arealene til analytt.

Det ble tilsatt 10 mL Folchs løsning. Prøvene ble ristet på ristebrett i 20 minutter ved 390 rpm. Deretter ble det tilsatt 2 mL saltvann til rørene, før de ble ristet med vortexmikser. Rørene ble så sentrifugert i 5 minutter ved 716 rcf. Vannfasen ble kastet, mens organisk fase ble overført med glasspipette til nye rør. Figur 3.3 illustrerer vannfase og organisk fase. Prøvene ble så dampet inn på varmeblokk ved 40 °C med N<sub>2</sub>-gass og gjort klare til derivatisering.



*Figur 3.3: Øverste lag består av vannfase. I nederste lag ligger organisk fase med lipidene. Proteinrester og annet biologisk restmateriale ligger som et mellomsljikt.*

Tabell 3.3: Mengde internstandard av trinonadekanoin (triglyserid av nonadekansyre, C19:0) brukt ved ekstraksjon av lipider i laks.

Serie 1	100 µL IS for Villaks
	200 µL IS for Oppdrettslaks
Serie 2	20 µL IS for Villaks
	200 µL IS for Oppdrettslaks

### 3.6.2 Derivatisering av lipider

For omdanning av lipider til fettsyremetylestere («fatty acid methyl esters», FAMES), ble det benyttet en kombinert metode for forestring og omestring. Lipidene fra ekstraksjonen ble reløst ved å tilsette 1 mL heptan, og deretter overført til derivatiseringsrør. Rørene ble ristet med vortexmikser, deretter tilsatt 1 mL natriummetanolat (5,0 mg/mL) og satt på ristebrett ved 390 rpm i 20 minutter. Rørene ble så tilsatt 1 mL BF<sub>3</sub>-metanol (14% BF<sub>3</sub> i metanol) og satt i vannbad ved 80 °C i 20 minutter. Prøvene ble avkjølt til romtemperatur, før de ble sentrifugert ved 381 rcf i 5 minutter. Heptanfasen ble overført til GC-vialer med en glasspipette. Prøvene ble fortynnet med heptan, 1:100 for oppdrettslaksen og 1:10 for villaksen, og lagret ved -20 °C inntil analyse med GC-MS.

### 3.7 Total fettsyreprofil i fiskefôr

Total fettsyreprofil til fiskefôret ble funnet på samme måte som for laksen i kapittel 3.6. 0,5 g homogenisert fiskefôr ble overført til sentrifugerør og tilsatt 200 µL IS (10 mg/mL). IS var triglyserid av C19:0. Prøvene ble fortynnet 1:100 med heptan.

### 3.8 Fraksjonering av lipider

#### 3.8.1 Ekstraksjon

Ekstraksjonen ble utført på samme måte som for total fettsyreprofil i kapittel 3.6.1. Det ble tilsatt tre internstandarder. Type og mengde internstandard er gitt i tabell 3.4. Etter inndamping med N<sub>2</sub>-gass, ble lipidene reløst i 1 mL kloroform og overført til GC-vialer. Det ble også laget blanke prøver med ren kloroform. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C inntil fraksjonering med SPE-robot.

Tabell 3.4: Internstandarder av C19:0 brukt ved fraksjonering av lipider. For de nøytrale lipidene i villaks ble det brukt to ulike mengder med internstandard.

		IS [10 mg/mL]	Volum [ $\mu$ L] tilsatt av IS	
			Villaks	Oppdrettslaks
Nøytrale lipider		Trinonadekanoin	100 / 25	200
Polare lipider	1,2-dinonadekanoyl-sn-glysero-3-fosfatidylkolin		25	50
Frie fettsyrer		Nonadekansyre	10	15

### 3.8.2 Fastfase-ekstraksjon av lipidklasser

Fastfase ekstraksjon ble utført med SPE-robot (Gilson, GX-274 ASPEC, Middleton, WI, USA). SPE-roboten fraksjonerer lipidene i nøytrale lipider, polare lipider og frie fettsyrer. Det ble benyttet ferdigpakke kolonner med lokk. GC-vialene med ekstraherte og reløste prøver ble satt i SPE-roboten sammen med kolonner og SPE-rør. Før fraksjoneringene kunne starte, ble instrumentet gjennomrenset med isopropanol. For kondisjonering av SPE-kolonnene ble det brukt 7,5 mL heptan. For å eluere de nøytrale lipidene ble det tilsatt 5,0 mL kloroform, og deretter ble 5,0 mL dietyleter:eddiksyre (98:2) benyttet for eluering av frie fettsyrer. Til slutt ble de polare lipidene eluert med 5,0 mL metanol. SPE roboten har en mobilfasehastighet på 1,0 mL/min og prøvene ble fraksjonert med et forhåndsinnlagt program kalt: «NL-FFA-PL».

### 3.8.3 Omestring av nøytrale- og polare lipider

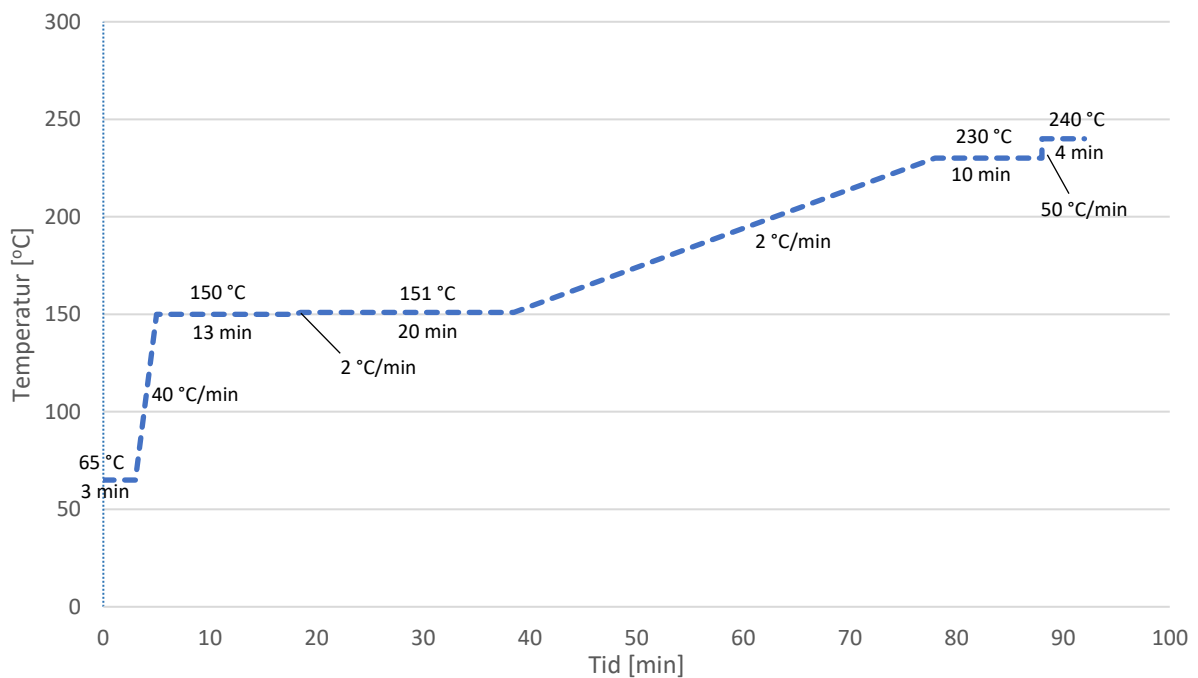
De nøytrale- og polare lipidene ble hver for seg overført fra SPE-rør til derivatiseringsrør med en glasspipette. De ble så dampet inn med N<sub>2</sub>-gass på varmeblokk ved 40 °C. Lipidene ble reløst i 2 mL heptan og tilsatt 1,5 mL Natriummetanolat. Prøvene ble så ristet på ristebrett ved 390 rpm i 30 minutter, og deretter satt i vertikal posisjon i 30 minutter for å skille de to lagene. Heptanfasen ble overført til GC vialer, og lagret ved -20 °C inntil analyse på GC-MS. De nøytrale lipidene for oppdrettslaks ble fortynnet 1:10 med heptan.

### 3.8.4 Forestring av frie fettsyrer

De frie fettsyrene ble overført fra SPE-rør til derivatiseringsrør, og dampet inn med N<sub>2</sub>-gass på varmeblokk ved 40 °C. Det ble så tilsatt 1 mL BF<sub>3</sub>-metanol, før prøvene ble plassert i vannbad i 5 minutter ved 80 °C. Rørene ble så avkjølt til romtemperatur, tilsatt 2 mL heptan og ristet med vortexmikser. Rørene sto noen minutter før heptanfasen ble overført til GC-vialer, og lagret ved -20 °C inntil analyse med GC-MS.

### 3.9 Analyse av fettsyrer med gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS)

Prøvene ble analysert på en GC-MS (GC: Agilent Technologies, Agilent 6890, Wilmington, DE, USA, MS: Micromass Ltd, Autospec Ultima, Manchester, England). GC-kolonnen fra Restek var 60 m, med en diameter på 0,25 mm og en filmtykkelse på 0,2 µm. Bæregassen var helium. Temperaturprogrammet varte i 90 minutter og er vist i figur 3.4.



Figur 3.4: Temperaturprogrammet til GC-MS.

Det ble brukt en split/splitless-injektor, som var i split-modus med split-ratio 1:10. Massespektrometeret hadde EI som ionekilde, produserte elektroner med 70 eV og hadde en akselerasjonsspenning på 8 kV. Massefilteret var en trippelsektor med EBE-konfigurasjon og detektoren var en elektronmultiplikator.

### 3.10 Identifisering av fettsyremetylestere

Fettsyremetylestere ble identifisert ved sammenlikning av retensjonstid til en referanseblanding med 37 standarder av ulike FAMEs, og biblioteksøk (NIST 08, Gaithersburg, MD, USA). Programvaren MassLynx 4.0 (Waters, Milford, MA, USA) ble brukt for innhenting av analysedata. Relative responsfaktorer (RRF) ble hentet fra Devle *et.al* (2009) og konsentrasjonen av fettsyrene ble beregnet ut i fra likning 3.1.

$$[\text{FAME}] = \frac{A(\text{FAME}) * [\text{IS}]}{A(\text{IS}) * \text{RRF}} \quad 3.1$$

RRF er den relative responsfaktoren til de ulike fettsyrene, og er gitt i vedlegg 3. [FAME] er konsentrasjonen til fettsyren og [IS] er konsentrasjonen til internstandard. Konsentrasjonen til de ulike internstandardene brukt i oppgaven er gitt i vedlegg 1. A (FAME) og A (IS) er arealet til henholdsvis fettsyren og internstandard.



## 4 Resultater og diskusjon

### 4.1 Bestemmelse av total fettinnhold i laksemuskel

Fettinnholdet i oppdrettslaks og villaks er gitt i tabell 4.1.

*Tabell 4.1: Fettinnholdet i laks (n=4) gitt i prosent av fiskemuskel med standardavvik.*

	Fettinnhold [%] $\pm$ SD
Villaks	1,8 $\pm$ 0,2
Oppdrettslaks	13,2 $\pm$ 0,6

Villaks og oppdrettslaks hadde et fettinnhold på henholdsvis 1,8% og 13,2%. Nylige studier (Jensen et al. 2012; Lundebye et al. 2017) har vist at villaks og oppdrettslaks har relativt ulikt fettinnhold, mens litt eldre studier (Blanchet et al. 2005) har kommet frem til at fettinnholdet i villaks og oppdrettslaks er omtrent det samme. Våre resultater viste at oppdrettslaks hadde et signifikant høyere fettinnhold enn villaks, med en differanse på 11,4%. Ut fra tidligere publisert litteratur (Jensen et al. 2012; Lundebye et al. 2017) var det forventet at villaks og oppdrettslaks skulle ha et fettinnhold på henholdsvis 6-8% og 12-14%. Det vil si at en fettprosent på 1,8 for villaks var lavere enn forventet. En årsak til dette kan være at vår studie kun inneholdt én laks av hver type. Individforskjeller mellom villaks og oppdrettslaks kan derfor ikke utelukkes. Med flere prøveparalleller fra flere ulike fisk, kunne man fått et mer representativt resultat. Et fettinnhold på 13,2% for oppdrettslaksen stemte godt overens med hva som var forventet.

