



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 60 stp
Kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Videreutvikling av metode for fast- fase ekstraksjon (SPE) av mono-, di- og triacylglyseroler ved bruk av automatisert SPE

Method refinement for solid phase extraction
(SPE) of mono-, di- and triacylglycerols using
automated SPE

Stine Haraldsen
Ingrid Hausberg
Lektorutdanning i realfag

Forord

Endelig er vi ferdig! Årene ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet har vært fylt med læring, latter og vennskap. Denne masteroppgaven markerer slutten på studiet, og vi kan nå stolt kalle oss lektorer i kjemi og matematikk. Masteroppgaven ble gjennomført ved avdelingen for kjemi ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

Vi vil gjerne rette en stor takk til hovedveileder professor Dag Ekeberg og medveileder senioringeniør Hanne M. Devle for at dere hadde tro på oss. Tusen takk for at dere alltid tok dere tid til å svare på spørsmål, veiledning på laboratoriet og for nyttige innspill underveis og i skriveprosessen. Deres kunnskap og lidenskap for analytisk kjemi har inspirert oss gjennom dette prosjektet. Videre vil vi sende en takk til Carl Fredrik Næss-Andresen for gode tilbakemeldinger og fine diskusjoner. Det har vært en fornøyelse å jobbe med dere. Takk til Anne Gravdal for bestilling av kjemikalier og Salima Fjeld og Lene Ruud som hentet utstyr når vi gikk tom.

Videre vil vi takke resten av mastergruppen til Dag. Dere har vært en inspirasjon og det har vært en glede å jobbe på laboratoriet sammen med dere. En spesiell takk til Tina Øvrebø for morsomme dager og helger de siste ukene.

Sist, men ikke minst, vil vi takke venner, familier og kjærester for støtte, hjelp, motivasjon og korrekturlesing dette halvåret.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, 29.mai 2019

Stine Haraldsen og Ingrid Hausberg

Sammendrag

Formålet med denne masteroppgaven var å utvikle en separasjonsmetode for å separere mono-, di- og triacylglyseroler (MAG, DAG og TAG) ved hjelp av automatisert fast-fase ekstraksjon (SPE). Fettsyresammensetningen av MAG, etter enzymatisk fordøyning av TAG, er et av fokusområdene i en ny stipendiatstilling ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. En SPE-metode som gir grunnlinjeseparasjon av MAG, DAG og TAG vil forenkle prøvebearbeiding i dette prosjektet.

En tidligere etablert separasjonsmetode som benyttet normalfasesystem med aminopropylkolonne ble reproduisert. Basert på resultatene fra dette ble det brukt iterativ tilnærming for videreutvikling av separasjonsmetoden. Parametere som ble testet var: elueringsmiddel for TAG, fraksjoneringsmønster, elueringsvolum for TAG og DAG, total lipidmasse påsatt SPE, blandingsforholdet mellom acylglyserolene og elueringshastighet. Etter SPE ble fraksjonene metylert og analysert på GC-MS.

Gitt en blanding med likt forhold mellom MAG, DAG og TAG ble det utviklet en separasjonsmetode som ga $\geq 99\%$ renhet for alle fraksjonene. Metoden var imidlertid avhengig av blandingsforholdet mellom acylglyserolene, og videre testing ble utført. Det ble utviklet en ny metode som ga god separasjon for tre av fire prøver med ulikt blandingsforhold. Metoden ble deretter testet på to kolonnepartier, med ulikt resultat. Flere fraksjoner økte krysskontamineringen med 10 prosentpoeng, mens én gikk ned 23 prosentpoeng. Relativt store variasjoner mellom analysene kan tyde på mangel av reproduserbarhet mellom produksjon av forskjellige kolonnepartier. Før det kan konkluderes om separasjonsmetoden kan benyttes, bør metoden testes på flere partier av SPE-kolonner.

Abstract

The purpose of this thesis was to develop a separation method for separating mono-, di- and triacylglycerols (MAG, DAG and TAG) by using automated solid-phase extraction (SPE). The fatty acid composition of MAG, after enzymatic digestion of TAG, is one of the focus areas in a project for a new PhD-student at the Norwegian University of Life Sciences. A SPE method that provides baseline separation of MAG, DAG and TAG will simplify sample processing in this project.

A previous separation method using normal phase system with aminopropyl column was reproduced. Based on these results, an iterative approach was used for further development of the separation method. Parameters tested were: TAG eluent, fractionation pattern, TAG and DAG elution volume, total lipid mass loaded onto the SPE columns, acylglycerol mixture ratio, and elution rate. After SPE, the fractions were methylated and analyzed on GC-MS.

Given a mix with equal amounts of MAG, DAG and TAG, a separation method with $\geq 99\%$ purity of all fractions was developed. However, the method was dependent on the mixing ratio of the acylglycerols, and further testing was performed. A new method was developed which provided good separation for three out of four samples with different mixing ratios. The method was then tested on two column lots, with various results. Several fractions increased the cross contamination by 10 percentage points, while one decreased by 23 percentage points. Relatively large variations between the analyses may indicate a lack of lot-to-lot reproducibility. Before it can be concluded whether the separation method can be used, the method should be tested on several batches.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	1
Innledning	2
2. Teori	3
2.1 Lipider	3
2.1.1. Fettsyrer.....	3
Nomenklatur av fettsyrer.....	4
2.1.2. Acylglyserol	5
Monoacylglyserol.....	6
Diacylglyserol	6
Triacylglyserol	6
2.2. Separasjon av lipider.....	7
2.2.1. Fast-fase ekstraksjon.....	7
Sorbentegenskaper	8
SPE-prosedyre	9
Automatisering av SPE	10
Gjenbruk av SPE-kolonner	11
2.3. Lipidanalyse.....	11
2.3.1. Gasskromatografi, GC	12
2.3.2. Massespektrometer, MS.....	13
Elektronionisering	13
Kvadrupol massefilter	14
2.3.3. Basekatalysert omestring.....	15
2.4. Tidligere forskning på separasjon av MAG, DAG og TAG ved bruk av SPE	16
3. Materialer og Metoder	18
3.1. Utstyr og Kjemikalier.....	18
3.2. Løsninger benyttet i oppgaven	19
Natriummetanolat	19
Stamløsninger	19
3.3. Optimalisering av SPE-robotens injeksjonsvolum	20

3.4. Videreutvikling av en separasjonsmetode for MAG, DAG og TAG	21
3.4.1. Reprodusering av tidligere etablert metode	22
Separasjon ved automatisert SPE	23
Analyse av fettsyremetyler	23
3.4.2. Videreutvikling av separasjonsmetode for MAG, DAG og TAG	24
3.5. Gjenbruk av kolonner for SPE	27
4. Resultat og diskusjon	28
4.1. Optimalisering av SPE-robotens pipetteringsvolum	28
4.2. Test av robustheten til GC-MS	31
4.3. Reprodusering av tidligere etablert metode	33
4.4. Videreutvikling av separasjonsmetoden for MAG, DAG og TAG	34
4.4.1. Endring av forholdet mellom heptan og dietyler i elueringsmiddelet for TAG	35
4.4.2. Endret fraksjoneringsmønster for DAG og TAG	36
4.4.3. Endret elueringsvolum for DAG og TAG.....	37
4.4.4. Analyse av mindre lipidmasse og endret sammensetning av MAG, DAG og TAG	40
4.4.5. Endret hastighet på elueringsmidlene gjennom SPE-kolonnen	41
4.4.6. Reproduserbarhet mellom kolonnepartier.....	42
4.5 Gjenbruk av SPE-kolonne	45
5. Konklusjon	46
6. Videre arbeid	47
7. Litteraturliste.....	48
Vedlegg 1 – Optimalisering av pipetteringsvolumet til SPE-roboten	54
Vedlegg 2 – Test av robustheten til GC-MS.....	56
Vedlegg 3 – Reprodusering av separasjonsmetode for MAG, DAG og TAG	60
Vedlegg 4 – Videreutvikling av metode.....	63
Endring av forholdet mellom heptan og dietyler i elueringsmiddelet for TAG	63
Endret fraksjoneringsmønster for TAG og DAG	65
Endret elueringsvolum for DAG og TAG	69
Analyse av mindre lipidmasse og endret sammensetning av MAG, DAG og TAG	72
Endret elueringshastighet for fire forskjellige stamløsninger	76
«Gammelt kolonneparti».....	76
«Nytt kolonneparti».....	78

Forkortelser

DAG	Diacylglyserol
FAME	Fettsyremetylester
GC	Gasskromatografi
LLE	Væske/væske ekstraksjon
LOD	Deteksjonsgrense
LOQ	Kvantifiseringsgrense
MAG	Monoacylglyserol
MS	Massespektrometri
RSD	Relativt standardavvik
S/N	Signal-til-støy
SPE	Fast-fase ekstraksjon
TAG	Triacylglyserol

Innledning

Lipider er en svært sammensatt gruppe av biomolekyler som er av stor vitenskapelig og bioteknologisk interesse på grunn av deres omfattende anvendelser. De fysiske og kjemiske egenskapene gjør at de har en sentral rolle i menneskelig ernæring (Pérez-Pazos & Fernández-Izquierdo, 2011; Ramírez *et al.*, 2001). Tidligere ble lipider hovedsakelig analysert for å finne energiinnholdet og fettsyreprofilen. Fokuset har i midlertidig endret seg til å undersøke helseeffektene av lipidene vi får i oss. Forskning har vist at lipiders struktur og fysiske egenskaper har innvirkning på fordøyelsen og metabolisme av fettsyrer, og dermed på næringsopptaket (Michalski *et al.*, 2013).

Nesten all olje og fett fra animalsk og vegetabilsk opprinnelse består av triacylglyserol, TAG. (Christie, 2003). Det er kjent at fettsyrer i TAG-molekylet har forskjellige fysiske egenskaper (kjedelengde og antall dobbeltbindinger) som innvirker på fettabsorpsjonen. I tillegg har det lenge blitt antatt at fettsyrenes posisjon i TAG (sn2 mot sn1 og sn3) har betydning i forhold til biotilgjengelighet og metabolisme (Michalski *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2001).

Ved Norges miljø- og biovitenskapelig universitet skal det startes et prosjekt som blant annet skal undersøke hvilke fettsyrer melk består av og hvilke sn-posisjon de har i TAG, etter enzymatisk fordøyning. For identifisering av fettsyrene skal det bruke GC-MS, hvor det ønskes at mono-, di- og triacylglyseroler (MAG, DAG og TAG) blir separert og fettsyrene metylert før applisering.

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en separasjonsmetode ved bruk av automatisert fast-fase ekstraksjon for å oppnå fullstendig separasjon av MAG, DAG og TAG.

2. Teori

2.1 Lipider

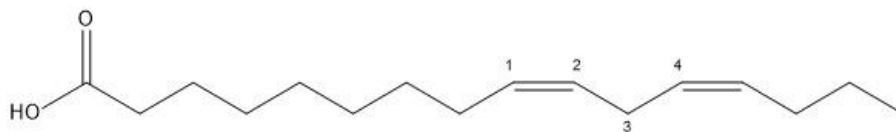
Naturstoffgruppen lipider er en kjemisk komplisert gruppe som har ulike funksjoner; blant annet energilagring, dannelse av membranstrukturer og som signalstoff (Mathews *et al.*, 2013). Lipider er upolare, hydrofobe molekyler som inkluderer fett, oljer, voks, steroider og de fosfolipidene som danner biologiske membraner (Sadava *et al.*, 2014).

En definisjon av lipider er «*organske forbindelser som er uløselig i vann, men løselig i organiske løsemiddel*» (Fahy *et al.*, 2011, s.637). Dette er en definisjon som brukes av flere, blant andre Gurr & James (1971) og Mathews *et al.* (2013). En annen definisjon benyttes av Christie (2003) som definerer lipider som «*fettsyrer og deres derivater, og substanser relatert biosyntetisk eller funksjonelt til disse forbindelser*» (Christie, 2003, s.5). O'Keefe (2002) peker på kompleksiteten og heterogeniteten til lipider som en årsak til at det ikke er en felles og eksakt definisjon. Likevel har de fleste forskere som jobber med lipider en felles forståelse av disse molekylene, men bruker forskjellige definisjoner avhengig av fagfelt (Christie, 2003).

2.1.1. Fettsyrer

Fettsyrer er en av de enkleste formene av lipider. De består av en karboksylgruppe og en karbonkjede vanligst bestående av 12 til 24 karbonatomer. Fettsyrene er derfor amfipatiske, med en hydrofil og hydrofob ende (Mathews *et al.*, 2013). Man er kjent med mer enn 1000 naturlige fettsyrer, men kun et fåtalls (ca. 20) forekommer i stor grad i naturen. Av de mest forekommende fettsyrene utgjør palmitinsyre, oleinsyre og linolsyre omtrent 80% (Scrimgeour & Harwood, 2007).

Fettsyrer kommer i to hovedformer, som mettet eller umettet fettsyre. Mettede fettsyrer er fettsyrer uten dobbeltbinding, mens umettede har en eller flere dobbeltbindinger mellom karbonatomene i karbonkjeden. Dobbeltbindingen(e) i umettede fettsyrer kan forekomme både som *cis* og *trans*, hvor *cis* er mest forekommende i naturen (McKee & McKee, 2017; Scrimgeour & Harwood, 2007). Dobbeltbindingene i flerumettede fettsyrer står hovedsakelig i et 1,4 - mønster, hvor dobbeltbindingene separeres av en CH₂-gruppe (Gunstone, 1996). Se figur 2.1 for illustrasjon



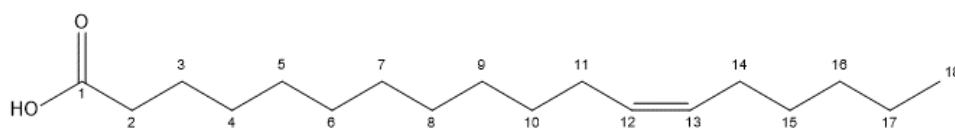
Figur 2.1: Illustrasjon av 1,4-mønster ved bruk av 9,12-heksadekanoidsyre.

Fettsyrer har sjeldent andre funksjonelle grupper enn karboksylgruppen og dobbeltbindinger, men det kan forekomme. De funksjonelle gruppene er da som oftest oksygenbasert (i form av hydroksyl eller epoksid), halogen, svovel eller nitrogruppe (Scrimgeour & Harwood, 2007).

Nomenklatur av fettsyrer

Fettsyrer var en av de første kjemiske gruppene som ble oppdaget. Dette har ført til at mange av forbindelsene har navn basert på det latinske eller greske ordet for hvor de ble oppdaget, i dag kalt trivialnavn. Palmitinsyre ble funnet i palmeolje, oleinsyre i olivenolje etc. (Hart *et al.*, 2012). Trivialnavnene kan være enkle å bruke, men gir ingen informasjon om molekylets kjemiske oppbygging (Gunstone, 1996).

Det systematiske navnet for fettsyrer baserer seg på IUPACs nomenklatur. Navnene gjenspeiler lengden på karbonkjeden, antall dobbeltbindinger, konfigurasjonen og plasseringen til dobbeltbindingen og tilsvarende for eventuelle substituentter (McKee & McKee, 2017; O'Keefe, 2002). For å forenkle navnesystemet for fettsyrer har det blitt utviklet en metode som er mye brukt på grunn av sin enkelhet. C18:1 indikerer en uforgreinet fettsyre med 18 karbonatomer og en dobbeltbinding (Gunstone & Norris, 1983). Det er i tillegg normalt å indikere hvor dobbeltbindingen sitter, men dette er det flere metoder for. Figur 2.2 viser 12-oktadekadiensyre og tre av forkortelsene som benyttes.



C18:1 ω 6

C18:1 n -6

C18:1(Δ 12)

Figur 2.2: Molekylstruktur av 12-oktadekadiensyre og tre forkortelser som blir benyttet.

De to første forkortelsene forteller at dobbeltbindingen er på karbonnummer seks fra metylenden. Den siste forteller at dobbeltbindingen sitter på karbonnummer 12 fra karboksylenden (Gunstone, 1996). Dersom det ikke blir spesifisert antas det *cis*-konfigurasjon og 1,4 mønster gitt at det er flere

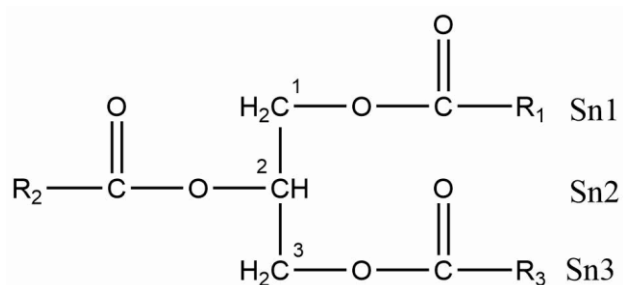
dobbeltbindinger (McKee & McKee, 2017; O'Keefe, 2002). Tabell 2.1 viser eksempler på ulike fettsyrer med trivialnavn, systematiske navn og forkortelser.

Tabell 2.1: Eksempler på noen fettsyrer med dets trivialnavn, systematiske navn og forkortelse.

Trivialnavn	IUPAC-navn	Forkortelse
Kaprylsyre	Oktansyre	C8:0
Kaprinsyre	Dekansyre	C10:0
Myristinsyre	Tetradekansyre	C14:0
Palmitinsyre	Heksadekansyre	C16:0
Roughansyre	7,10,13-Heksadekatriensyre	C16:3n-3
Oljesyre	9-Oktadekensyre	C18:1n-9

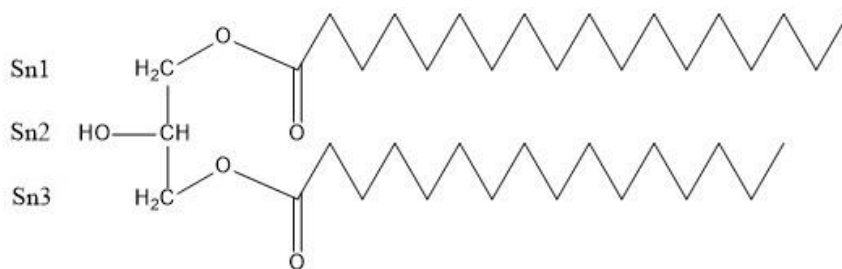
2.1.2. Acylglyserol

Acylglyseroler er derivater av alkoholen glyserol som er forestret med én, to eller tre fettsyrer til henholdsvis monoacylglyserol, diacylglyserol eller triacylglyserol (O'Keefe, 2002). Disse forbindelsene blir benyttet som energikilde og emulgatorer. Acylglyserolene er upolare, nøytrale molekyler uten ladning (Rarokar *et al.*, 2017).



Figur 2.3: Triacylglyserol med uspesifikk fettsyrer (R_1 , R_2 , R_3) og stereospesifikk nummerering.

Karbonene i glyserolet er navngitt basert på et stereospesifikt nummereringssystem (sn). Dersom glyserolet er plassert i Fisher-projeksjon, tilsvarer sn1, sn2 og sn3 henholdsvis karbon 1, 2 og 3, vist i figur 2.3 (O'Keefe, 2002). Når et slikt stereospesifikt nummereringssystem brukes, blir sn skrevet før glyserol, for eksempel 1,3- diacyl-sn-glyserol. Dette er en acylglyserol med to fettsyrer, plassert i karbon 1 og 3. Et mer spesifikt eksempel er 1-stearoyl-3-palmitoyl-sn-glyserol, figur 2.4 (O'Keefe, 2002).



Figur 2.4: Illustrasjon av 1-stearoyl-3-palmitoyl-sn-glyserol. Dette er et diacylglyserol med to fettsyrer i henholdsvis sn1 og sn3 posisjon.

Monoacylglyserol

Monoacylglyserol (MAG) består av glyserol forestret med én fettsyre. Den har to strukturisomerer, der α -MAG har fettsyren i sn1 eller sn3 posisjon og β -MAG har fettsyren i sn2 posisjon (Christie, 2018). MAG kan dannes gjennom biologiske- eller enzymatiske prosesser og industriell kjemisk glyserolyse (Rarokar *et al.*, 2017). MAG er mye brukt som emulgatorer i matindustri, kosmetikk og farmasøytisk industri på grunn av høy overflateaktivitet (Szeląg & Zwierzykowski, 1999; Zhong *et al.*, 2014). I tillegg er den, sammen med diacylglyserol, et viktig mellomprodukt i biosyntese og metabolisme av triacylglyseroler og andre lipider (Gunstone, 1996).

Diacylglyserol

Dersom to fettsyrer er forestret til et glyserol har vi diacylglyserol, DAG. DAG kan opptre som tre forskjellige strukturisomerer avhengig av plasseringen til fettsyrene, og ulike struktur- og stereoisomerer har ulike biologiske egenskaper. DAG er funnet som komponenter i cellemembraner, sekundær lipidbudbringer og som byggesteiner for fosfoacylglyseroler (Eichmann & Lass, 2015).

Triacylglyserol

I naturen er fettsyrer hovedsakelig funnet i form av triacylglyseroler, TAG. Avhengig av om de er flytende eller fast ved romtemperatur kalles de olje eller fett. TAG består av glyserol forestret med tre fettsyrer. Normalt finnes TAG i blandet form, som vil si at de tre fettsyrene ikke er identiske (Dewick, 2009). Dette fører til at TAG kan ha seks strukturisomerer. TAG blir brukt som lagring av energi hos mange organismer, blant annet mennesker, da de inneholder mer energi per gram fett (TAG) enn for eksempel karbohydrat og proteiner. TAG i animalsk fett blir lagret i fettceller, som heter adipocytter, og brukt til varmeproduksjon og isolasjon i kroppen (Mathews *et al.*, 2013).

2.2. Separasjon av lipider

Ekstraherte lipider fra ulike biologiske matrikser (marint, animalsk, vegetabilsk etc.) er ofte en kompleks blanding av forskjellige lipidklasser. Før videre lipidanalyse kan det være nyttig og/eller nødvendig å fraksjonere lipidene i underklasser, eksempelvis frie fettsyrer, fosfolipider, nøytrale lipider etc. Tradisjonelt har det blitt brukt væske/væske ekstraksjon (LLE), tynnsjiktskromatografi og væske-faststoff-kolonnekromatografi for å oppnå dette (Shahidi & Wanasundara, 2000). I dag blir fast-fase ekstraksjon (SPE), med ferdigpakkete kolonner, sett på som en av de mest effektive teknikkene for rask og selektiv prøvepreparering, og har derfor i stor grad overtatt (Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino, 2000; Shahidi & Wanasundara, 2000).

2.2.1. Fast-fase ekstraksjon

SPE er en av de mest brukte prøveprepareringsmetodene, og brukes hovedsakelig for rensing, konsentrering, ekstrahering, løsemiddelbytte og klassefraksjonering (Andrade-Eiroa *et al.*, 2016; Majors, 2002; Simpson & Wells, 2000). Tradisjonelt ble LLE brukt til dette. Noen ulemper med LLE er at den krever store mengder organisk løsemiddel, har høy kostnad, lenger analysetid og at det ofte dannes en emulsjon med vandige prøver som gjør fasene vanskelig å skille. I tillegg er LLE vanskelig å automatisere. Disse problemene har ikke SPE, noe som har ført til at SPE har fått en viktig rolle i prøvepreparering (Mitra, 2003; Thurman & Mills, 1998).

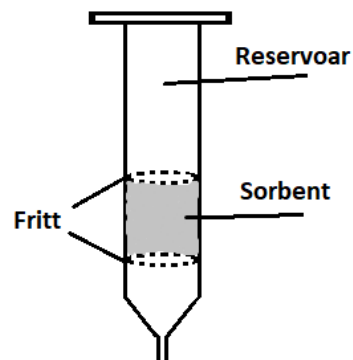
Prinsippene for SPE er de samme som for væskekromatografi, noe som har resultert i at sorbentene er relativt like (Pesek & Matyska, 2000). Den største forskjellen er at med væskekromatografi har man en kontinuerlig gjennomstrømning av mobilfase, mens ved SPE holdes analytten fullstendig igjen i kolonnen for deretter å elueres ved tilsetning av elueringsmiddel. Analyttens fullstendige retensjon i sorbenten er grunnen til at SPE har fått tilnavnet digital kromatografi, eller av/på-kromatografi. Ved tilstedeværelse av flere analytter vil analyttene elueres ut ved bruk av økende eluotropisk styrke i elueringsmiddelet. (Mitra, 2003; Thurman & Mills, 1998).

Sorbentegenskaper

På slutten av 70-tallet begynte populariteten til SPE å skyte fart, da ferdigpakke engangskolonner kom på markedet (Miller, 2005). I perioden mellom 1960 og 1980 forsøkte man å finne en universell sorbent for SPE. Dette viste seg å ikke være mulig, og interessen har i stedet gått til å finne de mest optimale sorbentene for spesifikke separasjoner (Mitra, 2003). Sorbenten er et porøst, partikkelformet faststoff med stor overflate. Dette sørger for god kontakt med prøven, som foreligger i væskeform (Fritz *et al.*, 1995). Silikabaserte sorbenter ($(\text{SiO}_2)_x$), med overflate mellom 50-500 m^2/g og porestørrelse på 50-500 Å, er de mest brukte i dag (Pesek & Matskya, 2000). Ved å binde

andre funksjonelle grupper til silika kan det dannes sorbenter som er egnet for reversfase, normalfase og ionebyttesystemer (Mitra, 2003; Shahidi & Wanasundara, 2000; Thurman & Mills, 1998). Disse sorbentene gir en prøvekapasitet på 1-5% av sorbentmassen (Ebeler & Shibamoto, 1994; Gilson, 2015).

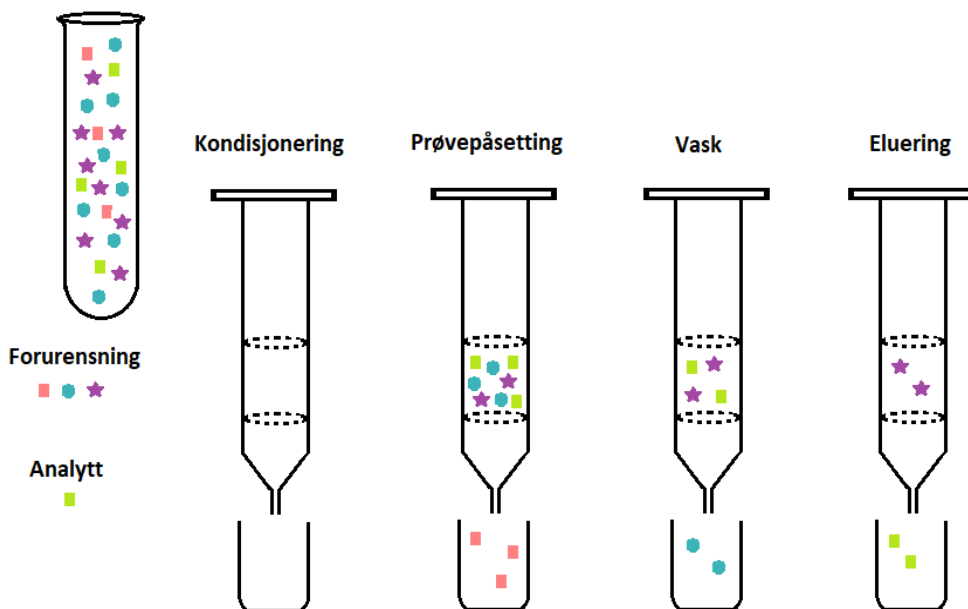
En av de mest brukte sorbentene for separasjon av lipider er normalfasesystem med silikabundet aminopropyl ($(\text{SiO}_2)_x - (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$), hvor aminopropylen vil ha sterke interaksjoner med polare grupper via hydrogenbindinger (Ebeler & Ebeler, 1996; Mitra, 2003). Normalfasesystem betyr at sorbenten er mer polar enn løsningsmiddelet eller matriksen som appliseres på sorbenten. Normalfasesystem er derfor godt egnet når analytten er løst i organisk løsningsmiddel (Thurman & Mills, 1998).



Figur 2.5: Illustrasjon av SPE – kolonne. Fritten er filter som holder sorbenten på plass. Inspirert av Thurman & Mills (1998)

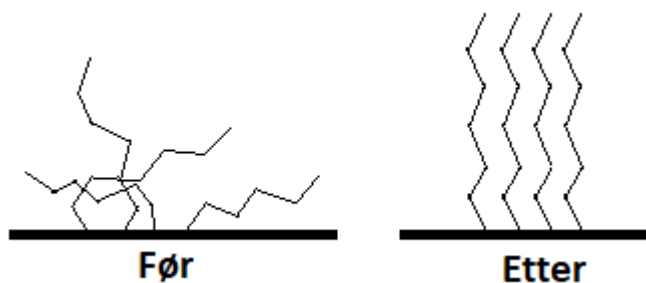
SPE-prosedyre

SPE består normalt av fire steg: (i) Kondisjonering, (ii) påsetting av prøve, (iii) utvasking og (iv) eluering (Thurman & Mills, 1998). Figur 2.6 illustrerer en slik prosedyre.



Figur 2.6: Illustrasjon av SPE-prosedyre. Inspirert av Thurman & Mills (1998).

(i) Kondisjonering er å tilsette en væske for å aktivere og rense opp sorbenten, se figur 2.7 (Thurman & Mills, 1998). Mellom kondisjonering og prøvetilsetning er det viktig at sorbenten ikke går tørr. Hvis dette skjer må sorbenten aktiviseres på nytt for å sørge for maksimal effekt av kolonnen (Simpson & Van Horne, 1993). Fravær av eventuell rekondisjonering kan føre til lavere utbytte (Thurman & Mills, 1998).



Figur 2.7: Illustrasjon av kondisjonering. Inspirert av Lippa & Sandor (2006).

(ii) Ved SPE er det viktig at analytten(e) av interesse har retensjon på kolonnen. Enkelte forurensninger vil kunne sitte fast sammen med ønsket analytt, mens andre elueres med løsningsmiddelet (Thurman & Mills,

1998). Krefter og prinsipper som gir analytten retensjon kan være van der Waalske interaksjoner, hydrogenbindinger, dipol krefter, størrelsesekklusjon og ionebytte (Mitra, 2003; Thurman & Mills, 1998).

(iii) Steg nummer tre er å vaske kolonnen ved å eluere eventuelle resterende forurensninger som sitter igjen. Analytten skal fortsatt holdes igjen (Thurman & Mills, 1998). Her utnyttes at retensjonen til et spesifikt molekyl kan endres avhengig av løsningen som blir benyttet. For å eluere må molekylet ha større affinitet til elueringsmiddelet enn sorbenten. Mellom tilsetning av ikke-blandbare elueringsmidler er det anbefalt å tørke sorbenten (Simpson & Van Horne, 1993).

(iv) Det siste steget er å eluere analytten(e). Elueringsmiddelet bør ikke eluere andre komponenter i kolonnen (Thurman & Mills, 1998). Elueringen bør skje ved så lite tilsatt elueringsmiddel som mulig. Optimal eluering bør ikke kreve mer enn 5 «bed» volumer, hvor bed volum er definert som *«mengden løsningsmiddel som kreves for å fylle alle indre porer og rommet mellom partiklene i en gitt sorbent «bed»* (Simpson & Van Horne, 1993, s. 22). I dette trinnet vil det være mulig med konsentrering, som kan være viktig for å få en nøyaktig, kvantitativ analyse. Dette oppnås ved å tilsette større volum av prøve enn elueringsmiddel (Simpson & Wells, 2000).

SPE-metoder gir mange valg, hvilket fører til kompleksitet, men også muligheter. Ved å endre sorbent og elueringsmidler vil det være mulig å lage ekstremt spesifikke metoder med ønsket renhet av analytt. Det vil også være mulig å reløse analytten(e) i et løsningsmiddel som er mer egnet for analytten(e) eller for videre prøvebehandling/analyse i samme steg (Simpson & Wells, 2000).

Alternativ metode er at all forurensning adsorberes til sorbenten, mens analytten(e) går direkte gjennom. Da vil metoden være komplett etter steg nummer to. Dette er ikke en mye brukt metode, og det vil ikke være mulig med konsentrering (Miller, 2005; Simpson & Wells, 2000; Thurman & Mills, 1998).

Automatisering av SPE

Det er flere fordeler ved å automatisere SPE. Blant disse er frigjøring av menneskelige ressurser til andre oppgaver, økt prøvekapasitet, større nøyaktighet, presisjon og utbytte (Mitra, 2003). En annen fordel med automatisering er beskyttelsen dette kan gi laboratoriepersonalet, i form av mindre kontakt med giftige/farlige løsemidler og prøver (Jordan, 2000). SPE-roboten kan i tillegg jobbe under forhold som ikke er egnet for mennesker, blant annet på grunn av støy eller temperatur (Thurman & Mills, 1998).

Noen ulemper med automatisert SPE er overføring av stoffer, systematiske feil som går uoppdaget og stabiliteten til prøven (Mitra, 2003). Overføring av stoffer vil si at rester fra én prøve kan overføres til en annen. Dette kan oppstå hvis det er én felles væskevei for prøve og reagens. For å unngå overføring er det viktig med rensing av væskeveien mellom prøver med egnet vaskemiddel (Jordan, 2000). I laboratorier hvor det analyseres store mengder prøver er fordelene ved automatisert SPE større enn ulempene, men ulempene bør fortsatt tas hensyn til (Jordan, 2000; Mitra, 2003).

Gjenbruk av SPE-kolonner

SPE-kolonner blir generelt sett på som et engangsprodukt, men gjenbruk har blitt forsøkt blant annet av Chen *et al.*, (1993) og Patel *et al.*, (1990). Begge konkluderte med at gjenbruk var mulig, men Chen *et al.* (1993) anbefalte derimot ikke å bruke kolonnene mer enn to-tre ganger på grunn av nedgang i kolonneeffektiviteten.

Høye utgifter knyttet til SPE-kolonnene er en av hovedårsakene for å gjenbruke kolonner (Chen *et al.*, 1993; Ebeler & Shibamoto, 1994). Når en SPE-kolonne koster rundt 40-60 NOK senkes kostnaden per bruk betraktelig ved å kunne bruke disse flere ganger. Ulemper med å gjenbruke kolonner er økt forbruk av løsemidler og tid, samt risiko for kontaminering fra tidligere analyser. Før gjenbruk må kolonnen vaskes med optimal(e) løsemidler og tørkes (de Zeeuw & Frankie, 2000). Hvor mange vaskesteg som er nødvendig må testes for hver enkelt kolonnetype og benyttet matriks (Ebeler & Shibamoto, 1994).

2.3. Lipidanalyse

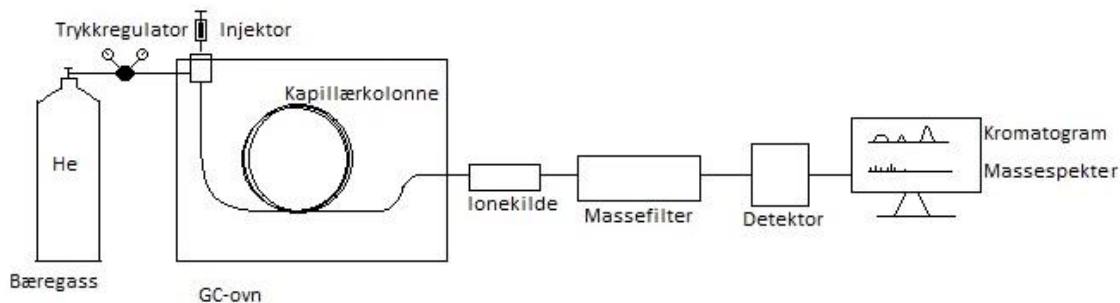
Kromatografi er en av de mest brukte metodene for å analysere lipider. Av kromatografimetoder er det gasskromatografi (GC), høytytende væskrokromatografi, superkritisk væskrokromatografi og tynnsjikt-kromatografi som er mest vanlig (Shahidi & Wanasundara, 2000). GC er en av de mest brukte analyseverktøyene, og er en effektiv metode for kvantitativ analyse og oppløsning (Myher & Kuksis, 1995). Ifølge Christie (1993) revolusjonerte GC lipidanalyser ved å gjøre det mulig å finne fullstendig fettsyreprofiler på relativt kort tid. Før fettsyreanalyse på GC er det vanlig å derivatisere for å øke flyktighet og forbedre kromatografiske topper («peak shape»), som igjen fører til bedre separasjon. En av de vanligste derivatiseringsprosessene er omdannelse av fettsyrekomponenter til metylestere (Christie, 1993; Liu, 1994).

2.3.1. Gasskromatografi, GC

Kromatografi er en fellesbetegnelse på separasjonsteknikker som ble først beskrevet i 1906 av Tswett (Stock & Rice, 1963). Et eksempel på en slik teknikk er gasskromatografi (GC), som blir brukt til å separere og analysere flyktige komponenter (Miller, 2005). Det er James & Martin som generelt tildeles oppfinnelsen av gasskromatografi i 1952 med artikkelen «*Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid*» (Bartle & Myers, 2002; Gordon, 1990; Miller, 2005).

Gasskromatografi baserer seg på at komponenter blir separert mellom en mobil gassfase og stasjonær fase (Gordon, 1990). Det finnes to typer gasskromatografi, gass-fast-kromatografi og gass-væske-kromatografi, hvor begge bygger på henholdsvis adsorpsjon og partisjonssystemer (Stock & Rice, 1963). I dag brukes gass-væske-kromatografi til de fleste analyser med GC (Rasmussen, 1994).

En gasskromatograf består av bæregass, trykkregulator, injektor, ovn, kolonne, detektor og datasystem, figur 2.8 (McNair & Miller, 2009). Kolonnene som brukes i en gasskromatograf kan deles inn i tre typer; preparative kolonner, analytiske kolonner og kapillærkolonner (Rasmussen, 1994). McNair & Miller (2009) estimerer at ca. 90% av alle analyser i dag er gjennomført ved bruk av kapillærkolonne. Kapillærkolonner ble først utviklet i 1959 av Marcel Golay. En slik kolonne kan lages av glass, rustfritt stål eller sintret silika, der det sistnevnte er mest vanlig (McNair & Miller, 2009). Det er tre hovedtyper kapillærkolonner; Porous Layer Open Tubular (PLOT), Support Coated Open Tubular (SCOT) og Wall Coated Open Tubular (WCOT). I PLOT er den indre veggen dekket av et adsorpsjonsmiddel, SCOT har kapillærveggen dekket av små partikler av inert bæremateriale, og i WCOT er den indre veggen i kapillærkolonnen dekket med stasjonær væskefase (Rasmussen, 1994). I dag brukes hovedsakelig WCOT-kolonner, mens PLOT-kolonner benyttes ved spesielle analyser, og SCOT er lite benyttet (Miller, 2005).



Figur 2.8: En skisse av en gasskromatograf koblet til et massespektrometer. Inspirert av McNair & Miller (2009).

Mobilfasen i en gasskromatograf består av en inert gass som har som oppgave å forflytte analyttmolekyler, som befinner seg i gassfase, gjennom kolonnen. Derfor blir mobilfasen i gasskromatografi ofte kalt bæregass. De mest vanlige bæregassene er nitrogen, helium og hydrogen (Miller, 2005).

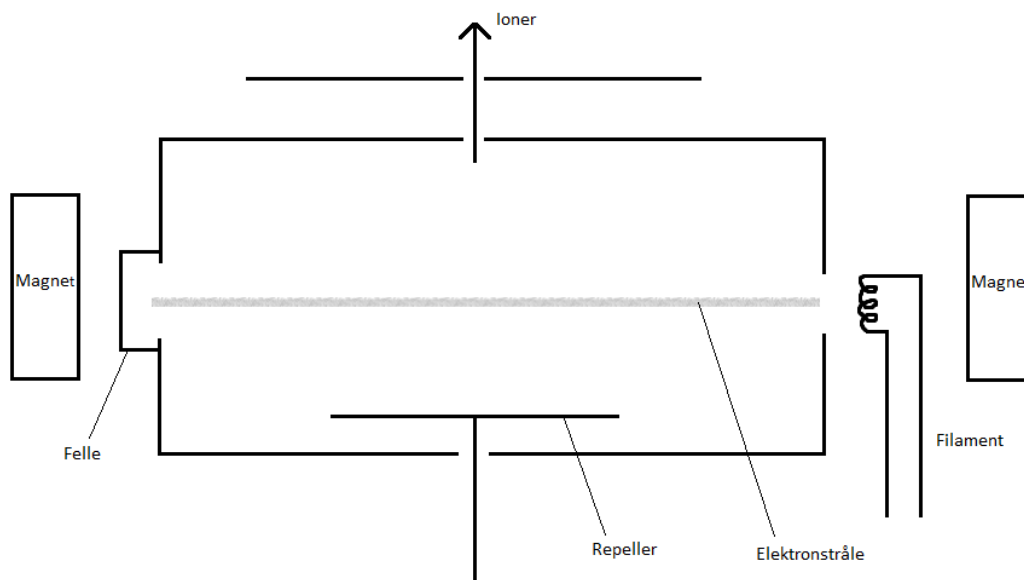
En gasskromatograf kan ha flere typer detektorer, hvor de mest vanlige er flammeioniseringsdetektor og massespektrometer. I dag er kombinasjonen mellom gasskromatografi og massespektrometri en av de mest avanserte redskapene for analyse av flyktige, komplekse stoffer (Rasmussen, 1994).

2.3.2. Massespektrometer, MS

Massespektrometri er et analytisk verktøy for å identifisere ukjente forbindelser (ved å finne molekylvekt, elementkomposisjon og struktur) og å kvantitere dem (McNair & Miller, 2009). Et massespektrometer består av ionekilde, massefilter og detektor. I ionekilden blir analytten omdannet til ioner før de blir filtrert basert på forholdet mellom masse og ladning (m/z -verdi) i et massefilter. Det blir dannet et elektrisk signal når de separerte ionene treffer detektoren. Dette signalet gir opphav til et massespekter (Urban, 2016). For analysene i denne oppgaven benyttes elektronionisering og kvadrupol som henholdsvis ionekilde og massefilter.

Elektronionisering

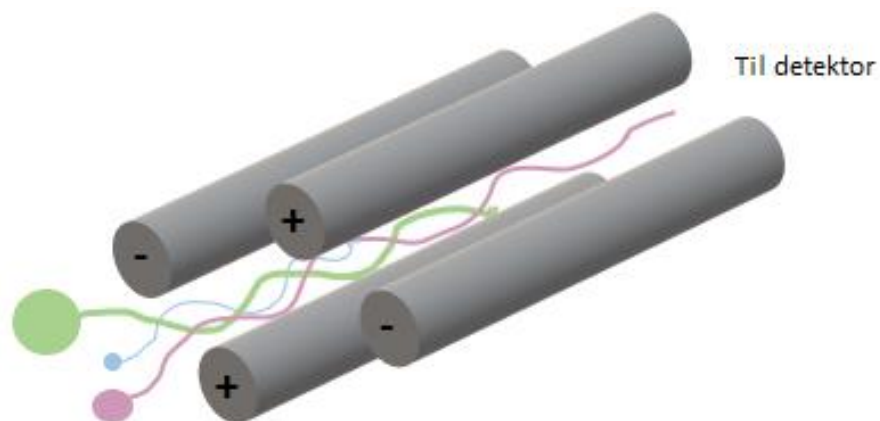
En av de mest brukte ioniseringsmetodene er elektronionisering, illustrert i figur 2.9. Elektronioniseringskilden består av et filament som sender ut elektroner. Disse elektronene blir akselerert mot en anode og kolliderer med gassmolekyl fra prøven. For å øke banelengden til elektronene blir de påvirket av et magnetfelt for å gi et spiral-formet bevegelsesmønster (de Hoffmann & Stroobant, 2007). Når elektronene kolliderer med et analyttmolekyl blir det ionisert ved at det taper et elektron. Avhengig av struktur og mengde energi som blir absorbert kan ionet enten være helt eller danne flere små fragmenter. Elektronionisering blir ansett til å være en hard ioniseringsmetode, med stor grad av fragmenteringer (Miller, 2005). Når betingelsene er gitt (temperatur og ioniseringsenergi) vil molekylene ha et fast fragmenteringsmønster, kalt «fingeravtrykk». «Fingeravtrykket» bidrar til strukturell informasjon som kan føre til identifisering av ukjente analytter (de Hoffmann & Stroobant, 2007).



Figur 2.9: Skisse av elektronioniseringskilde. Inspirert av de Hoffmann & Stroobant (2007)

Kvadrupol massefilter

For GC-MS er ionefelle, flyvetid (time of flight, TOF) og kvadrupol de vanligste massefilterne (McNair & Miller, 2009). Kvadrupol har vært det mest brukte massefilteret opp gjennom årene, da den er relativt billig og enkel i automatiseringen (Glish & Vachet, 2003). Et kvadrupol-massefilter består av fire hyperbolske staver som står rettviskelt på hverandre, se figur 2.10. De er påsatt en DC-spenning som gir sideliggende staver motsatt ladning. I tillegg til DC-spenningen er det påsatt en radiofrekvens, RF. Stavene endrer konstant ladning, og dette fører til at et positivt ion vil frastøte stav med samme ladning før den tiltrekkes samme stav når den bytter ladning (McNair & Miller, 2009). Avhengig av kombinasjonen mellom RF og DC blir ionene som ble dannet i ionekilden separert basert på m/z -forholdet. Ionet med den rette m/z -verdien slipper igjennom og blir detektert, resten blir nøytralisert (Miller, 2005). Ved å endre DC-spenningen og radiofrekvensen, og samtidig holde forholdet mellom de konstant, kan massespekteret oppnås (Somogyi, 2008).

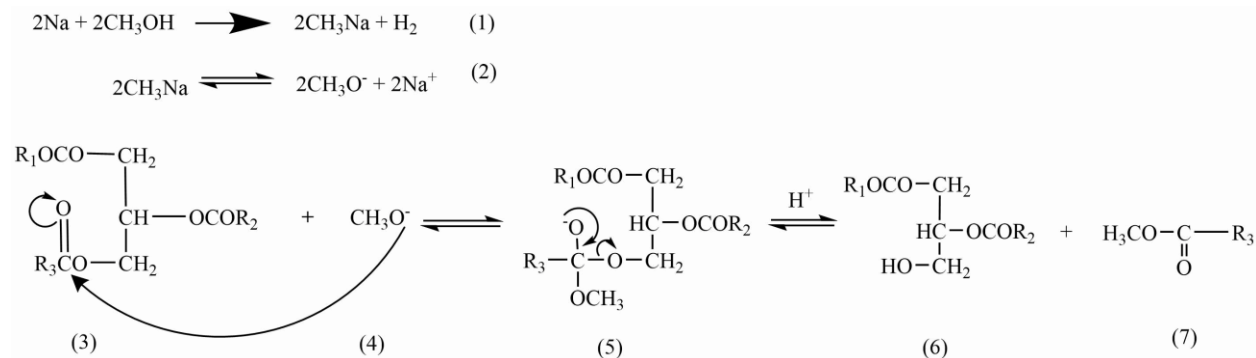


Figur 2.10: En grafisk fremstilling av et kvadrupol massefilter der ioner med rett m/z -verdi kommer gjennom, rosa ion. Ved å endre på spenningen mellom stavene, endres hvilke ioner som kommer gjennom. Inspirert av de Hoffmann & Stroobant (2007).

2.3.3. Basekatalysert omestring

Fettsyrer har ofte lavt damptrykk, som gir lav flyktighet og dermed dårlig separasjon i GC. En måte å forbedre separasjonen på er ved å derivatisere prøven. Den mest vanlige derivatiseringsprosessen for fettsyrer er å danne fettsyremetylestere (FAME) ved omestring (Liu, 1994; Carvalho & Malcata, 2005).

Schuchardt *et al.* (1998) definerer omestring som det «*generelle begrepet som er brukt for å beskrive en viktig klasse organiske reaksjoner der en ester blir omdannet til en annen gjennom utveksling av alkoksydelen*» (Schuchardt *et al.*, 1998, s. 199). Skjema 2.1 viser en skisse av basekatalysert omestring der natriummetanolat er benyttet som reagens.



Skjema 2.1: Kjemisk reaksjoner ved basekatalysert omestring av triacylglycerol med natriummetanolat som reagens.

Natriummetanolat er rapportert å være den mest aktive katalysatoren. Den gir høyt utbytte på kort tid, selv med lav konsentrasjon. Den gir i tillegg godt faseskille ved metylering av fettsyrer i organisk

løsemiddel (KoochiKamali, Tan & Ling, 2012). Natriummetanolat blir dannet ved å løse metallisk natrium i 100% metanol, skjema 2.1 likning 1. Dette er en eksoterm prosess som også danner hydrogengass (Christie, 1993).

Skjema 2.1 viser at når en ester (3) er tilstede med base, som for eksempel metanolatanion (4), blir det dannet et negativt ladet mellomprodukt (5). Dette mellomproduktet kan enten reversere og danne opprinnelig ester (3) og metanolatanionet (4) eller danne ny ester (6). Likevekten vil forskyves mot høyre dersom det blir tilsatt et overskudd av metanol, som metanolatanionet (4) er et derivat av (Christie, 1993; Schuchardt, Sercheli, & Vargas, 1998).

Dersom utgangsesteren er en triacylglyserol, og vi har overskudd av natriummetanolat, vil den nye esteren som dannes, DAG, reagere på samme måte til MAG og en ny metylert fettsyre. MAG vil reagere videre og sluttproduktet blir tre metylerte fettsyrer og et glyserolmolekyl (Vincente, Martinez, Aracil & Esteban, 2015).

2.4. Tidligere forskning på separasjon av MAG, DAG og TAG ved bruk av SPE

Ifølge Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino (2000) ble de første forskningsartiklene på bruk av SPE til lipider publisert av Williams & McCluer (1980) og Powell (1980) to år etter at silikabaserte fast-fase ekstraksjonskolonner ble lansert. Det er imidlertid Kaluzny *et al.* (1985) som blir regnet som pionérer innen separasjon av lipidklasser. De benyttet aminopropylkolonner for å separere lipidstandarder først i frie fettsyrer, nøytrale- og polare lipider. Deretter ble nøytrale lipider separert i TAG, DAG og MAG ved bruk av to kolonner plassert oppå hverandre (Flurkey, 2005; Kaluzny *et al.*, 1985). I ettertid har flere forsøkt å gjenta metoden til Kaluzny *et al.* (1985), med varierende hell. Det er spesielt i forhold til utbyttet av TAG resultatene har vært inkonsistente (Flurkey, 2005; Nurmela & Satama, 1988, Ebeler & Shibamoto, 1994).

Det har blitt gjort flere modifiseringer på metoden til Kaluzny *et al.* (1985). Modifikasjonene handlet ofte om å forenkle metoden ved å ha færre fraksjonerings, eller bytte løsninger som for eksempel heksan til heptan. Blant annet ble den modifisert for å oppnå fraksjonering av fosfolipider ved å endre den elutropiske styrken til elueringsmiddelet (Ebeler & Shibamoto, 1994). Dette ble blant annet gjort av Egberts & Buiskool (1988) og Kim & Salem (1990). I 1998 utviklet Pinkart *et al.*, en metode for å separere mikrobielle lipider ved bruk av aminopropylkolonne. Andre som har separert nøytrale lipider er Fagan *et al.* (2004), Flurkey (2005) og Giacometti *et al.* (2002).

I 2014 ble noen av de tidligere metodene utprøvd av Jacobsen, men det ble ikke oppnådd full separasjon av DAG og TAG for disse. Det ble derfor gjennomført en studie for å finne en ny metode. Resultatet av studien var å bruke 3000 µL aminopropylkolonne (500 mg sorbentmasse) med 150 µL påsetting av prøve løst i heksan:kloroform:metanol (90:6:4). TAG ble eluert med 1000 µL heptan:dietyleter (93:7) og DAG med 3000 µL av samme løsningsmiddel. MAG ble eluert med 3000 µL kloroform:metanol (2:1) (Jacobsen, 2014).

Det er varierende hvilken informasjon som blir gitt i forskningsartikler, hvor blant annet hastigheten til elueringsmiddelet, om det brukes positivt trykk, negativt trykk eller gravitasjon og informasjon knyttet til volumet på kolonnen ofte er fraværende. Dette fører til at mange av metodene er vanskelig å reprodusere, da informasjonen angående dette er avgjørende for separasjon ved bruk av SPE (Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino, 2000).

3. Materialer og Metoder

3.1. Utstyr og Kjemikalier

Dersom det ikke oppgis annen informasjon, er kjemikalienes spesifikasjoner oppgitt i tabell 3.1. Acetylglyserolene benyttet for reproduisering og videreutvikling av metoden er gitt i tabell 3.2. Tabell 3.3 viser en oversikt over forbruksmaterialer benyttet i oppgaven.

Ved løsemiddelblandinger er alle forholdene oppgitt i volum/volum (%).

Tabell 3.1: Oversikt over kjemikalier benyttet i oppgaven med produsent, renhet og CAS-nummer.

Produkt	Produsent	Renhet	CAS-nr.
Dietyleter	Sigma-Aldrich	99,8%	60-29-7
Helium (g)	AGA, Norge	6,0	7440-59-7
n-Heksan	VWR International	≥97% HiPerSolv CHROMANORM®	110-54-3
n-Heptan	VWR International	≥99% HiPerSolv CHROMANORM®	142-82-5
Isopropanol	VWR International	≥99,0%, GPR RECTAPUR®	67-63-0
Kloroform	VWR International	≥99,8% stabilised, HiPerSolv CHROMANORM®	67-66-3
Metanol	VWR International	≥99,9%, HiPerSolv CHROMANORM®	67-56-1
Nitrogen (g)	AGA, Norge	5,0	7727-37-9

Tabell 3.2: Oversikt over acetylglyserolene som ble benyttet for reproduisering og videreutvikling av metoden. For MAG og DAG er det et ubestemt blandingsforhold mellom de ulike strukturisomerene.

Trivialnavn	Fettsyre	Systematisk navn	Produsent	Renhet	CAS-nr
Monokaprylin	C8:0	Monooktanoin	Larodan AB	>99%	26402-26-6
Dikaprylin	C8:0	Dioktanoin	Larodan AB	>99%	36354-80-0
Dikaprin	C10:0	Didekanoin	Larodan AB	>99%	53988-07-01
Trilaurin	C12:0	Tridodekanoin	Larodan AB	>99%	538-24-9
Monomyristin	C14:0	Monotetradekanoin	Larodan AB	>99%	27214-38-6
Dipalmitin	C16:0	Diheksadekanoin	Larodan AB	>99%	26657-95-4
Tristearin	C18:0	Trioktadekanoin	Larodan AB	>99%	555-43-1
Monoolein	C18:1 <i>n</i> -9	Monooktadekenoin	Larodan AB	>99%	0111-03-05
Diolein	C18:1 <i>n</i> -9	Dioktadekenoin	Larodan AB	>99%	25637-84-7
Triolein	C18:1 <i>n</i> -9	Trioktadekenoin	Larodan AB	>99%	122-32-7

Tabell 3.3: Oversikt over forbruksmateriell benyttet, med dets produktnavn, produsent og spesifikasjoner.

Produkt	Produktnavn	Produsent	Spesifikasjoner
Pasteurpipette	Disposable Glass Pasteur Pipettes	VWR International	150 mm
Reagensrør med skrukork	Culture tubes with screw cap	Duran®	12 x 100 mm, DIN tread GL 14
Krympehetteglass	Crimp-Top Vial	VWR International	1,5 mL, 32x11,6 mm
Krympehette	Crimp-Top Cap	VWR International	alu cl 11 mm
Varmebløkk	Dri-block DB-3	Techne	
Fordampningsstativ	Pierce Reacti-Vap III	Thermo Scientific	
Automatpipette	Finnpipette® F2	Thermo Scientific	100 - 1000 µL
Automatpipette	Finnpipette®	Thermo Scientific	1 - 5 mL
Mikrovekt	C2P2	Sartorius	Max. 2,1 g
Veieskip	Disposable Square Weighing Boats	VWR International	46 x 46 x 8 mm
Veieskip	Aluminium Micro Weighing dishes	VWR International	10x4x4,5 mm
Hamiltonsprøyte	Hamiltonsyringe	Hamilton®	2,5 mL
SPE-kolonne	Bond Elut NH2	Agilent Technologies	500 mg 3 mL
SPE-kolonneopp	Disposable sealing cap	Gilson	3 mL SPE-kolonne
Reagensrør for SPE			10 x 75 mm

3.2. Løsninger benyttet i oppgaven

Natriummetanolat

Metallisk Natrium (Purum, Merck, Darmstadt, Tyskland) ble veid ut med gramvekt (Extend, Sartorius, Goettingen, Tyskland) og tilsatt metanol til en konsentrasjon på 3,3 mg/mL.

Stamløsninger

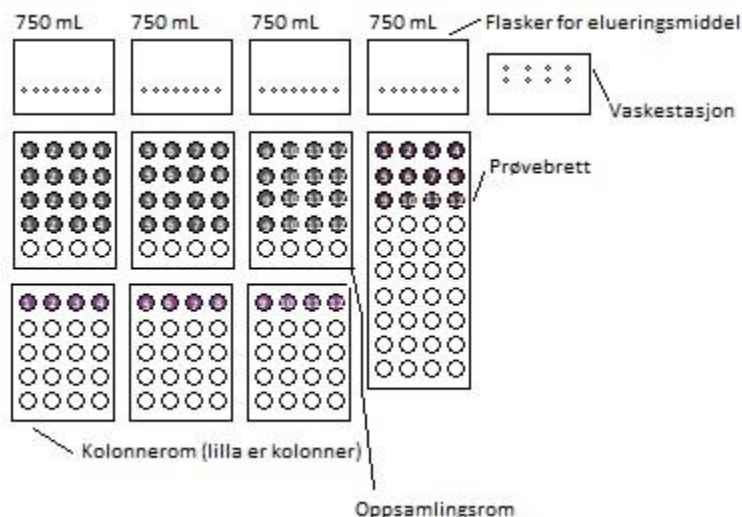
Acylglyseroler ble veid ut i aluminiumveieskip ved hjelp av mikrovekt. Oljer ble overført til veieskipet ved bruk av automatpipette (Finnpipette® 0,5-10 µL, Thermo Electron Corporation, Finland) og pulver ved bruk av mikrospatel (disposable antistatic microspatulas, 140 mm, VWR International, Radnor, PA, USA). Hvilke acylglyseroler som ble benyttet i stamløsningene varierte, se tabell 3.4, 3.8 og 3.9.

Veieskipet, med innhold, ble overført til egnet glassbeholder og acylglyseridene ble løst ved å tilsette kloroform, etterfulgt av heksan og til slutt metanol med en endelig prosentvis sammensetning, heksan:kloroform:metanol (90:6:4). Mellom tilsetningene av de ulike væskene ble prøven ristet på vortex (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Yellow Line TTS2, Staufen, Tyskland) i 20 sekunder. Tilsetning av væskene ble gjort med Hamiltonsprøyte. Prøven ble deretter satt på ultralydbad (Sonorex RK 106S, Bandelin, Berlin, Tyskland) i 2 minutter for å sikre fullstendig oppløsning.

Til fortykning av prøver ble samme løsningsmiddel benyttet (heksan:kloroform:metanol, 90:6:4)

3.3. Optimalisering av SPE-robotens injeksjonsvolum

Tolv mikrorør ble veid og plassert i kolonnerommet til SPE-roboten (Gilson, GX-274 ASPEC, Middleton, WI, USA), se figur 3.1. Hetteglass for GC med metanol ble plassert i prøvebrettet. Lokket på mikrorørene ble lukket umiddelbart etter pipettering og mikrorørene ble veid på nytt etter overføring. Differansen i vekt mellom rørene før og etter pipettering ble funnet, og pipettert volum beregnet. Dette ble gjentatt tre ganger, med til sammen 36 målinger per volum. Forsøket ble gjort med 0,2, 0,5 og 1,0 mL pipettert metanol og oppsugingshastighet på 1,0 mL/min.



Figur 3.1: Illustrasjon som viser en oversikt over SPE – robotens stativ.

Det ble prøvd ulike metoder for å finne optimale betingelsene for pipettering. Oppsugingshastigheten ble forsøkt endret fra 1,0 mL/min til 0,1 og 0,5 mL/min. I tillegg ble det forsøkt med «lite» og «stort» hull i septumet til korken for prøvebeholder, samt fjerne septumet. Figur 3.2 viser hvordan korkene så ut ved

disse endringene. Ved endring av septumet var oppsugingshastigheten 0,5 mL/min. Lite hull ble lagd ved å stikke flere ganger samme sted og stort hull ble lagd til varig visuelt hull.



Figur 3.2: Bilde av korken til hetteglass for GC ved lite og stort hull i septum, og uten septum.

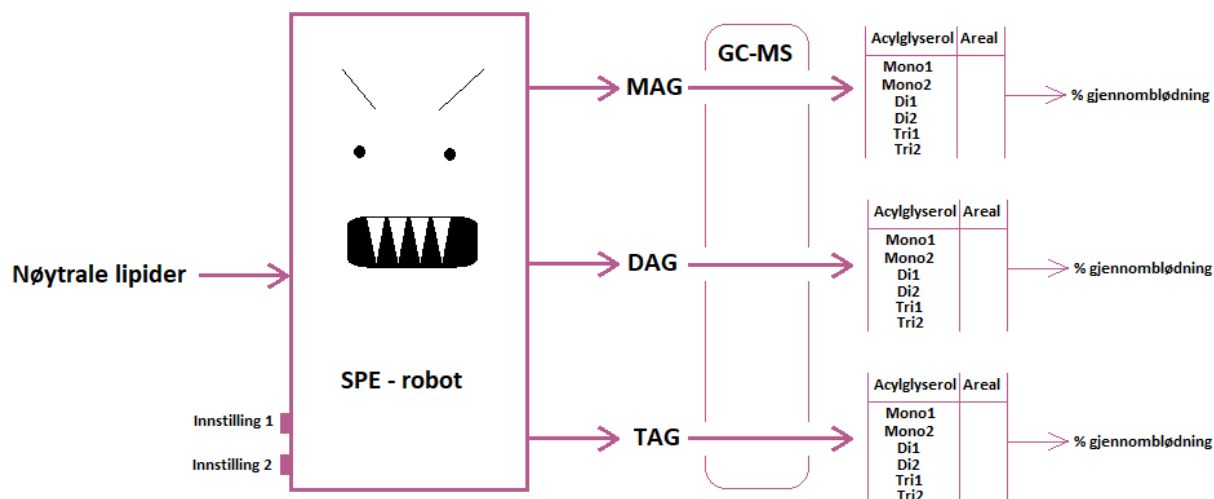
Forsøkene ble gjennomført ved at GC-hetteglass med metanol ble veid før og etter pipettering, og differansen i vekt og volum ble beregnet basert på dette.

Under forsøkene ble temperaturen i rommet holdt konstant på 20 °C. Ved beregning av volum ble massetettheten til metanol benyttet.

3.4. Videreutvikling av en separasjonsmetode for MAG, DAG og TAG

Metoden som ble reproduert, for deretter videreutviklet, er basert på en tidligere masteroppgave: «Analyse av TAG, DAG, og MAG i fordøyd kumelk ved off-line SPE-SPE og GC-MS» (Jacobsen, 2014). Figur 3.3 illustrerer prosedyren brukt i oppgaven; én nøytral lipidprøve påsatt SPE-roboten ble separert i tre fraksjoner (MAG, DAG og TAG). Fraksjonene ble deretter metylert og analysert på GC-MS, og andel metylert fettsyre (FAME) ble beregnet ved bruk av metoden gitt i likning 3.1. Innstilling 1 og 2 representerer ulike parametere som kan endres på SPE-roboten.

$$\text{Andel FAME (\%)} = \frac{\text{Areal}_{\text{FAME}}}{\text{Areal}_{\text{Total}}} \times 100 \quad (3.1)$$



Figur 3.3: Illustrasjon over analysemetoden med bruk av SPE-robot. En nøytral lipidprøve ble påsatt SPE-roboten og separert i tre fraksjoner, MAG, DAG og TAG. Disse ble metylert og analysert på GC-MS før prosent gjennomblødning ble beregnet. Innstilling 1 og 2 representerer ulike parametere som kan endres på SPE-roboten.

SPE-kolonnene som ble benyttet for separasjon hadde silikabundet aminopropyladsorbent med bed volum på ca. 600 μL og totalvolum på 3 mL (Gilson, 2015). Kolonnene inneholdt 500 mg adsorbent, med en gjennomsnittlig partikkelstørrelse på 52 μm og porestørrelse på 72 Å.

3.4.1. Reprodusering av tidligere etablert metode

Det ble laget én stamløsning som inneholdt seks acylglyseroler, se kapittel 3.2. Tabell 3.4 viser benyttet konsentrasjon for hver acylglyserol. Det ble testet med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse påsatt på SPE-kolonnen, med prøvevolumene 150 og 500 μL . Stamløsningen ble overført til hetteglass for GC og fortynnet med heksan:kloroform:metanol (90:6:4) til konsentrasjoner vist i tabell 3.5. Det ble lagd tre replikater for hver lipidmasse og prøvevolum.

Tabell 3.4: Oversikt over standarder og konsentrasjon som ble brukt for å lage én felles stamløsning av acylglyseroler i heksan:kloroform:metanol (90:6:4)

Standard	Fettsyre	Konsentrasjon (mg/mL)
Monomyristin	C14:0	3,25
Monoolein	C18:1 n -9	3,42
Dikaprin	C10:0	4,09
Dipalmitin	C16:0	3,32
Trilaurin	C12:0	3,37
Tristearin	C18:0	3,30
SUM		20,75

Tabell 3.5: Oversikt over konsentrasjoner av lipidene som ble benyttet i hetteglass for GC ved påsetting på SPE-kolonnen

Påsett prøvevolum (μL)	Total lipidmasse		
	1 mg	2 mg	3 mg
150	6,67 mg/mL	13,33 mg/mL	20,00 mg/mL
500	2,00 mg/mL	4,00 mg/mL	6,00 mg/mL

Separasjon ved automatisert SPE

Det ble lagd et stort hull i septumet til hetteglasset til GC, og prøven ble påsett SPE-roboten. Roboten utførte en fast-fase separasjonsprosedyre basert på en separasjonsmetode i robotens programvare (Trilution®lh 3.0). Elueringshastighet; 1,0 mL/min, oppsugingshastighet; 0,5 mL/min og likevektstid; 0,1 min.

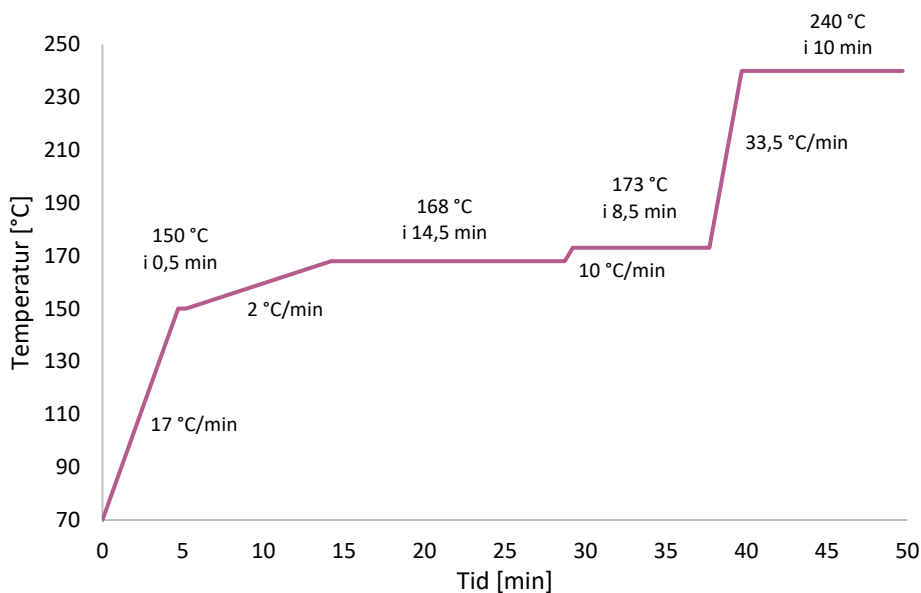
Før påsettelse av prøve ble SPE-roboten rensert for luft med 10 mL isopropanol. Kolonner og reagensrør satt i henholdsvis kolonne- og oppsamlingsrommet, se figur 3.1. Kolonnene ble kondisjonert med 7500 μL heksan. Deretter ble 150 μL eller 500 μL prøve påsett, og TAG ble eluert med 1000 μL heptan:dietyleter (93:7), DAG med 3000 μL heptan:dietyleter (93:7) og MAG med 3000 μL kloroform:metanol (2:1). For å presse elueringsmiddelet gjennom kolonnen ble det påsett et svakt positivt lufttrykk mellom hvert elueringssteg. Dette lufttrykket varierte mellom de ulike fraksjonene, hvor det mellom TAG og DAG var mengden luft 1500 μL , mellom DAG og MAG 1000 μL og 1000 μL etter MAG. Dette var for å få presset all elueringsmiddelet ut av kolonnen.

Fraksjonene fra SPE ble kvantitativt overført til reagensglass med skrukork, og deretter inndampet til tørrhet på varmeblokk med 40 °C med nitrogengass. Etter inndamping ble fraksjonene omestret ved å tilsette 2 mL heptan og 1,5 mL natriummetanolat, se avsnitt 3.2, og ristet horisontalt på ristebord (PSU 10i, Biosan, Latvia, Riga) ved 350 ppm i 30 minutter. De metylerte prøvene ble satt vertikalt i 10 minutter for å separere heptan- og metanolfasen. Heptan-fasen ble overført til hetteglass for GC.

Analyse av fettsyremetylester

De metylerte prøvene ble analysert med Trace 1310 gaskromatograf i kombinasjon med ISQ QD singelkvadrupol massespektrometer (GC og MS: Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Det ble brukt en 60 m sintret silika kapillærkolonne (RTX®-2330, Restek, Bellefonte, PA, USA) med indre diameter på 0,25 mm. Stasjonærfasen er en væskefilm med tykkelse på 0,2 μm og besto av 90% biscyanopropyl og 10%

phenylcyanoprpyl polysiloxane. Bæregassen som ble benyttet var helium med hastighet på 1,0 mL/min. Temperaturprogrammet som ble brukt er illustrert i figur 3.4.



Figur 3.4: Temperaturprogrammet for GC som ble brukt i analysene av FAME.

FAME'ene ble identifisert med GC-MS ved å sammenlikne retensjonstid med referansemiks bestående av 37 FAMEer (Food Industry Fame Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA). I tillegg til 37 FAMEer var miksen tilsatt metylert C19:0 standard (Trinonadekanoin, CAS-nr: 26536-13-0, Larodan AB, Malmö, Sverige) av laboratoriepersonalet. For å verifisere identifiseringen av de kromatografiske toppene ble MS-spekteret sjekket opp mot NIST-biblioteket (NIST MS Search V.2.3).

3.4.2. Videreutvikling av separasjonsmetode for MAG, DAG og TAG

For å optimalisere separasjonen ble det gjort endringer i den eksisterende SPE-metoden, gitt i kapittel 3.4. Ved metodeutviklingen ble det brukt iterativ tilnærming. Parameterne som ble testet var: forholdet mellom heptan og dietyler i elueringsmiddelet for TAG, fraksjoneringsmønsteret, elueringsvolumet for DAG og TAG, total lipidmasse påsatt SPE, blandingsforholdet mellom acylglyserolene i stamløsninga og elueringshastighet.

Endret elueringsmiddel, fraksjoneringsmønster og elueringsvolum ble basert på den tidligere etablerte metoden, se kapittel 3.4. Forholdet av heptan:dietyler som ble testet var 92:8, 94:6 og 95:5. Verdiene for elueringsvolum og fraksjoneringsmønster er vist i tabell 3.6 og 3.7. Med unntak av endret

elueringsvolum for TAG og DAG til 800-3200 μL ble stamløsningen gitt i tabell 3.4 benyttet. For elueringsvolumet 800-3200 μL ble stamløsningen vist i tabell 3.8 brukt.

Videre testing ble gjort med 800 μL eluering for TAG, 3200 μL for DAG og 3000 μL for MAG, med stamløsning gitt i tabell 3.8. Her ble først den totale lipidmassen påsatt SPE-roboten endret til 0,5 mg, og deretter ble det testet med tre nye stamløsninger som besto av ulike blandingsforhold av MAG, DAG og TAG, se tabell 3.9. Elueringshastigheten ble endret, hvor 0,5, 1,5, 2,0 og 2,5 mL/min ble prøvd. Elueringshastighetene 1,5, 2,0 og 2,5 mL/min ble i tillegg testet på nytt kolonneparti. Stamløsningene vist i tabell 3.8 og 3.9 er benyttet.

Tabell 3.6: Oversikt over opprinnelig og endret elueringsvolum (μL) for DAG og TAG. Det ble benyttet opprinnelig metode for resten av parameterne. n=1.

	Elueringsvolum for TAG (μL)	Elueringsvolum for DAG (μL)
Opprinnelig metode	1000	3000
Utprøvd	900	3000
	800	3000
	800*	3200*
	700	3300
	600	3400

*n=3

Tabell 3.7: Oversikt over opprinnelige og endrede elueringsvolumer (μL) benyttet for de ulike fraksjoneringene, hvor antall fraksjoneringer ble endret fra to til tre for DAG og TAG. Det ble prøvd med og uten luftgjennomstrømning mellom elueringene. For fraksjoneringen med luftgjennomstrømning er det 1500 μL luft mellom eluering 1 og 2 og 1000 μL luft mellom de resterende. Det ble benyttet opprinnelig metode for resten av parameterne. $n=1$.

	Fraksjon 1 (μL)	Fraksjon 2 (μL)	Fraksjon 3 (μL)	Fraksjon 4 (MAG) (μL)
Opprinnelig	1000		3000	3000
Med luft- gjennomstrømning	600	600	2800	3000
	650	400	2950	3000
	700	200	3100	3000
	750	250	3000	3000
Uten luft- gjennomstrømning	700	200	3100	3000
	900	100	3000	3000
	1000	100	2900	3000

Tabell 3.8: Oversikt over standarder og konsentrasjon som ble brukt for å lage en stamløsning for videreutvikling av metode

Standard	Fettsyre	Konsentrasjon (mg/mL)
Monokaprylin	C8:0	3,43
Monomyristin	C14:0	3,77
Dikaprin	C10:0	3,99
Diolein	C18:1 n -9	2,99
Trilaurin	C12:0	3,59
Tristearin	C18:0	3,98
SUM		21,75

Tabell 3.9: Oversikt over standarder, forhold og konsentrasjon som ble brukt for å lage tre stamløsninger med ulike blandingsforhold av MAG, DAG og TAG.

Standard	Fettsyre	5% MAG, 5% DAG og	10% MAG, 60% DAG,	90% MAG, 6% DAG,
		90% TAG	30% TAG	4% TAG
		Konsentrasjon (mg/mL)	Konsentrasjon (mg/mL)	Konsentrasjon (mg/mL)
Monomyristin	C14:0	0,18	0,39	3,27
Monoolein	C18:1	0,16	0,33	3,30
Dikaprin	C10:0	0,20	2,60	0,09
Dipalmitin	C16:0	0,17	1,65	0,35
Trilaurin	C12:0	3,16	1,18	0,21
Tristearin	C18:0	3,09	0,94	0,11
SUM		6,96	7,09	7,33

3.5. Gjenbruk av kolonner for SPE

Det ble gjort et forsøkt på gjenbruk av kolonnene som ble benyttet i SPE-roboten. Mellom brukene ble det vasket med 5000 µL kloroform:metanol (2:1) og tørket med 1500 µL luft. Vaskefraksjonen ble samlet opp, metylert og analysert på lik linje med MAG-, DAG og TAG-fraksjonene, ved samme metode som kapittel 3.4.

4. Resultat og diskusjon

Generell bemerkelse:

For GC-MS brukt i forskningsarbeidet er ikke deteksjonsgrensen (LOD) og kvantifiseringsgrensen (LOQ) bestemt. Det ble derfor benyttet LOD og LOQ basert på signal-til-støy-forhold (S/N-forhold) på henholdsvis 3 og 10. Kromatografiske topper under LOD ble ekskludert, mens topper under LOQ ble markert med mørkere farger i stolpediagram og rødt i vedlegg.

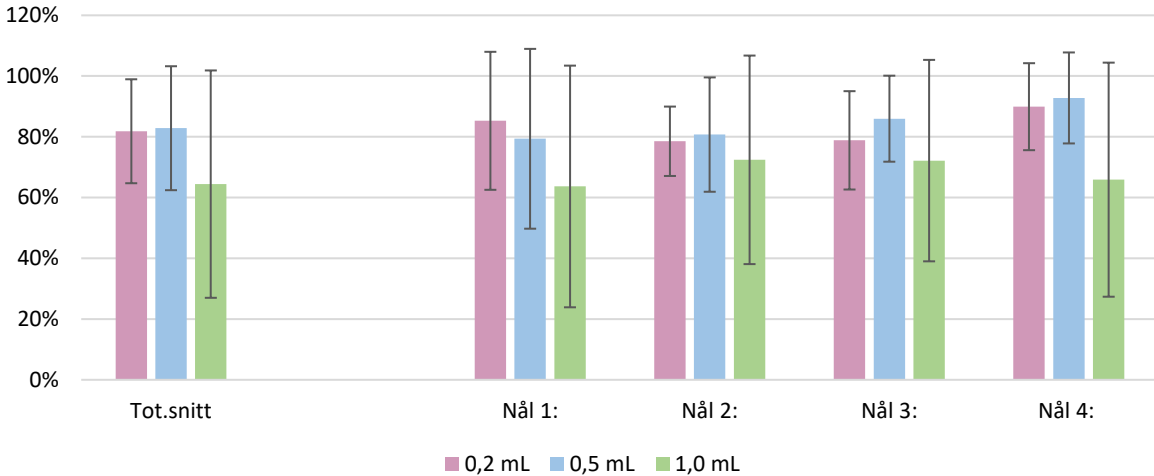
Gjennomblødning av acylglyseroler (herfra kun kalt gjennomblødning) er basert på andelen av det kromatografiske arealet de uønskede acylglyserolene utgjør i fraksjonen, beregnet som vist i likning 3.1. Resultatene som figurene er basert på, samt mer informasjon om fordelingen av acylglyseroler, er lagt ved i vedlegg.

4.1. Optimalisering av SPE-robotens pipetteringsvolum

Det har tidligere blitt registrert opp mot 33% avvik på pipetteringsvolumet til SPE-roboten, og dette avviket ble derfor identifisert. Ifølge robotens spesifikasjoner skal pipetteringsvolumet være >98% for volum mellom 100 µL og 25 mL.

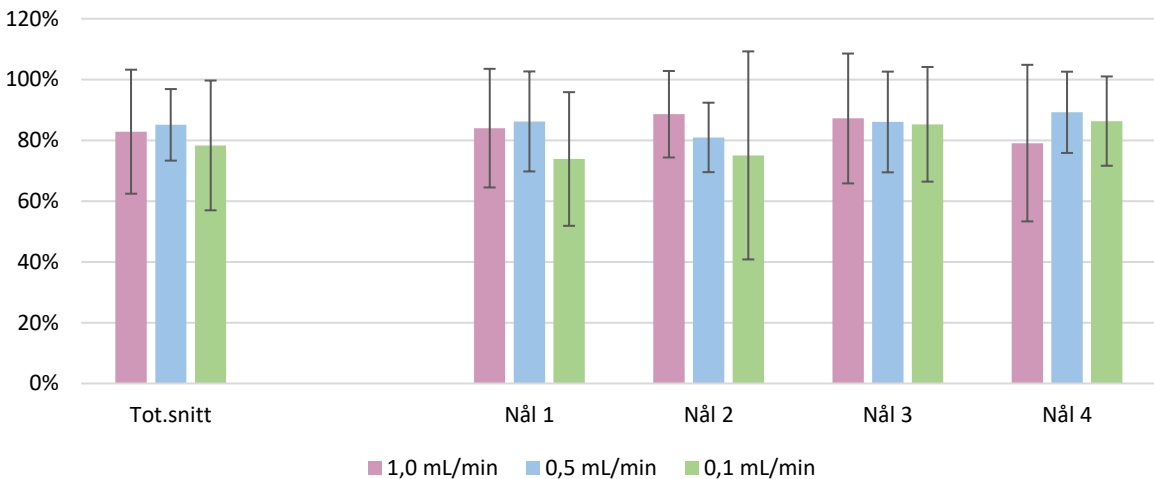
For å minimalisere fordampningen (og dermed øke nøyaktigheten i målingene) ble metanol valgt som prøveløsning, da det ble antatt at metanol var den minst flyktige væsken brukt i prosjektet. I forhold til damptrykket til kloroform (210 hPa), heksan (160 hPa), metanol (128 hPa) og heptan (48 hPa) ved 20 °C burde heptan ha blitt valgt i stedet (WVR International, 2012a-d). Basert på resultatene, vist i figur 4.1-4.3, ser ikke dette ut til å ha vært et problem, da det ble funnet to metoder (stort hull i septum og uten septum) som ga omtrent 100% nøyaktighet i pipetterert volum.

Gjennomsnittlig prosentvis pipetterert volum, samt relativt standardavvik (RSD), totalt og for hver nål ligger i vedlegg 1, og er illustrert i figur 4.1-4.3.

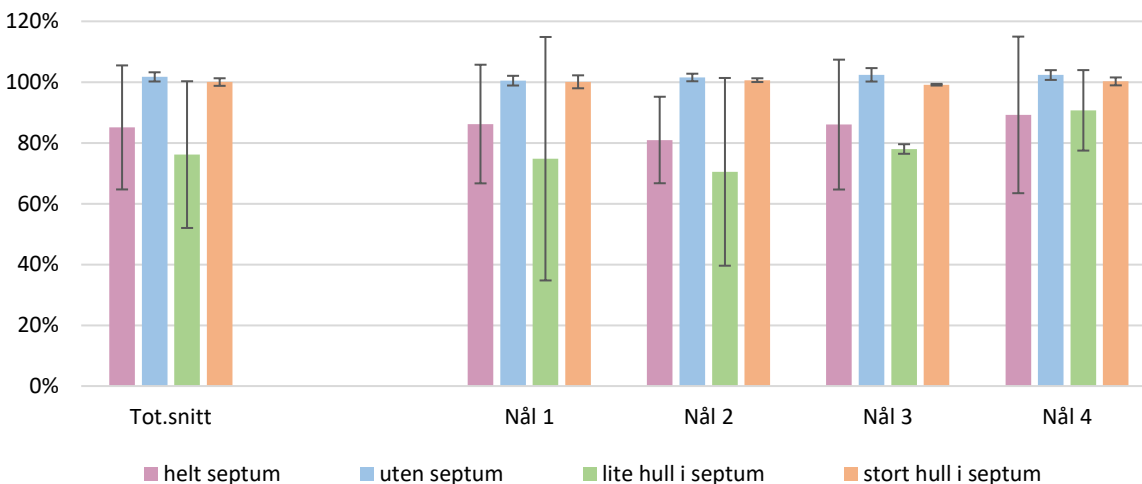


Figur 4.1: Gjennomsnittlig prosent metanol pipettert av SPE-robotens fire nåler og totalt, samt RSD, for pipetteringsvolum på 0,2, 0,5 og 1,0 mL. Oppsugingshastigheten var 1,0 mL/min. n=9.

Resultatene for pipetteringsforsøket med tre ulike volum, vist i figur 4.1, ga stor unøyaktighet, med store tilfeldige variasjoner mellom hver nål og innad i nålene. Det totale gjennomsnittet for hvert volum var >85%, med enkeltmålinger fra 30 til 100%. På grunn av dette ble det gjennomført to forsøk med endret oppsugingshastighet (figur 4.2) og tre forsøk for endret septumbetingelser (figur 4.3).



Figur 4.2: Gjennomsnittlig prosent metanol pipettert av SPE-robotens fire nåler og totalt, samt RSD, for endret oppsugingshastighet. Pipetteringsvolumet var 0,5 mL. n=3 for oppsugingshastigheten 0,1 mL/min, n=2 for 0,5 mL/min og n=9 for 1,0 mL/min



Figur 4.3: Gjennomsnittlig prosent metanol pipettert av SPE-robotens fire nåler og totalt, samt RSD, for endret septum. Det ble benyttet 0,5 mL/min oppsugingshastighet og pipetteringsvolum på 0,5 mL. n=9 for helt septum, n=2 uten septum, n=3 for lite og stort hull.

Forsøkene med endret oppsugingshastighet viste liten differanse i pipettert volum, både i forhold til presisjon og nøyaktighet. For å teste om det var signifikant forskjell mellom oppsugingshastighetene eller mellom nålene ble det gjort to lineære regresjonsanalyser. Gitt et testnivå på 0,05 var verken oppsugningshastighet eller nål signifikant forskjellige. Se vedlegg 1 for ANOVA-tabellene. Basert på dette ble det konkludert med at oppsugingshastighet og nål ikke har betydning. Det ble videre jobbet med 0,5 mL/min.

Endret septumbetingelser ga to nøyaktige og presise metoder; stort hull i septum og uten septum. Begge metodene var optimale i forhold til pipetteringsvolum, med henholdsvis $100,0 \pm 1,24\%$ og $101,7 \pm 1,52\%$. En ulempe med å fjerne septumet var at ved bruk av flyktige løsemidler kan løsemiddelet fordampe. Det var lavere sannsynlighet for fordamping dersom det blir laget et stort hull i septumet, men dette var en tidkrevende og tungvint prosess hvor det var fare for å få septum i prøven.

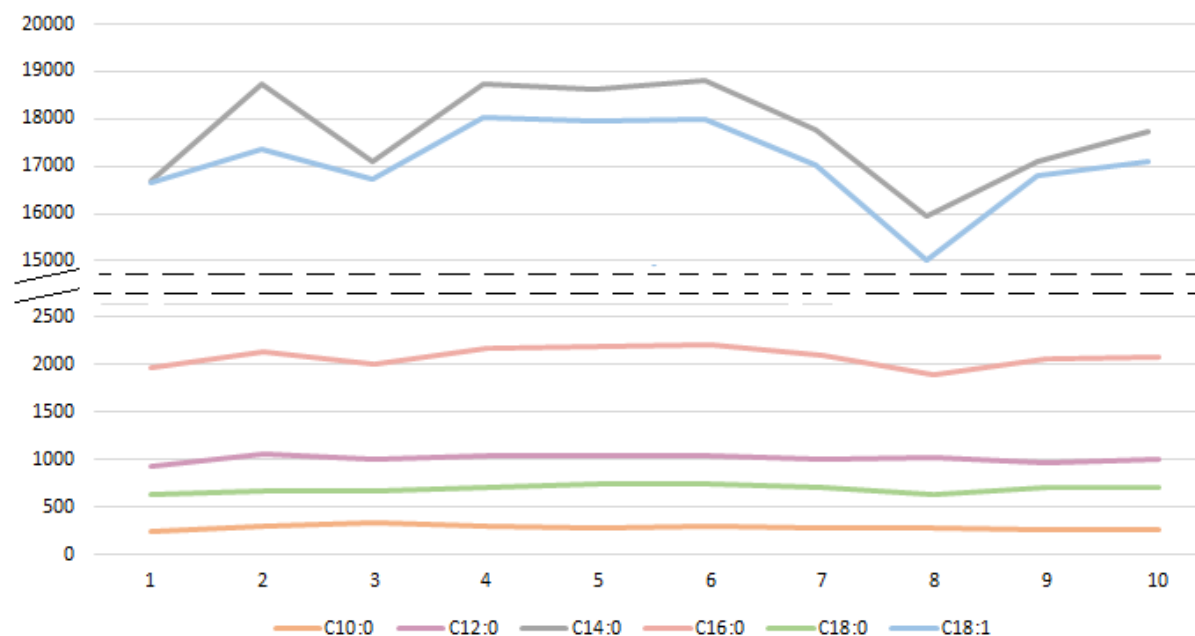
En forklaring på de store variasjonene i pipetteringsvolumet var at det ble dannet undertrykk under pipettering som førte til at væsken gikk over i gassfase, og det ble dannet bobler i nålen (Dolan, 2001). Ved at det ble dannet ulikt trykk hver gang førte til variasjoner i volumet, uavhengig av hvilken nål som benyttes. Det at man ser en vesentlig forbedring i pipetteringsvolumet (fra 68,5 til 101,7%), samt nedgang i pipetteringsvariasjonen (RSD fra 35,18 til 1,24%) ved å gjøre beholderen til et åpent system, bygger opp under hypotesen med at dannelse av undertrykk var et signifikant problem. Lite hull i septum ga vesentlig

dårligere resultater ($76,2 \pm 24,1\%$) enn stort hull. Dette kan skyldes at det ikke ble et varende hull igjennom septumet, som igjen kan føre til dannelse av undertrykk.

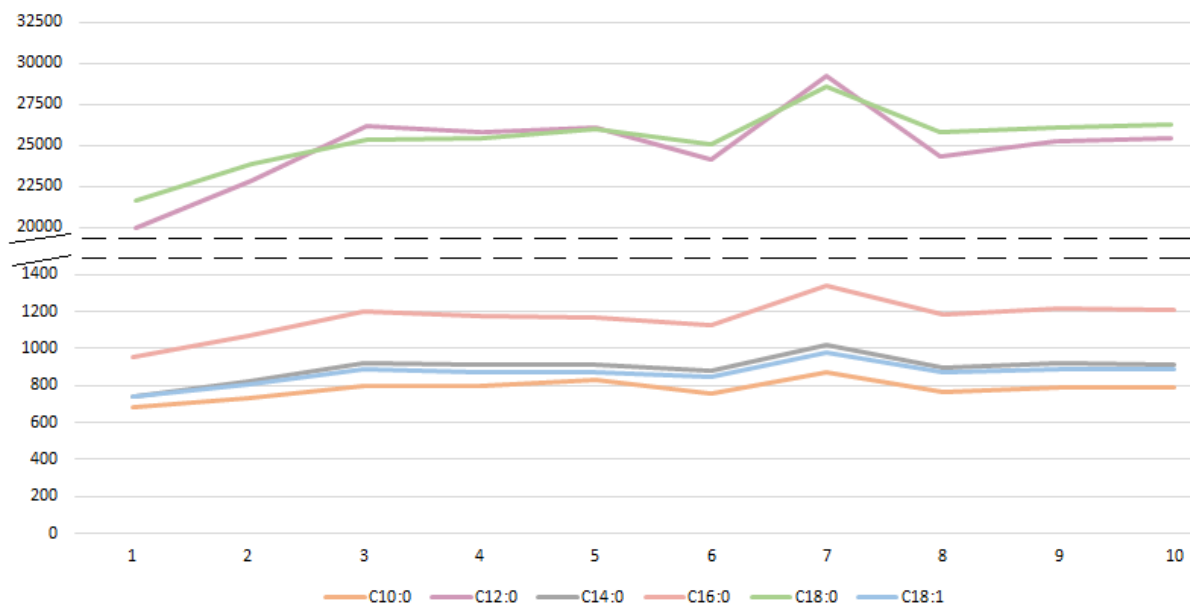
Videre i analysen ble det benyttet både stort hull og uten septum i hetteglasskorken. På grunn av faren for fordampning av løsemiddel, ble det først valgt å bruke stort hull i septumet. Dette ble senere forkastet da prøvene stadig ble forurenset av gummi fra septumet. Det ble i stedet benyttet septumfri kork hvor prøven ble påsatt ny kork med septum umiddelbart etter prøvepåsetting. Det ble i tillegg benyttet 0,5 mL/min oppsugingshastighet av prøveløsning, uavhengig av volum pipetert.

4.2. Test av robustheten til GC-MS

Ved analyser av to FAME-prøver (kalt prøve 1 og prøve 2) ble det observert store variasjoner i de kromatografiske arealene mellom gjentakende analyser av samme prøve, vist i figur 4.4 og 4.5 (modifisert figurer, for opprinnelig data og figurer, se vedlegg 2). RSD for arealene til de metylerte fettsyrene var mellom 3,90 og 9,74%. Center for Drug Evaluation and Research (1994) anbefaler at RSD bør være $\leq 1\%$ ved ti injeksjoner. Basert på dette var RSD for disse analysene høye. Det observeres derimot ingen sammenheng mellom de to prøvene og innad i hver prøve, noe som tyder på tilfeldig variasjon.



Figur 4.4: Oversikt over de kromatografiske arealene til de ulike metylerte fettsyrene i prøve 1 når prøven ble analysert ti ganger. Y-aksen er modifisert, for opprinnelig figur se vedlegg 2. n=1

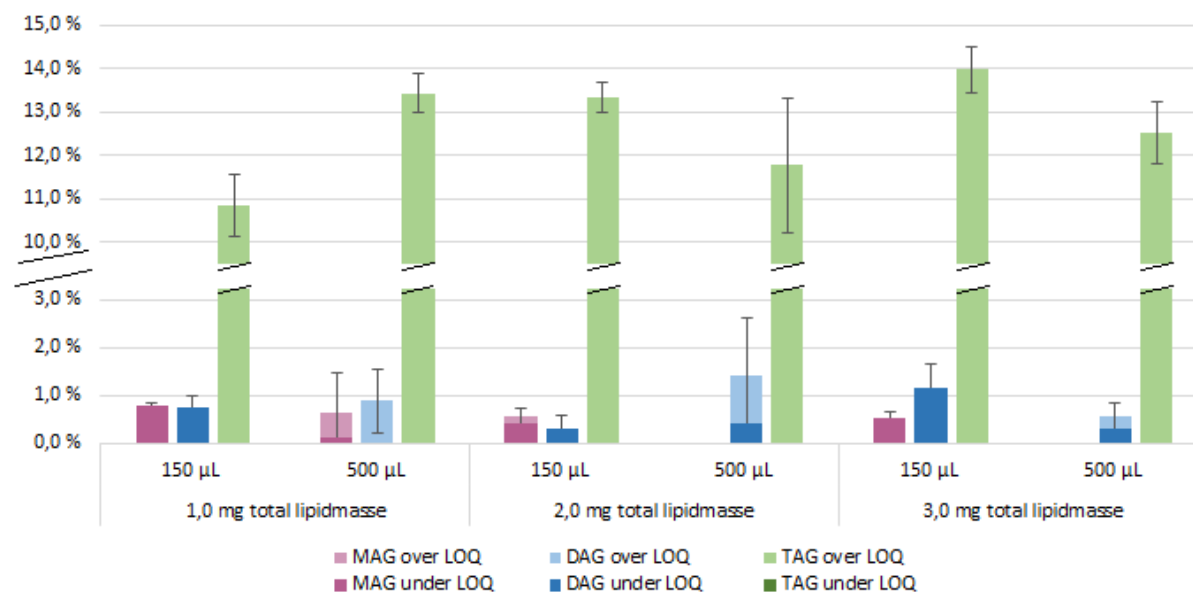


Figur 4.5: Oversikt over de kromatografiske arealene til de ulike metylerte fettsyrene i prøve 2 når prøven ble analysert ti ganger. Y-aksen er modifisert, for opprinnelig figur se vedlegg 2. n=1

I forskningsarbeidet ble gjennomsnitt og standardavvik basert på andelen FAME-arealet utgjør i fraksjonen (%), i stedet for det kromatografiske areal. Dette førte til at de tilfeldige variasjonene fra GC-MS ble tatt hensyn til under presentasjonen av data, da standardavviket for andel FAME var $\leq 0,90\%$ i alle tilfellene (se vedlegg 2).

4.3. Reprodusering av tidligere etablert metode

En tidligere utarbeidet metode (Jacobsen, 2014) ble reprodusert, og beregnet gjennomsnittlig prosentvis andel acylglyserol (i areal) i de ulike fraksjonene ligger i vedlegg 3.



Figur 4.6: Total prosentvis gjennomblødning av acylglyserol i fraksjonene MAG, DAG og TAG med standardavvik. Lipidmassen påsatt SPE-kolonnene var 1,0, 2,0 og 3,0 mg, med 150 og 500 µL påsatt prøvevolum. Y-aksen er modifisert, for opprinnelig figur se vedlegg 3. n=3.

Resultatene, vist i figur 4.6, viser lite gjennomblødning til MAG og DAG (98,5-100% ren), men noe høyere gjennomblødning til TAG (86-89% ren). Resultatene tyder på at det er mulig å analysere prøver ved bruk av denne metoden dersom det kun blir sett på MAG og DAG-fraksjonene. All gjennomblødning til de ulike fraksjonene besto av DAG og TAG, mens all MAG ble eluert i korrekt fraksjon. Ved å se nærmere på resultatene for 150 µL består TAG-fraksjonen av 10,8-14,0% DAG, mens DAG-fraksjonen inneholder 0,3-1,2% ikke-kvantitativ TAG. MAG-fraksjonen består av 0,2% DAG som var kvantitativ, og 0,4% ikke kvantitativ DAG. Siden det var ønskelig med grunnlinjeseparasjon for alle fraksjonene ble det forsket videre på metoden. Det ble imidlertid fokusert på å bedre separasjonen av DAG og TAG, samt ren MAG-fraksjon.

Det ble analysert flere prøvevolumer med samme metode for å se hvordan separasjonen endret seg ved økt volum. Resultatene viser at prøvevolumet på 150 µL var noe bedre enn 500 µL, i forhold til den totale kvantitative gjennomblødningen (0,0-0,2% mot 0,0-1,0%). I tillegg var standardavviket for 150 µL lavere i

alle tilfeller med gjennomblødning (0,07-0,71% mot 0,28-1,55%). Det ble derfor kun gått videre med 150 μ L påsatt prøvevolum.

Siden dette var en reproduksjon av Jacobsens (2014) metode ble gjennomblødningen sammenlignet med hennes resultater. Jacobsen (2014) beregnet gjennomblødning ved å se på andelen av det totale acylglyserolet som eluerte «feil», mens det i dette forskningsarbeidet ble sett på hvor stor del av fraksjonen acylglyserolet opptok. For å kunne sammenligne og se på reproduserbarheten til metoden ble den andre gjennomblødningsmetoden beregnet, lagt ved i vedlegg 3.

Resultatene viser at det var stor forskjell mellom Jacobsens (2014) forsøk og dette forsøket. For Jacobsen (2014) var andelen TAG som eluerte i DAG mellom 1,2-3,3%, mens i TAG-fraksjonen ble det observert $\leq 0,5\%$ DAG. Også i dette forsøket var det liten andel TAG i DAG-fraksjonen (0,2-1,9%), men større andel av DAG i TAG (24,0-29,0%). Forskjellen kan skyldes at det potensielt ble brukt ulike parametere på blant annet luftgjennomstrømning og mobilfasehastighet. Resultater senere i arbeidet viser at endringer i disse parametere kan utgjøre store forskjeller på separasjonen. En annen faktor som kan ha spilt inn var reproduserbarheten mellom kolonnepartiene, dette blir diskutert i detaljer senere.

4.4. Videreutvikling av separasjonsmetoden for MAG, DAG og TAG

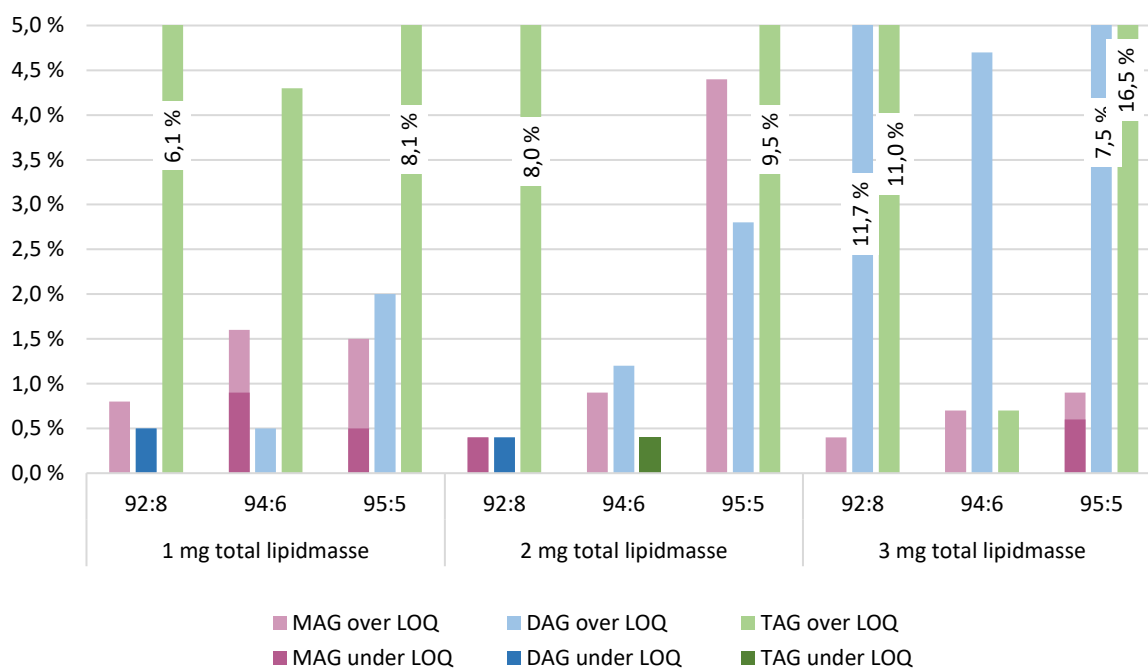
Resultatene for reprodusering av etablert metode var ikke tilfredsstillende, og det ble derfor gjort flere tiltak for å optimalisere separasjonen, se kapittel 3.5. Andelen av det kromatografiske arealet acylglyserolene utgjør i fraksjonen er lagt ved i vedlegg 4, og gjennomblødningen er illustrert i dette kapittelet gjennom figurer. Unntaket er fraksjoneringsmønster, hvor det kromatografiske arealet av acylglyserol i fraksjonen divideres på summen av arealet til tilsvarende acylglyserol fra alle fraksjonene. Resultatene på dette ligger i vedlegg 4.

Under videreutviklingen ble det hovedsakelig analysert én prøve for hver parameterendring. En slik begrensning kommer av høyt tidsbruk per analyse og kostandene knyttet til SPE-kolonnene. Selv om én prøve ikke utelukker tilfeldige variasjoner, vil det gi en indikasjon på grad av separasjon. Dersom første analyse for en parameterendring ga positive resultater ble det analysert flere replikater. På denne måten ble det mulig å teste mange parameterendringer på relativt kort tid.

Målet for metoden var grunnlinjeseparasjon av MAG, DAG og TAG. Hvis dette ikke blir oppnådd for alle gruppene var det viktigere med rene MAG- og DAG-fraksjoner enn TAG. Dette skyldes at det hovedsakelig er MAG- og DAG-fraksjonene som er av interesse i den kommende stipendiatstillingen.

4.4.1. Endring av forholdet mellom heptan og dietyleter i elueringsmiddelet for TAG

For å optimalisere separasjonene av DAG og TAG ble forholdet mellom heptan og dietyleter i elueringsmiddelet for TAG endret. Ved å endre sammensetningen av heptan:dietyleter ble den eluotropiske styrken og polariteten til elueringsmiddelet endret (Gilson, 2015; Thurman & Mills, 1998). Resultatene, vist i figur 4.7, viser at gjennomblødningen til TAG var lavere for alle elueringsmidler sammenliknet med resultatene for opprinnelig metode (mellom 2,8-15,8 prosentpoeng). Unntaket er blandingen 95:5 for 3,0 mg total lipidmasse. Dette indikerer at økt retensjon av DAG ble oppnådd, da 3,0 mg for 95:5 inneholdt 10,7% gjennomblødning av MAG. Ingen av de andre fraksjonene inneholdt gjennomblødning av MAG.



Figur 4.7: Total prosentvis gjennomblødning av acylglyserol i fraksjonene MAG, DAG og TAG for 1,0, 2,0 og 3,0 mg lipidmasse påsatt SPE-kolonnen. Forholdet mellom heptan og dietyleter i elueringsmiddelet for TAG ved SPE var 92:8, 94:6 og 95:5. n=1.

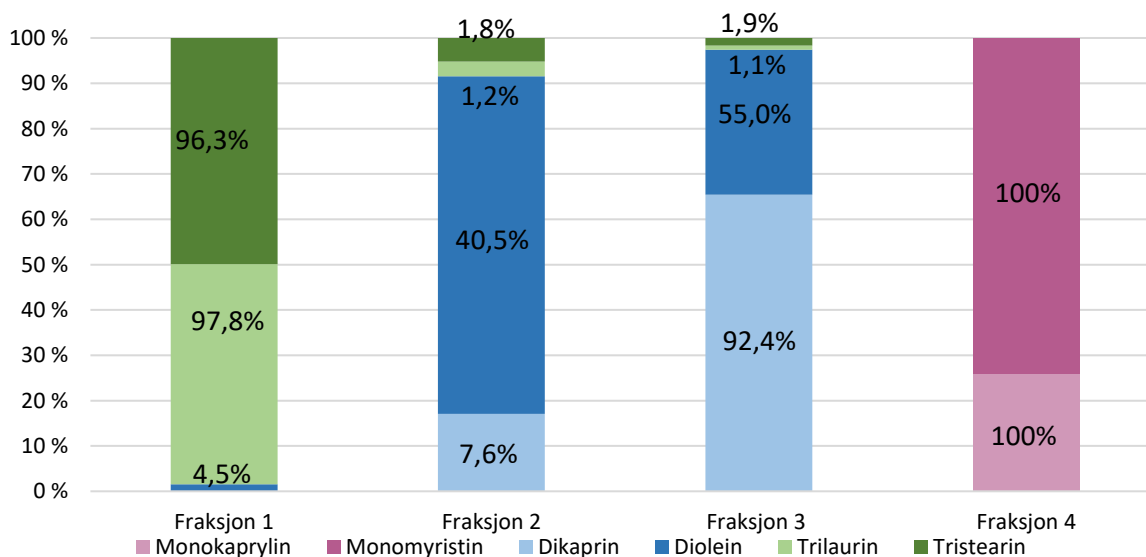
Til tross for økt retensjon av DAG, ble det ikke oppnådd bedre separasjon av DAG og TAG sammenliknet med opprinnelig metode. Resultatene viste at MAG- og DAG-fraksjonene gikk fra å ha $\leq 1,2\%$ gjennomblødning til opptil 11,7%. Dette tyder på at endret elueringsmiddel påvirket TAG negativt, ved at også TAG fikk høyere retensjon. Dette kan komme av at DAG og TAG har ganske like fysiske og kjemiske egenskaper når DAG inneholder lange fettsyrer, som fører til at DAG og TAG påvirkes likt.

Ved å se på alle lipidmassene ble resultatet av å bytte elueringsmiddel for TAG jevnt over dårligere for MAG og DAG (opptil 3,8 og 11,7 prosentpoeng økning) enn opprinnelig metode. Da hovedfokus var ren

MAG og DAG ble elueringsmiddelet for TAG holdt til heptan:dietyleter, 93:7. Senere ble 3,0 mg lipidmasse forkastet på grunn av varierende resultater. Basert på resultatene for endret elueringsmiddel, og forkasting av 3,0 mg, hadde det vært av interesse å undersøke 92:8 videre. For eksempel ved å se på interaksjonen ved å endre parametere som mobilfasehastighet og elueringsvolum.

4.4.2. Endret fraksjoneringsmønster for DAG og TAG

For å optimalisere renheten av DAG- og TAG-fraksjonene ble de to første elueringene delt i tre. Målet var ren TAG i fraksjon én, blanding i fraksjon to og ren DAG i den tredje. Resultatene av dette ble svært variert. Til tross for relativt ren TAG i fraksjon én ble mye av DAG eluert i fraksjon to. Dette førte til at den midterste fraksjonen inneholdt opptil 90% av den totale mengden DAG. Figur 4.8 viser resultatene for «den beste» fraksjoneringen.



Figur 4.8: Oversikt over andelen av fraksjonen (fargefordeling) som består av de ulike acylglyserolene, samt hvor stor del av hver acylglyserol som befinner seg i fraksjonene (prosenttall) ved 1,0 mg påsatt lipidmasse. De ulike fraksjoneringene består av henholdsvis 700-200-3100-3000 µL elueringsvolum. n=1.

Resultatene, vist i figur 4.8, viser at begge monoacylglyserolene befinner seg i samme fraksjon. Fraksjon to består av akseptabel mengde TAG (1,2 og 1,8%), men for høy mengde DAG (7,6 og 40,5%). Å tape mer enn 15% av en acylglyserol ble ikke sett på som akseptabelt. I tillegg til stort tap til fraksjon to var det fortsatt noe gjennomblødning til fraksjon én og tre (1,5 og 2,6%). Flere av de andre fraksjoneringskombinasjonene hadde ren fraksjon én og tre, men mellom 70-90% av diacylglyserolene i fraksjon to.

Mellom fraksjoneringene ble det sendt luft igjennom kolonnene for å presse ut alt elueringsmiddel. Dette kan muligens bidra til økt båndspredning, og være en forklaring på gjennomblødningen av DAG og TAG til fraksjon én og tre, samt stort tap av DAG i fraksjon to. Kombinasjonen av å miste stor andel (mellom 40-90%) diacylglyserol til fraksjon to og noe gjennomblødning til fraksjonene én og tre førte til at fraksjonering med luftgjennomstrømning ble forkastet. Det ble derfor gjort to forsøk med fraksjonering uten luftgjennomstrømning.

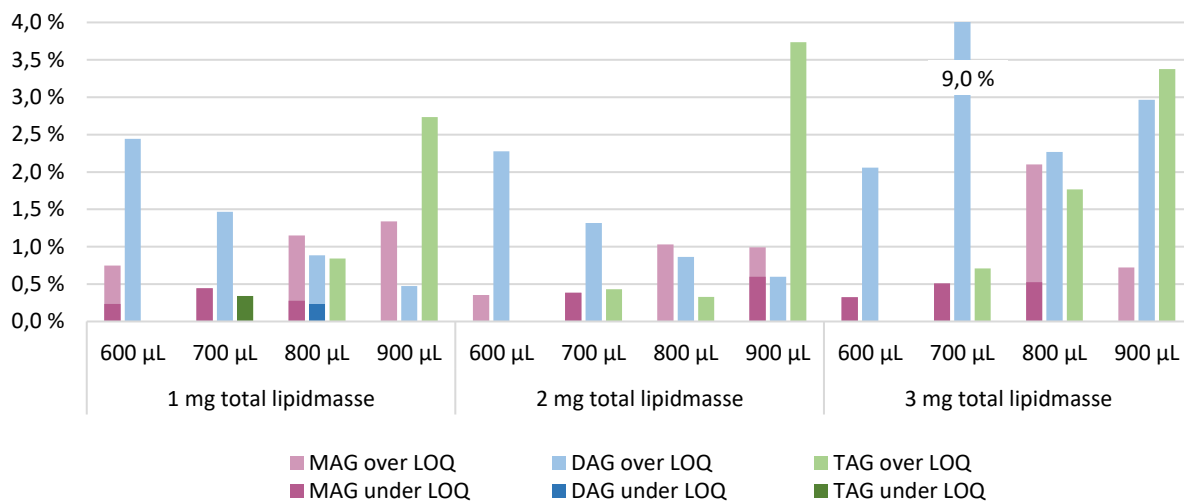
Ved å fjerne luftgjennomstrømningen ble fraksjoneringene vesentlig bedre, med >95% renhet for fraksjon én og tre for 1,0 og 2,0 mg påsatt lipidmasse. MAG-fraksjonen hadde en renhet på over 99%, uavhengig av påsatt lipidmasse. Det ble antatt at mangel på luftgjennomstrømning kunne påvirke mengde elueringsmiddel som ble eluert. Dette problemet ble observert. Om elueringsvolumet var for høyt eller lavt i forhold til påsatt volum varierte mellom fraksjonene. I tillegg ble det observert varierende elueringsvolumer innad i samme fraksjoneringstrinn. Ujevnheter i volumet bidrar til varierende fraksjonering og dermed mangel på repeterbarhet.

Fraksjonering av DAG og TAG i flere deler ga lavere gjennomblødning, men andre sentrale problemer ble fremtredende. Derfor ble fraksjonering i flere deler, med og uten luftgjennomstrømning, forkastet.

4.4.3. Endret elueringsvolum for DAG og TAG

For å minke gjennomblødningen fra DAG til TAG ble elueringsvolumet for TAG senket.

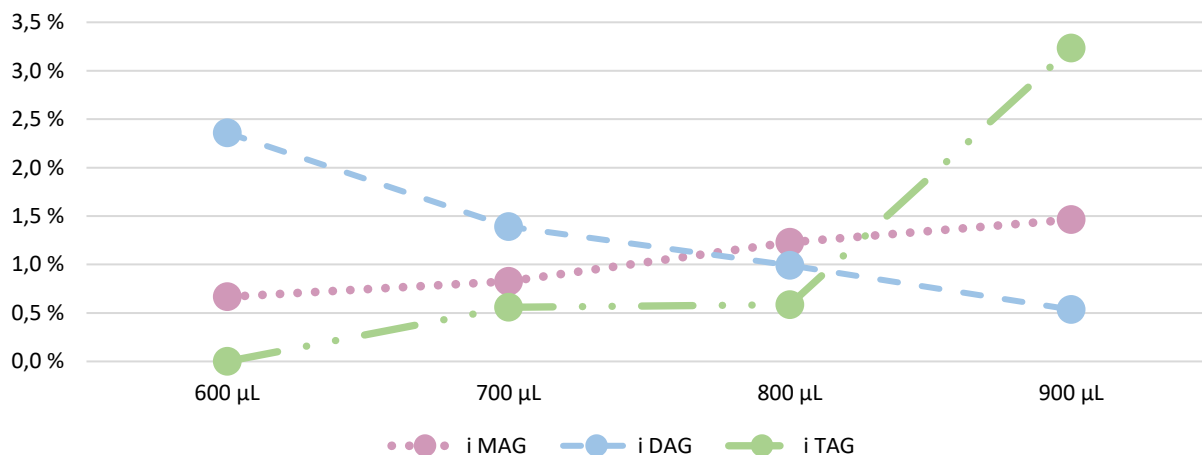
Resultatene, vist i figur 4.9, viste et mønster for 1,0 og 2,0 mg total lipidmasse, med avtagende gjennomblødning til TAG ved avtagende elueringsvolum (fra 3,7 til 0%), mens gjennomblødningen til DAG økte (fra 0,5 til 2,3%). Dette gjaldt derimot ikke for 3,0 mg påsatt lipidmasse, hvor både DAG- og TAG-fraksjonen har antydninger til avtagende gjennomblødning ved avtagende elueringsvolum. Elueringsvolumet på 700 µL skiller seg derimot kraftig ut, med 9,0% gjennomblødning til DAG, og ble derfor analysert på nytt. Resultatet for DAG-fraksjonen ble vesentlig bedre, med nedgang fra 9,0 til 2,4% gjennomblødning. TAG-fraksjonen ble derimot dårligere, med økning på 11,3 prosentpoeng, hvorav 9,2 prosentpoeng besto av MAG. På grunn av generelt ujevne resultater ble det besluttet å ikke bruke 3,0 mg påsatt lipidmasse ved valg av elueringsvolum.



Figur 4.9: Prosent total gjennomblødning i fraksjonene MAG, DAG og TAG 1,0, 2,0 og 3,0 mg påsatt lipidmasse på SPE. Elueringsvolumet for TAG ble endret til 900, 800, 700 eller 600 µL, og elueringsvolumet til DAG var henholdsvis 3000, 3000, 3300 eller 3400 µL. n=1

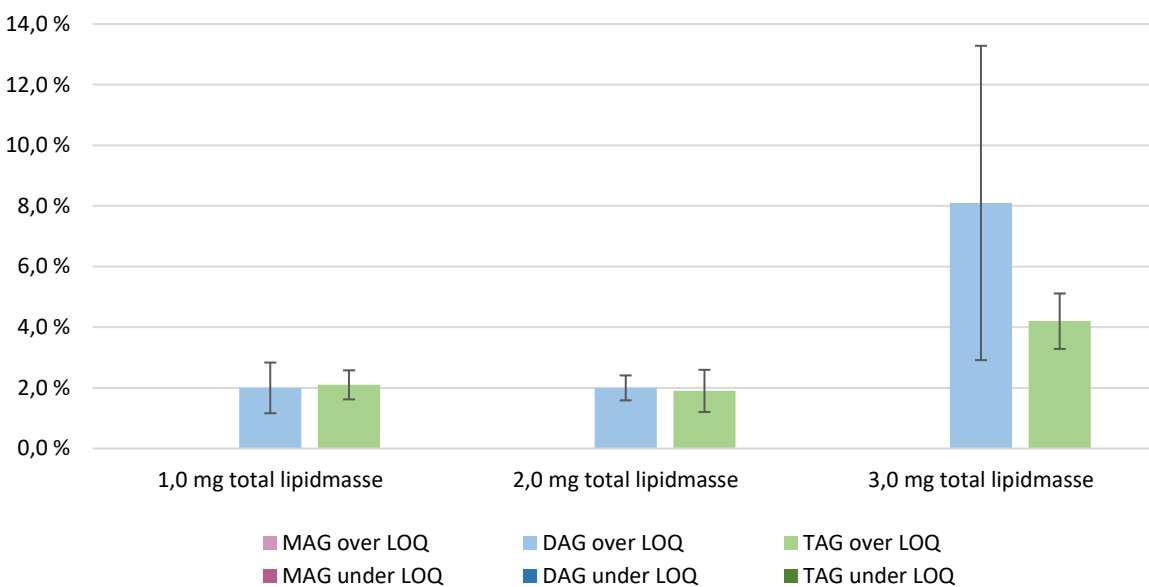
Resultatene for 1,0 og 2,0 mg hadde god renhet, med >96% for alle fraksjonene. I opprinnelig metode var det TAG-fraksjonen som hadde høyest krysskontaminering, med 13,3% gjennomblødning for 2,0 mg. For 600 µL var derimot TAG-fraksjonen ren, for begge lipidmassene. Lavere gjennomblødning av DAG til TAG var dermed oppnådd, da all MAG ble eluert i rett fraksjon.

Ved å evaluere alle fraksjonene så 700 og 800 µL spesielt bra ut, med >98% renhet for alle fraksjonene. For å lettere kunne sammenlignet ble gjennomsnittlig prosent gjennomblødning i de ulike fraksjonene for 1,0 og 2,0 mg beregnet, og vist i figur 4.10.



Figur 4.10: Gjennomsnittlig prosentvis gjennomblødning av acylglyserol i fraksjonene MAG, DAG og TAG av 1,0 og 2,0 mg total lipidmasse påsatt SPE for 600, 700, 800 og 900 µL elueringsvolum for TAG. n= 1

Basert på resultatene ble 800 µL valgt som elueringsvolum for TAG. Gjennomblødningen til TAG for 700 og 800 µL var identiske (0,6%), mens gjennomblødningen til DAG var lavere for 800 µL (1,0 mot 1,4%). Gjennomblødningen til MAG var derimot noe høyere (1,2 mot 0,8%), men dette skyldes mest sannsynlig endring av det totale volumet av heptan:dietyler (93:7) som ble tilsatt. I utgangspunktet var det totale volumet av heptan:dietyler på 4000 µL, fordelt på to fraksjoner. Ved endret elueringsvolum for TAG var intensjonen at elueringsvolumet for DAG skulle øke tilsvarende, for å gi totalt 4000 µL. Det vil si at 600 µL eluering for TAG ga 3400 µL eluering for DAG. Ved 800 og 900 µL eluering for TAG ble dette ikke gjort, hvor elueringsvolumet for DAG ble holdt til 3000 µL. Det ble derfor analysert to replikater med 800 µL elueringvolum for TAG og 3200 µL for DAG.



Figur 4.11: Prosent gjennomblødning i MAG, DAG og TAG for 800 µL elueringsvolum for TAG og 3200 µL for DAG, samt standardavviket. Det ble påsatt 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse på SPE-kolonnene. n=2

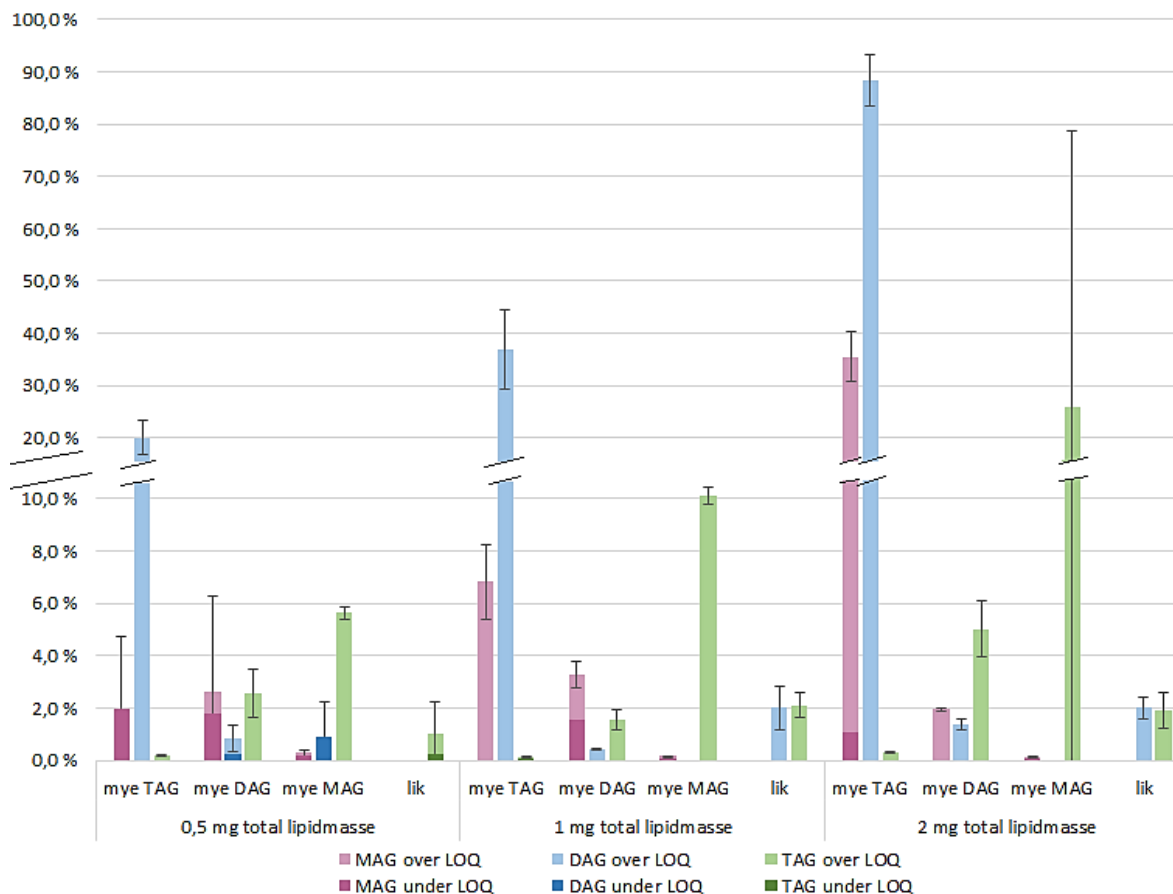
Ved å endre elueringsvolumet for DAG til 3200 µL, vist i figur 4.11, ble all gjennomblødning til MAG fjernet, men liten økning i gjennomblødninga til DAG og TAG (ca. 1 prosentpoeng). Økningen var svært liten, og skyldes mest sannsynlig tilfeldige variasjoner. Men økt gjennomblødning til TAG kan òg skyldes at analysene illustrert i figur 4.9 var fra en stamløsning med annerledes sammensetning av acylglyseroler enn figur 4.11. En av endringene i den nye stamløsningen var endring av DAG sammensetningen. I stedet for DAG med C10:0 og C16:0 fettsyrer ble det benyttet C10:0 og C18:1. Det er allerede nevnt at DAG og TAG har relativt like egenskaper dersom DAG består av lange fettsyrer. Dette kan derfor være årsak til økt gjennomblødning til TAG fra DAG.

Endring av elueringsvolumet for DAG og TAG forbedret separasjonen betraktelig i forhold til opprinnelig metode, med >98% renhet for alle fraksjonene, ved 1,0 og 2,0 mg total lipidmasse. I tillegg var standardavvikene lave (<1%). Det ble derfor jobbet videre med 800 µL elueringsvolum for TAG og 3200 µL DAG.

4.4.4. Analyse av mindre lipidmasse og endret sammensetning av MAG, DAG og TAG

Prøvekapasitet på 1-5% av sorbentmassen tilsvarer en total lipidmasse mellom 5 og 25 mg ved bruk av 500 mg sorbentmasse. Ved metodeutviklingen ble det brukt 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse, som var godt innenfor kapasitetsområdet. Likevel var det varierende gjennomblødning mellom lipidmassene. Eksempelvis var det stor variasjon for replikatene ved 700 µL elueringsvolum for TAG ved 3,0 mg total lipidmasse, med 6,6 prosentpoeng nedgang i gjennomblødning til DAG og økning på 11,3 prosentpoeng til TAG. I tillegg hadde endret elueringsmiddel for TAG til heptan:dietyler (94:6) mindre gjennomblødning i TAG-fraksjonen ved 2,0 mg enn 1,0 mg total lipidmasse (0,4 mot 4,3%). Dette kan tyde på overbelastning av kolonnematerialet (Ebeler & Shibamoto, 1994). Det hadde derfor vært av interesse å teste med større sorbentmasse, men dette var ikke mulig på grunn av begrensningen i ferdigpakkede kolonner tilpasset SPE-roboten. Det ble i stedet antatt at økt sorbentmasse og lavere påsatt lipidmasse ville gi tilsvarende resultat, og det ble derfor testet med lavere total lipidmasse.

Endring av total lipidmasse til 0,5 mg resulterte i ren MAG- og DAG-fraksjon, og renhet i TAG på $99,0 \pm 1,22\%$. For at en metode skal være brukbar må den være uavhengig av konsentrasjonene til acylglyserolene. Basert på det gode resultatet for 0,5 mg total lipidmasse ble det testet med tre nye stamløsninger, med ulikt blandingsforhold mellom MAG, DAG og TAG, se tabell 3.9. Blandingsforholdene ble basert på forventet innhold i reelle prøver.



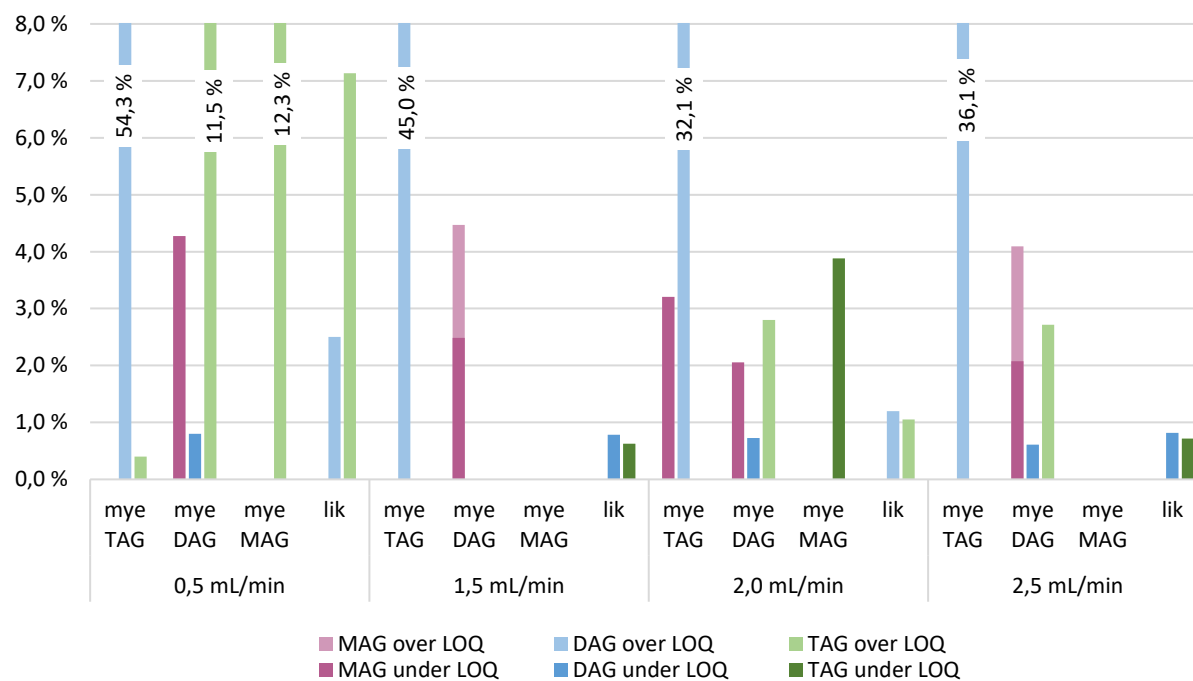
Figur 4.12: Total prosent gjennoblødning i fraksjonene MAG, DAG og TAG for analyser med ulik prøvesammensetning, samt standardavvik. De ulike prøvene består av: mye TAG: 90% TAG, 5% DAG og 5% MAG, mye DAG: 30% TAG, 60% DAG og 10% MAG, mye MAG: 4% TAG, 6% DAG og 90% MAG og lik: 33% MAG, DAG og TAG. Det ble påsatt 0,5, 1,0 og 2,0 mg total lipidmasse på SPE-kolonnen, og elueringsvolumet for TAG var 800 µL, 3200 µL for DAG og 3000 µL for MAG. n=2 for alle med unntak 0,5 mg total lipidmasse for lik sammensetning, hvor n=3. Y-aksen er modifisert, for opprinnelig figur se vedlegg 3.

Resultatene, vist i figur 4.12, viste store variasjoner i gjennoblødningene avhengig av blandingsforholdet i prøven. For blandingen mye TAG var det hovedsakelig høyere gjennoblødning til DAG-fraksjonen (20,0-88,1%), mens for mye MAG var det TAG-fraksjonen som fikk økt gjennoblødning (5,6-26%). Siden resultatene viste store gjennoblødninger og avhengighet av prøvesammensetningen ble elueringshastigheten endret. Videre ble det kun testet for 0,5 mg total lipidmasse da økende lipidmasse ga generelt økt gjennoblødning.

4.4.5. Endret hastighet på elueringsmidlene gjennom SPE-kolonnen

Resultatene for endret elueringshastighet, vist i figur 4.13, viste forbedret separasjon sammenlignet med 1,0 mL/min. Unntaket var 0,5 mL/min, som økte gjennoblødningen med 0,2-8,8 prosentpoeng i åtte

fraksjoner. Dette kan tyde på at elueringshastigheten på 1,0 mL/min har vært for lav. Totalt sett ga elueringshastighet på 1,5 mL/min best resultat. Blandingen med mye MAG var grunnlinjeseperert, blandingen med likt forhold hadde fraksjonering med >99% renhet og blandingen med mye DAG hadde kun gjennomblødning av DAG til MAG (4,5%). Krysskontamineringen av DAG til MAG for blandingen mye DAG kan potensielt elimineres ved å øke elueringsvolumet for DAG-fraksjonen. Blandingen bestående av mye TAG skiller seg derimot ut, med 45,0% TAG i DAG-fraksjonen. Det bør allikevel merkes at prosentmessig andel av det totale TAG-innholdet i DAG-fraksjonen var lavt, 1,9% C12:0 og 4,6% C18:0.



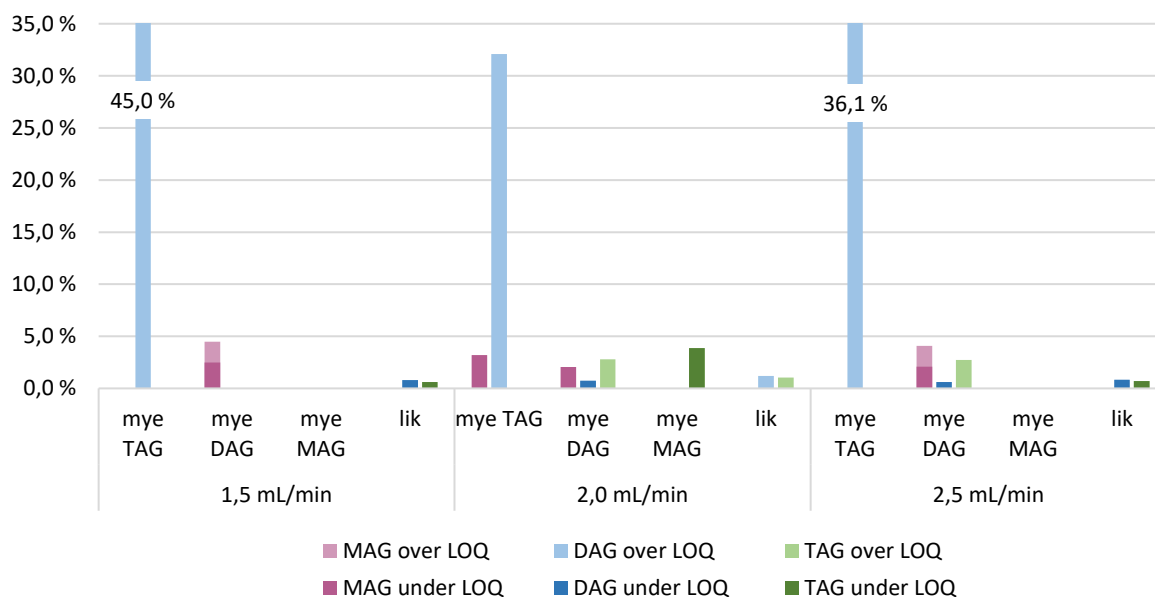
Figur 4.13: En oversikt over gjennomblødning i de ulike fraksjonene for 0,5 mg påsatt lipidmasse ved ulike elueringshastigheter. Det ble benyttet ulike blandingsforhold hvor de består av: mye TAG: 5% MAG, 5% DAG og 90% TAG, mye DAG: 10% MAG, 60% DAG og 30% TAG, mye MAG: 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG og lik: 33% MAG, DAG og TAG. n=1.

Basert på de gode resultatene for elueringshastigheten 1,5 mL/min ble det analysert replikater, se kapittel 4.4.6, figur 4.15.

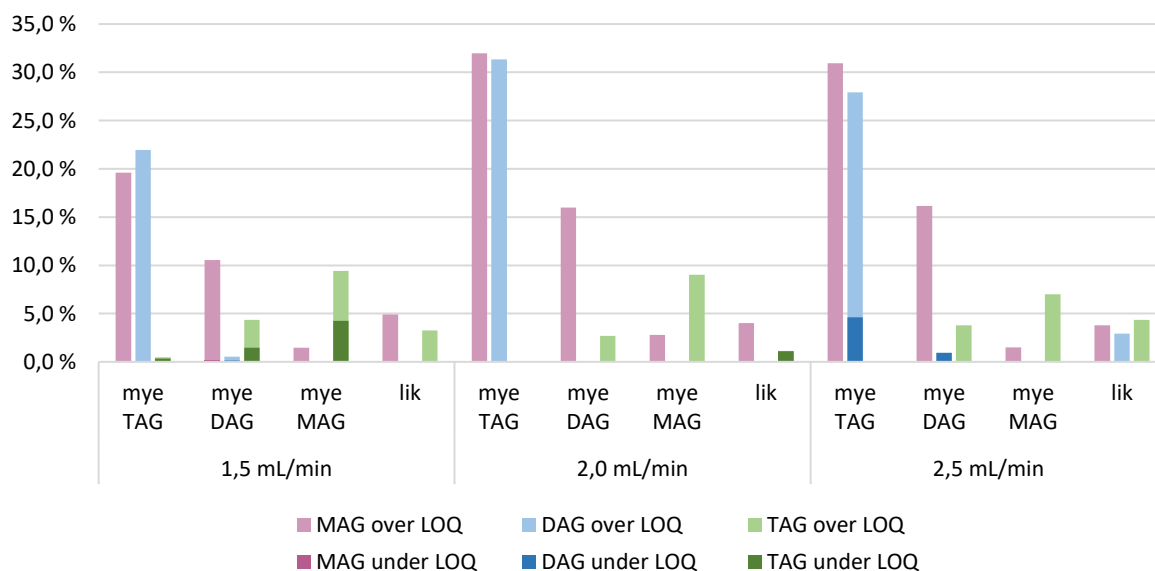
4.4.6. Reproduserbarhet mellom kolonnepartier

Replikatene for elueringshastigheten 1,5 mL/min ble analysert med kolonner fra nytt parti. Dette skyldes mangel av kolonner fra «gammelt kolonneparti». «Gammelt kolonneparti», vist i figur 4.14 (modifisert av figur 4.13), ga >95% renhet for alle prøvene ved 1,5 mL/min, med unntak av mye TAG. Sammenlignet med «nytt kolonneparti» (figur 4.15), hvor renheten var >89%, tyder dette på mangelfull homogenitet mellom

kolonnepartiene. For å se om dette var en trend ble det analysert én prøve for elueringshastighetene 2,0 og 2,5 mL/min.



Figur 4.14: Oversikt over gjennomblodning i de ulike fraksjonene for 0,5 mg påsatt lipidmasse ved ulike elueringshastigheter, med «gammelt kolonneparti». Det ble benyttet ulike blandingsforhold; hvor de består av: mye TAG: 5% MAG, 5% DAG og 90% TAG, mye DAG: 10% MAG, 60% DAG og 30% TAG, mye MAG: 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG og lik: 33% MAG, DAG og TAG. n=1.



Figur 4.15: Oversikt over gjennomblodning i de ulike fraksjonene for 0,5 mg påsatt lipidmasse ved ulike elueringshastigheter, med «nytt kolonneparti». Det ble benyttet ulike blandingsforhold hvor de består av: mye TAG: 5% MAG, 5% DAG og 90% TAG, mye DAG: 10% MAG, 60% DAG og 30% TAG, mye MAG: 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG og lik: 33% MAG, DAG og TAG n=3 for 1,5 mL/min og n=1 for 2,0 og 2,5 mL/min.

Resultatene for «nytt kolonneparti» viste at blandingene mye DAG, mye MAG og lik har generelt økt gjennomblødning sammenlignet med «gammelt kolonneparti», med opptil 11 prosentpoeng økning. Dette gjelder derimot ikke for mye TAG, hvor gjennomblødningene til DAG-fraksjonen for hastighetene 1,5 og 2,5 mL/min sank med henholdsvis 23,1 og 8,2 prosentpoeng. For hastigheten 2,0 mL/min var gjennomblødninga tilnærmet identisk for begge kolonnepartiene, med 31,3% for «nytt» parti og 32% for «gammelt».

Resultatene viste stor differanse mellom kolonnepartiene, for alle elueringshastighetene, noe som underbygger hypotesen om mangelfull homogenitet mellom kolonnepartier. Ifølge Henry (2000) er reproduserbarheten til SPE-kolonner dårlig mellom kolonnepartier, noe han hovedsakelig skylder på variasjon i pakkingen av sorbentmassen. En tettpakket sorbent vil ha saktere gjennomstrømning (flow) enn en løsere sorbent, da gjennomtrengingen (permeability) endres. Derfor anbefaler Shepherd (1996) at en nyutviklet metode bør testes for mange forskjellige kolonnepartier før metoden valideres.

4.5 Gjenbruk av SPE-kolonne

SPE-kolonnene brukt i metodeutviklingen er relativt dyre (67,25 NOK per kolonne). For å redusere kostnaden ble SPE-kolonnene gjenbrukt opptil fire ganger. Resultatene, tabell 4.1, viser tendens til lavere gjennomblydning for TAG, fra 11,4 til 6,5% ved gjenbruk. Gjennomblydningen av acylglyserolene til MAG- og DAG-fraksjonen var konstant, på henholdsvis 0,2 og 0%. Dette kan komme av at kolonnene blir mettet ved første ekstraksjon, som kan påvirke interaksjonen med sorbenten ved gjentagende bruk. Gjenbruk av kolonner kan dermed være en påvirkende faktor for å oppnå grunnlinjeseparasjon, i stedet for kun en kostnadsreducerende faktor. Dette kunne vært interessant å forske mer på, men på grunn av tidsrammene for prosjektet ble ikke dette prioritert.

Som tidligere nevnt var det viktig at kolonnene blir grundig kondisjonert før gjenbruk for å hindre krysskontaminering til ny prøve. Resultatet fra de metylerte vaskefraksjonene viste at disse var 100% rene. Dermed ser det ut som om krysskontaminering har blitt unngått.

Tabell 4.1: Prosentvis fordeling av acylglyserolene innad i en fraksjon, ved gjenbruk av SPE-kolonne. Kolonnene ble gjenbrukt fire ganger (kalt runde 1, 2, 3 og 4). Prøven analysert besto av 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	Runde 1			Runde 2			Runde 3			Runde 4		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C8:0	56,3	-	-	54,5	-	-	55,1	-	-	58,1	-	-
M C14:0	43,5	-	-	45,3	-	-	44,7	-	-	41,7	-	-
D C10:0	-	14,5	-	0,2	14,4	-	-	13,4	-	-	15,3	-
D C18:1	0,2	85,5	11,4	-	85,6	7,9	0,2	86,6	7,0	0,2	84,7	6,5
T C12:0	-	-	57,7	-	-	56,3	-	-	55,4	-	-	58,7
T C18:0	-	-	29,1	-	-	35,8	-	-	37,6	-	-	34,8

5. Konklusjon

Optimaliseringen av pipetteringsvolumet for SPE-roboten viste at problemet skyldes dannelse av undertrykk i prøvebeholderen. Ved å fjerne eller lage et stort, varig hull i septumet ble undertrykkproblematikken eliminert. Fjerning av septumet ga mest optimale forhold, med $101 \pm 1,52\%$ pipettert volum, da kontaminering av prøven fra septum ble unngått.

En metode med elueringsmiddelet heptan:dietyler (93:7) for TAG og DAG og kloroform:metanol (2:1) for MAG, elueringsvolumene 800, 3200 og 3000 μL (TAG, DAG og MAG) og elueringshastighet på 1,5 mL/min ga best resultat for tre av fire prøver med ulikt blandingsforhold av MAG, DAG og TAG. Total lipidmasse applisert på SPE-kolonnene var 0,5 mg. Her ble blandingen med mye MAG grunnlinjeseperert, lik ga >99% renhet for alle fraksjonene og mye DAG hadde kun gjennomblødning til MAG-fraksjonen (4,5%). Dette var også metoden som var best, gitt analyse av ulike blandingsforhold av acylglyseroler og fokus på ren MAG- og DAG-fraksjonene.

Analyse av samme metode på nytt kolonneparti viste derimot ikke konsistente resultater, som tyder på mangel på reproduserbarhet. Før det kan konkluderes om separasjonsmetoden kan benyttes, bør metoden testes på flere kolonnepartier. Dette for å se om reproduserbarheten mellom partier er et problem, eller om det ble benyttet et «dårlig» parti.

6. Videre arbeid

Nålene benyttet på SPE-roboten var ikke designet for septumgjennomtrenging, som var grunnen til dannelse av vakuum i prøvebeholderen. Det finnes derimot nåler designet for dette, og det hadde vært interessant å teste pipetteringsvolumet med septum ved bruk av disse.

Selv om det ser ut til at metoden ikke var reproducerbar på ulike kolonnepartier må dette verifiseres ved at metoden testes på flere partier. Det kunne også vært interessant å teste metoden på aminopropylkolonner fra andre produsenter. Siden det ble oppnådd ujevne resultater ved 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse påsatt SPE-kolonnen bør metoden testes med økt adsorbentmasse, eventuelt lengre kolonner med samme masse.

På grunn av tidsrammen for masteroppgaven ble det ikke fokusert på gjenbruk av kolonner. Det hadde vært spennende å forske mer på gjenbruk for å se om gjenbruk kan fjerne usikkerheten rundt nye partier og/eller om det kan bidra til å senke gjennomblødningen. Dette inkluderer blant annet å finne ut hvor mange separasjoner kolonnen kan utsettes for, samt i hvilket område separasjonen er stabil.

7. Litteraturliste

- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Canellieri, V. & Cerdá, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends in Analytical Chemistry*, 80(2016), 641-654.
- Bartle, K.D. & Myers, P. (2002). History of Gas Chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(9-10), 547-557.
- Carvalho, A.P. & Malcata, F.X. (2005) Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5049-5059.
- Center for Drug Evaluation and Research (1994). *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. <https://www.fda.gov/media/75643/download> Lest. 30.04.19
- Chen, X.-H., Franke, J.-P., Wijsbeek, J. & de Zeeuw, R.A. (1993). Reusability of Bond Elut Certify columns for the extraction of drugs from plasma. *Journal of Chromatography*, 619(1993), 137-142.
- Christie, W.W. (1993). *Advances in Lipid Methodology*. Dundee: The Oily Press.
(<http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40374>)
- Christie, W.W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of lipids*. (3.utg.). Bridgwater: The Oily Press
- Christie, W.W. (2018). *Monoacylglycerols*. <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/mg/index.htm> Lest 18.01.19 kl.11.13.
- Dewick, P.M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3.utg.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Dolan, J.W. (2001). Autosamplers, Part II —Problems and Solutions. *LCGC North America* 19(5), 478- 482.
- Ebeler, S.E. & Ebeler, J.D. (1996). SPE methodologies for the separation of lipids. *Inform*, 7(10), 1094-1103.
- Ebeler, S.E. & Shibamoto, T. (1994). Overview and Recent Developments in Solid-Phase Extraction for Separation of Lipid Classes. I Shibamoto, T. (red.), *Lipid Chromatographic Analysis* (1-49). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.

- Eichmann, T.O. & Lass, A. (2015). DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol—stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(20), 3931–3952.
- Egberts, J. & Buiskool, R. (1988). Isolation of the Acidic Phospholipid Phosphatidylglycerol from Pulmonary Surfactant by Sorbent Extraction Chromatography. *Clinical Chemistry*, 34(1), 163-164.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M. & Subramaniam, S. (2011). Lipid Classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637-647.
- Fagan, P., Wijesundera, C. & Watkins, P. (2004). Determination of mono- and diacylglycerols in milk lipids. *Journal of Chromatography*, 1054, 251-259.
- Flurkey, W.H. (2005). Use of Solid Phase Extraction in the Biochemistry Laboratory to Separate Different Lipids. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(5), 357-360.
- Fritz, J.S., Dumont, P.J. & Schmidt, L.W. (1995). Methods and materials for solid-phase extraction. *Journal of chromatography A*, 691(1995), 133-140.
- Giacometti, J., Milošević, A. & Milin, C. (2002). Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 976(1–2), 47-54.
- Gilson. (2015). *Gilson Guide to SPE Automation*. Middleton, WI: Gilson
- Glish, G.L. & Vachet, R.W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 140-150.
- Gordon, M.H. (1990) Principles of gas chromatography. I Gordon, M.H. (red.), *Principles and applications of Gas Chromatography in Food Analysis* (11-58). Chichester: Ellis Horwood.
- Gunstone, F.D. (1996). *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Gunstone, F.D. & Norris, F.A. (1983). *Lipids in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology*. Oxford: Pergamon press.
- Gurr, M.I. & James, A.T. (1971). *Lipid Biochemistry and Introduction*. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Hart, D.J., Hadad, C.M., Craine, L.E. & Hart, H. (2012). *Organic Chemistry: A Brief Course, international edition* (13.utg.) s.l: Cengage Learning, Inc.

- Henry, M. (2000). SPE technology – principles and practical consequences. I Simpson, N.J.K. (red), *Solid-Phase Extraction: Principlec, Techniques and Applications* (125-179). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- de Hoffmann, E. & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (3.utg.). Chichester: John Willey & Sons Ltd.
- Jacobsen, A.L. (2014). *Analyse av TAG, DAG, og MAG i fordøyd kumelk ved off-line SPE-SPE og GC-MS.* (masteravhandling). Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Ås
- James, A.T. & Martin, A.J.P. (1952). Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*, 50(5), 679–690.
- Jordan, L. (2000). Automation of solid-phase extraction. I Simpson, N. J. K. (red.), *Solid-Phase Extraction: Principlec, Techniques and Applications* (381-410). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Kaluzny, M.A., Duncan, L.A., Merritt, M.V. & Eppse, D.E. (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid*, 26(1), 135-140.
- Kim, H.-Y. & Salem, N. (1990). Seperation of lipid classes by solid phase extraction. *Journal of Lipid Research*, 31(1990), 2285-2289.
- KoohiKamali, S., Tan, C.P., & Ling, T.C. (2012). Optimization of sunflower oil transesterification process using sodium methoxide. *The Scientific World Journal*, 2012, 475027.
- Lippa, K.A. & Sander, L.C. (2006). Identifaction of isolated cavity features within molecular dynamics simulated chromatographic surfaces. *Journal of Chromatography A*, 1128(2006), 79-19.
- Liu, K.S. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of American Oil Chemist's society*, 71(11), 1179–1187.
- Majors, R.E. (2002). Trends in Sample Preperation. *LCGC North America*, 20(12), 1098-1113.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Appling, D.R. & Anthony-Cahill S.J. (2013). *Biochemistry* (4.utg.) Toronto: Pearson.
- McKee, T. & McKee, J.R. (2017). *Biochemistry: the molecular basis of life*. New York, N.Y: Oxford University Press.

- McNair, H.M. & Miller, J.M. (2009). *Basic Gas Chromatography* (2.utg.). Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, Inc.
- Michalski, M.C., Genot, C., Gayet, C., Lopez, C., Fine, F., Joffre, F., ... Raynal-Ljutovac, K. (2013). Multiscale structures of lipids in food as paramters affecting fatty acid bioavilability and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 354-373.
- Miller, J.M. (2005). *Chromatography: Concepts & Contrasts* (2.utg.). Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, Inc.
- Mitra, S. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, N.J: Wiley & Sons, Inc.
- Myher, J.J. & Kuksis, A. (1995). General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 3-33.
- Nurmela, K.V.V. & Satama, L.T. (1988). Quantitative analysis of triglycerides by high-performance liquid chromatography using non-linear gradient elution and flame ionization detection. *Journal of Chromatography*, 435(1), 139-148.
- O'Keefe S.F. (2002). Nomenclature and Classification of Lipids. I Akoh, C.C. & Min, D.B. (red.), *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology* (2.utg.). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Patel, R.M., Jagodzinski, J.J., Benson, J.R. & Hometchko, D. (1990). Mixed-Mode Sorbent for Sample Preparation. *LC-GC*, 8(11), 874-878.
- Pérez-Pazos, J.-V. & Fernández-Izquierdo, P. (2011). Synthesis of neutral lipids in Chlorella Sp. Under different light and carbonate conditions. *CT&F – Ciencia, Tecnología y Futuro*, 4(4), 47-57.
- Pesek, J.J. & Matyska, M.T. (2000). SPE sorbents and formats. I Simpson, N. J. K. (red.), *Solid-Phase Extraction: Principlec, Techniques and Applications* (19-38). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Pinkart, H.C., Devereux, R. & Chapman, P.J. (1998). Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *Journal of microbiological methods*, 34(1), 9-15.
- Powell, W.S (1980). Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. *Prostaglandins*, 20(5), 947-957.
- Ramírez, M., Amate, L. & Gil, A. (2001). Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development*, 65(2), 95-101.

- Rarokar, R.N., Menghani S., Kerzare D. & Khedekar P.B. (2017). Progress in Synthesis of Monoglycerides for Use in Food and Pharmaceuticals. *Journal of Experimental food chemistry*, 3(3), 128.
- Rasmussen, K.E. (1994). Gasskromatografi. I Greibrokk, T., Lundanes, E. & Rasmussen, K.E. (red.), *Kromatografi* (3.utg., 109-153). Oslo: Universitetsforlaget AS.
- Ruiz-Gutiérrez, V. & Pérez-Camino, M.C. (2000). Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 855(1-2), 321-341.
- Sadava, D, Hillis, D.M, Heller, H.C. & Berenbaum, M.R. (2014). *Life: The Science of Biology* (10.utg.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Scrimgeour, C.M. & Harwood, J.L (2007). Fatty Acid and Lipid Structure. I Gunstone, F.D., Harwood, J.L. & Dijkstra, A.J. (red.), *The lipid handbook* (3.utg., 1-36). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Schuchardt, U., Sercheli, R. & Vargas R.M. (1998). Transesterification of Vegetable Oils: A Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(3), 199-210.
- Shahidi, F. & Wanasundara, P.K.J.P.D. (2000). Extraction and Analysis of Lipids. I Akoh, C.C. & Min, D.B. (red.), *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology* (2.utg.). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Shepherd, M.J. (1996). Automated clean-up techniques for trace component analysis in complex biological matrices including food. I Gilbert, J. (red.), *Progress in Food Contaminant Analysis* (32-65). London; Blackie Academic & Professional.
- Simpson, N. & Van Horne, K.C. (Red.). (1993). *Handbook of Sorbent Extraction Technology* (2.utg.). Harbor City, CA: Varian Associates, Inc.
- Simpson, N.J.K. & Wells, M.J.M. (2000). Introduction to Solid-Phase Extraction. I Simpson, N. J. K. (red.), *Solid-Phase Extraction: Principlec, Techniques and Applications* (1-16). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Somogyi, A. (2008). Mass spectrometry instrumentation and techniques. I Vékey, K., Telekes, A. & Vertes, A. (red.), *Medical applications of mass spectrometry* (93-140). Amsterdam: Elsevier B.V.
- Stock, R. & Rice, C.B.F. (1963). *Chromatographic methods*. London: Chapman and Hall.

- Szeląg, H. & Zwierzykowski, W. (1999). The behaviour of modified monoacylglycerol emulsifiers in emulsion systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 155(2-3), 349-357.
- Thurman, E.M. & Mills, M.S. (1998). *Solid-Phase Extraxtion: Principles and Practice*. Hoboken, N.J: John Willey & Sons, Inc.
- Urban, P.L. (2016). Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transaction A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079), 1-5.
- Vicente, G., Martinez, M., Aracil, J. & Esteban, A. (2005). Kinetics of Sunflower Oil Methanolysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(15), 5447–5454.
- VWR International (2012a). *Kloroform CAS-nr 67-66-3*. Oslo, Norge. Lest 18.03.19
https://app.ecoonline.com/documents/msds/1013766/285_8407173.pdf
- VWR International (2012b). *n-Heksan CAS-nr 110-54-3*. Oslo, Norge. Lest 18.03.19
https://app.ecoonline.com/documents/msds/1013766/285_8422487.pdf
- VWR International (2012c). *Metanol CAS-nr 67-56-1*. Oslo, Norge. Lest 18.03.19
https://app.ecoonline.com/documents/msds/1000472/285_8454830.pdf
- VWR International (2012d). *n-Heptan CAS-nr 142-82-5*. Oslo, Norge. Lest 18.03.19
https://app.ecoonline.com/documents/msds/1013766/285_8411920.pdf
- Williams, M.A. & McCluer, R.H. (1980). The Use of Sep-Pek™ C₁₈ Cartridges During the Isolation of Gangliosides. *Journal of Neurochemistry*, 35(1), 266-269.
- de Zeeuw, R.R. & Franke, J.P. (2000). Solid-phase extraction for broad-spectrum drug screening in toxicological analysis. I Simpson, N. J. K. (red.), *Solid-Phase Extraction: Principlec, Techniques and Applications* (243-272). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Zhong, N., Cheong, L. & Xu, X. (2014). Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(2), 97-107.

Vedlegg 1 – Optimalisering av pipetteringsvolumet til SPE-roboten

Validering og optimalisering av SPE-robotens pipetteringsvolum ved bruk av metanol. Tettheten til metanol benyttet for utregning er $0,7918 \text{ g/cm}^3$ ved $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabell V.1: Gjennomsnittlig prosent og relativt standardavvik for 0,2, 0,5 og 1,0 mL pipettert metanol. n=9

	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
Total	$83,1 \pm 17,12$	$84,7 \pm 19,95$	$68,5 \pm 35,18$
Nål 1	$85,3 \pm 22,72$	$79,4 \pm 29,60$	$63,7 \pm 39,79$
Nål 2	$78,5 \pm 11,42$	$80,7 \pm 18,83$	$72,4 \pm 34,33$
Nål 3	$78,8 \pm 16,19$	$86,0 \pm 14,16$	$72,2 \pm 33,16$
Nål 4	$89,9 \pm 14,32$	$92,8 \pm 14,98$	$65,9 \pm 38,53$

Tabell V.2: Gjennomsnittlig prosent og relativt standardavvik for oppsugingshastighetene 0,1, 0,5 og 1,0 mL/min for pipettert metanol. n=9 for 1,0 mL/min og n=2 for 0,5 mL/min og n=3 for 0,1 mL/min.

	1,0 mL/min	0,5 mL/min	0,1 mL/min
Total	$82,8 \pm 20,40$	$85,1 \pm 11,77$	$78,3 \pm 21,35$
Nål 1	$84,0 \pm 19,52$	$86,2 \pm 16,45$	$73,9 \pm 21,99$
Nål 2	$88,6 \pm 14,23$	$81,0 \pm 11,43$	$75,0 \pm 34,22$
Nål 3	$87,2 \pm 21,36$	$86,0 \pm 16,57$	$85,3 \pm 18,86$
Nål 4	$79,1 \pm 25,76$	$89,2 \pm 13,37$	$86,3 \pm 14,69$

Tabell V.3: Gjennomsnittlig prosent og relativt standardavvik for endret septum (hel, uten, lite og stort hull) for pipettert metanol. n=9 for helt septum og n=3 for uten septum og n=3 for lite og stort hull i septum.

	Helt septum	Uten septum	Lite hull i septum	Stort hull i septum
Total	85,1 ± 20,40	101,7 ± 1,52	76,2 ± 24,14	100,0 ± 1,24
Nål 1	86,2 ± 19,52	100,5 ± 1,60	74,8 ± 40,05	100,1 ± 2,13
Nål 2	81,0 ± 14,23	101,5 ± 1,25	70,5 ± 30,88	100,6 ± 0,62
Nål 3	86,0 ± 21,36	102,4 ± 2,21	78,0 ± 1,58	99,1 ± 0,27
Nål 4	89,2 ± 25,76	102,3 ± 1,61	90,7 ± 13,24	100,2 ± 1,30

Tabell V.4: Oversikt over ANOVA-tabell for volum pipettert ved oppsugingshastighet på 1,0, 0,5 og 0,1 mL/min. Data= oppsugingshastighet, tilsvarer prosent pipettert for hver enkelt prøve.

lm(formula = Pipettert ~ Oppsugingshastighet, data = Oppsugingshastighet)

Respons: Pipettert

	Sum Sq	Df	F verdi	Pr(>F)
Oppsugingshastighet	0.00501	2	0.3847	0.6825
Residual	0.34514	53		

Tabell V.5: Oversikt over ANOVA-tabell for volum pipettert for hver nål ved oppsugingshastighet på 1,0, 0,5 og 0,1 mL/min. Data= oppsugingshastighet, tilsvarer prosent pipettert for hver enkelt prøve.

lm(formula = Pipettert ~ Oppsugingshastighet, data = Oppsugingshastighet)

Respons: Pipettert

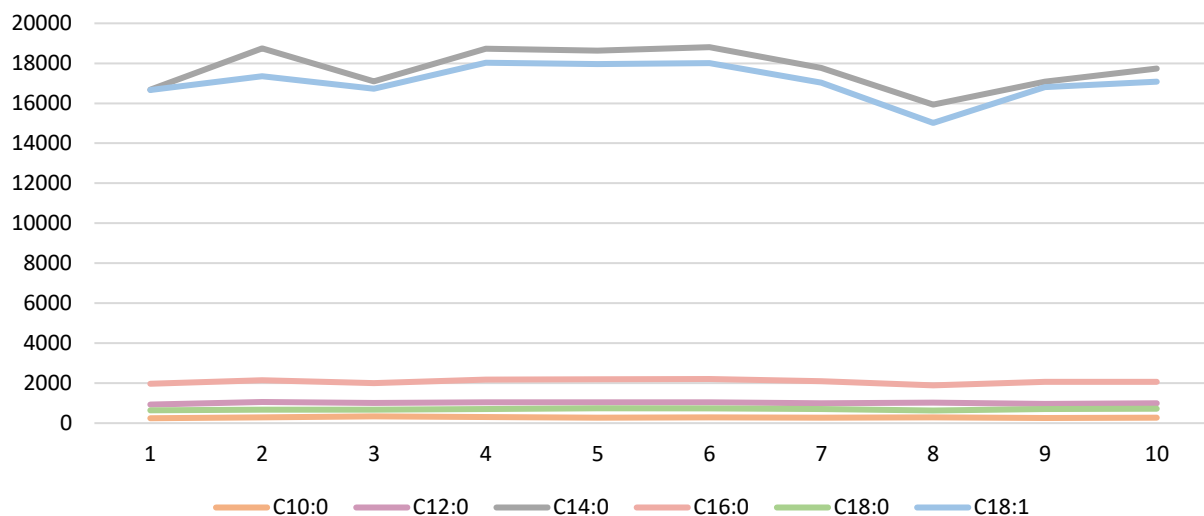
	Sum Sq	Df	F verdi	Pr(>F)
Oppsugingshastighet	0.03077	3	1.6699	0.1848
Residual	0.31938	52		

Vedlegg 2 – Test av robustheten til GC-MS

For å teste robustheten til GC-MS ble det analysert to ulike prøver ti ganger hver. Tabell V.6, og V.8, med tilhørende illustrasjon i figur V.1 og V.2, viser oversikt over arealet til hver analyse. Tabell V.7 og V.9 viser prosentvis fordeling av acylglyserolene for hver analyse.

Tabell V.6: Oversikt over areal, gjennomsnitt, standardavvik (SD) og relativt standardavvik (RSD) for metylert fettsyreprøve #1 analysert på GC-MS. Analysert ti ganger. n=1

Prøve	Fettsyre					
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1
1	245	930	16676	1967	640	16665
2	288	1058	18741	2141	674	17361
3	339	1002	17095	2000	668	16729
4	301	1047	18727	2173	708	18029
5	280	1034	18635	2195	743	17960
6	296	1038	18807	2207	741	18009
7	271	998	17771	2102	709	17029
8	284	1022	15934	1890	632	15018
9	252	966	17083	2059	701	16805
10	268	996	17732	2073	714	17087
Gjennomsnitt	281	1008	17694	2078	692	17047
SD	26,74	39,31	1008,53	104,33	38,45	896,99
RSD	9,51 %	3,90 %	5,70 %	5,02 %	5,56 %	5,26 %



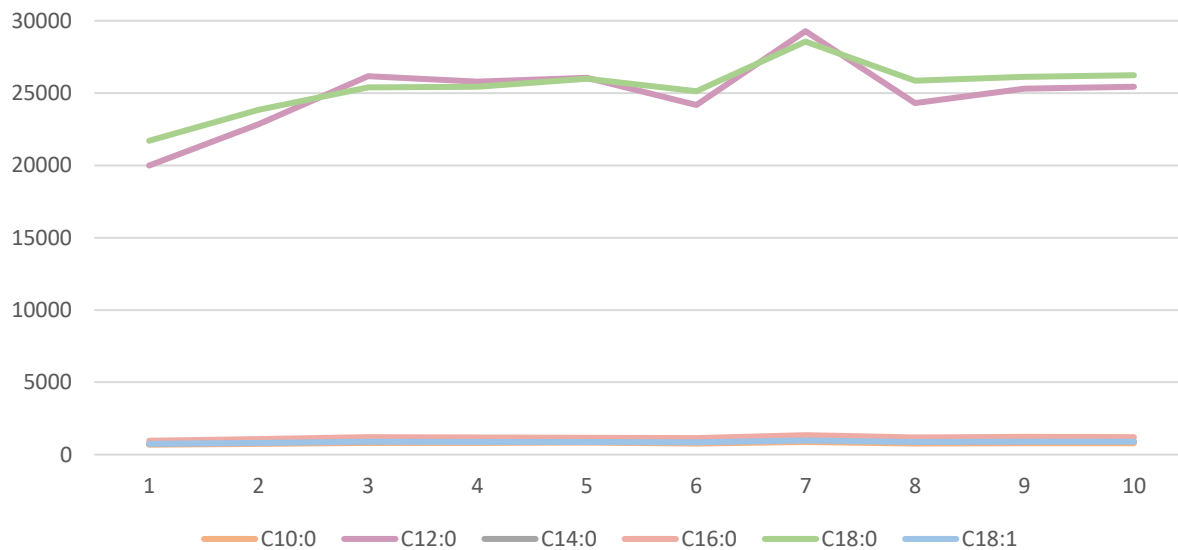
Figur V.1: Opprinnelig figur av figur 4.4. Illustrasjon over arealet til de ulike fettsyrene i metylert fettsyreprøve #1. Analysert ti ganger. n=1

Tabell V.7: Oversikt over prosentvis andel av acylglyserol i fraksjonen, samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) for metylert fettsyreprøve #1 analysert på GC-MS. Analysert ti ganger.n=1

Prøve	Fettsyre					
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1
1	0,7	2,5	44,9	5,3	1,7	44,9
2	0,7	2,6	46,5	5,3	1,7	43,1
3	0,9	2,6	45,2	5,3	1,8	44,2
4	0,7	2,6	45,7	5,3	1,7	44,0
5	0,7	2,5	45,6	5,4	1,8	44,0
6	0,7	2,5	45,8	5,4	1,8	43,8
7	0,7	2,6	45,7	5,4	1,8	43,8
8	0,8	2,9	45,8	5,4	1,8	43,2
9	0,7	2,6	45,1	5,4	1,9	44,4
10	0,7	2,6	45,6	5,3	1,8	44,0
Gjennomsnitt	0,7	2,6	45,6	5,4	1,8	43,9
SD	0,07	0,13	0,45	0,06	0,06	0,52

Tabell V.8: Oversikt over areal, gjennomsnitt, standardavvik (SD) og relativt standardavvik (RSD) for metylert fettsyreprøve #2 analysert på GC-MS. Analysert ti ganger. n=1

Prøve	Fettsyre					
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1
1	682	19987	741	956	21700	743
2	733	22840	824	1071	23842	806
3	798	26162	919	1198	25389	890
4	799	25784	913	1179	25444	872
5	827	26056	915	1167	26000	870
6	759	24172	881	1130	25121	851
7	873	29281	1021	1342	28559	978
8	766	24306	899	1184	25862	874
9	786	25298	920	1220	26127	888
10	789	25438	909	1209	26236	891
Gjennomsnitt	780	24823	891	1162	25371	864
SD	51,74	2417,64	72,23	100,93	1762,88	60,83
RSD	6,64 %	9,74 %	8,10 %	8,69 %	6,95 %	7,04 %



Figur V.2: Opprinnelig figur av figur 4.5. Illustrasjon over arealet til de ulike fettsyrene i metylert fettsyreprøve #2. Analysert ti ganger. n=1

Tabell V.9: Oversikt over prosentvis andel av acylglyserol i fraksjonen, samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) for metylert fettsyreprøve #2 analysert på GC-MS. Analysert ti ganger. n=1

Prøve	Fettsyre					
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1
1	1,5	44,6	1,7	2,1	48,4	1,7
2	1,5	45,6	1,6	2,1	47,6	1,6
3	1,4	47,3	1,7	2,2	45,9	1,6
4	1,5	46,9	1,7	2,1	46,3	1,6
5	1,5	46,7	1,6	2,1	46,6	1,6
6	1,4	45,7	1,7	2,1	47,5	1,6
7	1,4	47,2	1,6	2,2	46,0	1,6
8	1,4	45,1	1,7	2,2	48,0	1,6
9	1,4	45,8	1,7	2,2	47,3	1,6
10	1,4	45,9	1,6	2,2	47,3	1,6
Gjennomsnitt	1,4	46,1	1,7	2,2	47,1	1,6
SD	0,03	0,90	0,01	0,03	0,86	0,03

Vedlegg 3 – Reprodusering av separasjonsmetode for MAG, DAG og TAG

Det ble forsøkt å reprodusere en tidligere metode for separasjon av MAG, DAG og TAG. Tabell V.10 og V.12 viser gjennomsnittlig prosentvis acylglyserol med standardavvik i de ulike fraksjonene. Tabell V.11 og V.13 prosentvis fordeling av acylglyserol mellom fraksjonene. I acylglyserolkolonnen indikerer M monoacylglyserol, D diacylglyserol og T triacylglyserol. Tallene markert i rødt er under LOQ.

Tabell V.10: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling, samt standardavvik, av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=3.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	48,8 ± 0,13	-	-	48,7 ± 0,73	-	-	49,1 ± 0,92	-	-
M C18:1	50,4 ± 0,15	-	-	50,7 ± 0,79	-	-	50,4 ± 0,93	-	-
D C10:0	0,3 ± 0,06	55,3 ± 1,20	0,8 ± 0,17	0,2 ± 0,14	57,1 ± 0,83	1,2 ± 0,03	0,2 ± 0,15	57,4 ± 0,19	1,3 ± 0,06
D C16:0	0,5 ± 0,01	43,9 ± 1,27	10,0 ± 0,56	0,4 ± 0,05	42,6 ± 0,55	12,1 ± 0,32	0,4 ± 0,05	41,4 ± 0,57	12,7 ± 0,56
T C12:0	-	0,2 ± 0,16	43,8 ± 0,33	-	-	44,0 ± 0,50	-	0,2 ± 0,27	44,3 ± 0,99
T C18:0	-	0,6 ± 0,08	45,3 ± 0,41	-	0,3 ± 0,28	42,6 ± 0,64	-	1,0 ± 0,28	41,7 ± 0,49

Tabell V.11: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserolene, samt standardavvik, mellom de tre fraksjonene som utgjør en prøve. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=3.

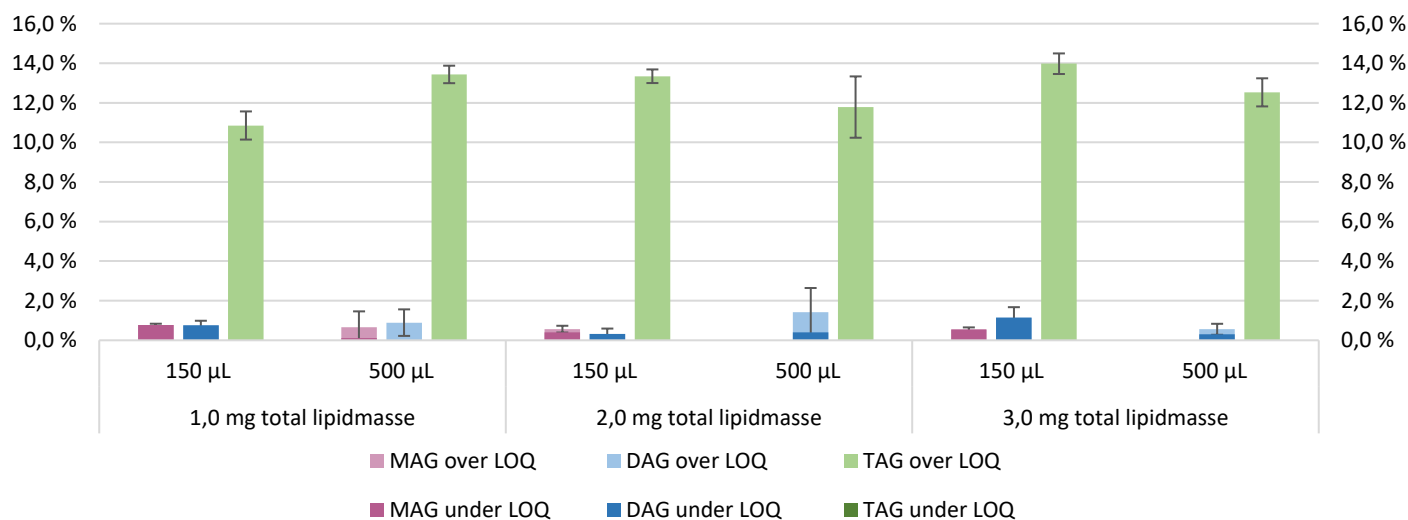
Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	100 ± 0,00	-	-	100 ± 0,00	-	-	100 ± 0,00	-	-
M C18:1	100 ± 0,00	-	-	100 ± 0,00	-	-	100 ± 0,00	-	-
D C10:0	0,5 ± 0,08	97,6 ± 0,37	2,0 ± 0,37	0,3 ± 0,27	96,7 ± 0,36	3,0 ± 0,20	0,3 ± 0,28	96,8 ± 0,56	2,9 ± 0,40
D C16:0	0,8 ± 0,02	75,2 ± 1,92	24,0 ± 1,90	0,7 ± 0,15	70,3 ± 1,66	29,0 ± 1,81	0,7 ± 0,05	70,4 ± 0,78	28,9 ± 0,81
T C12:0	-	0,3 ± 0,26	99,7 ± 0,26	-	-	100 ± 0,00	-	0,3 ± 0,48	99,7 ± 0,48
T C18:0	-	0,9 ± 0,10	99,1 ± 0,10	-	0,5 ± 0,45	99,5 ± 0,45	-	1,8 ± 0,63	98,2 ± 0,63

Tabell V.12 Gjennomsnittlig prosentvis fordeling, samt standardavvik, av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 500 µL prøvevolum påsatt SPE roboten. n=3.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	52,2 ± 0,07	0,1 ± 0,19	-	52,9 ± 1,15	0,2 ± 0,32	-	53,6 ± 1,54	-	-
M C18:1	47,1 ± 0,74	0,5 ± 0,47	-	47,1 ± 1,15	0,8 ± 0,88	-	46,4 ± 1,54	0,3 ± 0,30	-
D C10:0	-	57,7 ± 0,32	1,8 ± 0,14	-	55,5 ± 1,40	1,5 ± 0,35	-	57,1 ± 1,00	1,4 ± 0,28
D C16:0	0,5 ± 0,61	41,4 ± 0,67	11,6 ± 0,39	-	43,1 ± 0,67	10,3 ± 1,20	-	42,0 ± 0,86	11,1 ± 0,43
T C12:0	-	-	48,1 ± 1,30	-	-	48,9 ± 0,97	-	-	50,5 ± 1,91
T C18:0	0,1 ± 0,20	0,3 ± 0,25	38,5 ± 1,12	-	0,5 ± 0,04	39,3 ± 2,06	-	0,6 ± 0,07	37,0 ± 2,62

Tabell V.13: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserolene, samt standardavvik, mellom de tre fraksjonene som utgjør en prøve. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 500 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=3.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	99,8 ± 0,41	0,2 ± 0,41	-	99,6 ± 0,62	0,4 ± 0,62	-	100 ± 0,00	-	-
M C18:1	98,8 ± 1,12	1,2 ± 1,12	-	98,3 ± 1,95	1,7 ± 1,95	-	99,2 ± 0,68	0,8 ± 0,68	-
D C10:0	-	96,1 ± 0,18	3,9 ± 0,18	-	96,8 ± 0,75	3,2 ± 0,75	-	97,0 ± 0,69	3,0 ± 0,69
D C16:0	0,9 ± 1,05	73,1 ± 0,08	26,0 ± 0,98	-	77,0 ± 1,72	23,0 ± 1,72	-	75,8 ± 0,79	24,2 ± 0,79
T C12:0	-	-	100 ± 0,00	-	-	100 ± 0,00	-	-	100 ± 0,00
T C18:0	0,2 ± 0,39	0,6 ± 0,50	99,2 ± 0,80	-	0,9 ± 0,15	99,1 ± 0,15	-	1,2 ± 0,14	98,8 ± 0,14



Figur V.3 Opprinnelig figur av figur 4.6: Prosent gjennoblødning, samt standardavvik, i MAG, DAG og TAG for 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse applisert SPE-kolonnen ved prøvevolum på 150 og 500 µL ved Jacobsen (2014) sin metode. n=3

Vedlegg 4 – Videreutvikling av metode

Separasjonsmetoden for MAG, DAG og TAG ble videreutviklet. Parametere som ble testet var forholdet mellom heptan og dietyler i elueringsmiddelet for TAG (tabell V.14-V.26), endret fraksjoneringsmønster (tabell V.17-V.22), endret elueringsvolum for TAG og DAG (tabell V.23-V.27), mindre lipidmasse og endret sammensetning av MAG, DAG og TAG (tabell V.28-V.31, samt figur V.4) og endret elueringshastighet (tabell V.32-V.39). I acylglyserolkolonnen indikerer M monoacylglyserol, D diacylglyserol og T triacylglyserol. Tallene markert i rødt er under LOQ.

Endring av forholdet mellom heptan og dietyler i elueringsmiddelet for TAG

Elueringsmiddelet for TAG ble endret fra 93:7 til 95:5, 94:6 og 92:8 (v/v, %). Basert på de kromatografiske arealene ble prosent gjennomblødning beregnet for de ulike fraksjonene. Det ble påsatt 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum.

Tabell V.14: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsmiddelet for TAG var heptan:dietyler, 95:5. n=1.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	45,9	-	-	42,4	-	-	46,6	0,3	0,8
M C18:1	52,6	-	-	53,3	-	-	52,4	4,7	9,9
D C10:0	-	48,6	0,4	-	50,2	0,4	0,3	42,1	-
D C16:0	1,0	49,3	7,7	3,0	47,0	9,1	0,6	50,6	5,8
T C12:0	-	0,9	47,6	-	1,4	49,6	-	0,8	45,4
T C18:0	0,5	1,2	44,3	0,8	1,4	40,9	-	1,4	38,1

Tabell V.15: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsmiddelet for TAG var heptan:dietyleter, 94:6. n=1.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	48,1	-	-	46,9	-	-	46,9	-	-
M C18:1	50,3	-	-	52,2	-	-	52,4	-	-
D C10:0	0,5	47,6	0,2	0,4	43,4	-	0,3	43,6	-
D C16:0	0,7	52,0	4,1	0,5	55,4	0,4	0,4	51,7	0,7
T C12:0	-	-	52,8	-	1,2	55,3	-	-	56,9
T C18:0	0,4	0,5	42,9	-	-	44,3	-	4,7	42,4

Tabell V.16: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsmiddelet for TAG var heptan:dietyleter, 92:8. n=1.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	46,1	-	-	47,1	-	-	46,7	-	-
M C18:1	53,1	-	-	52,5	-	-	52,9	-	-
D C10:0	0,3	49,1	0,3	-	51,1	0,5	-	45,1	0,6
D C16:0	0,5	50,4	5,8	0,4	48,5	7,6	0,4	43,2	10,4
T C12:0	-	-	50,5	-	-	50,0	-	-	54,0
T C18:0	-	0,5	43,5	-	0,4	41,9	-	11,7	35,0

Endret fraksjoneringsmønster for TAG og DAG

Fraksjoneringsmønster for TAG og DAG ble endret fra to til tre fraksjoner. Basert på de kromatografiske arealene ble den prosentvise fordelingen av acylglyserolene i en fraksjon beregnet. Tabell V.17-V.20 er med luftgjennomstrømning, mens tabell V.21 og V.22 er uten.

Tabell V.17: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon, for fraksjoneringsmønsteret 600, 600, 2800 og 3000 μL . Luftgjennomstrømningen i fraksjonene var henholdsvis 1500, 1000, 1000 og 1000 μL . Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 μL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	1,0 mg				2,0 mg				3,0 mg			
	600 μL	600 μL	2800 μL	3000 μL	600 μL	600 μL	2800 μL	3000 μL	600 μL	600 μL	2800 μL	3000 μL
M C8:0	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
M C14:1	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
D C10:0	-	53,9	46,1	-	-	56,3	43,7	-	-	61,4	37,9	0,7
D C18:1	-	91,2	8,8	-	-	92,9	7,1	-	-	94,2	5,8	-
T C12:0	98,3	1,7	-	-	98,2	1,8	-	-	98,5	1,5	-	-
T C18:0	95,6	2,8	1,6	-	93,3	4,0	2,0	0,6	75,2	14,1	10,1	0,5

Tabell V.18: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon, for fraksjoneringsmønsteret 650, 400, 2950 og 3000 µL. Luftgjennomstrømningen i fraksjonene var henholdsvis 1500, 1000, 1000 og 1000 µL. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	1,0 mg				2,0 mg				3,0 mg			
	650 µL	400 µL	2950 µL	3000 µL	650 µL	400 µL	2950 µL	3000 µL	650 µL	400 µL	2950 µL	3000 µL
M C8:0	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
M C14:1	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
D C10:0	-	27,9	72,1	-	-	21,6	78,4	-	-	31,1	68,9	-
D C18:1	2,0	76,8	21,2	-	2,4	71,9	25,7	-	3,2	76,0	20,8	-
T C12:0	97,9	2,1	-	-	98,0	2,0	-	-	98,5	1,5	-	-
T C18:0	95,7	3,0	1,3	-	85,5	11,3	3,3	-	63,3	18,0	18,0	0,7

Tabell V.19: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon, for fraksjoneringsmønsteret 750, 250, 3000 og 3000 µL. Luftgjennomstrømningen i fraksjonene var henholdsvis 1500, 1000, 1000 og 1000 µL. Prøvene er analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	1,0 mg				2,0 mg				3,0 mg			
	750 µL	250 µL	3000 µL	3000 µL	750 µL	250 µL	3000 µL	3000 µL	750 µL	250 µL	3000 µL	3000 µL
M C8:0	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
M C14:1	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
D C10:0	-	15,1	84,9	-	0,8	1,3	98,0	-	-	16,1	83,9	-
D C18:1	4,7	63,1	32,1	-	9,5	55,8	34,7	-	7,5	57,8	34,8	-
T C12:0	100	-	-	-	98,7	0,7	0,6	-	99,5	0,5	-	-
T C18:0	96,6	1,7	1,2	0,5	95,6	2,1	2,2	-	90,4	6,1	3,5	-

Tabell V.20: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon, for fraksjoneringsmønsteret 700, 200, 3100 og 3000 μL . Luftgjennomstrømningen i fraksjonene var henholdsvis 1500, 1000, 1000 og 1000 μL . Prøvene er analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 μL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	1,0 mg				2,0 mg				3,0 mg			
	700 μL	200 μL	3100 μL	3000 μL	700 μL	200 μL	3100 μL	3000 μL	700 μL	200 μL	3100 μL	3000 μL
M C8:0	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
M C14:1	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
D C10:0	-	7,6	92,4	-	-	3,4	96,6	-	-	7,1	92,9	-
D C18:1	4,5	40,5	55,0	-	1,6	31,8	66,7	-	5,5	40,5	54,0	-
T C12:0	97,8	1,2	1,1	-	98,5	0,8	0,7	-	98,3	0,9	0,8	-
T C18:0	96,3	1,8	1,9	-	95,0	3,1	1,8	-	92,6	2,8	4,6	-

Tabell V.21: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon, for fraksjoneringsmønsteret 900, 100, 3000 og 3000 μL . Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 μL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Det ble ikke brukt luftgjennomstrømning mellom fraksjonene. n=1.

Acylg.	1,0 mg				2,0 mg				3,0 mg			
	900 μL	100 μL	3000 μL	3000 μL	900 μL	100 μL	3000 μL	3000 μL	900 μL	100 μL	3000 μL	3000 μL
M C8:0	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
M C14:1	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
D C10:0	-	-	99,3	0,7	-	-	99,1	0,9	-	-	99,2	0,8
D C18:1	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-
T C12:0	89,3	8,5	2,2	-	87,8	9,3	2,9	-	90,3	7,4	2,3	-
T C18:0	92,7	5,1	2,2	-	90,3	6,3	3,3	-	57,4	7,2	35,4	-

Tabell V.22: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon, for fraksjoneringsmønsteret 1000, 100, 2900 og 3000 μL . Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 μL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Det ble ikke brukt luftgjennomstrømning mellom fraksjonene. n=1.

Acylg.	1,0 mg				2,0 mg				3,0 mg			
	1000 μL	100 μL	2900 μL	3000 μL	1000 μL	100 μL	2900 μL	3000 μL	1000 μL	100 μL	2900 μL	3000 μL
M C8:0	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
M C14:1	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
D C10:0	-	-	98,7	1,3	-	-	99,2	0,8	-	-	100	-
D C18:1	-	-	100	-	1,1	-	98,9	-	1,3	-	98,7	-
T C12:0	99,0	1,0	-	-	99,2	0,8	-	-	98,6	1,4	-	-
T C18:0	98,2	0,8	0,9	-	93,1	2,0	5,0	-	38,7	6,2	53,6	1,4

Endret elueringsvolum for DAG og TAG

Elueringsvolumet for DAG og TAG ble endret, mens elueringsvolumet for MAG ble holdt konstant (3000 μL). Basert på de kromatografiske arealene ble den prosentvise fordelingen av acylglyserolene i en fraksjon beregnet.

Tabell V.23: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 μL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsvolumet for TAG var 900 μL og 3000 μL for DAG. n=1.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	46,5	-	-	46,7	-	-	46,7	-	-
M C18:1	52,2	-	-	52,3	-	-	52,6	-	-
D C10:0	-	45,8	-	0,2	47,4	0,2	0,2	45,0	-
D C16:0	0,9	53,7	2,7	0,5	52,0	3,5	0,5	52,1	3,4
T C12:0	-	-	53,7	-	-	55,3	-	-	48,0
T C18:0	0,5	0,5	43,6	0,3	0,6	41,0	-	3,0	48,6

Tabell V.24: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 μL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsvolumet for TAG var 800 μL og 3000 μL for DAG. n=1.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	46,8	-	-	47,8	-	-	45,0	-	-
M C18:1	52,1	-	-	51,2	-	-	52,2	1,0	-
D C10:0	0,3	43,3	-	0,2	43,5	-	0,3	43,9	-
D C16:0	0,9	55,8	0,8	0,5	55,7	0,3	1,6	53,8	1,8
T C12:0	-	0,2	52,0	-	0,2	56,9	0,3	0,4	53,5
T C18:0	-	0,7	47,2	0,3	0,6	42,7	0,5	0,9	44,7

Tabell V.25: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsvolumet for TAG var 700 µL og 3200 µL for DAG. n=1.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg 1.forsøk			3,0 mg 2. forsøk		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	46,0	-	-	46,7	-	-	44,9	-	-	46,3	-	-
M C18:1	53,6	-	-	52,9	-	-	54,6	-	-	53,3	-	9,2
D C10:0	-	43,0	-	-	43,5	-	-	42,9	-	-	43,6	0,2
D C16:0	0,4	55,5	0,3	0,4	55,2	0,4	-	48,1	0,7	0,4	54,0	2,6
T C12:0	-	0,4	52,4	-	0,3	55,4	-	0,4	62,7	-	0,5	48,1
T C18:0	-	1,0	47,3	-	1,0	44,2	0,5	8,7	36,6	-	1,9	39,8

Tabell V.26: Prosentvis fordeling av acylglyserol innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsvolumet for TAG var 600 µL og 3400 µL for DAG. n=1.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	46,7	-	-	49,1	-	-	47,2	-	-
M C18:1	52,6	-	-	50,5	-	-	52,5	-	-
D C10:0	-	43,2	-	-	44,1	-	-	45,3	-
D C16:0	0,5	54,3	-	0,4	53,6	-	0,3	52,6	-
T C12:0	-	0,9	54,7	-	1,0	55,6	-	0,8	56,7
T C18:0	0,2	1,6	45,3	-	1,3	44,4	-	1,3	43,3

Tabell V.27: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserol, samt standardavvik, innad i en fraksjon. Analysert med 1,0, 2,0 og 3,0 mg total lipidmasse og 150 μ L prøvevolum påsatt SPE-roboten. Elueringsvolumet for TAG var 800 μ L og 3200 μ L for DAG. n=3.

Acylg.	1,0 mg			2,0 mg			3,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	26,9 \pm 0,09	-	-	27,6 \pm 0,46	-	-	27,7 \pm 0,21	-	-
M C18:1	73,1 \pm 0,09	-	-	72,4 \pm 0,46	-	-	72,3 \pm 0,21	-	-
D C10:0	-	55,2 \pm 0,12	-	-	57,1 \pm 0,26	-	-	50,8 \pm 0,63	0,2 \pm 0,23
D C16:0	-	42,7 \pm 0,96	2,1 \pm 0,48	-	40,9 \pm 0,15	1,9 \pm 0,70	-	41,1 \pm 5,13	4,1 \pm 0,69
T C12:0	-	0,7 \pm 0,38	50,4 \pm 0,38	-	0,6 \pm 0,27	51,3 \pm 1,32	-	0,8 \pm 0,34	53,3 \pm 3,21
T C18:0	-	1,3 \pm 0,46	47,5 \pm 0,10	-	1,4 \pm 0,14	46,8 \pm 0,63	-	7,3 \pm 4,84	42,5 \pm 2,30

Analyse av mindre lipidmasse og endret sammensetning av MAG, DAG og TAG

Elueringsvolum for TAG var 800 μL og 3200 μL for DAG, og lipidmassen som ble benyttet var 0,5 mg påsatt SPE-kolonnen. Det ble analysert tre replikater. Det ble i tillegg analysert tre ulike stamløsninger med ulik sammensetning av MAG, DAG og TAG. Tabell V.28-V.31 viser gjennomsnittlig prosentvis fordeling i de ulike fraksjonene, for 0,5, 1,0 og 1,5 mg total lipidmasse påsatt kolonnen og de ulike sammensetningene.

Tabell V.28: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserol, samt standardavvik, innad i en fraksjon. Analysert med 0,5 mg total lipidmasse og 150 μL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=3.

Acylg.	0,5 mg		
	MAG	DAG	TAG
M C8:0	31,4 \pm 1,21	-	-
M C14:1	68,6 \pm 1,21	-	-
D C10:0	-	55,7 \pm 2,20	-
D C18:1	-	44,3 \pm 2,20	1,0 \pm 1,22
T C12:0	-	-	48,1 \pm 3,41
T C18:0	-	-	50,9 \pm 2,50

Tabell V.29: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserol, samt standardavvik, innad i en fraksjon. Prøven analysert besto av 5% MAG, 5% DAG og 90% TAG. Analysert for 0,5, 1,0 og 2,0 total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=2.

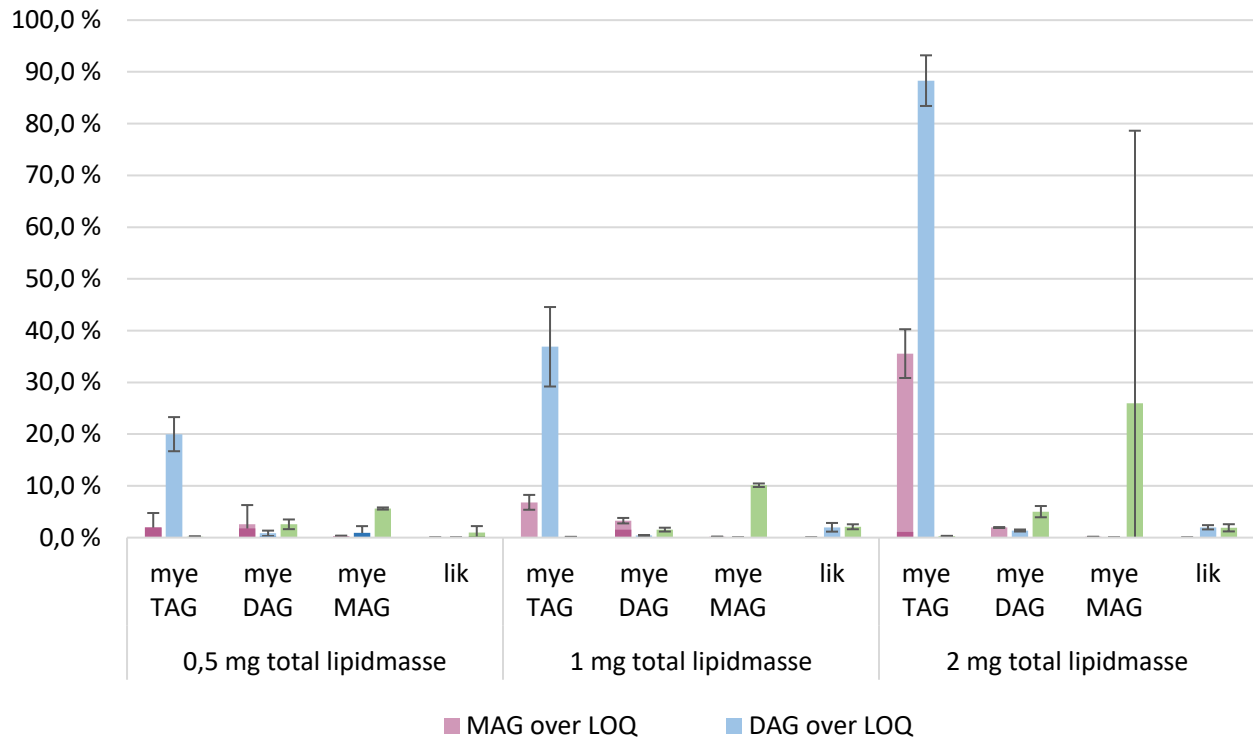
Acylg.	0,5 mg			1,0 mg			2,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	51,8 ± 2,07	-	-	49,3 ± 0,26	-	-	34,4 ± 3,71	-	-
M C18:1	46,2 ± 0,76	-	-	43,9 ± 1,17	-	-	30,1 ± 1,00	-	-
D C10:0	-	37,9 ± 0,13	-	-	29,5 ± 3,70	-	-	5,9 ± 0,07	-
D C16:0	-	42,1 ± 3,03	0,2 ± 0,01	-	33,6 ± 3,25	0,1 ± 0,03	1,1 ± 1,55	5,8 ± 0,45	0,3 ± 0,02
T C12:0	-	3,4 ± 0,07	51,8 ± 2,75	-	2,2 ± 0,36	55,0 ± 0,78	-	2,2 ± 2,26	78,3 ± 1,87
T C18:0	2,0 ± 2,79	16,6 ± 3,23	48,0 ± 2,76	6,8 ± 1,44	34,7 ± 7,31	44,8 ± 0,75	34,5 ± 3,16	86,1 ± 2,63	21,4 ± 1,89

Tabell V.30: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserol, samt standardavvik, innad i en fraksjon. Prøven analysert besto av 10% MAG, 60% DAG og 30% TAG. Analysert for 0,5, 1,0 og 2,0 total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=2.

Acylg.	0,5 mg			1,0 mg			2,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	54,0 ± 5,02	-	-	56,5 ± 1,70	-	-	56,0 ± 0,76	-	-
M C18:1	43,3 ± 1,33	-	-	40,2 ± 1,17	-	-	42,1 ± 0,80	-	-
D C10:0	0,8 ± 1,16	57,1 ± 1,69	-	1,7 ± 0,35	57,9 ± 0,46	-	2,0 ± 0,04	58,8 ± 0,61	0,4 ± 0,11
D C16:0	1,0 ± 1,42	42,1 ± 1,17	2,6 ± 0,94	1,6 ± 0,17	41,7 ± 0,45	1,6 ± 0,37	-	39,8 ± 0,62	4,6 ± 0,98
T C12:0	-	0,3 ± 0,35	54,2 ± 1,81	-	-	56,5 ± 0,51	-	0,6 ± 0,10	56,4 ± 3,19
T C18:0	0,8 ± 1,11	0,6 ± 0,17	43,2 ± 2,75	-	0,4 ± 0,01	41,9 ± 0,88	-	0,8 ± 0,09	38,5 ± 2,10

Tabell V.31: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserol, samt standardavvik, innad i en fraksjon. Prøven analysert besto av 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG. Analysert for 0,5, 1,0 og 2,0 total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=2.

Acylg.	0,5 mg			1,0 mg			2,0 mg		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	56,5 ± 2,39	-	-	57,9 ± 0,07	-	-	58,0 ± 0,07	-	-
M C18:1	43,2 ± 2,34	-	-	41,9 ± 0,06	-	-	41,9 ± 0,09	-	18,2 ± 25,73
D C10:0	-	14,2 ± 0,34	-	-	16,2 ± 0,64	-	-	15,7 ± 0,71	-
D C16:0	0,2 ± 0,03	84,9 ± 0,96	5,6 ± 0,21	0,2 ± 0,02	83,8 ± 0,64	10,1 ± 0,34	0,1 ± 0,02	84,3 ± 0,71	7,8 ± 1,20
T C12:0	-	-	61,2 ± 3,27	-	-	59,2 ± 0,01	-	-	48,5 ± 19,91
T C18:0	0,1 ± 0,08	0,9 ± 1,30	33,2 ± 3,48	-	-	30,7 ± 0,35	-	-	25,5 ± 7,01



Figur V.4: Opprinnelig figur av figur 4.9. Total prosent gjennomblødning i fraksjonene MAG, DAG og TAG for analyser med ulike prøvesammensetning, samt standardavvik. De ulike prøvene består av: mye TAG: 5% MAG, 5% DAG og 90% TAG, mye DAG: 10% MAG, 60% DAG og 30% TAG, mye MAG: 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG og lik: 33% MAG, DAG og TAG. Det ble påsatt 0,5, 1,0 og 2,0 mg total lipidmasse på SPE-kolonnen. n=2

Endret elueringshastighet for fire forskjellige stamløsninger

For fire ulike stamløsninger ble det forsøkt å endre hastigheten til elueringsmiddelet fra 1,0 mL/min til 0,5, 1,5, 2,0 og 2,5 mL/min. Basert på de kromatografiske arealene ble den prosentvise fordelingen av acylglyserolene i en fraksjon beregnet. Tabell V.33-V.35 viser gjennomsnittlig prosentvis fordeling i de ulike fraksjonene for "gammelt kolonneparti". For gjennomsnittlig prosentvis fordeling i de ulike fraksjonene for "nytt kolonneparti" se tabell V.36-V.39.

«Gammelt kolonneparti»

Tabell V.32: Prosentvis fordeling av acylglyserolene innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av 5% MAG, 5% DAG og 90% TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	0,5 mL/min			1,5 mL/min			2,0 mL/min			2,5 mL/min		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	55,3	-	-	52,1	-	-	49,6	-	-	52,2	-	-
M C18:1	44,7	-	-	47,9	-	-	47,2	-	-	47,8	-	-
D C10:0	-	21,1	-	-	24,3	-	-	30,2	-	-	28,8	-
D C16:0	-	24,6	0,4	-	30,7	-	-	37,7	-	-	35,1	-
T C12:0	-	17,6	50,0	-	14,3	53,7	-	5,0	51,4	-	12,1	51,9
T C18:0	-	36,7	49,6	-	30,7	46,3	3,2	27,1	48,6	-	24,0	48,1

Tabell V.33: Prosentvis fordeling av acylglyserolene innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av 10% MAG, 60% DAG og 30% TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	0,5 mg/mL			1,5 mg/mL			2,0 mg/mL			2,5 mg/mL		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	50,1	-	-	50,4	-	-	51,5	-	-	51,4	-	-
M C18:1	45,6	-	-	45,1	-	-	46,4	-	-	44,5	-	-
D C10:0	2,1	58,0	0,7	2,0	56,2	-	2,1	58,0	-	2,0	56,8	-
D C16:0	2,2	41,2	10,7	2,5	43,8	-	-	41,3	2,8	2,1	42,6	2,7
T C12:0	-	-	43,9	-	-	52,6	-	-	52,5	-	-	49,4
T C18:0	-	0,8	44,7	-	-	47,4	-	0,7	44,7	-	0,6	47,9

Tabell V.34: Prosentvis fordeling av acylglyserolene innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	0,5 mg/mL			1,5 mg/mL			2,0 mg/mL			2,5 mg/mL		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	50,1	-	-	51,0	-	-	56,7	-	-	51,3	-	-
M C18:1	49,9	-	-	49,0	-	-	43,3	-	-	48,7	-	-
D C10:0	-	14,3	-	-	13,2	-	-	13,7	-	-	14,4	-
D C16:0	-	85,7	12,3	-	86,8	-	-	86,3	3,9	-	85,6	-
T C12:0	-	-	50,8	-	-	59,6	-	-	58,3	-	-	58,5
T C18:0	-	-	36,9	-	-	40,4	-	-	37,8	-	-	41,5

Tabell V.35: Prosentvis fordeling av acylglyserolene innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av likt forhold mellom MAG, DAG og TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	0,5 mg/mL			1,5 mg/mL			2,0 mg/mL			2,5 mg/mL		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C8:0	27,4	-	-	26,9	-	-	28,3	-	-	28,9	-	-
M C14:0	72,6	-	-	73,1	-	-	71,7	-	1,1	71,1	-	-
D C10:0	-	56,4	0,4	-	50,9	-	-	51,0	-	-	53,1	-
D C18:1	-	41,1	6,7	-	48,3	0,6	-	47,8	-	-	46,1	0,7
T C12:0	-	0,7	42,8	-	-	46,5	-	-	44,0	-	-	47,4
T C18:0	-	1,8	50,0	-	0,8	52,9	-	1,2	54,9	-	0,8	51,9

«Nytt kolonneparti»

Tabell V.36: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserolene, samt standardavvik gitt replikater, innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av 5% MAG, 5% DAG og 90% TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=3 for 1,5 mL/min og n=1 for 2,0 og 2,5 mL/min

Acylg.	1,5 mL/min			2,0 mL/min			2,5 mL/min		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	37,8 ± 7,21	-	-	30,5	-	-	32,2	-	-
M C18:1	42,6 ± 4,02	-	-	37,5	-	-	36,9	-	-
D C10:0	-	32,9 ± 1,65	-	-	32,7	-	-	33,9	-
D C16:0	11,2 ± 3,58	45,2 ± 1,07	0,5 ± 0,26	14,3	36,0	-	14,0	38,1	-
T C12:0	-	-	47,5 ± 2,69	-	6,2	48,1	-	4,6	50,3
T C18:0	8,4 ± 7,94	21,9 ± 0,60	52,0 ± 2,89	17,7	25,1	51,9	16,9	23,3	49,7

Tabell V.37: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserolene, samt standardavvik, innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av 10% MAG, 60% DAG og 30% TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	1,5 mL/min			2,0 mL/min			2,5 mL/min		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	43,0 ± 6,30	-	-	38,2	-	-	41,0	-	-
M C18:1	46,5 ± 1,97	-	-	45,8	-	-	42,9	-	-
D C10:0	1,8 ± 3,04	55,7 ± 1,30	0,2 ± 0,32	-	59,0	-	-	58,1	-
D C16:0	4,5 ± 4,01	43,7 ± 1,46	4,2 ± 2,41	8,2	41,0	2,7	8,2	41,0	3,8
T C12:0	-	-	46,5 ± 1,80	-	-	49,4	-	-	48,8
T C18:0	4,3 ± 4,32	0,6 ± 0,61	49,1 ± 3,78	7,8	-	47,9	8,0	0,9	47,4

Tabell V.38: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserolene, samt standardavvik, innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av 90% MAG, 6% DAG og 4% TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	1,5 mL/min			2,0 mL/min			2,5 mL/min		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C14:0	45,6 ± 3,84	-	-	45,2	-	-	49,2	-	-
M C18:1	53,0 ± 3,13	-	-	52,0	-	-	49,3	-	-
D C10:0	-	13,2 ± 0,72	-	-	15,4	-	-	15,5	-
D C16:0	0,8 ± 0,18	86,8 ± 0,72	9,4 ± 5,41	1,5	84,6	9,0	0,8	84,5	7,0
T C12:0	-	-	47,5 ± 0,15	-	-	51,4	-	-	54,1
T C18:0	0,6 ± 0,54	-	43,0 ± 5,32	1,3	-	39,6	0,7	-	38,9

Tabell V.39: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av acylglyserolene, samt standardavvik, innad i en fraksjon, ved endret mobilfasehastighet. Prøven analysert besto av likt forhold mellom MAG, DAG og TAG. Analysert for 0,5 mg total lipidmasse og 150 µL prøvevolum påsatt SPE-roboten. n=1.

Acylg.	1,5 mL/min			2,0 mL/min			2,5 mL/min		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
M C8:0	30,6 ± 0,95	-	-	32,0	-	-	29,9	-	-
M C14:0	64,5 ± 0,64	-	-	64,0	-	-	66,3	-	-
D C10:0	-	47,8 ± 2,53	-	-	50,2	-	-	48,1	-
D C18:1	-	52,2 ± 2,53	3,3 ± 1,59	-	49,8	1,1	-	49,0	4,3
T C12:0	-	-	38,7 ± 1,43	-	-	44,3	-	-	42,1
T C18:0	4,9 ± 0,43	-	58,0 ± 2,26	4,0	-	54,5	3,8	2,9	53,6



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway