



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2020/2021 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Analyse av MAG i melk ved bruk av offline SPE GC-MS**

Analysis of MAG in milk using offline SPE GC-MS

Gard Østbø

Kjemi

## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU) i perioden august 2020 til mai 2021. Oppgaven ble utført hos forskningsgruppen for massespektrometri og utgjør 60 studiepoeng av en 120 stp. mastergrad i kjemi.

Jeg ønsker å takke veilederen mine Dag Ekeberg og Hanne Devle for god veiledning med oppgaven. Dere har vært en uvurderlig hjelp både på lab og under skriveprosessen av oppgaven. Jeg ønsker også å takke Simen Antonsen for all hjelpen ved NMR-delen av oppgaven. Jeg ønsker også å takke forskningsgruppen *LipidInflammaGenes* for god informasjon om prosjektet og teoretiske grunnlaget til oppgaven. Jeg ønsker også å takke personalet ved meierilaboratoriet for fordøying av prøver til prosjektet. En spesiell takk til medstudent Anders Flytkjær for godt samarbeid under flere deler av oppgaven.

Norges miljø og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2021

Gard Østbø

## Sammendrag

Inntak av mettet fett har lenge vært assosiert med negative helseeffekter som hjerte og karsykdommer. Mange tidlige utviklingsstadier av hjerte og karsykdommer viser lavgradig betennelse. I forskningsprosjektet *LipidInflammaGenes* forskes det på sammenhengen imellom utvikling av lavgradig betennelse og opptak av mettet fett fra kjøtt og meieriprodukter. Melkefett regnes som en av de mest komplekse kildene til fett, med over 400 forskjellige fettsyrer. Melkefett består i hovedsak av triacylglyserider (TAG). Under fordøyelsen omdannes TAG til 2-monoacylglyserider (2-MAG) og frie fettsyrer (FFA) som deretter tas i kroppen. Lite forskning er gjort på den metabolske skjebnen til MAG og *LipidInflammaGenes* ønsker derfor å utvikle en metode for å identifisere og kvantifisere fettsyrene i 2-MAG i meieriprodukter etter fordøyelse. Utvikling av den metoden er hovedmålet for denne oppgaven.

Meieriproduktene fordøyes ved bruk av en simulert fordøyelsesmetode med humane enzymer. Lipidene ekstraheres ut med væske/væske-ekstraksjon og de nøytrale lipidene fraksjoneres ut ved fast-fase-ekstraksjon (SPE). De nøytrale lipidene blir videre fraksjonert ut i MAG, DAG og TAG-fraksjoner. MAG-fraksjonen omesteres til fettsyremetylestere (FAME) og analyseres på GC-MS. Denne metoden gir god informasjon om fettsyrene til stede i MAG, men gir lite strukturell informasjon om det er 1-MAG eller 2-MAG tilstede etter fordøyelse. For å kunne bevise dette ble det også utført et forsøk på å skille imellom 1-MAG og 2-MAG ved bruk av <sup>1</sup>H-NMR.

En metodevalidering ble utført på utvalgte fettsyrer som både skulle representere fettsyrene funnet i meieriprodukter, samt korte, medium, lange og umettede fettsyrer. Deteksjons- og kvantifiseringsgrensen (LOD og LOQ) ble funnet til å ligge imellom 3,5 til 14,1 µg/mL og 11,8 til 47,0 µg/mL. Metodens repeterbarhet og reproduserbarhet ligger henholdsvis på under 5% og 10% avvik imellom paralleller. Metodens nøyaktighet viser mindre enn 5% avvik fra sann verdi for alle fettsyrer utenom C8:0 og C20:0. Metoden viser lineære resultater opp mot 30 mg/mL total lipidkonsentrasjon.

I en analyse av MAG fra fire fordøyde meieriprodukter, Kremgo, Kremfløte, Norvegia og Seterrømme, ble det identifisert 25 forskjellige fettsyrer. 12 mettede, 7 én-umettede og 6 er flerumettede fettsyrer. Rundt 90 % av den totale fettsyremengden i produktene bestod av C14:0 (12 – 17 %), C16:0 (47 – 56 %), C18:0 (6 – 9 %) og C18:1<sub>cis</sub>9 (14-21 %). Denne

fettsyreprofilen stemmer godt overens med hva tidligere litteratur sier om fettsyrer som forestret i sn-2 posisjon i TAG fra melkefett.

Den stereospesifikke posisjonen til MAG skulle bestemmes ved bruk av  $^1\text{H-NMR}$ . I område 3 – 5 ppm vil 1-MAG ha 3 separate signaler, mens 2-MAG vill ha 2 signaler på grunn av symmetri. Denne metoden fungerte på standarder, men på bakgrunn av at 2-MAG isomeriserer til 1-MAG i SPE-kolonnene var det vanskelig å benytte metoden i praksis.

Analysemetoden gir akseptable resultater når det kommer til fraksjonering, identifisering og kvantifisering av fettsyrene i MAG-fraksjonen. Metoden gir akseptable resultater for medium (C10 – C18) og lange fettsyrer (> C18), samt én-umettede fettsyrer. Metoden underkvantifiserer korte fettsyrer (< C10), men dette problemet kan løses ved å benytte en bedre egnet internstandard. Bestemmelse av den stereospesifikke posisjonen til fettsyren i MAG er vanskelig på grunn av isomeriseringen i SPE-kolonnen, men fettsyreprofilen til MAG-fraksjonen fra meieriproduktene analysert indikerer sterkt at prøvene er 2-MAG etter fordøyelse.

## Abstract

The intake of saturated fat has for a long time been associated with negative health effects such as cardiovascular diseases. Early stages of the development of cardiovascular diseases show signs of low-grade inflammation. In the research project *LipidInflammaGenes*, research is carried out to find the connection between the development of low-grade inflammation and the intake of saturated fat from meat and dairy products. Dairy fat is one of the most complex sources of natural fat with more than 400 different fatty acids. Dairy fat mostly consists of triacylglycerides (TAG) and during digestion, TAG is broken down to 2-monoacylglycerides (2-MAG) and free fatty acids (FFA) before the body absorbs it. There is limited research on the uptake and metabolic fate of the fatty acid in 2-MAG, and *LipidInflammaGenes* wants to develop an analytical method to identify and quantify the fatty acid in 2-MAG in digested dairy product. Developing this method is the main goal of this master thesis.

The dairy products are digested with a simulated digestion method using human enzymes. The lipids are extracted with liquid/liquid extraction and the neutral lipids (NL) are extracted with solid-phase extraction (SPE). NL is further fractionated into MAG, DAG and TAG-fractions with SPE, and MAG are derivatized into fatty acid methyl esters (FAME) with transesterification. FAME is analysed with a GC-MS. The method gives information about the fatty acids in the MAG-fraction, but little structural information about the MAG after digestion. To find the stereo specific position of the fatty acid in the MAG, a method to find the difference between 1-MAG and 2-MAG with  $^1\text{H-NMR}$  where also developed.

A method validation was performed on selected MAG-standards that represent various fatty acids found in dairy products, as well as short, medium, long and unsaturated fatty acids. LOD and LOQ was found to be between 3.5 – 14.1  $\mu\text{g/mL}$  and 11.8 – 47.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The methods reproducibility and repeatability were found to give less than 5 % and 10 % deviation of the results between parallel samples for all standards. The methods accuracy was found to give less than 5 % deviation from the true values of the samples for all standards except for two. The method also had a linear range up to 30  $\text{mg/mL}$  total lipid concentration.

In an analysis of MAG from four digested dairy products, Kremgo, Kremfløte, Norvegia and Seterrømme, 25 different fatty acids were identified. 12 saturated, 7 monounsaturated, and 6 polyunsaturated fatty acids were identified in the samples. About 90 % of the total fatty acid concentration consist of C14:0 (12 – 17 %), C16:0 (47 – 56 %), C18:0 (6 – 9 %) og C18:1 $_{cis9}$

(14-21 %). The fatty acids profile fits well with what research tells us about which fatty acid that are present in the sn-2 position in TAG in diary fats.

The stereospecific position of the fatty acid in MAG was supposed to be determined by <sup>1</sup>H-NMR. In the area between 3 and 5 ppm, 1-MAG should have 3 separate signals, while 2-MAG would only have 2 because of the symmetry between the sn-1 and sn-2 position. The method worked well on standards, but because of isomerisation of 2-MAG to 1-MAG in the SPE-column, we found that the method was unsuitable for use on dairy samples.

The analytical method gives acceptable results when it comes to extraction of the lipid classes and identification and quantification of the fatty acids in the MAG-fraction. The method gives acceptable results for medium (C10-C18), long chained (>C18) and monounsaturated fatty acids. The method is under quantifying short chained fatty acids (<C10), but this problem can be solved by using a more suitable internal standard. Determining the stereo specific position of the fatty acid in MAG was found to be difficult because of isomerisation in the SPE-column, but the fatty acid profile to the MAG-fractions from the diary product indicates that the samples are 2-MAG after digestion.

## Innhold

Forord .....	i
Sammendrag .....	ii
Abstract .....	iv
Forkortelser .....	x
1. Innledning.....	1
1.1 Mål for oppgaven.....	2
2 Teori .....	3
2.1 Lipider .....	3
2.1.1 Fettsyrer .....	3
2.1.2 Nøytrale lipider (acylglyserider).....	6
2.1.3 Acylmigrering .....	7
2.1.4 Lipiders rolle i ernæring og helse .....	9
2.1.5 Fordøyelse av lipider.....	10
2.2 Melk.....	15
2.3 Instrumenter og analyseteknikker.....	19
2.3.1 Lipidekstraksjon og derivatisering.....	19
2.3.2 Internstandardkvantifisering .....	20
2.3.3 Fastfaseekstraksjon .....	21
2.3.4 Gasskromatografi (GC).....	22
2.3.5 Massespektrometri (MS).....	23
2.3.6 Kjernemagnetisk resonans (NMR) .....	30
2.4 Metodevalidering.....	34
3. Materialer og metoder .....	39
3.1 Kjemikalier, materiale og instrumenter .....	39
3.2 Løsninger .....	44
3.3 Metode .....	45

3.3.1	Prøveopparbeidelse .....	45
3.3.2	Lipidekstraksjon.....	45
3.3.3	SPE-fraksjonering av NL, FFA og PL .....	45
3.3.4	SPE-fraksjonering av NL til MAG, DAG, TAG .....	46
3.3.5	Derivatisering til FAME .....	46
3.3.6	Analyse med GC-MS .....	47
3.3.7	Kvantifisering og Databehandling .....	48
3.4	Metodevalidering.....	50
3.4.1	Identitetskriterier.....	50
3.4.2	LOD og LOQ .....	50
3.4.3	Presisjon og nøyaktighet.....	51
3.4.4	Linearitet.....	51
3.5.	<sup>1</sup> H-NMR.....	52
3.5.1	Manuel SPE-fraksjonering ved -20 °C .....	52
3.6	Kjemisk hydrolyse av melk .....	53
3.6.1	Hydrolyse med HCl .....	53
3.6.2	Hydrolyse med H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	53
3.6.3	Hydrolyse med NaOH.....	53
4.	Nøkkresultater og diskusjon.....	54
4.1	Metodeutvikling.....	54
4.1.1	Fordøyelse og ekstraksjon.....	54
4.1.2.	SPE-fraksjonering av nøytrale lipider, frie fettsyrer og fosfolipider .....	57
4.1.3	SPE fraksjonering av MAG, DAG og TAG .....	58
4.1.4:	Derivatisering av MAG, DAG og TAG til FAME .....	58
4.1.5	Analyse og kvantifisering .....	59
4.1.6	Oppsummering metodeutviklingen.....	60
4.2.	Metodevalidering .....	61



4.2.1: LOD og LOQ .....	61
4.2.2 Presisjon og nøyaktighet .....	62
4.2.3 Linearitet .....	66
4.2.4 Oppsummering metodevalidering .....	67
4.3: Fordøyde meieriprodukter .....	68
4.3.1 Fettsyreprofil i MAG .....	68
4.3.2 Fettsyreprofil DAG og TAG .....	71
4.3.3 Oppsummering analyse av meieriprodukter .....	73
4.4 Bestemmelse av stereospesifikk posisjon til MAG etter fordøyelse .....	74
4.4.1: Analyse av standarder .....	74
4.4.2 Integrering av SPE-fraksjonering inn i <sup>1</sup> H-NMR-metoden.....	75
4.3.3 SPE-fraksjonering ved -20 C .....	76
4.3.4 Diskusjon og forslag til videre arbeid .....	77
4.5. Oppsummering diskusjon og videre arbeid .....	79
4.5.1 Videre arbeid.....	80
5. Konklusjon .....	81
6. Referanser.....	83
Vedlegg .....	1
Vedlegg 1 Supelco 37 Component FAME Mix .....	1
Vedlegg 2 RRF og utvalgte ionetopper for identifisering av fettsyren. ....	3
Vedlegg 3 Fordøyelsesprosessen.....	5
Vedlegg 4 Metodevalidering .....	7
Vedlegg 5 Fordøyd meieriprodukter .....	10
Vedlegg 6 Fordøyd helmelk .....	21
Vedlegg 7 <sup>1</sup> H-NMR spektra .....	34
1. Monostearin .....	34
2. Monoolein .....	34

3. Monocaprylin .....	35
4. Diolein.....	35
5. Tristearin .....	36
Vedlegg 8 Derivatisering av 2-monopalmitin med BSTFA:TMCS .....	37

## Forkortelser

AG: Acylglyserol

CAS#: CAS registry number – Identifikasjonskode for kjemiske forbindelser

CRF: Sertifisert referansemateriale

DAG: Diacylglyserol

EIC: Rekonstruert ionekromatogram (også kalt RIC eller XIC)

FFA: Frie fettsyre

FAME: Fettsyremetylester

GC: Gasskromatografi

HDJ: Human duodenial juice

HGJ: Human magesyre

HGL: Human gastrisk lipase (human gastric juice)

LCFA: Langkjedete fettsyrer

LOD: Deteksjonsgrense

LOQ: Kvantifiseringsgrense

m: Stigningstall

MAG: Monoacylglycerol

MF: Mobilfase

MS: Massespektrometri

MUFA: Én-umettede fettsyrer

NL: Nøytrale lipider

NMR: Kjernemagnetisk resonans

PL: Fosfolipider

PUFA: Flerumettede fettsyrer

R: Hydrokarbonkjeden til fettsyrer

RF: Referansemateriale

RSD: Relativt standard avvik

SD: Standard avvik (også kalt  $\sigma$ )

Sn: Stereospesifikk nummerering (posisjonen på acylglyseridet)

S/N-forhold: Signal/støy-forhold

SF: Stasjonærfase

SPE: Fastfase-ekstraksjon

TAG: Triacylglyserol

TIC: Total-ion chromatogram

X: Antall

$\bar{x}$ : Gjennomsnitt

## 1. Innledning

Kostholdet ditt og helsen din er sterkt knyttet sammen. I Nasjonalt råd for ernæring; Kostråd om fett, vises det til at inntaket av mettet fett er betydelig høyere enn anbefalte nivåer (Nasjonalt råd for ernæring, 2017). Inntaket av mettet fett har lenge blitt assosiert med negative helseeffekter, og i et større forskningsprosjektet, *LipidInflammaGenes*, forskes det på effekten av lipider i kjøtt og meieriprodukter på fordøyelse og lavgradig betennelse i celler, dyr og mennesker (NMBU, 2018).

Mange tidlige stadier i utvikling av hjerte og karsykdommer og fedme viser lavgradig betennelse (Harris et al., 2019). *LipidInflammaGenes* har et overordnet målt å utvikle en forståelse for hvordan forholdet er imellom lavgradig betennelse og mettede fettsyrer ifra kjøtt og melk (Haug, 2017). Rundt 62 % av inntaket av mettet fett stammer fra kjøtt og meieriprodukter, hvorav 40 – 42 % av dette stammer fra melk (NMBU, 2018) & (Totland et al., 2012).

Forskjellen i fettsyreprofilen i fett fra storfekjøtt, meieriprodukter og svinekjøtt er stor (Haug, 2017). Spesielt melkefett regnes som en av de mest komplekse fettkildene, da det finnes over 400 forskjellige fettsyrer i melken (Pereira, 2014), (Fox, Uniacke-Lowe, McSceneey, & O'Mahony, 2015b). Melkefettet består hovedsakelig av triacylglyserider (TAG), der tre fettsyrer bundet til glyserol (Fox et al., 2015b). Når kroppen fordøyer fett, hydrolyseres triacylglyseridene til 2-monoacylglycerider (2-MAG, som har en fettsyre i sn-2 posisjon på glyserolkjeden) og frie fettsyrer (Mu & Porsgaard, 2005). MAG og de frie fettsyrene absorberes av tynntarmen, resyntenseres til TAG og fraktes videre til fettvev og muskulatur (Mu & Porsgaard, 2005).

Lite forskning har blitt utført på den «metabolske skjebnen» til fettsyren som sitter i sn-2 posisjon i TAG (NMBU, 2018). I forskningsprosjektet *LipidInflammaGenes* ønsker man derfor å utvikle en analysemetode for å identifisere og kvantifisere fettsyren i sn-2 posisjon på TAG i fett fra melk og andre meieriprodukter. Det er utvikling av en slik metode som er hovedmålet for denne oppgaven.

I et tidligere prosjekt tilknyttet *LipidInflammaGenes* ble det benyttet  $^{13}\text{C}$ -NMR for å identifisere fettsyrene i sn-2 posisjon i svinefett (Kildahl-Andersen, Gjerlaug-Enger, Rise, Haug, & Egelanddal, 2020). En tilsvarende metode med bruk av NMR for melkefett er vanskelig på grunn av kompleksiteten og det store antallet ulike fettsyrer i dette fett. Derfor

ønsker man fortrinnsvis å lage en kjemisk analysemetode med bruk av GC-MS for å identifisere de forskjellige fettsyrene. Prøvene som analyseres går igjennom en simulert enzymatisk fordøyelse, hvor TAG hydrolyseres til MAG og frie fettsyrer. Lipidene ekstraheres og MAG separeres fra resterende lipider via SPE-fraksjonering. På grunn av at MAG er lite egnet for direkte analyse på GC, derivatisere MAG til fettsyremetylestere (FAME) og analyseres med GC-MS. Metoden vil gi god informasjon om fettsyrene til stede i MAG etter fordøyelsen, men vil ikke gi noe strukturell informasjon om den gjenværende fettsyren er plassert i sn1- eller sn2-posisjon. Det blir derfor også utviklet en metode for å skille imellom 1-MAG og 2-MAG ved bruk av  $^1\text{H-NMR}$ .

### 1.1 Mål for oppgaven

Hovedmålet med masteroppgaven er å utvikle en kvalitativ og kvantitativ analysemetode for analyse av fettsyreprofilen i monoacylglyserider ekstrahert fra fordøyde meieriprodukter ved bruk av GC-MS. Metoden kan deles inn i følgende punkter:

- Enzymatisk fordøyelse.
- Væske/væske-ekstraksjon av lipider.
- SPE fraksjonering av lipidekstraktet til NL-, FFA- og PL-fraksjoner.
- SPE fraksjonering av NL til MAG-, DAG- og TAG-fraksjoner.
- Omestering av MAG til FAME.
- Analyse på GC-MS.

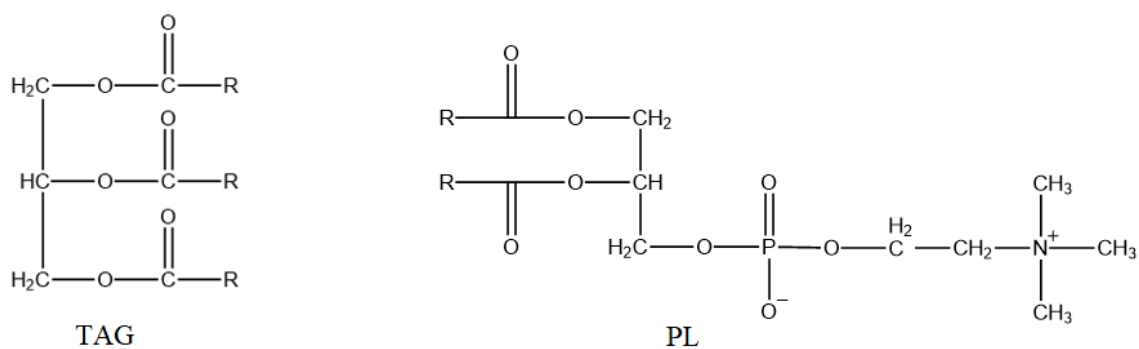
Delmål:

- Metodevalidering. Henholdsvis finne LOD, LOQ, linearitet, presisjon og nøyaktighet for analysemetoden.
- Utføre analyse på utvalgte fordøyde meieriprodukter.
- Finne en måte å skille mellom 1-MAG og 2-MAG ved  $^1\text{H-NMR}$ .

## 2 Teori

### 2.1 Lipider

Navnet lipider er ofte brukt synonymt med fett, men er per definisjon en kjemisk heterogen gruppe som ofte er uløselig i vann, men løselig i upolare organiske løsemidler (Gurr, Harwood, Frayn, Murphy, & Michell, 2016d). Lipider er en samlebetegnelse for en større og varierende mengde stoffgrupper og kan deles inn i to hovedgrupper, nøytrale lipider (NL) og polare lipider (Rod-in, Monmai, Shin, You, & Park, 2020). Nøytrale lipider består av lange hydrofobe hydrokarbonkjeder, uten frie polare grupper (Lordan, Tsoupras, & Zabetakis, 2017), eller ladning (Rarokar, Menghani, Kerzare, & Khedekar, 2017). Nøytrale lipider er ofte kalt lagringslipider og er en av hovedkildene til energi (Gurr, Harwood, Frayn, Murphy, & Michell, 2016a). Eksempler på nøytrale lipider er mono-, di og triacylglyserider. Polare lipider består både av hydrofobe hydrokarbonkjeder, men inneholder også en polar gruppe, som for eksempel en fosfat-gruppe (Lordan et al., 2017). Polare lipider er sentrale komponenter i cellemembranen og blir ofte kalt membranlipider (Gurr et al., 2016a). Eksempler på polare lipider er fosfolipider og sphingolipider (Fox, Uniacke-Lowe, McSceneey, & O'Mahony, 2015a). Figur 2.1.1 viser et eksempel på et nøytralt lipid (TAG) og et polart lipid (PL).

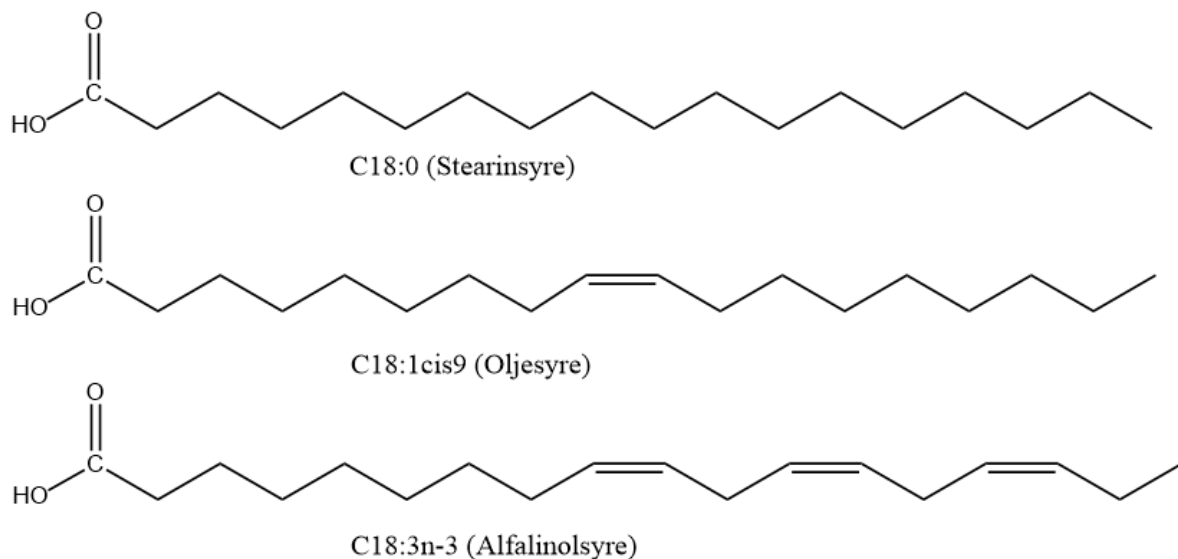


**Figur 2.2.1:** Et triacylglyserid (nøytralt) og et fosfolipid (polart). R står for karbonylkjeden. PL i dette tilfellet er et fosfatidylkolin (PC).

#### 2.1.1 Fettsyrer

Fettsyrer er alifatiske karboksylsyrer som spiller en nøkkelrolle i kroppen metabolisme, både som energilagring og energitransport (Rustan & Drevon, 2001). Fettsyrer er også en essensiell komponent i alle cellemembraner (Rustan & Drevon, 2001) og viktige byggesteiner for andre lipider, som acylglyserider, fosfolipider og voksesterer (Vik & Hansen, 2016). Fettsyrer består

normalt av en karboksylgruppe (COOH) og en karbonkjede (mellom 2 til 80 karbon, men typisk å finne fettsyrer med kjedelengder fra 4 til 22 i mat) med en metyl-ende, n-enden (Lunn & Theobald, 2006). Fettsyrene klassifiseres etter antall karbonatomer og grad av umettethet (Lunn & Theobald, 2006). Mettede fettsyrer (SFA) er fettsyrer uten dobbeltbindinger, én-umettede fettsyrer (MUFA) har én dobbeltbinding og flerumettede fettsyrer (PUFA) har to eller flere (Lunn & Theobald, 2006). Posisjonen på dobbeltbindingen er også viktig i klassifisering av fettsyren; umettede fettsyrer klassifiseres ofte etter hvilket karbon den første dobbeltbindingen er plassert (n-3, n-6, n-9 osv., fra metyl-enden av karbonkjeden). I Figur 2.1.2 vises forskjellige grad av umettethet i C18-fettsyre. Stearinsyre er en mettet fettsyre, Oljesyre er en n-9 én-umettet fettsyre og alfa-linolsyre er en flerumettet n-3 fettsyre.



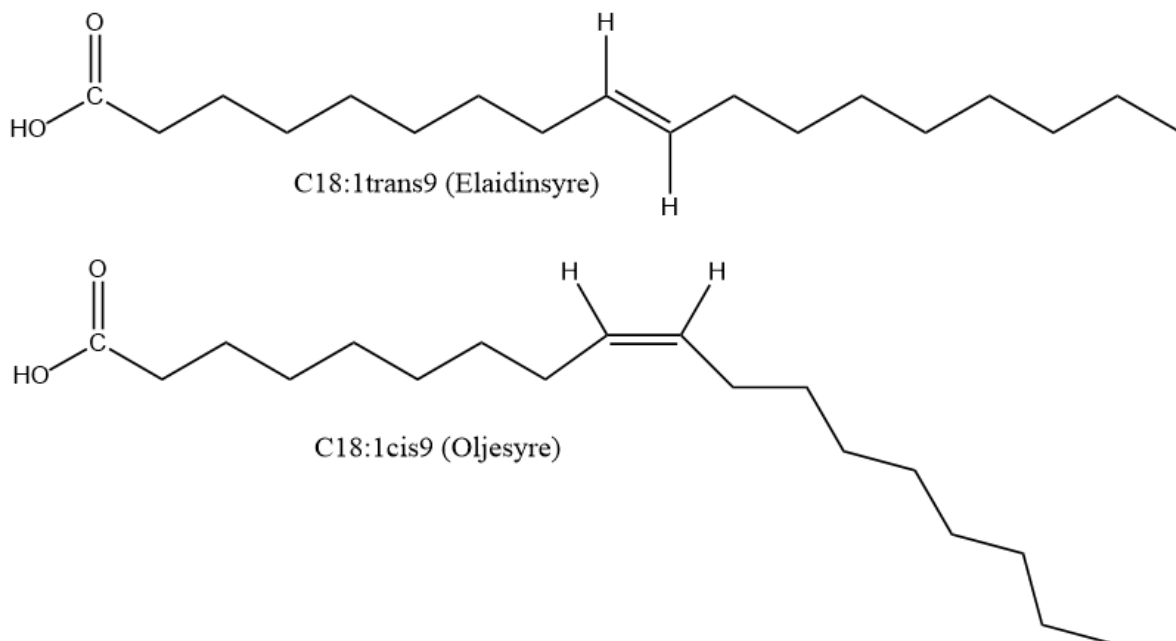
**Figur 2.1.2:** Forskjellige grad av umettethet i 18-karbons fettsyrer. C18:0 er en SFA, C18:1cis9 er en MUFA og C18:3n-3 er en PUFA.

Umettede fettsyrer finnes i to forskjellige isomerer, *cis* og *trans*. I *cis*-fettsyrer ligger hydrogenatomene på samme side av dobbeltbindingen, som vist i figur 2.1.2. Dette gjør at kjeden får en liten knekk. *Trans*-fettsyrer har hydrogenatomet på forskjellige sider av dobbeltbindingen. Isomerene har forskjellige egenskaper, som for eksempel «brekket» i *cis*-fettsyrene gjør at fettsyren ikke kan pakkes like tett som *trans*-fettsyren. Dette fører til at smeltepunktet til *cis*-fettsyrene er lavere enn *trans* (Lunn & Theobald, 2006). Transfett er primært sett en effekt av hydrogenering under industrielle prosesser, og er sjeldent funnet i naturen (Rustan & Dreven, 2001). Selv om transfett i naturen er sjeldent, vil man kunne finne transfett i dyrefett, som melkeprodukter og kjøtt (Lichtenstein, 2016). Dette kommer av



anaerobisk bakteriell fermentering som skjer vommen til drøvtyggere (Lichtenstein, 2016).

Figur 2.1.3 viser de to isomere formene til C18:1n-9 fettsyren.



**Figur 2.1.3:** *Cis* og *trans*-isomerene for C18:1n-9.

Fettsyrer er «kjære barn med mange navn» og de navnettes ofte med systematisk navn, trivialnavn og forkortelser. Det systematiske navnet (som IUPAC) gir strukturell informasjon om fettsyren, men blir tungvint å bruke (Scrimgeour & Harwood, 2007). Trivialnavn gir lite strukturell informasjon, men er ofte historisk benyttede navn fra historiske kilder til fettsyren (Scrimgeour & Harwood, 2007). Forkortelsene stammer fra bruken av GC, hvor fettsyrene separeres ut ifra kjedelengde og metningsgrad (Gurr et al., 2016a). Tabell 2.1.1 viser en oversikt over struktur, systematiske, trivial og forkortelsesnavn som ofte benyttes for utvalgte fettsyrer (Scrimgeour & Harwood, 2007).

**Tabell 2.1.1:** Oversikt over struktur, systematisk navn, trivialnavn og forkortelse for utvalgte fettsyrer.

Struktur	Systematisk navn	Trivialnavn	Forkortelse
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	Oktansyre	Caprylsyre	C8:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	Dekansyre	Caprinsyre	C10:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Dodekansyre	Laurinsyre	C12:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Tetradekansyre	Myristinsyre	C14:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Heksadekansyre	Palmitinsyre	C16:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Oktadekansyre	Stearinsyre	C18:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> -9-oktadekan-syre	Oljesyre	C18:1 <i>cis</i> 9
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>trans</i> -9-oktadekan-syre	Elaidinsyre	C18:1 <i>trans</i> 9
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Eikosansyre	Arakidinsyre	C20:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_5(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eikosapentaensyre	EPA	C20:5 <i>cis</i> 5,8,11,14,17

Fettsyreprofilen vil variere stort mellom matkilder. I for eksempel kjøtt finnes palmitinsyre (C16:0), myristinsyre (C14:0) og oljesyre (C18:1n-9), mens planter vil ofte ha linolsyre (C18:2n-6) og alfa-linolsyre (C18:3n-9) og sjømat vil for eksempel større mengder eikosapentaensyre (C20:5n-3, også kjent som EPA) og dokosaheksaensyre (C22:6n-3, også kjent som DHA) (Rustan & Drevon, 2001). Fettsyreprofilen er en viktig faktor for å bestemme egenskapene til fett, da fettsyrene bestemmer fettets smeltepunkt, kjemisk aktivitet og næringsverdi (Walstra, Wouters, & Geurts, 2006b).

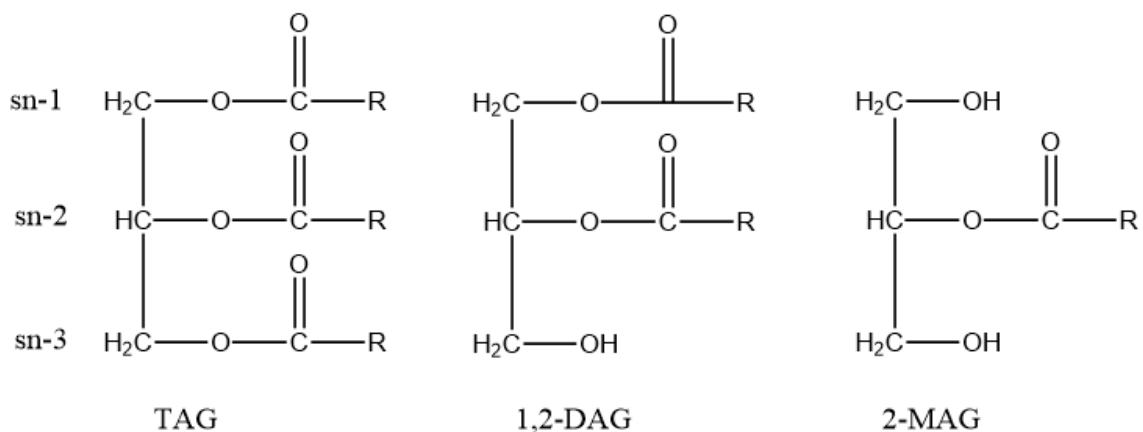
### 2.1.2 Nøytrale lipider (acylglyserider)

Nøytrale lipider er lipider uten ladning (Rarokar et al., 2017). De er upolare og består ofte av lange hydrokarbonkjeder som for eksempel fettsyrer (Lordan et al., 2017). Navnet benyttes ofte synonymt med acylglyserider, men andre lipider, som voksester og sterolester, er også nøytrale lipider (Athenstaedt & Daum, 2006).

Acylglyserider er upolare estere dannet av glyserol og fettsyrer (Scrimgeour & Harwood, 2007). Glyserol har tre hydroksyl-grupper, som alle kan forestres til å danne mono-, di- eller

triacylglyserider (MAG, DAG og TAG). TAG, DAG og MAG er illustrert i figur 2.1.4. De tre stereospesifikke posisjonene i glyserol-ryggraden kalles sn-1, sn-2 og sn-3 posisjon (Scrimgeour & Harwood, 2007).

Acylglyseridens hovedoppgave er å fungere som energilager, men er også en viktig brikke i syntese av biodiesel fra olje og fett (Rarokar et al., 2017). Den strukturelle posisjonen til fettsyrene i TAG molekyler vil bestemme egenskapene til fett. Dette påvirker absorpsjon, metabolisme og vevsdistribusjon (Berry, 2009). For eksempel viser studier på dyr og spedbarn at absorpsjonen av C16:0 og C18:0 øker når de er i sn-2 posisjon enn i sn-1(3) (Berry, 2009).

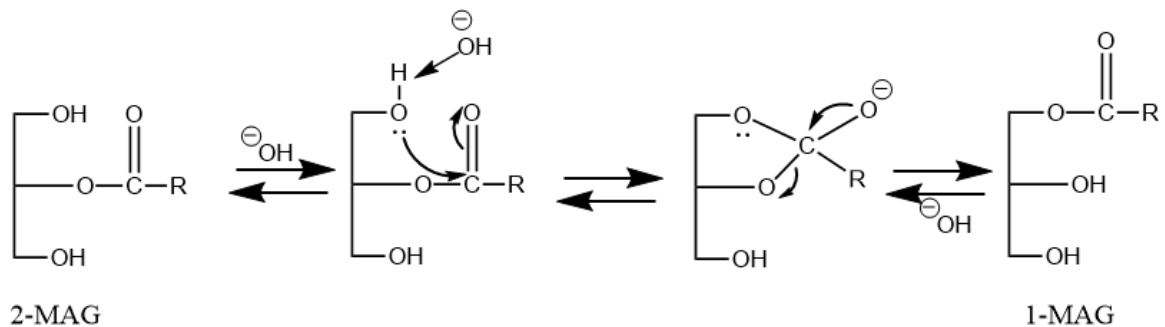


**Figur 2.1.4:** TAG, 1,2-DAG og 2-MAG. Acylglyseridene navnesettes etter stereospesifikk posisjonering (sn) til fettsyrene. DAG kan forekomme som 1,2-DAG, som vist i figuren, og 1,3-DAG. MAG kan forekomme som 2-MAG, som vist i figuren, eller 1(3)-MAG.

### 2.1.3 Acylmigrering

Acylmigrering i lipider er et fenomen hvor acylglyseridet isomeriserer, noe som vil si at fettsyren bytter stereospesifikk posisjon (Serdarevich, 1967). For MAG innebærer dette ofte at 2-MAG isomeriserer til den mer stabile 1-MAG (Wang, Zhao, Yang, Wang, & Wang, 2020). Figur 2.1.5 viser en foreslått reaksjonsmekanisme for basekatalysert acylmigrering av 2-MAG til 1-MAG. I forskning utført av Fischer (1920) foreslås det at acylmigrering foregår via sykliske intermediater, hvor den mer sterisk stabile hydroksylgruppen i sn-1 posisjonen reagerer med estergruppen og danner et syklisk intermediat (Serdarevich, 1967). Estergruppen i sn-2 posisjon vil ha en større grad av interaksjoner med nabo-hydroksylgruppene sn-1 (og sn-3). Likevekten vil derfor forskyve seg mot den mer termisk stabile 1-MAG

(Serdarevich, 1967). Likevektsforholdet mellom 2 og 1-MAG er 1:9 (Wang et al., 2020) & (Serdarevich, 1967).



**Figur 2.1.5:** Mekanisme for basekatalysert acylmigrering mellom 2-MAG og 1-MAG (Serdarevich, 1967).

Acylmigrering er en spontan prosess (Wang et al., 2020), og variabler som temperatur, løsemiddel, fettsyrelengde, pH og tid vil akselerere eller inhibere isomeriseringen (Compton, Laszlo, & Evans, 2013).

Tidligere forskning viser flere kilder til acylmigrering:

- Temperatur: Acylmigrering øker med økende temperatur (Kodali, Tercyak, Fahey, & Small, 1990) & (Fureby, Virto, Adlercreutz, & Mattiasson, 1996). Den høye temperaturen tilsier at det kreves en høy aktiveringsenergi for å oppnå isomeriseringen (Kodali et al., 1990).
- Løsemiddel: Løsemidler som ikke fremmer acylmigrering er ketoner, etere og toluen (Fureby et al., 1996). Fureby et al. (1996) forskning viser at acylmigrering reduseres ved å benyttet en alkohol som reaksjonsmedium.
- Flere stoffer fremmer acylmigrering:
  - Silicagel fremmer acylmigrering i tørre stoffer (Kodali et al., 1990). Dette skjer ikke når acylglyseridet er løst i et organisk løsemiddel (Kodali et al., 1990).
  - Aminopropyl: I Fagan et al. (2004) ble det observert opp mot 30 % migrering fra 2-monopalmatin til 1-monopalmatin i aminopropylkolonner til SPE (Fagan, Wijesundera, & Watkins, 2004). Det ble her også observert mindre migrering i DAG-standarder enn for MAG (Fagan et al., 2004). Det ble derimot ikke observert stor isomerisering i MAG og DAG ved bruk av silica-diol-kolonner (Fagan et al., 2004).

- pH: Acylmigring er både syre og basekatalysert, avhengig av styrken til katalysatoren (Fureby et al., 1996).

#### 2.1.4 Lipiders rolle i ernæring og helse

Fett påvirke matens smak og tekstur, men det viktigste bidraget er at TAG leverer metabolsk energi til kroppen (Gurr et al., 2016a; Gurr, Harwood, Frayn, Murphy, & Michell, 2016c). Rundt 90 % av alle lipidene mennesker får via kosten er TAG, og dette tilsvarer rundt 35 til 45 % av alt energiinntaket ifra kosten (Gurr et al., 2016c). Hovedkomponentene fra disse lipidene er fettsyrer (Yaqoob, 2013). De resterende lipidene kommer i form av fosfolipider, glykolipider, andre komplekse lipider og kolesterol (Yaqoob, 2013)

Hvor mye energi TAG gir baserer seg på fordøybarheten til fett og lengden til fettsyrene (Gurr et al., 2016c). Kaloriinntaket fra fett er 9kcal/g, noe som er mer enn det dobbelt av hva man får fra proteiner og karbohydrater (begge 4 kcal/g) (Yaqoob, 2013).

Lipider har også andre essensielle funksjoner i kroppen. Fosfolipider og sphingolipider danner det lipide dobbeltlaget i cellemembranen, noe som gir membranen amfifile egenskaper dvs gir både hydrofobiske og hydrofile egenskaper i cellemembranen (Yaqoob, 2013). Lengde og metningsgrad til fettsyrene er viktig for å bestemme egenskapene til cellemembranen og fettsyrene som inntas via kostholdet vil til en viss grad påvirke cellemembranen (Yaqoob, 2013).

To essensielle fettsyrer linolsyre (18:2n-6) og alfa-linoleninsyre (18:3n-3) kan ikke lages av menneskekroppen, og trengs derfor å tilføres via kostholdet (Gurr et al., 2016c). Disse er viktige da de er byggesteiner for C20 og C22 flerumettede fettsyrer, som igjen er byggesteiner for hormonlignende stoffer kalt eikosanoider (Yaqoob, 2013). Eikosanoider er signalmolekyler som har biologiske effekter på ulike cellyper (Gurr et al., 2016c).

Inntaket av mettet fett er ofte assosiert med økt risiko for hjerte og karsykdommer (Santos, Oliveira, & Lopes, 2013). Tradisjonelt har forholdet mellom mettet fett og hjertesykdommer blitt forklart med at inntaket av mettet fett øker mengden LDL-kolesterol i kroppen (Siri-Tarino, Sun, Hu, & Krauss, 2010). LDL og HDL-kolesterol er henholdsvis kjent som det «dårlige» og «gode» kolesterolet. Det er økt risiko når LDL til HDL-forholdet er høyt (Siri-Tarino et al., 2010). Forskjellige fettsyrer har forskjellig innvirkning på LDL og HDL. C12:0, C14:0 og C16:0 viser LDL-økende egenskaper. C12:0 viser også HDL-økende egenskaper, mens C18:0 har ingen innvirkning (Siri-Tarino et al., 2010). Kronisk, lavgrads betennelse er

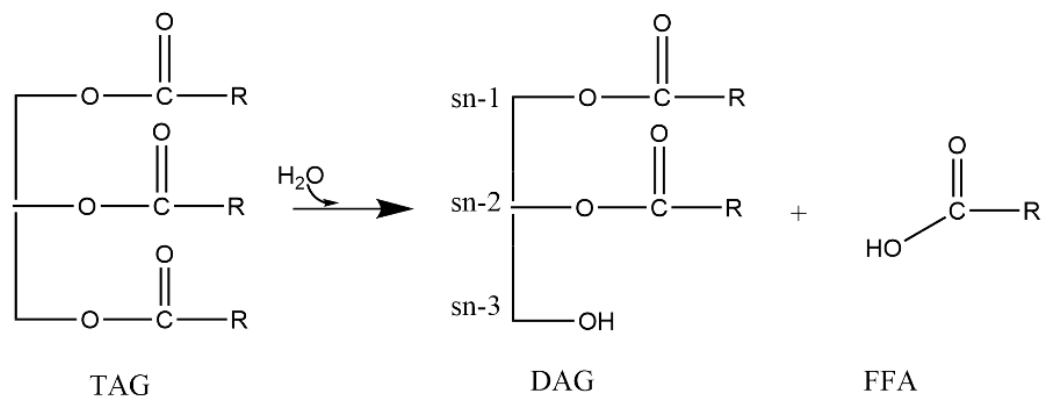
ofte funnet i tidlige stadier av hjerte og karsykdommer (Harris et al., 2019). Studier viser også at mettet fett fremmer betennelsesprosesser i kroppen (Harris et al., 2019). Hvordan mettet fett påvirker lavgradig betennelse baserer seg på flere faktorer, som kjedelengden til fettsyren, samt andre diettkomponenter og livsstilsfaktorer (Ruiz-Núñez, Dijck-Brouwer, & Muskiet, 2016).

Forskere er noe uenig i hvor mye de typiske kildene til mettet fett påvirker hjerte og karsykdom. Ifølge ernæringsforsker Arne Astrup, er det flere matgrupper som er rike på mettet fett som ikke lenger assosiert med hjerte og karsykdommer (Astrup et al., 2020). I artikkelen nevnes det at melk og yoghurt er omvendt assosiert med hjerte og karsykdommer, og at meieriprodukter med høyt fettinnhold kan hjelpe med å forebygge diabetes type 2 (Astrup et al., 2020). Forklaringen på dette er at melkefett-globulen inneholder forskjellige fettsyrer, proteiner (myse og kasein), samt mineraler som kalsium, magnesium og fosfat. Yoghurt og ost inneholder også probiotika og bioaktive peptider, kortkjedede fettsyrer og vitamin K2, noe som gjør at helseeffekten ikke kan bestemmes av mengden mettet fett (Astrup et al., 2020). Helsedirektoratet anbefaler fortsatt å bytte ut matvarer med mettet fett til fordel for matvarer med flerumettet fett (Helsedirektoratet, 2018).

#### 2.1.5 Fordøyelse av lipider

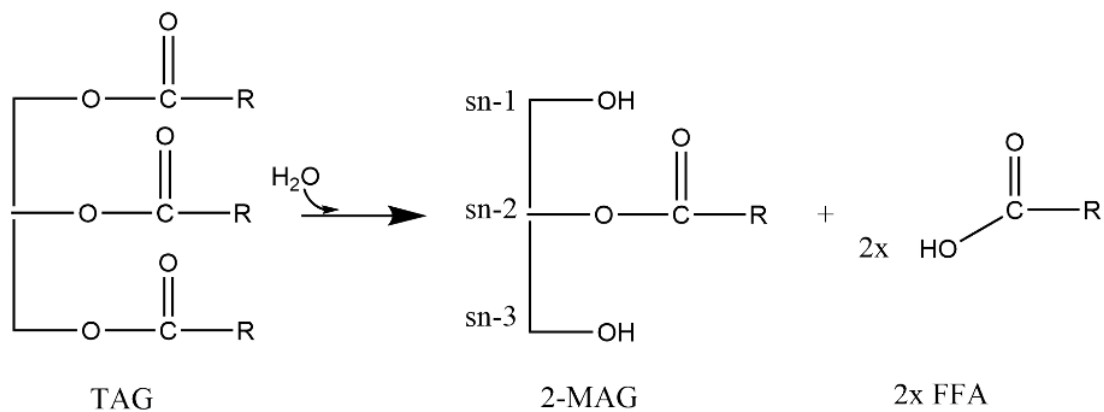
Som nevnt er hoveddelen av lipidene triacylglycerider. Siden TAG er upolare, ikke-vannløselige stoffer trenger TAG å hydrolyseres til mer polare produkter for å kunne krysse cellemembraner og må derfor delvis hydrolyseres for å kunne absorberes i kroppen (Gurr, Harwood, Frayn, Murphy, & Michell, 2016b). Det meste av næringsfettet består av fettemulisjoner (fettkuler) med en kjerne av TAG (Bergström, 1993). Fordøyelsen skjer ved fettavspaltene enzymer kalt lipaser. Lipaser er typoselektive, regioselektive og stereoselektive i reaksjonen med TAG (Mitchell, Rodriguez, Carriere, & Krieger, 2008). Dette betyr at lipasen kan være selektive til å kun angripe spesielle fettsyrer eller posisjoner i TAG. Sammen er gastrisk og pankreatisk lipase (HGL og HPL) spesialisert til å fjerne fettsyrene i sn-1 og sn-3 i TAG (Mitchell et al., 2008).

Fordøyelsen starter i magesekken med gastrisk lipase. Gastrisk lipase hydrolyserer primært TAG til DAG + 1 FFA (Carrière, Barrowman, Verger, & René, 1993). Dette er illustrert i figur 2.1.6. Fra figuren kan man merke seg at fettsyren i sn-3 posisjon som oftest spaltes av (Miled et al., 2020). Rundt 17,5 % av TAG hydrolyseres i magen (Carrière et al., 1993).

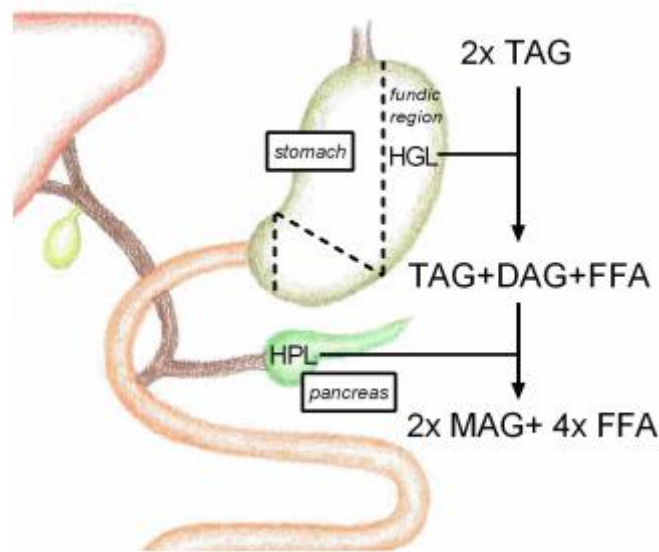


**Figur 2.1.6:** Nedbryting av TAG til DAG + fri fettsyre.

Videre overføres en miks (kalt «chyme») av de gastrisk-fordøyde lipidene inn i tynntarmen (nærmere bestemt tolvfingertarmen) hvor *lipolyse* (hovedsakelig ved hjelp av HPL-enzym fra bukspyttkjertel) hydrolyserer TAG til MAG + 2 fettsyrer (Aarak, 2013). Dette er illustrert i figur 2.1.7. Her er det fettsyrene i posisjon 1 og 3 som oftest spaltes av, noe som gir en 2-MAG (Mattson & Volpenhein, 1963). Hele hydrolyseringsprosessen av TAG til MAG og FFA er illustrert i figur 2.1.8.



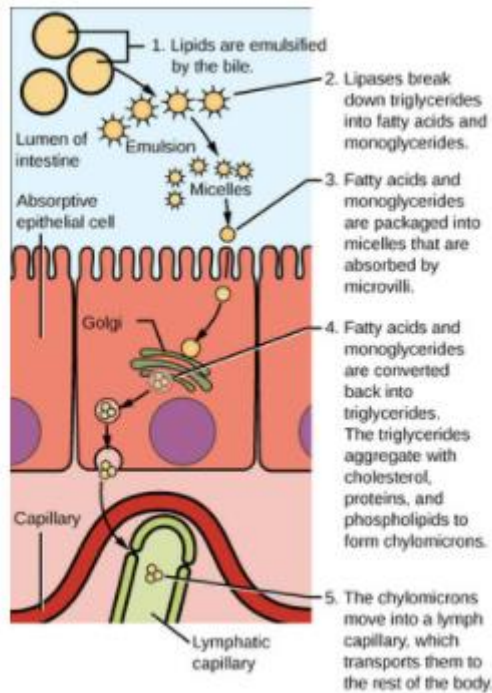
**Figur 2.1.7:** Nedbryting av TAG til MAG + 2 frie fettsyrer.



**Figur 2.1.8:** Nedbryting av TAG til MAG og FFA i magen og tynntarmen (Aarak, 2013).

Fettsyrens kjedelengde har stor innvirkning på hvordan fettsyren absorberes. Kortere fettsyre (<C12) er mer løselige i vandige medier, spesielt når de binder seg til proteinet albumin (Hamilton & Kamp, 2000). Dette gjør at fettsyrene enklere kan diffundere inn i epitelcellene og videre inn i blodstrømmen (Calder, 2016). De lengre fettsyrene (>12) er mer hydrofobe og absorberes ved at gallsalter omringer FFA og MAG og danner små kuler kalt *miceller* (Embleton & Pouton, 1997). *Micellene* beveger seg videre inn i tynntarmen og løser seg opp på grunn av pH-endringer. Dette fører til at FFA og MAG absorberes av absorpsjonsceller i tarmveggen hvor de resynteseres til TAG (Aarak, 2013) & (Lumen, u.d). TAG samler seg med kolesterol, fosfolipider og proteiner og danner lipoproteiner kalt *chylomicroner*. Disse har hydrofile egenskaper, noe som gjør at de kan bevege seg i mer «vandige miljø.» *Chylomicronene* transporteres via lymfekaret, hvor de videre kan forflyttes til hele kroppen. (Lumen, u.d). Lipidfordøyelsen er veldig effektiv og 95-98 % av lipidene i kosten absorberes i tynntarmen (Aarak, 2013). Figur 2.1.9 illustrere prosessen for fordøyelse av TAG.

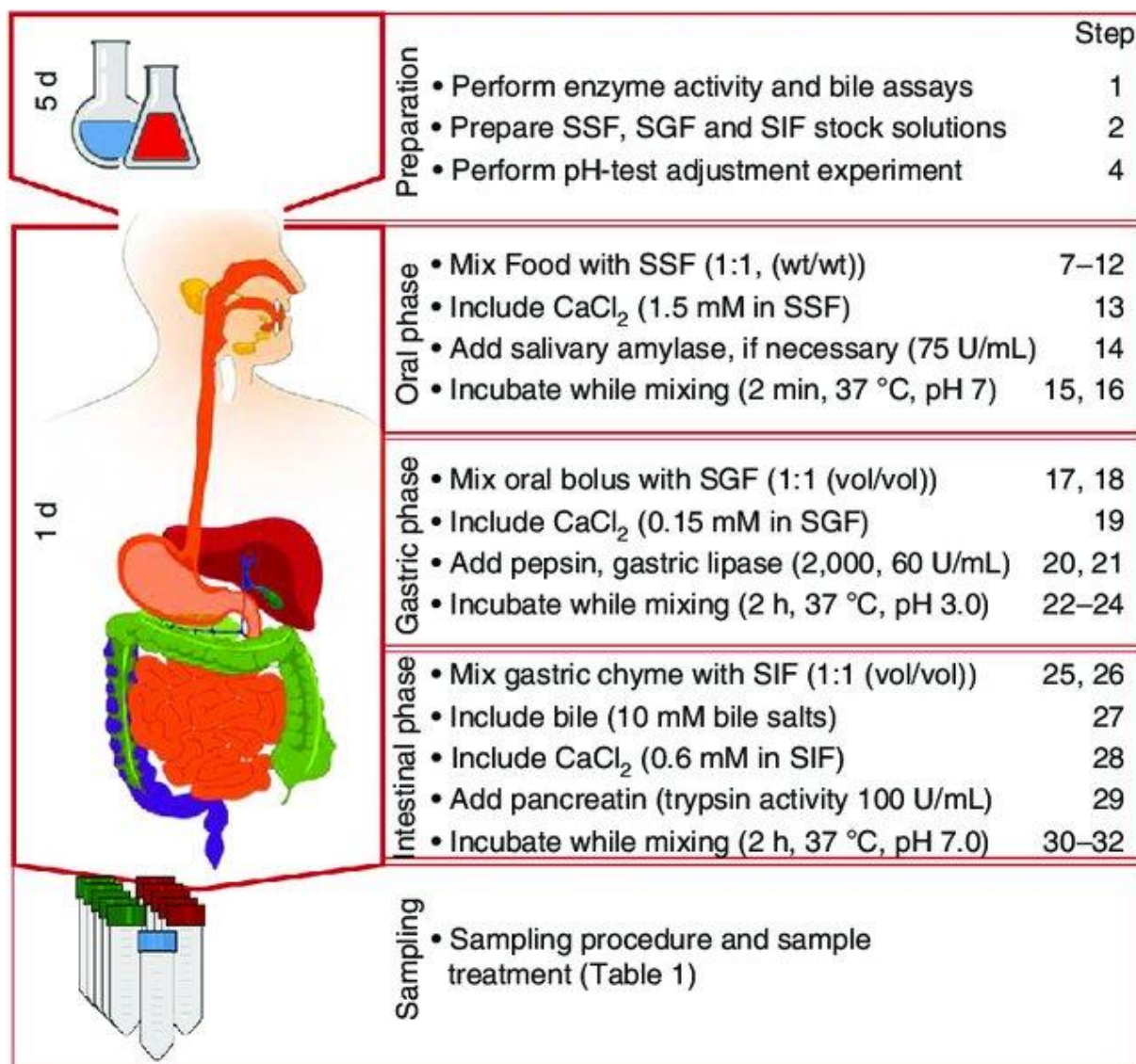




**Figur 2.1.9:** Absorpsjonsprosessen for lipider i kroppen (Lumen, u.d).

Selv om lipasen i fordøyelsen selektivt hydrolyserer fettsyrene i sn-1 og 3 kan det også oppstå 1(3)-MAG etter fordøyelse, enten via isomerisering eller direkte hydrolyse av sn-2 fettsyren (Mattson & Volpenhein, 1963). En svært liten mengde 1(3)-MAG absorberes fordi 1(3)-MAG hydrolyseres til fri fettsyre og glyserol i tarmveggen (Mattson & Volpenhein, 1963).

I denne prosjektoppgaven benyttes en simulert fordøyelsesmetode etter INFOGEST 2.0 modellen (Brodkorb et al., 2019). INFOGEST 2.0 er en standardisert protokoll for fordøyelse av mat-matriser og kan benyttes til analyse av flere fordøyelsesprodukter som peptider, aminosyrer, fettsyrer og enkle sukkerarter (Brodkorb et al., 2019). I modellen simuleres fordøyelse i munn, mage og tarm. Et flyttdiagram av modellen er vist i figur 2.1.10.



**Figur 2.1.10:** Flyttdiagram for INFOGEST 2.0 fordøyelsesmodell. Diagrammet viser forventet tidsbruk i til venstre, beskrivelse av stegene i midten og nummeret til høyere. SGF = simulert magevæse, SIF = simulert tarmvæske og SSF = simulert spyttvæske (Brodkorb et al., 2019).

## 2.2 Melk

Melk er primært sett på som en næringskilde til nyfødte, men melken fra noen dyr, som ku, sau, og geit, er også en viktig del av menneskets kosthold, både som melk og som meieriprodukter (Walstra et al., 2006b). Melk og meieriprodukter er ofte inkludert som viktige elementer i et sunt og balansert kosthold (Pereira, 2014).

Melk betegnes som er veldig variabel biologiske væske, hvor det er stor forskjell i sammensetningen av melken mellom ulike arter (Fox et al., 2015b). Det vil også være individuelle forskjeller i melkesammensetningen mellom individer innenfor samme art. Faktorer som rase, laktasjonsperiode, kost, årstid, helse og alder påvirke næringsinnholdet (Fox et al., 2015b). Tabell 2.2.1 viser et typisk eksempel næringsinnholdet i kumelk (Walstra et al., 2006b).

**Tabell 2.2.1:** Typisk sammensetning av kumelk (Walstra et al., 2006b).

<b>Komponent</b>	<b>Gjennomsnittlig mengde i melk (% w/w)</b>	<b>Område (% w/w)</b>	<b>Gj.snittlig mengde i tørrstoff (% w/w)</b>
Vann	87,1	85,3 – 88,7	–
Faststoff (ikke-fett)	8,9	7,9 – 10	–
Fett i tørrstoff	31	22 – 38	–
Laktose	4,6	3,8 – 5,3	36
Fett	4,0	2,5 – 5,5	31
Protein	3,3	2,3 – 4,4	25
Casein	2,6	1,7 – 3,5	20
Mineraler	0,7	0,57 – 0,83	5,4
Organiske syrer	0,17	0,12 – 0,21	1,3
Annet	0,15	–	1,2

Fra tabellen kan man se at kumelk inneholder rundt 2,5 – 5,5 % fett. Melkefettet består av små, mikroskopiske fettglobuler emulert av en vandig fase. Fettglobulen har en kjerne av upolare lipider (primært TAG) dekket av en globulmembran bestående av polare lipider (primært fosfolipider), glykolipider, proteiner (Bernard et al., 2018), samt kalsium, magnesium og fosfat (Astrup et al., 2020). Melkefettet består i hovedsak av TAG, men inneholder også små mengder DAG, polare lipider (primært fosfolipider), kolesterol og frie fettsyrer. Det er også spormengder av andre lipidkomponenter som MAG, og fettløselighet vitaminer (Bernard

et al., 2018). Tabell 2.2.2 viser en oversikt over typiske lipidklasseverdier i melk fra ku, geit og sau.

**Tabell 2.2.2:** Fordeling av lipidklasser i kumelk, geitemelk og sauemelk (Bernard et al., 2018). Tabellen viser de forskjellige lipidklassene i prosent av totalt fettinnhold, samt vitamininnholdet i µg/L melk.

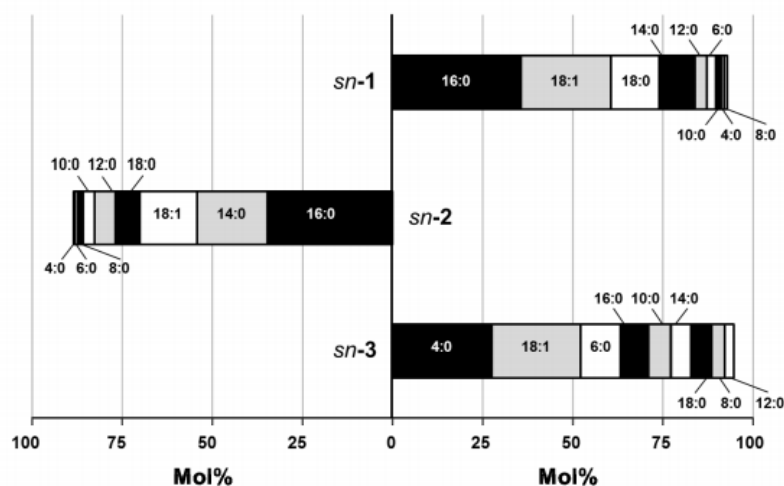
	<b>Ku</b>	<b>Geit</b>	<b>Sau</b>
Triacylglyserider (%)	98,9 – 99,3	99,6 – 99,7	99,4 – 99,8
Diacylglyserider (%)	0,59 – 0,98	0,23 – 0,29	0,06 – 0,49
Monacylglyserider (%)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Kolestrolestere (%)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Kolesterol og frie fettsyrer (%)	0,07 – 0,12	0,07 – 0,10	0,02 – 0,17
Fosfolipider (%)	≈ 1	≈ 1	≈ 1
Vitamin A (µg/L)	378 – 520	400 – 622	438 – 830
Vitamin D (µg/L)	0,30 – 1,32	0,25 – 1,10	1,80 – 1,8
Vitamin E (µg/L)	700 – 1120	300 – 670	1100 – 1100
Vitamin K (µg/L)	2.1 – 19.7	–	–

Melkefett ses ofte på som en av de mest komplekse naturlige kildene til fett. Dette skyldes at melken kan inneholde over 400 forskjellige fettsyrer, men de fleste fettsyrene finnes bare i spormengder (Fox et al., 2015b). Fettsyreprofilen er en viktig faktor for å bestemme egenskapene til fett, da fettsyrene bestemmer smeltepunkt, kjemisk reaktivitet og næringsverdier (Walstra, Wouters, & Geurts, 2006a). Som med næringsinnholdet, vil også fettsyreprofilen variere mellom individer. Det er typisk at det er markante sesongmønstre i fettsyreprofilen (Fox et al., 2015b) og fettsyreprofilen påvirkes i stor grad av dyrets fôr (Yaqoob, 2013). Når melkefett biosyntetiseres er den strukturelle sammensetning av TAG ikke tilfeldig og det observeres markante trender i kumelk:

- Melkefettet inneholder 15 – 20 % kortkjedete fettsyrer (C4:0 til C10:0) (Fox et al., 2015b).
  - De korte fettsyrene vil primært forestre seg i sn-3 posisjon (Fox et al., 2015b). Spesielt C4:0 er eksklusiv til sn-3 (Kemppinen, 2018).
- Rundt 70 % er mettede fettsyrer (Walstra et al., 2006a).
  - C12:0 og C14:0 vil primært esterifiseres i sn-2 posisjon (Kemppinen, 2018).
  - C16:0 vil esterifisere seg i like forhold i sn-1 og sn-2 (Kemppinen, 2018).

- C18:0 vil primært være i sn-1 (Fox et al., 2015b) & (Kemppinen, 2018).
- Umettede fettsyrer fordeler seg imellom sn-1 og sn-3, ofte i like forhold (Fox et al., 2015b).
  - Oljesyre (C18:1<sub>cis9</sub>) utgjøre mesteparten av de umettede fettsyrene i kumelk (Walstra et al., 2006a).
  - Både *cis* og *trans*-isomerer kan forekomme og opp mot ca. 5 % av de umettede fettsyrene kan være *trans*-fettsyrer (Fox et al., 2015b).
- Melkefettet kan også inneholde små konsentrasjonen er keto eller hydroksi-syrer (Fox et al., 2015b).
- Forgrenede fettsyrer er også normalt forekommende (Walstra et al., 2006a).
- De mest utbredte fettsyrene i de forskjellige posisjonene i TAG fra kumelk er (Kemppinen, 2018):
  - C16:0, C18:0 og C18:1 for sn-1.
  - C16:0, C14:0 og C18:1 for sn-2.
  - C4:0, C6:0 og C18:1 for sn-3.

Figur 2.2.1 viser en oversikt over de mest utbredte fettsyrene i sn-posisjonene til TAG i kumelk. Andre typiske fettsyrer funnet i melk fra ku, geit og sau vises i tabell 2.2.3.



**Figur 2.2.1:** Fordeling av de mest utbredte fettsyrene i sn posisjonen til TAG fra kumelk (Kemppinen, 2018). Verdiene i figuren er gjennomsnittsverdien fra tre referanser (W. Christie & Clapperton, 1982), (Parodi, 1979) & (Blasi et al., 2012).

**Tabell 2.2.3:** Hovedfettsyrer funnet i TAG i melk fra ku, sau og geit (Fox et al., 2015b).

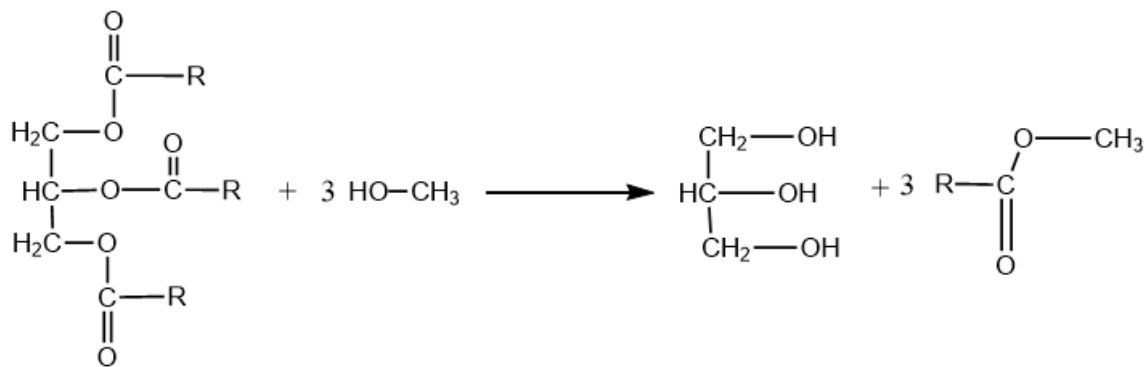
Art	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20 - C22
	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %
Ku	3,3	1,6	1,3	3,0	3,1	9,5	26,3	2,3	14,6	29,8	2,4	0,8	T
Sau	4,0	2,8	2,7	9,0	5,4	11,8	25,4	3,4	9,0	20,0	2,1	1,4	T
Geit	2,6	2,9	2,7	8,4	3,3	10,3	24,6	2,2	12,5	28,5	2,2	—	—

## 2.3 Instrumenter og analyseteknikker

### 2.3.1 Lipidekstraksjon og derivatisering

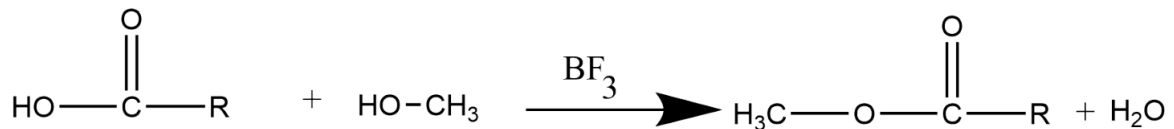
Klassisk analyse av fettsyrer innebærer først å ha en metode for å ekstrahere fett fra en organisk matriks (Hoffmann & Stroobant, 2012a). Det finnes flere forskjellige metoder for å ekstrahere ut fett, men en av de mest anvendte metodene er Folch-metoden (Folch, M. Lees, & Stanley, 1957). Metoden benytter et todelt løsemiddelsystem bestående av kloroform og metanol (typisk 2:1-volumforhold) (Folch et al., 1957). En annen mye brukt metode er Bligh:Dyer-metoden som benytter en blanding av kloroform:metanol:vann (typisk 2:2:1,8-volumforhold) (Bligh & Dyer, 1959).

Lipidene vill primært sett bestå av frie fettsyrer og acylglyserider. På grunn av varierende grad av termisk stabilitet og flyktighet på lipidene er det normalt å derivatiseres fettsyrene og acylglyseridene til fettsyrestere før analyse (Chiu & Kuo, 2020). Derivatisering med metanol til fettsyremetylestere (FAME) er den mest anvendte teknikken, men andre alkoholer, som etanol og propanol, kan benyttes. En mye bruk metode for derivatisering av acylglyserider til FAME er ved basekatalysert omestering med metanol og metallisk natrium (Chiu & Kuo, 2020) & (Devle, Rukke, Naess-Andresen, & Ekeberg, 2009). Reaksjon for omestering er vist i figur 2.3.1.



**Figur 2.3.1:** Omestering av TAG til FAME.

Derivatisering av FFA til FAME kan gjøres ved å varme opp FFA sammen med metanol og en katalysator, som bortrifluorid (BF<sub>3</sub>). Reaksjonen er vist i figur 2.3.2



**Figur 2.3.2:** Esterifisering av en fri fettsyre ved bruk av metanol og  $\text{BF}_3$ .

Historisk benyttes gasskromatografi for analyse av FAME. Det er da viktig å benytte seg av en kolonne som effektivt kan separere fettsyrer med forskjellig kjedelengde, metningsgrad, posisjon på dobbeltbinding og *cis/trans*-isomere (Chiu & Kuo, 2020). Kolonner med høy polaritet, som HP-88 cyanopropylkolonner, eller Rtx-2330 (90 % biscyanopropyl / 10 % cyanopropylphenyl polysiloxane) er begge gode eksempler (Agilent, u.d) & (Restek, u.d).

Både MS og FID er ofte brukte detektorer i FAME analyser (Chiu & Kuo, 2020). Fordelen med MS, sammenlignet med FID, er at MS gir strukturell informasjon, og gir bedre selektivitet. Det eksisterer også godt etablerte databaser for massespektra av FAME hvilket er nyttig for identifisering (Chiu & Kuo, 2020). Fordelen med FID er at den er selektiv til å bare detektere komponenter med hydrokarboner og har et høyt dynamisk område (område hvor analytt signal er proporsjonal med analyttkonsentrasjonen) (Gebruers, Courtin, & Delcour, 2009). Det er også mindre forskjell i analyttens responsfaktor ved bruk av FID sammenlignet med MS.

### 2.3.2 Internstandardkvantifisering

Internstandardmetoden er en kvantifiseringsmetode som benytter seg av å sammenligne areal/høyde til analytt mot areal/høyde til en komponent med kjent konsentrasjon (Hoffmann & Stroobant, 2012b). Det er flere krav som må oppfylles for å ha en god internstandard. En god internstandard bør ha tilnærmet like kjemiske og fysikalske egenskaper som analytten, men det skal fortsatt mulig å kunne skille imellom dem. Internstandarden må ikke være tilstede i prøven som analyseres, og den må ikke reagere med analytt (Hoffmann & Stroobant, 2012b). En godt valgt internstandard kan man kompensere for både systematiske og tilfeldige feil som kan oppstå under opparbeidelsesprosessen ved at forholdet imellom analytt og internstandard holder seg stabilt (Hoffmann & Stroobant, 2012b). For analyse av fettsyrer er det normalt å benytte seg av fettsyrer med oddetalls kjedelengder, som C11:0, C13:0, C17:0 og C19:0 siden disse er mindre naturlig forekommende i matriksen (Chiu & Kuo, 2020).

Formel 2.3.1 viser den generelle internstandardmetoden.  $A_x$  og  $C_x$  er areal og konsentrasjon

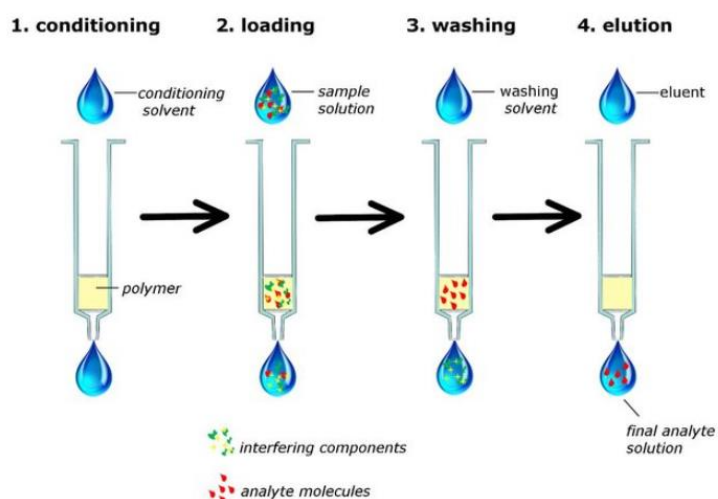


for analytten,  $A_{IS}$  og  $C_{IS}$  er areal og konsentrasjon for internstandarden. RRF er responsfaktoren til instrumentet. RRF beregnes ut ifra formel 2.3.1, ved å bruke kjente verdier på  $C_x$ .

$$\frac{A_x}{C_x} = RRF * \frac{A_{IS}}{C_{IS}} \quad [2.3.1]$$

### 2.3.3 Fastfaseekstraksjon

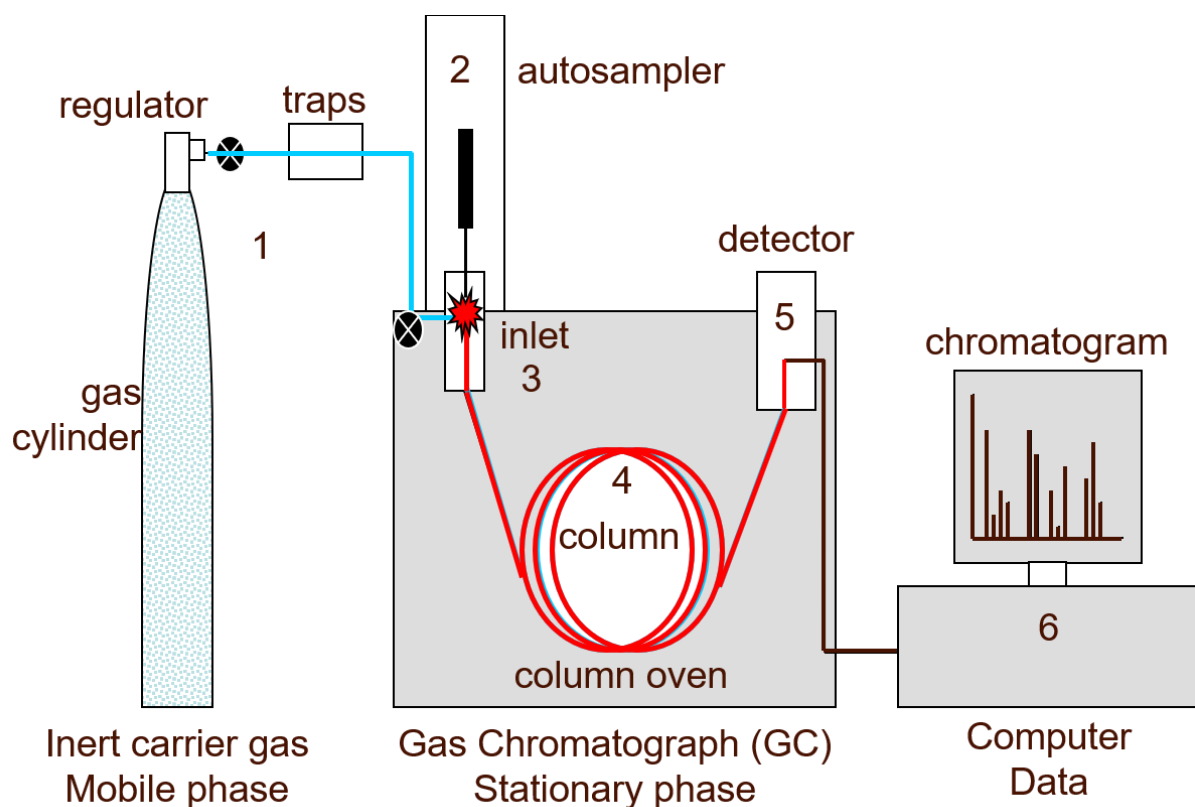
Fastfase-ekstraksjon (SPE) er en separasjonsmetode som benytter væske-faststoffseparasjon (Flurkey, 2006). Prinsipielt består den av en kolonne som inneholder et fast overflatepulver (stasjonærfase), ofte av silica eller modifisert silica, som er bearbeidet til å inneholde spesifikke organiske funksjonelle grupper (Flurkey, 2006). Figur 2.3.3 viser de generelle stegene i en SPE-ekstraksjon. Kolonnen kondisjoneres, noe som vil si at den faste fasen aktiveres for at interaksjoner med analytt blir mulig (Flurkey, 2006). Prøven appliseres på kolonnen og analytt adsorberes på stasjonærfasen. Typiske interaksjoner er ioneoverføring, polare/upolare interaksjoner eller hydrogenbindinger (Flurkey, 2006). Kolonnen vaskes for å fjerne komponenter som fester seg dårlig til stasjonærfasen (Flurkey, 2006). Ofte kan SPE-fraksjonering benyttes til å la ønsket analytt gå gjennom kolonnen, mens urenheter fester seg til kolonnen (Christie, 1992). Til slutt elueres analytt ut med et egnet løsemiddel. Et egnet løsemiddel vil være et løsemiddel som forstyrrer interaksjonene mellom analytt og stasjonærfasen, og løser den adsorberte analytten slik at den blir eluert ut av kolonnen.



**Figur 2.3.3:** Generelle steg i en SPE-ekstraksjon (Sandoval, u.d).

### 2.3.4 Gasskromatografi (GC)

Kromatografi er en samlebetegnelse for flere separasjonsmetoder som baserer seg på at analytt fordeler seg mellom to faser, stasjonærfase (SF) og mobilfasen (MF). Metodene der MF er en væske kalles væskekromatografi (LC) og metodene der MF er en gass kalles gasskromatografi (GC) (Greibrokk, Karlsen, Rasmussen, & Lundanes, 1998b). For gasskromatografi er separasjonsprinsippet at analyttene er både flyktige og termostabile under temperaturene som benyttes i analysen (Greibrokk, Karlsen, Rasmussen, & Lundanes, 1998a). Gasskromatografi deles ofte inn i to ulike typer, *Gas-solid chromatography* (GSC) som benytter er faststoff som stasjonærfase, og *gas-liquid chromatography* (GLC) som benytter en væske som stasjonærfase (Greibrokk et al., 1998a). GLC er den mest utbredte metodene og navnet blir ofte bruk synonymt med GC (Skoog, Holler, & Crouch, 2007a). Et typisk GC-system består primært av seks deler, som er illustrert i figur 2.3.4.



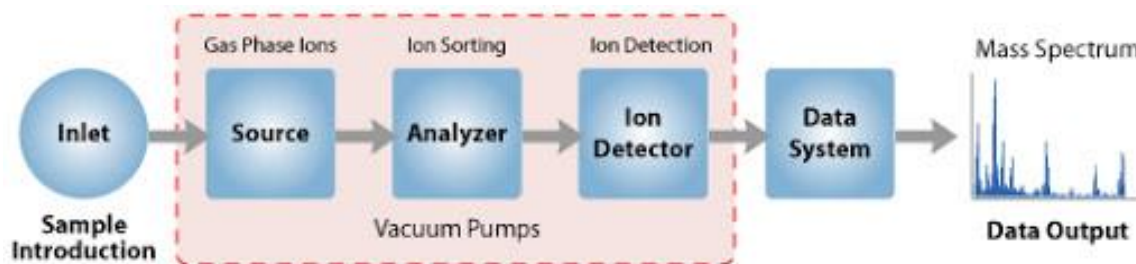
**Figur 2.3.4:** Skisse av et typisk GC-system (Anthias Consulting, 2021).

1. **Mobilfasen, eller bæregassen:** Hensikten med bæregassen er å frakte analytt igjennom kolonnen (Greibrokk et al., 1998a). Det er viktig at gassen ikke reagerer med analytt eller stasjonærfasen (Greibrokk et al., 1998a). De vanligste bæregassene er nitrogen, helium og hydrogen (Greibrokk et al., 1998a).
2. **Injeksjonssystem:** Hensikten med injeksjonssystemet er å introdusere analytt inn i GC-en. Det finnes forskjellige typer injektor, som *on-column-injector*, *splitt* og *splittless* injektor. Analytt kan introduseres som væske, gass eller faststoff (Greibrokk et al., 1998a).
3. **Kolonne med stasjonærfase:** Separasjon mellom analytter skjer i kolonnen. Hva slags stasjonærfase varierer etter hvilke analytter du ønsker å separere, men det er også faktorer som porestørrelse, form og overflateareal som vil påvirke separasjonen (Greibrokk et al., 1998a). Vandrehastigheten til analytt igjennom kolonnen baserer seg på flyktigheten, løseligheten i stasjonærfase og temperatur (Greibrokk et al., 1998a). I gaskromatografi er stasjonærfasen ofte silikonbasert (Greibrokk et al., 1998a).
4. **Kolonneovn:** Kolonneovnens oppgave er å gi kolonnen riktig temperatur. De fleste GC-analyser benytter seg av et temperaturprogram (eller gradient) og det er viktig at ovnen kan øke temperaturen og holde den stabilt, da kolonnetemperaturen styrer retensjonen av analytt (Greibrokk et al., 1998a).
5. **Detektor:** Detektorens jobb er å måle antall molekyler som kommer ut av kolonnen. Detektoren sender et signal som er proporsjonalt med antall molekyler videre til en PC hvor det tegnes et kromatogram. Det finnes flere typer detektorer, som FID og MS (Greibrokk et al., 1998a).
6. **PC:** Datamaskinen bearbeider resultatene og gir et kromatogram. Det er fra denne datamaskinen man ofte styrer analysen. Det finnes flere programmer som kan benyttes til dette som Chromeleon eller Masshunter. Ved bruk av MS får man massespektra i tillegg til kromatogram.

#### 2.3.5 Massespektrometri (MS)

Et massespektrometer (MS) er en massefølsom teknikk for å identifisere, strukturbestemme og massebestemme molekyler (Silverstein, Webster, & Kiemle, 2005a). Prinsippet bak MS er at en komponent overføres til gassfase, ioniseres og ionene separeres i henhold til masse/landingsforhold ( $m/z$ -ratio). En detektor måler antall ioner som treffer den og sende et

proporsjonalt signal videre til en datamaskin som lager et massespekter (Silverstein et al., 2005a). Et typisk MS-system er skissert i figur 2.3.5:

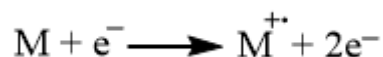


**Figur 2.3.5:** Skisse av et typisk MS-system. (Premier Biosoft, u.d).

Det finnes mange forskjellige ionekilder og massefiltere, men på bakgrunn av at elektronionisering og kvadrupol-massefilter benyttes i oppgaven, fokuserer teorien på disse to.

#### 2.3.5.1: Elektronionisering – EI

Elektronionisering (EI) er en av de mest anvendte ioniseringsmetodene i MS (Silverstein et al., 2005a). Metoden egner seg godt for mange gassfasemolekyler, men gir også en stor grad av fragmentering, noe som gjør at molekylionet ikke alltid kan observeres (Hoffmann & Stroobant, 2012d). Prinsippet bak metoden er at EI-kilden har et oppvarmet filament som det går strøm igjennom, som sen der en elektronstråle mot en anode (typisk potensialforskjell på 70 eV). Molekylene går inn i elektronstrålen og bombarderes av elektroner med høy energi. Dette fører til at molekylet mister ett elektron, og det dannes et radikalt kation kalt molekylion ( $M^{+\bullet}$ ) (Hoffmann & Stroobant, 2012d). Reaksjonsmekanismen vises under:

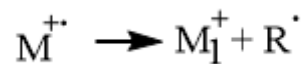


Ioniseringspotensialet til et organisk molekyl er generelt lavere enn 15 eV (Silverstein et al., 2005a). De bombarderende ionene (70 eV) gir fra seg overflødig energi til molekylionet, og det fører til videre bindingsbrudd (fraksjonering) i molekylet. Fraksjoneringen er reproducerbare og karakteristiske for molekylet og er såpass forutsigbart at fragmentering benyttes til å identifisere molekylet som analyseres (Silverstein et al., 2005a). Grad av fragmentering avhenger av energien som tilføres under ioniseringen. Standarden, som er 70

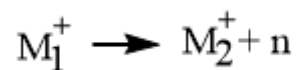
eV, kan i visse tilfeller føre til omfattende fragmentering, noe som igjen kan føre til at signalet blir for svakt (Silverstein et al., 2005a).

Molekylionet er radikale kationer