Hvis man beregner en vanlig middagsporsjon til å være 150 g laksefilet, vil vi basert på denne studien få i oss 2,7 g fett fra villaksen og 19,5 g fett fra oppdrettslaksen. Vi får altså i oss betydelig mer fett ved inntak av oppdrettslaks.

Det er sesong for oppdrettslaks hele året og det var enkel tilgang på dette prøvematerialet. Villaks derimot har fiskesesong om sommeren og den er dermed vanskeligere å få tak resten av året. Villaksen som er brukt i denne oppgaven har ligget nedfrosset siden juni, mens oppdrettslaksen ble kjøpt fersk i januar. Etter å ha ligget i fryseren over lengre tid kan noe av fettsyrene i villaksen blitt oksidert, eller på annen måte dekomponert. Resultatene kunne dermed vært mer sammenlignbare hvis både oppdrettslaksen og villaksen hadde vært fersk, og/eller var fra samme årstid.

## 4.2 Bestemmelse av total fettsyreprofil i laks og fiskefôr

Det ble funnet totalt 18 ulike fettsyrer i dette studiet. En oversikt over alle fettsyrer funnet i villaks, oppdrettslaks og fiskefôr er gitt i tabell 4.2. Fettsyreprofilene er brukt for å sammenlikne ulike fettsyrer i villaks og oppdrettslaks, samt fôret som oppdrettslaksen spiser. Alle umettede fettsyrer som ble funnet hadde *cis*-konfigurasjon, og ingen hadde *trans*. Den korteste fettsyren som ble identifisert var C14:0, mens den lengste var C24:1*cis*15. Topparealene fra GC-MS-analysene ble regnet om til mg fettsyre/g laksemuskel, for å kunne sammenlikne konsentrasjonen av fettsyrene i hver fisk. Alle fettsyrene er over deteksjonsgrensen (LOD) og kvantifiseringsgrensen (LOQ), som er beregnet av Devle et al. (2009), og identifikasjon ble bekreftet med standarder gitt i vedlegg 2.

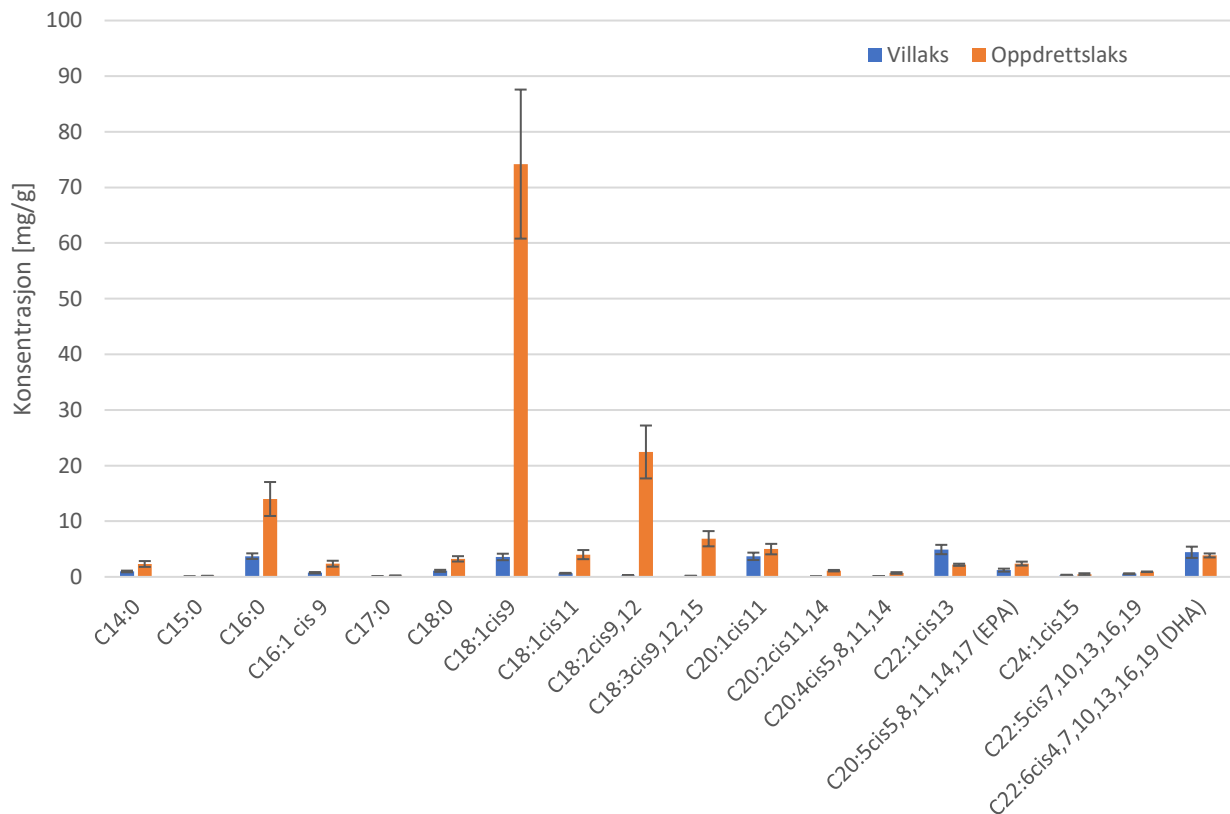
Tabell 4.2: Oversikt over alle fettsyrer funnet i villaks, oppdrettslaks og fiskefôr (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:		Villaks [mg/g] ± SD	Oppdrettslaks [mg/g] ±SD	Fiskefôr [mg/g] ±SD
C14:0		0,98 ± 0,1	2,32 ± 0,52	6,45 ± 0,39
C15:0		0,06 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,34 ± 0,02
C16:0		3,73 ± 0,50	14,00 ± 3,05	28,03 ± 1,39
C16:1 <i>cis</i> 9		0,75 ± 0,12	2,37 ± 0,53	4,98 ± 0,26
C17:0		0,09 ± 0,03	0,18 ± 0,08	0,55 ± 0,08
C18:0		1,09 ± 0,19	3,24 ± 0,48	8,83 ± 0,41
C18:1 <i>cis</i> 9		3,58 ± 0,58	74,20 ± 13,40	128,53 ± 6,86
C18:1 <i>cis</i> 11		0,65 ± 0,07	4,00 ± 0,82	7,44 ± 0,25
C18:2 <i>cis</i> 9,12	(n-6)	0,27 ± 0,03	22,45 ± 4,75	46,87 ± 2,43
C18:3 <i>cis</i> 9,12,15	(n-3)	0,19 ± 0,01	6,86 ± 1,37	18,01 ± 0,69
C20:1 <i>cis</i> 11		3,70 ± 0,66	4,99 ± 0,94	8,66 ± 0,24
C20:2 <i>cis</i> 11,14	(n-6)	0,06 ± 0,01	1,12 ± 0,13	0,34 ± 0,19
C20:4 <i>cis</i> 5,8,11,14	(n-6)	0,12 ± 0,02	0,70 ± 0,15	0,43 ± 0,05
C22:1 <i>cis</i> 13		4,92 ± 0,84	2,18 ± 0,19	8,60 ± 0,41
C20:5 <i>cis</i> 5,8,11,14,17 (EPA)	(n-3)	1,21 ± 0,27	2,39 ± 0,35	8,49 ± 0,36
C24:1 <i>cis</i> 15		0,33 ± 0,06	0,47 ± 0,19	0,70 ± 0,05
C22:5 <i>cis</i> 7,10,13,16,19	(n-3)	0,57 ± 0,08	0,92 ± 0,05	0,86 ± 0,07
C22:6 <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19 (DHA)	(n-3)	4,42 ± 1,01	3,86 ± 0,36	7,80 ± 0,47



### 4.3 Sammenlikning av total fettsyreprofil i villaks og oppdrettslaks

Da fôringsregimet er vidt forskjellig for villaks og oppdrettslaks er det forventet at dette gjenspeiles i fettsyreprofilene som er gitt i figur 4.1. En oversikt over alle fettsyrer funnet i villaks og oppdrettslaks er gitt i vedlegg 4 og 5. Vedleggene viser fettsyrene med tilhørende areal, retensjonstid, matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av fettsyrene inkludert standardavvik.

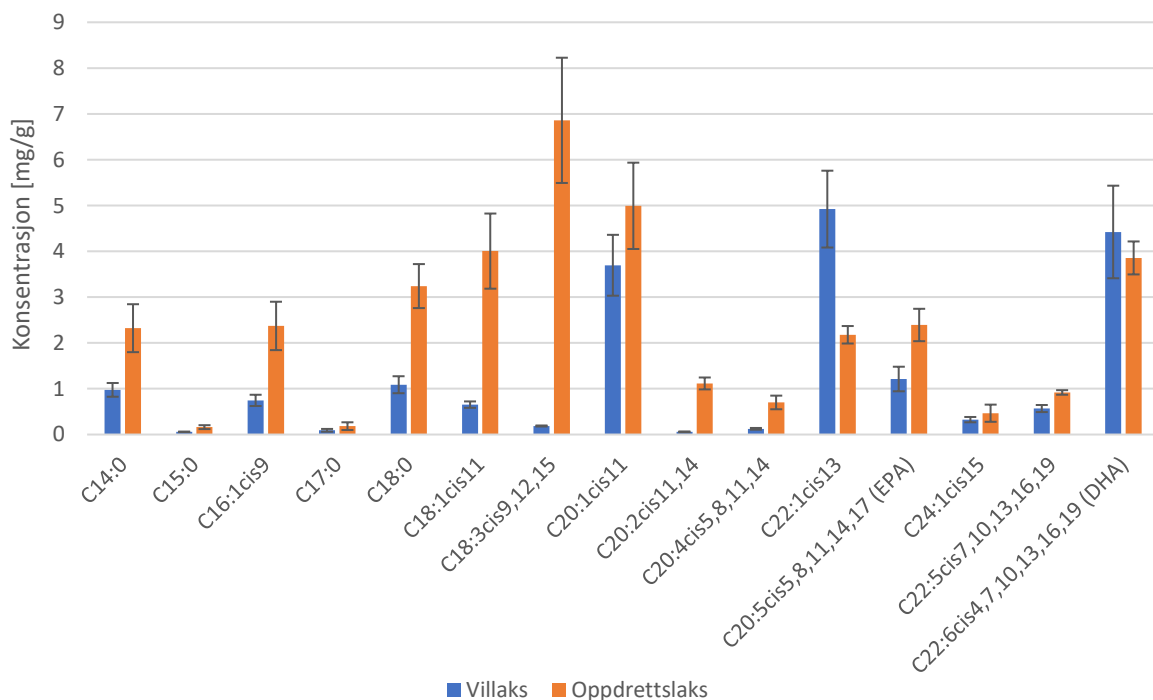


Figur 4.1: Sammenlikning av fettsyreprofil for villaks og oppdrettslaks (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

Det er spesielt tre fettsyrer som skiller seg ut i fettsyreprofilen for oppdrettslaks; C16:0, C18:1cis9 og C18:2cis9,12. Dette er fettsyrer med relativ høy konsentrasjon (14-74 mg/g), og tilsammen utgjør disse 75% av fettsyrene representert i oppdrettslaks. I villaks har disse tre fettsyrene en betydelig lavere konsentrasjon og utgjør kun 28% av fettsyrene. For å få en bedre oversikt over de resterende fettsyrene, er disse gitt i figur 4.2.

C18:1*cis*9 (oljesyre) i oppdrettslaks har en konsentrasjon på 74,2 mg/g og utgjør hele 50% av fetttsyreinnholdet i fisken. Dette er en umettet n-9 fettsyre som finnes naturlig i ulike plante- og animalske kilder, og er blant annet hovedbestanddelen i olivenolje (Menendez et al. 2005). C18:1*cis*9 er med på å redusere risiko for hjertesykdommer (Lopez-Huertas 2010) og innholdet av denne fettsyren i olivenolje er årsaken til at olivenolje er med på å redusere høyt blodtrykk (Terés et al. 2008). Det stemmer godt overens med nylige studier at oppdrettslaksen har et høyt innhold av C18:1*cis*9 (Friesen et al. 2015; Sprague et al. 2016).

Fettsyren med den nest høyeste konsentrasjonen i oppdrettslaks er n-6 fettsyren C18:2*cis*9,12 (linolsyre, LA). LA hadde en konsentrasjon på 22,5 mg/g og utgjorde 15% av fetttsyreinnholdet i laksen. Dette er en viktig essensiell fettsyre. Oppdrettslaksen hadde også en høy konsentrasjon av den essensielle n-3 fettsyren C18:3*cis*9,12,15 (alfalinolsyre, ALA). Det som er spesielt med ALA er at kroppen selv kan danne de viktige n-3 fettsyrene EPA og DHA ved inntak av denne fettsyren (Nelson & Cox 2017). Disse to essensielle fettsyrene er viktig for kroppen, og må inntas via kostholdet. Til sammen utgjør disse to essensielle fettsyrene 20% av fettsyrene i oppdrettslaksen, og kun 2% i villaksen.



Figur 4.2: Sammenlikning av fetttsyreprofil for villaks og oppdrettslaks (n=4) med standardavvik. C16:0, C18:1*cis*9 og C18:2*cis*9,12 er utelatt fra figuren for å få frem de resterende fettsyrene. Konsentrasjonen er gitt i mg fetttsyre/g laksemuskel.

Oppdrettslaksen inneholder mer fett enn villaksen, og det var derfor forventet at den også skulle ha en høyere konsentrasjon av de fleste fettsyrer. Det er kun to fettsyrer som har en høyere konsentrasjon i villaks. Det er n-9 fettsyren C22:1*cis*13 og n-3 fettsyren C22:6*cis*4,7,10,13,16,19 (DHA) som til sammen utgjør 35% av fettsyrene i villaks. C22:1*cis*13 (erukasyre) kan utgjøre en helserisiko for barn under 10 år, og Europeiske myndigheter for næringsmiddeltrygghet, EFSA, kom i 2016 med en rapport som anbefalte et daglig inntak på 7 mg/kg kroppsvekt (Knutsen et al. 2016). For et barn som veier 25 kg vil dette si et inntak på 19,6 mg/kg C22:1*cis*13 ved å spise 100 g villaks. Dette er nesten tre ganger mer enn hva som er anbefalt.

I villaks er det tre fettsyrer som skiller seg ut i tillegg til C22:1*cis*13 og DHA. Det er C20:1*cis*11, C18:1*cis*9 og C16:0. Disse fem fettsyrene utgjør til sammen 76% av fettsyrene representert i villaks. En studie fra 2013 (Olsen et al. 2013) viste at disse fettsyrene utgjorde 65% av fettsyreinholdet i villaks.

En oversikt over total mengde mettede fettsyrer («saturated fatty acid», SFA), enumettede fettsyrer («monounsaturated fatty acid», MUFA) og flerumettede fettsyrer («polyunsaturated fatty acid», PUFA), samt n-3- og n-6 fettsyrer i oppdrettslaks og villaks er gitt i tabell 4.3.

Tabell 4.3: Total mengde SFA, MUFA, PUFA, n-3- og n-6 fettsyrer i villaks og oppdrettslaks (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

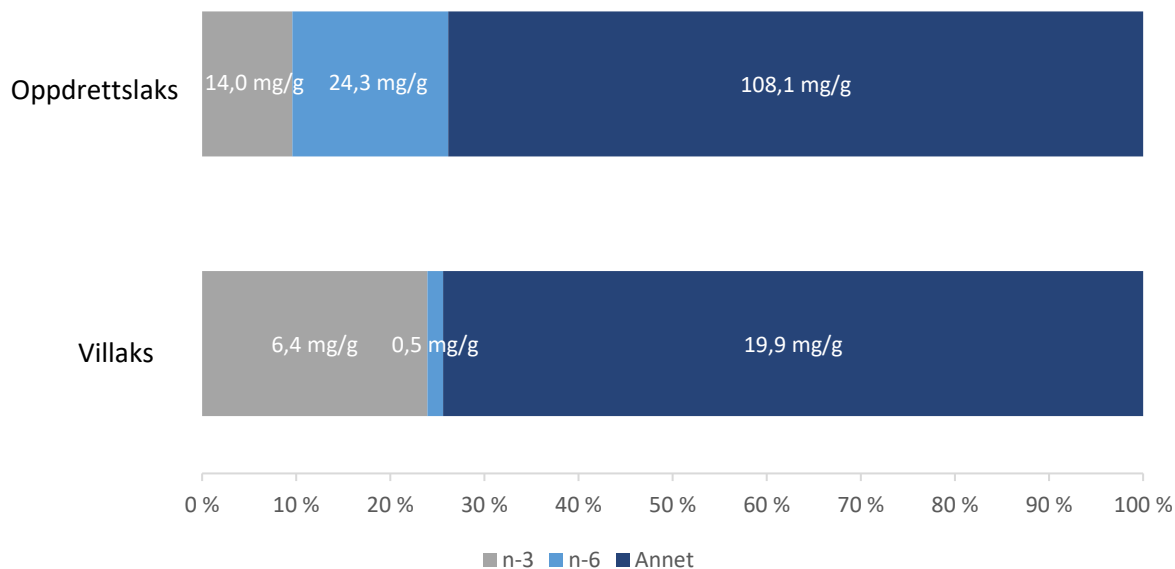
	Villaks [mg/g] ±SD	Oppdrettslaks [mg/g] ±SD
Σ SFA	5,90 ± 0,50	19,90 ± 3,05
Σ MUFA	13,92 ± 0,84	88,21 ± 13,40
Σ PUFA	6,84 ± 1,01	26,16 ± 4,75
Totalt	26,70	134,27
Σ n-3	6,39 ± 1,01	14,03 ± 1,37
Σ n-6	0,45 ± 0,03	24,27 ± 4,75

Standardavvikene er det høyeste standardavviket av de summerte verdiene.

Totalt inneholder villaks 26,7 mg/g fettsyrer, mens oppdrettslaksen inneholder 134,3 mg/g. Oppdrettslaksen inneholder fem ganger så mye fettsyrer som villaksen. Dette stemmer godt overens med det totale lipidinnholdet, som var syv ganger høyere for oppdrettslaks enn villaks.

#### 4.4 Sammenlikning av n-3- og n-6 fettsyrer i villaks og oppdrettslaks

En prosentvis oversikt over n-3- og n-6 fettsyrer i de to laksetypene er samlet i figur 4.3. De resterende fettsyrene er også tatt med, for å vise hvor stor andel av laksen n-3- og n-6 fettsyrene utgjør.



Figur 4.3: Prosentvis mengde n-3 fettsyrer, n-6 fettsyrer og de resterende fettsyrene i villaks og oppdrettslaks. Konsentrasjonen til de ulike kategoriene er vist inne i figuren med benevnning mg fettsyre/g laksemuskel. Villaks består av 23,0% n-3 fettsyrer, 1,6% n-6 fettsyrer og 75,4% andre fettsyrer. Oppdrettslaks består av 9,6% n-3 fettsyrer, 16,5% n-6 fettsyrer og 73,9% andre fettsyrer.

Både villaks og oppdrettslaks inneholder til sammen rundt 25% n-3- og n-6 fettsyrer. De har altså et relativt likt forhold (1:3) mellom n-3- og n-6 fettsyrer og de resterende fettsyrene. Forholdet mellom n-3 fettsyrene og n-6 fettsyrene i villaks og oppdrettslaks er derimot ulikt. Villaksen inneholder mer n-3 fettsyrer enn n-6 fettsyrer, mens oppdrettslaksen inneholder mindre n-3 fettsyrer enn n-6 fettsyrer. Siden man får i seg nok n-6 fettsyrer i kosten ellers (Simopoulos 2004), er det n-3 fettsyrene som er viktig å få fra fisk. Villaks har et n-6/n-3 forhold på 0,1, mens oppdrettslaks har et n-6/n-3 forhold på 1,7. Forholdet n-6/n-3 vil man skal være så lite som mulig (Simopoulos 2008), og villaks har dermed et mer gunstig forhold mellom n-6- og n-3 fettsyrer enn oppdrettslaksen. Et n-6/n-3-forhold i kostholdet på mindre enn 5:1 er fordelaktig for human helse (Yang et al. 2016).

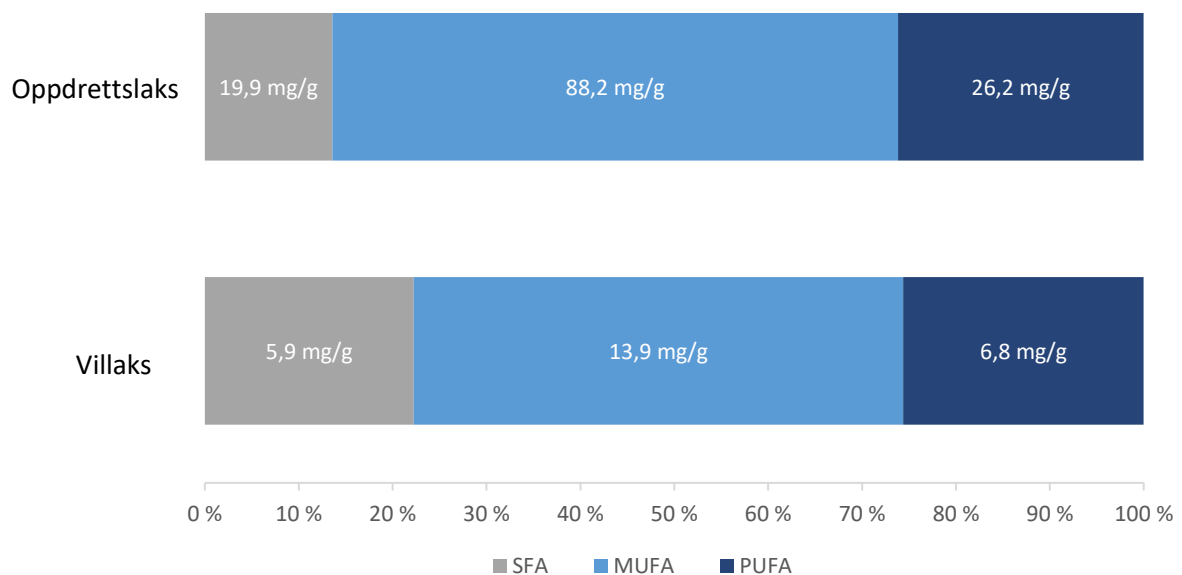
Siden oppdrettslaks inneholder mer fett enn villaks, vil man få i seg mer n-3- og n-6 fettsyrer ved å spise oppdrettslaks. Hvis man spiser en middagsporsjon med 150 g laksefilet, vil vi basert

på denne studien få i oss 5,7 g n-3- og n-6 fettsyrer fra oppdrettslaks og 1,0 g fra villaks. Fra oppdrettslaks får vi da i oss 2,1 g n-3 fettsyrer og 3,6 g n-6 fettsyrer, mens fra villaksen får vi i oss 1,0 g n-3 fettsyrer og 0,1 g n-6 fettsyrer. Oppdrettslaks inneholder mer n-3 fettsyrer enn villaksen, men også betydelig mer n-6.

Vi har to viktige marine n-3 fettsyrer, DHA og EPA. EFSA anbefaler et daglig inntak av disse marine n-3 fettsyrene på 0,25 g (EFSA Panel on Dietetic Products & Allergies 2012). Spiser vi 150 g laks får vi basert på denne studien i oss 0,9 g DHA og EPA fra oppdrettslaksen og 0,8 g fra villaksen. Man trenger altså kun å spise 47 g villaks eller 42 g oppdrettslaks for å få i seg det anbefalte daglige inntaket av DHA og EPA.

#### 4.5 Sammenlikning av SFA, MUFA og PUFA i oppdrettslaks og villaks

For å skille mellom mettede-, enumettede- og flerumettede fettsyrer er disse ulike kategoriene gitt i tabell 4.3 og figur 4.4. SFA, MUFA og PUFA har ulik påvirkning på human helse. Generelt mener man at MUFA og PUFA er bedre for kroppen enn SFA, og ved å spise umettet fett kan man redusere muligheten for å få hjerte- og karsykdommer (Sacks et al. 2017).



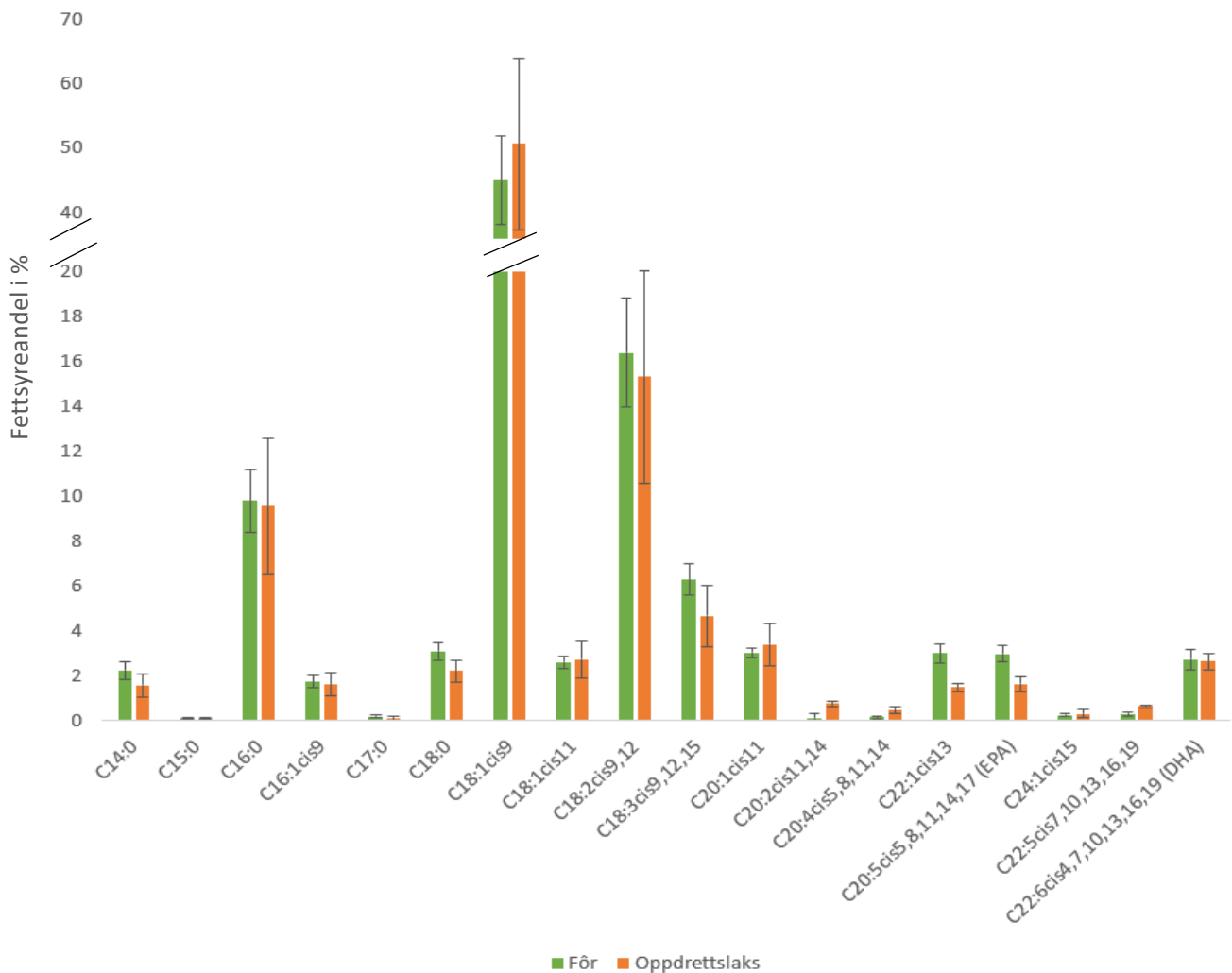
Figur 4.4: Prosentvis mengde SFA, MUFA og PUFA i villaks og oppdrettslaks. Konsentrasjonen til de ulike kategoriene er vist inne i figuren med benevnning mg fettsyre/g laksemuskel. Villaks består av 22,3% SFA, 52,1% MUFA og 25,6% PUFA. Oppdrettslaks består av 13,6% SFA, 60,2% MUFA og 26,2% PUFA.

Villaks består av 22,3% SFA, mens oppdrettslaks består av 13,6%. Villaks har altså en høyere prosentandel SFA enn oppdrettslaks, men ser vi på konsentrasjonen inneholder oppdrettslaksen vesentlig mer SFA enn villaksen (henholdsvis 19,9 mg/g og 5,9 mg/g). Spiser man like mye oppdrettslaks som villaks får man altså i seg mer SFA ved å spise oppdrettslaks. Selv om man får i seg mer SFA, får man også i seg betydelig mer MUFA og PUFA på grunn av oppdrettslaksens høye fettprosent i forhold til villaks.

#### 4.6 Sammenlikning av total fettsyreprofil i oppdrettslaks og fiskefôr

For å kunne vurdere fiskefôrets påvirkning på oppdrettslaksens fettsyresammensetning, ble det i denne studien også bestemt total fettsyreprofil i fiskefôr. Siden fôrsammensetningen har vært i endring de siste årene, ville det være interessant å se i hvor stor grad fettsyreprofilen til fôret ble gjenspeilet i oppdrettslaksen. Den prosentvise andelen av de ulike fettsyrene i henholdsvis oppdrettslaks og fiskefôr er gitt i figur 4.5. En oversikt over alle fettsyrer funnet i fiskefôr med tilhørende areal, retensjonstid, matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av fettsyrene inkludert standardavvik er gitt i vedlegg 6.

## Resultater og diskusjon



Figur 4.5: Sammenligning av fettsyreprofil for oppdrettslaks og fiskefôr (n=4) med standardavvik. y-aksen har et brudd for å komprimere C18:1cis9.

Ut fra figur 4.5 ser man at oppdrettslaks og fôret den spiser inneholder de samme fettsyrene. Også det prosentvise innholdet av de enkelte fettsyrene er relativt likt. C18:1cis9, som utgjorde hele 50% av fettsyrene i oppdrettslaksen, er også fettsyren det er mest av i fôret. En studie av Sprague et al. (2016) viser at mengden C18:1cis9 har økt i oppdrettslaks i samsvar med økt mengde vegetabiliske ingredienser i fôret. Dette stemmer godt overens med hva som er funnet i dette studiet.

Oppdrettslaksen hadde et n-6/n-3 forhold på 1,7, mens fôret har et forhold på 1,4. Oppdrettslaksen har altså et relativt likt n-6/n-3 forhold som fôret den spiser. De viktige marine n-3 fettsyrene EPA og DHA utgjør 5,7% av fettsyrene i fôret og 4,2% i oppdrettslaksen. Det vil si at fôret har en litt bedre sammensetning av n-6- og n-3 fettsyrer, i tillegg til å inneholde mer EPA og DHA enn oppdrettslaksen studert i denne oppgaven. Siden det i dette studiet kun er

hentet prøvemateriale fra én oppdrettslaks, kunne resultatet blitt annerledes hvis det ble utført samme studie med et større utvalg av prøvemateriale.

#### 4.7 Fraksjonering av lipider i laks

I tillegg til bestemmelse av total fettsyreprofil, ble de ekstraherte lipidene fra lakseprøvene separert i tre ulike fraksjoner; nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider. Resultatet av fraksjoneringen er gitt i tabell 4.4. Her er alle fettsyrer i de ulike fraksjonene tatt med for å gi en best mulig oversikt. En oversikt over alle nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider funnet i villaks og oppdrettslaks er også gitt i vedlegg 7-9. Vedleggene viser fettsyrene med tilhørende areal, retensjonstid, matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av fettsyrene inkludert standardavvik.



Tabell 4.4: Oversikt over alle nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider funnet i villaks og oppdrettslaks (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i µg fettsyre/g laksemuskel

Fettsyre:	Villaks [µg/g] ± SD				Oppdrettslaks [µg/g] ± SD			
	NL	FF	PL	NL	FF	PL		
C14:0	1015,6 ± 128,7	102,3 ± 27,7	21,0 ± 4,4	1689,9 ± 407,4	21,5 ± 3,6	16,2 ± 3,2		
C15:0	55,1 ± 10,9	7,9 ± 1,7	3,3 ± 0,9	104,7 ± 24,8	2,2 ± 0,5	3,8 ± 0,5		
C16:0	2770,5 ± 341,4	559,3 ± 132,8	448,1 ± 117,2	9033,0 ± 2193,1	187,9 ± 17,0	499,2 ± 133,5		
C16:1cis9	683,4 ± 152,8	59,5 ± 14,9	9,4 ± 3,2	1753,7 ± 447,7	16,3 ± 4,1	10,5 ± 2,4		
C17:0	63,6 ± 13,9	6,8 ± 2,6	6,4 ± 1,1	101,1 ± 23,3	n.d.	6,0 ± 3,5		
C18:0	791,1 ± 200,1	115,4 ± 19,1	28,7 ± 7,4	2241,6 ± 523,5	71,4 ± 3,1	27,4 ± 7,9		
C18:1cis9	3311,8 ± 542,3	220,2 ± 50,4	65,0 ± 15,7	53379 ± 12298,4	259,7 ± 58,1	287,1 ± 76,7		
C18:1cis11	584,9 ± 144,2	60,5 ± 15,6	16,8 ± 4,7	2964,6 ± 732,6	22,0 ± 4,6	28,8 ± 8,6		
C18:2cis9,12	265,5 ± 67,8	31,7 ± 7,3	4,4 ± 0,5	16966,4 ± 3894,2	135,7 ± 25,2	109,7 ± 25,6		
C18:3cis9,12,15	190,8 ± 43,3	25,3 ± 5,2	4,8 ± 0,9	5556,8 ± 1365,2	53,3 ± 9,4	76,3 ± 18,5		
C20:1cis11	3307,4 ± 576,0	166,5 ± 43,7	17,6 ± 4,8	3716,5 ± 825,6	16,1 ± 4,2	9,7 ± 2,8		
C20:2cis11,14	60,5 ± 14,7	5,4 ± 2,1	n.d.	871,4 ± 207,9	8,6 ± 1,7	n.d.		
C20:4cis5,8,11,14	101,6 ± 22,1	15,9 ± 3,7	13,0 ± 4,0	474,5 ± 109,6	n.d.	22,4 ± 4,9		
C22:1cis13	4296,4 ± 642,2	212,2 ± 59,0	n.d.	1678,5 ± 382,5	6,5 ± 1,5	n.d.		
C20:5cis5,8,11,14,17 (EPA)	1046,7 ± 161,9	236,9 ± 61,7	146,7 ± 38,0	1629,2 ± 370,4	31,9 ± 3,6	259,0 ± 65,1		
C24:1cis15	367,7 ± 116,1	18,3 ± 5,3	n.d.	395,6 ± 81,4	4,8 ± 2,5	7,5 ± 1,3		
C22:5cis7,10,13,16,19	597,8 ± 138,3	42,1 ± 10,8	42,2 ± 12,0	747,8 ± 162,8	10,3 ± 7,7	65,9 ± 15,4		
C22:6cis4,7,10,13,16,19 (DHA)	2773,7 ± 424,3	289,2 ± 82,4	1459,3 ± 390,0	2259,0 ± 526,6	28,1 ± 4,9	979,1 ± 234,1		

n.d.: Ikke funnet («not detected»).

En oversikt over total mengde SFA, MUFA PUFA, samt n-3- og n-6 fettsyrer i de ulike fraksjonene er gitt i tabell 4.5.

Tabell 4.5: Total mengde SFA, MUFA, PUFA, n-3- og n-6 fettsyrer i villaks og oppdrettslaks for nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

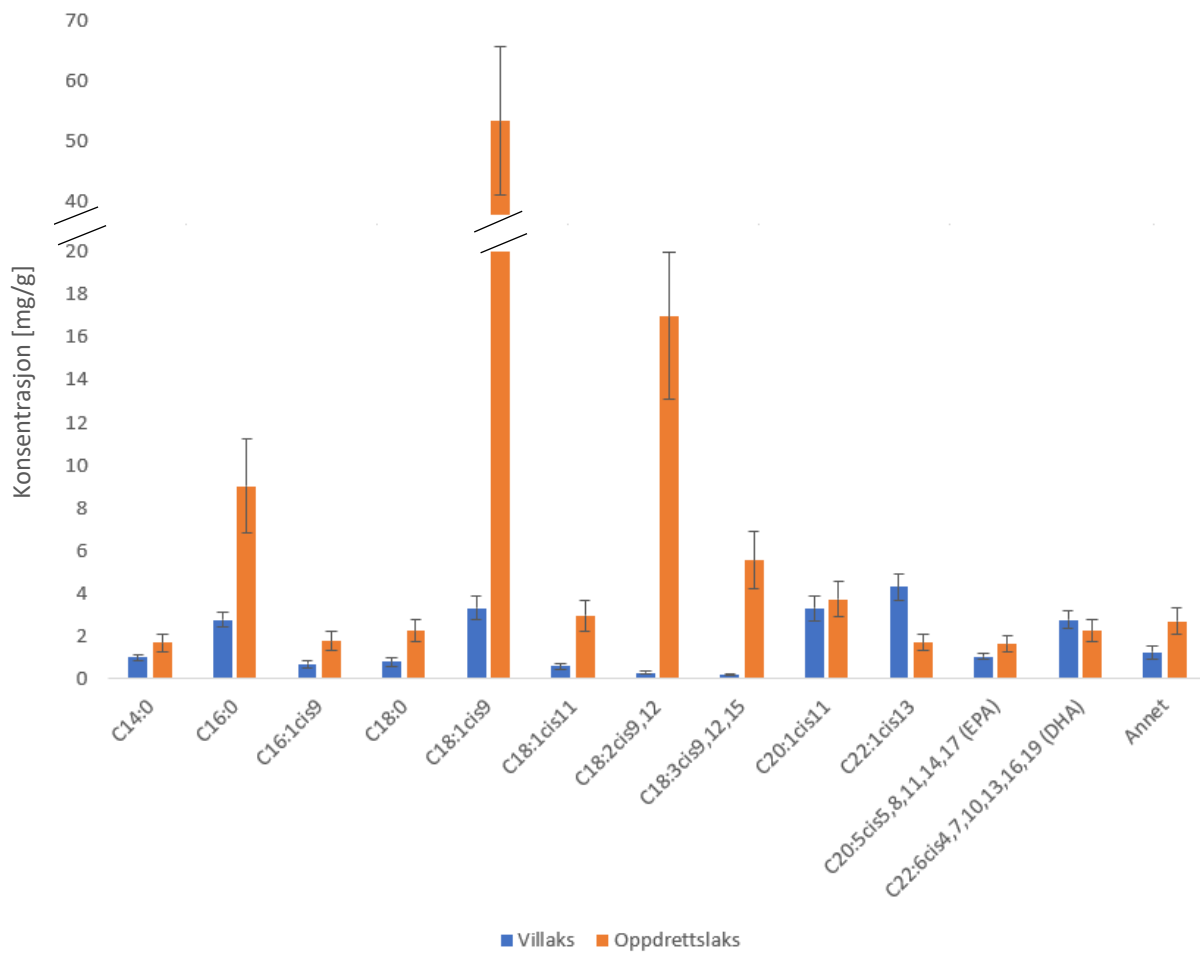
	Villaks [mg/g] ±SD			Oppdrettslaks [mg/g] ±SD		
	NL	FF	PL	NL	FF	PL
Σ SFA	4,69 ± 0,34	0,80 ± 0,13	0,51 ± 0,01	13,16 ± 2,19	0,28 ± 0,02	0,55 ± 0,13
Σ MUFA	12,55 ± 0,64	0,74 ± 0,06	0,11 ± 0,02	63,89 ± 12,30	0,33 ± 0,06	0,34 ± 0,08
Σ PUFA	5,04 ± 0,42	0,66 ± 0,08	1,67 ± 0,04	28,51 ± 3,89	0,27 ± 0,03	1,51 ± 0,23
Totalt	22,28	2,20	2,29	105,56	0,88	2,41
Σ n-3	4,61 ± 0,42	0,60 ± 0,08	1,65 ± 0,39	10,20 ± 1,37	0,12 ± 0,01	1,39 ± 0,23
Σ n-6	0,43 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,02 ± <0,01	18,31 ± 3,89	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,03

Standardavvikene er det høyeste standardavviket av de summerte verdiene.

Både villaks og oppdrettslaks inneholder mest nøytrale lipider med henholdsvis 22,3 mg/g og 105,6 mg/g. Oppdrettslaksen inneholder altså fem ganger så mye nøytrale lipider som villaksen. Dette stemmer godt med forskjell i totalt lipidinnhold.

Det er relativt lite polare lipider og frie fettsyrer i både villaks og oppdrettslaks. I oppdrettslaks utgjør frie fettsyrer 1%, mens de polare lipidene utgjør 2% av totalt lipidinnhold. Det er få studier gjort på frie fettsyrer og polare lipider i laks, men en studie utført av Aursand et al. (1994) stemmer godt overens med våre resultater med henholdsvis 0,4% frie fettsyrer og 3% polare lipider i oppdrettslaks. I vår studie utgjør frie fettsyrer 8%, mens de polare lipidene utgjør 9% av totalt lipidinnhold i villaks. En studie av Bell et al. (1998) viser at oppdrettslaks og villaks inneholder henholdsvis 8% og 20% polare lipider. Dette er vesentlig mer enn hva som er funnet av oss i vårt prøvemateriale. Aursand et al. og Bell et al. er begge eldre studier som kanskje ikke er like representative i dag. Oppdrettslaksen har fått endret førsammensetning, mens villaksen kan ha blitt fisket fra andre havområder enn vår.

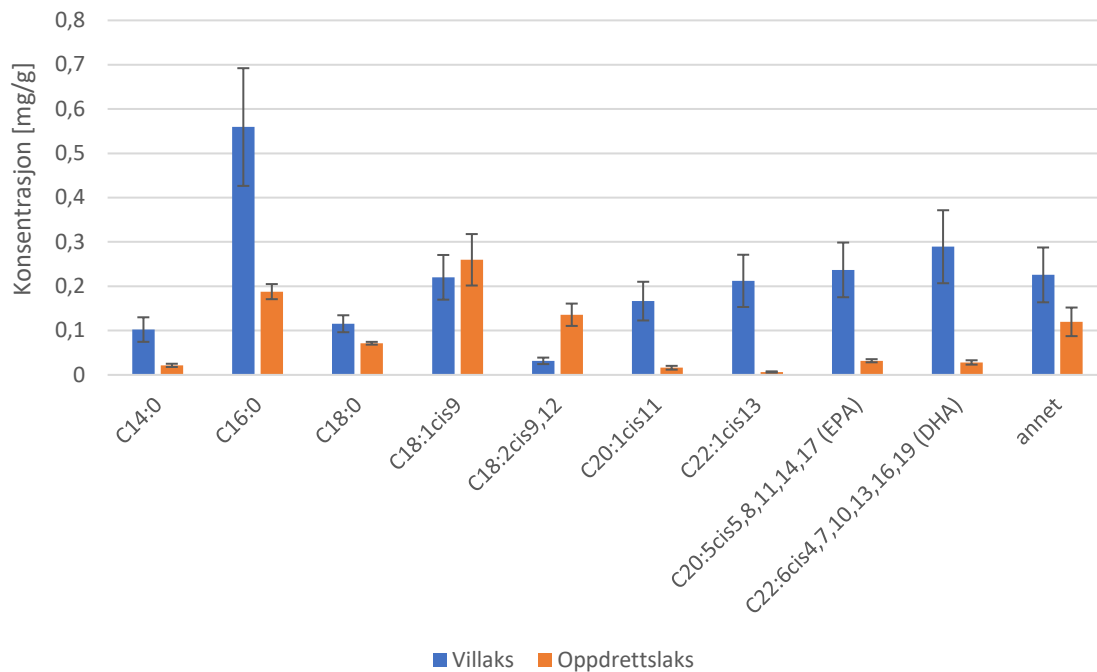
De nøytrale lipidene har en fettsyreprofil som er relativt lik den totale fettsyreprofilen for villaks og oppdrettslaks, og er gitt i figur 4.6.



Figur 4.6: Nøytrale lipider i villaks og oppdrettslaks (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel. Fettsyrer som utgjorde mindre enn 1,0 mg/g er utelatt fra figuren. y-aksen har et brudd for å komprimere C18:1cis9.

Oppdrettslaksen har totalt en høyere konsentrasjon av de nøytrale lipidene enn villaksen, som var forventet ettersom oppdrettslaksen inneholdt mer fett. Igjen er det C18:1cis9 som er den dominerende fettsyren i oppdrettslaks.

De frie fettsyrene som ble funnet etter fraksjonering er gitt i figur 4.7.

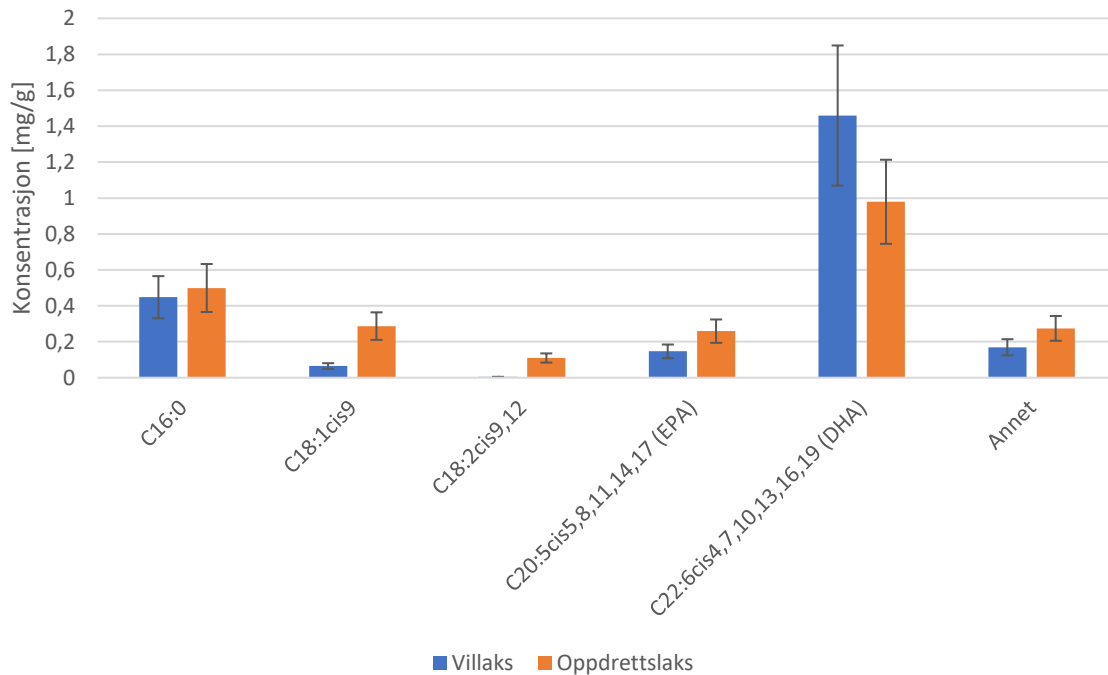


Figur 4.7: Sammenligning av frie fettsyrer i villaks og oppdrettslaks (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel. Fettsyrer som utgjorde mindre enn 0,1 mg/g er utelatt fra figuren.

Frie fettsyrer fungerer som energikilder eller signalmolekyler i cellulære prosesser og er viktig for skjelett, hjerte og lever (Boden & Shulman 2002; Itoh et al. 2003). Villaksen inneholder totalt en høyere konsentrasjon av frie fettsyrer enn oppdrettslaksen, med henholdsvis 2,2 mg/g og 0,9 mg/g frie fettsyrer. Selv om villaksen inneholder betydelig mindre fett enn oppdrettslaksen, har den mer enn dobbelt så mye frie fettsyrer. Det er hittil ikke funnet andre studier som sammenlikner innhold av frie fettsyrer i villaks med oppdrettslaks. Det er derfor vanskelig å vurdere validiteten til våre resultater, særlig med bakgrunn i vårt manglede prøveutvalg. En årsak til at vår villaks inneholder betydelig mer frie fettsyrer enn oppdrettslaks kan være at villaksen har ligget lenge i fryser. Noe av fettsyrene fra nøytrale lipider kan da ha spaltet av til frie fettsyrer.

Fettsyren som har høyest konsentrasjon er C16:0, som utgjør 26% av de frie fettsyrene i villaks. Oppdrettslaks inneholder lite frie fettsyrer, og det er C18:1cis9 som har høyest konsentrasjon. C18:1cis9 utgjør 30% av de frie fettsyrene i oppdrettslaks.

De polare lipidene er gitt i figur 4.8.



Figur 4.8: Sammenligning av polare lipider i villaks og oppdrettslaks (n=4) med standardavvik. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel. Fettsyrer som utgjorde mindre enn 0,1 mg/g er utelatt fra figuren.

Polare lipider er viktige for cellemembranen. Villaks og oppdrettslaks har høyest konsentrasjon av n-3 fettsyren DHA, som utgjør henholdsvis 64% og 41% av fettsyrene i fisken. C16:0, C18:1cis9, n-6 fettsyren C18:2cis9,12 og n-3 fettsyren EPA er også fettsyrer som kommer frem blant polare lipider i oppdrettslaks. Disse fem fettsyrene utgjør 89% av de polare lipidene i oppdrettslaksen. C16:0 og EPA, sammen med DHA utgjør hele 90% av de polare lipidene i villaks. Totalt inneholder oppdrettslaks og villaks relativt lik mengde med polare lipider.



## 5 Konklusjon

Det ble funnet fettinnhold i villaks og oppdrettslaks, og oppdrettslaksen hadde en høyere fettprosent enn villaksen. Villaks inneholdt 1,8% fett, mens oppdrettslaksen inneholdt 13,2%.

Total fettsyreprofil ble funnet i villaks og oppdrettslaks. Oppdrettslaks hadde en høyere fettprosent enn villaks og da også en høyere konsentrasjon av de fleste fettsyrer. C18:1*cis*9 var fettsyren med høyest konsentrasjon i oppdrettslaksen, og utgjorde hele 50% av fettsyrene. Både villaks og oppdrettslaks hadde høyere innhold av MUFA og PUFA i forhold til SFA. Villaks og oppdrettslaks inneholdt relativ lik mengde av de viktige marine n-3 fettsyrene EPA og DHA, men villaks hadde det beste n-6/n-3 forholdet.

Total fettsyreprofil for fiskefôr ble også funnet, for å sammenlikne med fettsyrene i oppdrettslaks. Fiskefôret inneholdt de samme fettsyrene som oppdrettslaks, og prosentvis mengde av hver enkel fettsyre var også relativt lik. Fiskefôret som består av mer vegetabiliske ingredienser enn fôr, påvirker altså fettsyrene i oppdrettslaksen. Oppdrettslaks består av mer vegetabiliske n-6 fettsyrer og mindre marine n-3 fettsyrer enn tidligere.

Lipidene i villaks og oppdrettslaks ble fraksjonert i nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider. Villaks og oppdrettslaks inneholdt mest nøytrale lipider og relativt lite frie fettsyrer og polare lipider. Oppdrettslaks og villaks hadde relativt likt innhold av polare lipider, men villaks hadde den høyeste konsentrasjonen av den viktige fettsyren DHA. DHA utgjorde hele 64% av de polare lipidene i villaks.

Av oppdrettslaks og villaks hadde oppdrettslaks det høyeste fettinnholdet. Begge laksetypene inneholdt omtrent lik mengde av de viktige n-3 fettsyrene DHA og EPA, men villaksen viste seg å ha det mest gunstige n-6/n-3-forholdet. Ut fra disse resultatene kan man utfra et helsemessig perspektiv vurdere et kosthold med inntak av villaks i stedet for oppdrettslaks som mest gunstig.





## 6 Videre arbeid

I dette studiet ble det sett på forskjell i fettsyreprofil for villaks og oppdrettslaks, samt fiskefôr. Det ble analysert én fisk av hvert slag. Videre kan flere paralleller av et større utvalg med laks analyseres, for å få et mer representativt resultat. Flere typer fisk kan også analyseres, som ørret (*Salmo trutta*) og torsk (*Gadus morhua*). Det er mulig å sammenlikne vill ørret og oppdrettsørret, samt vill torsk og oppdrettstorsk og sammenlikne disse resultatene med villaks og oppdrettslaks. Det ville vært interessant å se på totalt fettinnhold og forskjell i n-6/n-3-forholdet i ulike fiskearter.



## 7 Referanser

- Akoh, C. C. & Min, D. B. (2008). *Food lipids: chemistry nutrition, and biotechnology*. 2 utg. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Anon. (2018). Status for norske laksebestander i 2018. *Rapport fra Vitenskapelig råd for lakseforvaltning nr 11*, 122 s.
- Aursand, M., Bleivik, B., Rainuzzo, J. R., Jørgensen, L. & Mohr, V. (1994). Lipid distribution and composition of commercially farmed atlantic salmon (*salmosalar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64 (2): 239-248.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Webster, J. L., McGhee, F., Millar, R. M. & Sargent, J. R. (1998). Flesh lipid and carotenoid composition of Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1): 119-127.
- Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A., Smullen, R. P. & Sargent, J. R. (2002). Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, 132 (2): 222-230.
- Blanchet, C., Lucas, M., Julien, P., Morin, R., Gingras, S. & Dewailly, É. (2005). Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*, 40 (5): 529-531.
- Boden, G. & Shulman, G. I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. *European journal of clinical investigation*, 32: 14-23.
- Christie, W. W. (2003). *Lipid analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. 3 utg. Bridgewater: The Oily Press.
- Connor, W. E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*, 71 (1): 171S-175S.
- Devle, H., Rukke, E. O., Naess-Andresen, C. F. & Ekeberg, D. (2009). A GC-magnetic sector MS method for identification and quantification of fatty acids in ewe milk by different acquisition modes. *Journal of separation science*, 32 (21): 3738-3745.
- Diserud, O. H., Hindar, K., Karlsson, S., Glover, K. A. & Skaala, Ø. (2017). Genetisk påvirkning av rømt oppdrettslaks på ville laksebestander-status 2017.
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. & Allergies. (2012). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA Journal*, 10 (7): 2815.

- Fiskeridirektoratet. (2019a). Tilgjengelig fra: <https://kart.fiskeridir.no/> (hentet 03.04.2019).
- Fiskeridirektoratet. (2019b). *Rømmingsstatistikk*. Tilgjengelig fra: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Roemningsstatistikk> (lest 04.04.2019).
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J biol Chem*, 226 (1): 497-509.
- Friesen, E. N., Higgs, D. A. & Devlin, R. H. (2015). Flesh nutritional content of growth hormone transgenic and non-transgenic coho salmon compared to various species of farmed and wild salmon. *Aquaculture*, 437: 318-326.
- Glover, K. A., Hindar, K., Karlsson, S., Skaala, Ø. & Svåsand, T. (2011). Genetiske effekter av rømt oppdrettslaks på ville laksebestander:: utforming av indikatorer. *NINA rapport*.
- Grefsrud, E. S., Glover, K., Grøsvik, B. E., Husa, V., Karlsen, Ø., Kristiansen, T., Kvamme, B. O., Mortensen, S., Samuelsen, O. B., Stien, L. H., et al. (2018). Risikoreport norsk fiskeoppdrett 2018. Fisken og havet, særnr. 1-2018.
- Haga, T. (2018). *Oppdrettslaks, bilde*. Tilgjengelig fra: <https://laksefakta.no/lakseoppdrett-i-norge/hvor-frisk-er-oppdrettslaksen/> (hentet 25.04.2019).
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative chemical analysis*. 8 utg. New York: W. H. Freeman and Company.
- Helsedirektoratet. (2018). *Næringsstoffanbefalinger*. Oslo. Tilgjengelig fra: <https://helsedirektoratet.no/folkehelse/kosthold-og-ernering/neringsstoffanbefalinger-#fett> (lest 13.03.2019).
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46 (2): 185-196.
- Hoffmann, E. & Stoobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3 utg. Chichester: Jhon Wiley & Sons, Ltd.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y. & Uejima, H. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through GPR40. *Nature*, 422 (6928): 173.
- Jensen, I. J., Mæhre, H. K., Tømmerås, S., Eilertsen, K. E., Olsen, R. L. & Elvevoll, E. O. (2012). Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is a good source of long chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Bulletin*, 37 (1): 25-29.

- Karasek, F. W. & Clement, R. E. (1988). *Basic gas chromatography-mass spectrometry; principles and techniques*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B. & Hogstrand, C. (2016). Erucic acid in feed and food. *EFSA Journal*, 14 (11).
- Lopez-Huertas, E. (2010). Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological research*, 61 (3): 200-207.
- Lundebye, A. K., Lock, E. J., Rasinger, J. D., Nøstbakken, O. J., Hannisdal, R., Karlsbakk, E., Wennevik, V., Madhun, A. S., Madsen, L. & Graff, I. E. (2017). Lower levels of persistent organic pollutants, metals and the marine omega 3-fatty acid DHA in farmed compared to wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Environmental research*, 155: 49-59.
- Menendez, J. A., Vellon, L., Colomer, R. & Lupu, R. (2005). Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses her-2/neu (erb b-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (herceptin™) in breast cancer cells with her-2/neu oncogene amplification. *Annals of oncology*, 16 (3): 359-371.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: Concepts & Contrasts*. 2 utg. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Mørkøre, T., Ytrestøyl, T., Ruyter, B., Torstensen, B. E. & Thomassen, M. S. (2014). Kvalitetsaspekter hos laks som matvare ved endret fettsyresammensetning.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2017). *Principles of biochemistry*. 5 utg. New York: W. H. Freeman and Company.
- Olsen, R. E., Taranger, G. L., Svåsand, T. & Skilbrei, O. T. (2013). Improved method for triacylglycerol-derived fatty acid profiling by various non-lethal and lethal sampling techniques in Atlantic salmon. *Aquaculture Environment Interactions*, 4 (3): 251-261.
- Sacks, F. M., Lichtenstein, A. H., Wu, J. H., Appel, L. J., Creager, M. A., Kris-Etherton, P. M., Miller, M., Rimm, E. B., Rudel, L. L. & Robinson, J. G. (2017). Dietary fats and cardiovascular disease: a presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation*, 136 (3): e1-e23.
- Sanden, M., Hemre, G. I., Måge, A., Lunestad, B. T., Espe, M., Lie, K. K., Lundebye, A. K., Amlund, H., Waagbø, R. & Ørnsrud, R. (2017). Program for overvåking av fiskefor: Årsrapport for prøver innsamlet i 2016. *Bergen: NIFES*.

## Referanser

- Sele, V., Sanden, M., Berntssen, M., Lunestad, B. T., Espe, M., Lie, K. K., Amlund, H., Lundebye, A. K., Hemre, G. I. & Waagbø, R. (2018). Program for overvåking av fiskefôr. *Rapport fra havforskningen*.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56 (8): 365-379.
- Simopoulos, A. P. (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food reviews international*, 20 (1): 77-90.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine*, 233 (6): 674-688.
- Sissener, N. H. (2018). Are we what we eat? Changes to the feed fatty acid composition of farmed salmon and its effects through the food chain. *Journal of Experimental Biology*, 221 (Suppl 1): jeb161521.
- Skogheim, J. I. (2018). *Den fantastiske villaksen*. NRK (produsent).  
<https://tv.nrk.no/serie/den-fantastisk-villaksen/sesong/1> (sett 05.01.2019).
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9 utg. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Sprague, M., Dick, J. R. & Tocher, D. R. (2016). Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006–2015. *Scientific reports*, 6: 21892.
- Statistisk sentralbyrå. (2018). *Akvakultur*. Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett> (lest 04.04.2019).
- Terés, S., Barceló-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J. E. & Escribá, P. V. (2008). Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (37): 13811-13816.
- Yang, L. G., Song, Z. X., Yin, H., Wang, Y. Y., Shu, G. F., Lu, H. X., Wang, S. K. & Sun, G. J. (2016). Low n-6/n-3 PUFA ratio improves lipid metabolism, inflammation, oxidative stress and endothelial function in rats using plant oils as n-3 fatty acid source. *Lipids*, 51 (1): 49-59.
- Ytrestøyl, T., Aas, T. S. & Åsgård, T. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448: 365-374.

## Vedlegg 1 - Internstandarder

Tabell V.1: Internstandarder brukt ved ekstraksjon av villaks, oppdrettslaks og fiskefôr. Internstandarden for triglyseridet av C19:0 ble brukt. I villaks ble det brukt to ulike mengder med internstandard.

Internstandard		Molekylvekt [g/mol]	Konsentrasjon [mg/mL]	IS brukt [mL]	Mengde IS [mg]	Mol IS	Mol Fettsyre
C19:0 TG	Villaks	933,60	10	0,10	1,0	$1,07 * 10^{-6}$	$3,21 * 10^{-6}$
C19:0 TG	Villaks	933,60	10	0,02	0,2	$2,14 * 10^{-7}$	$6,43 * 10^{-7}$
C19:0 TG	Oppdrettslaks	933,60	10	0,20	2,0	$2,14 * 10^{-6}$	$6,43 * 10^{-6}$
C19:0 TG	Fiskefôr	933,60	10	0,20	2,0	$2,14 * 10^{-6}$	$6,43 * 10^{-6}$

Tabell V.2: Internstandarder brukt for nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider i villaks. Det ble brukt to ulike mengder internstandarder for nøytrale lipider.

Internstandard	Molekylvekt [g/mol]	Konsentrasjon [mg/mL]	IS brukt [mL]	Mengde IS [mg]	Mol IS	Mol Fettsyre
C19:0 NL	933,60	10	0,100	1,00	$1,07 * 10^{-6}$	$3,21 * 10^{-6}$
C19:0 NL	933,60	10	0,025	0,25	$2,68 * 10^{-7}$	$8,03 * 10^{-7}$
C19:0 FF	298,52	10	0,010	0,10	$3,35 * 10^{-7}$	$3,35 * 10^{-7}$
C19:0 PL	818,20	10	0,025	0,25	$3,06 * 10^{-7}$	$6,11 * 10^{-7}$

Tabell V.3: Internstandarder brukt for nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider i oppdrettslaks.

Internstandard	Molekylvekt [g/mol]	Konsentrasjon [mg/mL]	IS brukt [mL]	Mengde IS [mg]	Mol IS	Mol Fettsyre
C19:0 NL	933,60	10	0,200	2,00	$2,14 * 10^{-6}$	$6,43 * 10^{-6}$
C19:0 FF	298,52	10	0,015	0,15	$5,02 * 10^{-7}$	$5,02 * 10^{-7}$
C19:0 PL	818,20	10	0,050	0,50	$6,11 * 10^{-7}$	$1,22 * 10^{-6}$

## Vedlegg 2 – Referansestandarder

Tabell V.4: Fettsyrer i R37 FAME Mix som ble brukt som referansestandarder for fettsyrene funnet i villaks, oppdrettslaks og fiskefôr.

FAME	Navn	Vekt (%)
C4:0	Butansyre, ME	4.0
C6:0	Heksansyre, ME	4.0
C8:0	Oktansyre, ME	4.0
C10:0	Dekansyre, ME	4.0
C11:0	Undekansyre, ME	2.0
C12:0	Dodekansyre, ME	4.0
C13:0	Tridekansyre, ME	2.0
C14:0	Tetradekansyre, ME	4.0
C14:1 <i>cis</i> 9	<i>cis</i> -9-Tetradekensyre, ME	2.0
C15:0	Pentadekansyre, ME	2.0
C15:1 <i>cis</i> 9	<i>cis</i> -9-Oktadekensyre, ME	2.0
C16:0	Heksadekansyre ME	6.0
C16:1 <i>cis</i> 9	<i>cis</i> -9-Heksadekensyre ME	2.0
C17:0	Heptadekansyre, ME	2.0
C17:1 <i>cis</i> 10	<i>cis</i> -10-Heptadekensyre, ME	2.0
C18:0	Oktadekansyre, ME	4.0
C18:1 <i>cis</i> 9	<i>cis</i> -9-Oktadekensyre, ME	2.0
C18:1 <i>trans</i> 9	<i>trans</i> -9-Oktadekensyre, ME	4.0
C18:2 <i>cis</i> 9,12	all- <i>cis</i> -9,12-Oktadekadiensyre, ME	2.0
C18:2 <i>trans</i> 9,12	all- <i>trans</i> -9,12- Oktadekadiensyre, ME	2.0
C18:3 <i>cis</i> 6,9,12	all- <i>cis</i> -6,9,12-Oktadekatriensyre, ME	2.0
C18:3 <i>cis</i> 9,12,15	all- <i>cis</i> -9,12,15-Oktadekatriensyre, ME	2.0
C20:0	Eikosansyre, ME	4.0
C20:1 <i>cis</i> 11	<i>cis</i> -11-Eikosansyre, ME	2.0
C20:2 <i>cis</i> 11,14	all- <i>cis</i> -11,14-Eikosadiensyre, ME	2.0
C20:3 <i>cis</i> 8,11,14	all- <i>cis</i> -8,11,14-Eikosatriensyre, ME	2.0
C20:3 <i>cis</i> 11,14,17	all- <i>cis</i> -11,14,17-Eikosatriensyre, ME	2.0
C20:4 <i>cis</i> 5,8,11,14	all- <i>cis</i> -5,8,11,14-Eikosatetraensyre, ME	2.0
C20:5 <i>cis</i> 5,8,11,14,17	all- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eikosapentaensyre, ME	2.0
C21:0	Heneikosansyre, ME	2.0



Vedlegg

C22:0	Dokosansyre, ME	4.0
C22:1 <i>cis</i> 13	<i>cis</i> -13-Dokosensyre, ME	2.0
C22:2 <i>cis</i> 13,16	all- <i>cis</i> -13,16-Dokosadiensyre, ME	2.0
C22:6 <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19	all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,16,19-Dokosaheksaensyre, ME	2.0
C23:0	Trikosansyre, ME	2.0
C24:0	Tetrakosansyre, ME	4.0
C24:1 <i>cis</i> 15	<i>cis</i> -15-Tetrakosensyre, ME	2.0

---

*Fra Devle et al. (2009). ME: metylester.*

*Tabell V.5: Fettsyrer som ble brukt som referansestandarder til fettsyrene funnet i villaks, oppdrettslaks og fiskefôr som ikke er i R37 FAME mix.*

FAME	Navn:
C18:1 <i>cis</i> 11	<i>cis</i> -11-Oktadekensyre, ME
C22:5 <i>cis</i> 7,10,13,16,19	all- <i>cis</i> -7,10,13,16,19-Dokosapentaensyre, ME

## Vedlegg 3 - RRF

Tabell V.6: RRF-verdier og molekylvekt til fettsyrer funnet i villaks, oppdrettslaks og fiskefôr.

Fettsyre:	Molekylvekt [g/mol]:	RRF-verdi:
C14:0	228,38	1,01
C15:0	242,41	1,22
C16:0	256,43	1,09
C16:1 <i>cis</i> 9	254,43	1,18
C17:0	270,46	1,22
C18:0	284,48	1,19
C18:1 <i>cis</i> 9	282,48	1,16
C18:1 <i>cis</i> 11*	282,48	1,16
C18:2 <i>cis</i> 9,12	280,48	1,01
C18:3 <i>cis</i> 9,12,15	278,48	0,98
C20:1 <i>cis</i> 11	310,54	1,13
C20:2 <i>cis</i> 11,14	308,54	1,06
C20:4 <i>cis</i> 5,8,11,14	304,52	1,00
C22:1 <i>cis</i> 13	338,59	1,10
C20:5 <i>cis</i> 5,8,11,14,17	302,52	0,96
C24:1 <i>cis</i> 15	366,65	1,01
C22:5 <i>cis</i> 7,10,13,16,19*	330,57	1,01
C22:6 <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19	328,57	1,01

\* Ingen kalkulert RRF-verdi

## Vedlegg 4 – Total fettsyreprofil i villaks

Tabell V.7: Oversikt over fettsyrer funnet i villaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal:	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [mg/g] ± SD
C14:0	6178	14,2	936	72,7	0,98 ± 0,1
C15:0	423	16,8	872	55,1	0,06 ± 0,01
C16:0	23269	20,5	937	76,2	3,73 ± 0,50
C16:1cis9	4603	22,9	916	25,7	0,75 ± 0,12
C17:0	784	25,4	722	3,5	0,09 ± 0,03
C18:0	5594	32,4	912	63,0	1,09 ± 0,19
C18:1cis9	20823	36,2	919	6,5	3,58 ± 0,58
C18:1cis11	3766	36,9	903	6,1	0,65 ± 0,07
C18:2cis9,12	1312	43,0	878	7,9	0,27 ± 0,03
C18:3cis9,12,15	862	49,2	847	30,0	0,19 ± 0,01
C20:1cis11	18534	51,3	934	24,1	3,70 ± 0,66
C20:2cis11,14	240	55,1	844	37,3	0,06 ± 0,01
C20:4cis5,8,11,14	539	59,1	854	38,0	0,12 ± 0,02
C22:1cis13	22938	60,4	939	50,3	4,92 ± 0,84
C20:5cis5,8,11,14,17	5397	62,9	932	36,4	1,21 ± 0,27
C24:1cis15	1130	67,8	872	51,1	0,33 ± 0,06
C22:5cis7,10,13,16,19	2237	70,1	882	28,9	0,57 ± 0,08
C22:6cis4,7,10,13,16,19	17802	71,3	950	50,6	4,42 ± 1,01

## Vedlegg 5 – Total fettsyreprofil i oppdrettslaks

Tabell V.8: Oversikt over fettsyrer funnet i oppdrettslaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [mg/g] ± SD
C14:0	1702	14,2	919	67,9	2,32 ± 0,52
C15:0	91	16,8	789	33,5	0,16 ± 0,04
C16:0	7747	20,4	929	71,3	14,00 ± 3,05
C16:1cis9	1428	22,9	900	20,7	2,37 ± 0,53
C17:0	93	25,4	691	9,2	0,18 ± 0,08
C18:0	1802	32,4	883	42,0	3,24 ± 0,48
C18:1cis9	40004	36,3	933	6,6	74,20 ± 13,40
C18:1cis11	2142	37,0	903	6,7	4,00 ± 0,82
C18:2cis9,12	10500	43,0	934	20,5	22,45 ± 4,75
C18:3cis9,12,15	3144	49,2	915	46,1	6,86 ± 1,37
C20:1cis11	2374	51,3	915	21,5	4,99 ± 0,94
C20:2cis11,14	512	55,2	839	22,6	1,12 ± 0,13
C20:4cis5,8,11,14	299	59,2	747	6,7	0,70 ± 0,15
C22:1cis13	959	60,3	881	26,7	2,18 ± 0,19
C20:5cis5,8,11,14,17	1005	62,9	902	24,2	2,39 ± 0,35
C24:1cis15	186	67,8	703	20,1	0,47 ± 0,19
C22:5cis7,10,13,16,19	386	70,1	837	11,3	0,92 ± 0,05
C22:6cis4,7,10,13,16,19	1598	71,2	923	34,9	3,86 ± 0,36

## Vedlegg 6 - Total fettsyreprofil i fiskefôr

Tabell V.9: Oversikt over fettsyrer funnet i fiskefôr. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [mg/g] ± SD
C14:0	3853	15,1	934	68,3	6,45 ± 0,39
C15:0	234	18,1	839	48,0	0,34 ± 0,02
C16:0	16175	22,1	943	74,3	28,03 ± 1,39
C16:1cis9	3133	25,0	880	20,1	4,98 ± 0,26
C17:0	340	27,7	769	59,3	0,55 ± 0,08
C18:0	5023	35,6	931	71,9	8,83 ± 0,41
C18:1cis9	71393	40,1	931	7,9	128,53 ± 6,86
C18:1cis11	4132	40,8	913	7,7	7,44 ± 0,25
C18:2cis9,12	22776	46,2	943	30,9	46,87 ± 2,43
C18:3cis9,12,15	8546	51,8	916	50,1	18,01 ± 0,69
C20:1cis11	4258	53,4	900	22,5	8,66 ± 0,24
C20:2cis11,14	166	57,2	708	9,6	0,34 ± 0,19
C20:4cis5,8,11,14	188	61,1	757	14,0	0,43 ± 0,05
C22:1cis13	3791	62,0	928	41,3	8,60 ± 0,41
C20:5cis5,8,11,14,17	3652	64,9	919	39,0	8,49 ± 0,36
C24:1cis15	261	69,2	802	33,1	0,70 ± 0,05
C22:5cis7,10,13,16,19	354	71,9	836	14,1	0,86 ± 0,07
C22:6cis4,7,10,13,16,19	3229	73,1	923	43,3	7,80 ± 0,47

## Vedlegg 7 – Fraksjonering av nøytrale lipider

Tabell V.10: Oversikt over nøytrale lipider funnet i villaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [mg/g] ± SD
C14:0	32192	15,1	928	72,5	1,02 ± 0,13
C15:0	1677	18,0	830	42,7	0,06 ± 0,01
C16:0	85626	22,1	931	75,1	2,77 ± 0,34
C16:1cis9	19258	25,0	925	29,5	0,68 ± 0,15
C17:0	1741	27,5	732	16,6	0,06 ± 0,01
C18:0	20047	35,3	933	71,0	0,79 ± 0,20
C18:1cis9	98653	40,0	938	8,2	3,31 ± 0,54
C18:1cis11	14502	40,6	928	6,8	0,58 ± 0,14
C18:2cis9,12	5770	46,0	903	16,2	0,27 ± 0,07
C18:3cis9,12,15	4068	51,8	870	34,9	0,19 ± 0,04
C20:1cis11	86938	53,4	948	27,9	3,31 ± 0,58
C20:2cis11,14	1270	57,1	892	40,5	0,06 ± 0,01
C20:4cis5,8,11,14	2028	61,1	830	27,9	0,10 ± 0,02
C22:1cis13	101401	62,0	941	59,6	4,30 ± 0,64
C20:5cis5,8,11,14,17	24082	64,9	947	56,6	1,05 ± 0,16
C24:1cis15	6019	68,9	912	70,2	0,37 ± 0,12
C22:5cis7,10,13,16,19	11132	71,9	879	27,9	0,60 ± 0,14
C22:6cis4,7,10,13,16,19	61515	73,1	949	61,2	2,77 ± 0,42

Vedlegg

Tabell V.11: Oversikt over nøytrale lipider funnet i oppdrettslaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i mg fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [mg/g] ± SD
C14:0	3151	15,1	906	66,0	1,69 ± 0,41
C15:0	222	18,0	779	45,6	0,10 ± 0,02
C16:0	16260	22,0	939	74,2	9,03 ± 2,19
C16:1cis9	3438	24,9	830	20,1	1,75 ± 0,45
C17:0	194	27,4	563	13,3	0,10 ± 0,02
C18:0	3980	35,1	834	62,9	2,24 ± 0,52
C18:1cis9	92640	39,9	935	7,1	53,38 ± 12,30
C18:1cis11	5125	40,5	924	8,9	2,96 ± 0,73
C18:2cis9,12	25768	46,0	936	24,8	16,97 ± 3,89
C18:3cis9,12,15	8219	51,7	909	52,3	5,56 ± 1,37
C20:1cis11	5705	53,2	891	21,4	3,72 ± 0,83
C20:2cis11,14	1264	57,1	773	11,1	0,87 ± 0,21
C20:4cis5,8,11,14	657	61,1	786	9,9	0,47 ± 0,11
C22:1cis13	2317	61,7	856	33,1	1,68 ± 0,38
C20:5cis5,8,11,14,17	2189	64,8	859	26,8	1,63 ± 0,37
C24:1cis15	463	68,9	814	45,7	0,40 ± 0,08
C22:5cis7,10,13,16,19	971	71,8	784	24,3	0,75 ± 0,16
C22:6cis4,7,10,13,16,19	2927	73,0	878	29,9	2,26 ± 0,53

## Vedlegg 8 - Fraksjonering av frie fettsyrer

Tabell V.12: Oversikt over frie fettsyrer funnet i villaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i  $\mu\text{g}$  fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [ $\mu\text{g/g}$ ] $\pm$ SD
C14:0	1639	15,0	860	63,5	102,3 $\pm$ 27,7
C15:0	145	17,9	732	40,1	7,9 $\pm$ 1,7
C16:0	8654	21,8	931	74,1	559,3 $\pm$ 132,8
C16:1cis9	1007	24,8	891	35,1	59,4 $\pm$ 14,9
C17:0	109	27,3	525	35,7	6,8 $\pm$ 2,6
C18:0	1769	34,9	850	68,4	115,4 $\pm$ 19,1
C18:1cis9	3332	39,4	861	8,3	220,2 $\pm$ 50,4
C18:1cis11	904	40,2	774	5,0	60,5 $\pm$ 15,6
C18:2cis9,12	428	45,8	780	5,0	31,7 $\pm$ 7,3
C18:3cis9,12,15	331	51,6	827	39,9	25,3 $\pm$ 5,2
C20:1cis11	2203	53,0	894	20,7	166,5 $\pm$ 43,7
C20:2cis11,14	66	56,9	564	2,1	5,4 $\pm$ 2,1
C20:4cis5,8,11,14	192	61,0	760	8,7	15,9 $\pm$ 3,7
C22:1cis13	2509	61,6	888	34,7	212,2 $\pm$ 59,0
C20:5cis5,8,11,14,17	2739	64,7	905	32,2	236,9 $\pm$ 61,7
C24:1cis15	181	68,8	765	18,7	18,2 $\pm$ 5,3
C22:5cis7,10,13,16,19	470	71,7	833	15,9	42,1 $\pm$ 10,8
C22:6cis4,7,10,13,16,19	3228	72,9	914	34,3	289,2 $\pm$ 82,4



Vedlegg

*Tabell V.13: Oversikt over frie fettsyrer funnet i oppdrettslaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i µg fettsyre/g laksemuskel.*

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [µg/g] ± SD
C14:0	340	15,0	844	55,2	21,5 ± 3,6
C15:0	40	18,0	458	6,0	2,2 ± 0,5
C16:0	2873	21,9	934	72,4	187,9 ± 17,0
C16:1cis9	271	24,9	791	36,9	16,3 ± 4,1
C18:0	1082	35,0	863	72,5	71,4 ± 3,1
C18:1cis9	3803	39,6	897	6,2	259,7 ± 58,1
C18:1cis11	322	40,4	658	3,5	22,0 ± 4,6
C18:2cis9,12	1743	45,9	863	10,3	135,7 ± 25,2
C18:3cis9,12,15	668	51,7	846	54,7	53,3 ± 9,4
C20:1cis11	209	53,1	721	17,2	16,1 ± 4,2
C20:2cis11,14	105	57,0	645	9,7	8,6 ± 1,7
C22:1cis13	76	61,7	678	25,1	6,5 ± 1,5
C20:5cis5,8,11,14,17	364	64,8	870	26,1	31,9 ± 3,6
C24:1cis15	47	68,8	528	8,1	4,8 ± 2,5
C22:5cis7,10,13,16,19	111	71,8	635	2,5	10,3 ± 7,7
C22:6cis4,7,10,13,16,19	308	73,0	821	15,5	28,1 ± 4,9

## Vedlegg 9 – Fraksjonering av polare lipider

Tabell V.14: Oversikt over polare lipider funnet i villaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i  $\mu\text{g}$  fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [ $\mu\text{g/g}$ ] $\pm$ SD
C14:0	458	15,0	905	68,6	21,0 $\pm$ 4,4
C15:0	80	17,9	663	18,1	3,3 $\pm$ 0,9
C16:0	9262	21,9	929	74,1	448,1 $\pm$ 117,2
C16:1cis9	208	24,8	747	39,2	9,4 $\pm$ 3,2
C17:0	143	27,3	588	27,3	6,4 $\pm$ 1,1
C18:0	586	34,9	796	64,6	28,7 $\pm$ 7,4
C18:1cis9	1298	39,4	833	8,9	65,0 $\pm$ 15,6
C18:1cis11	332	40,2	783	5,9	16,8 $\pm$ 4,7
C18:2cis9,12	78	45,8	547	3,0	4,4 $\pm$ 0,5
C18:3cis9,12,15	83	51,6	664	10,6	4,8 $\pm$ 0,9
C20:1cis11	309	53,0	781	20,0	17,6 $\pm$ 4,8
C20:4cis5,8,11,14	205	61,0	649	20,2	13,0 $\pm$ 4,0
C20:5cis5,8,11,14,17	2254	64,7	855	22,8	146,7 $\pm$ 38,0
C22:5cis7,10,13,16,19	630	71,8	828	12,8	42,2 $\pm$ 12,0
C22:6cis4,7,10,13,16,19	21683	73,0	944	58,4	1459 $\pm$ 390,0

Tabell V.15: Oversikt over polare lipider funnet i oppdrettslaks. Fettsyrene og de tilhørende arealene er oppgitt i tabellen, samt retensjonstiden til de ulike toppene. Matchfaktor, sannsynlighet og konsentrasjon av de ulike fettsyrene med standardavvik er også oppgitt. Sannsynligheten sier noe om hvor korrekt bestemmelsen fra bibliotekssøket er. Matchfaktoren er et mål på hvor godt et funn i biblioteket stemmer overens med det analyserte spekteret (max-verdi: 999). Alle fettsyrene i tabellen er bekreftet med standard. Konsentrasjonen er gitt i  $\mu\text{g}$  fettsyre/g laksemuskel.

Fettsyre:	Areal	Retensjonstid (min)	Matchfaktor	Sannsynlighet (%)	Konsentrasjon [ $\mu\text{g/g}$ ] $\pm$ SD
C14:0	350	15,0	890	60,3	16,2 $\pm$ 3,2
C15:0	96	17,9	677	35,4	3,8 $\pm$ 0,5
C16:0	10297	21,9	937	75,0	499,2 $\pm$ 133,5
C16:1cis9	237	24,8	781	57,7	10,5 $\pm$ 2,4
C17:0	135	27,3	581	47,5	6,0 $\pm$ 3,5
C18:0	556	34,9	845	75,5	27,4 $\pm$ 7,9
C18:1cis9	5702	39,4	889	8,6	287,1 $\pm$ 76,7
C18:1cis11	568	40,2	802	5,9	28,8 $\pm$ 8,6
C18:2cis9,12	1920	45,8	863	9,3	109,6 $\pm$ 25,6
C18:3cis9,12,15	1303	51,6	877	58,1	76,3 $\pm$ 18,5
C20:1cis11	170	53,1	708	14,4	9,7 $\pm$ 2,8
C20:4cis5,8,11,14	356	60,9	688	19,7	22,3 $\pm$ 4,9
C20:5cis5,8,11,14,17	3993	64,7	886	24,8	259,0 $\pm$ 65,1
C24:1cis15	103	68,8	701	26,3	7,5 $\pm$ 1,3
C22:5cis7,10,13,16,19	979	71,7	781	15,5	65,9 $\pm$ 15,4
C22:6cis4,7,10,13,16,19	14578	73,0	936	44,3	979,1 $\pm$ 234,1







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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway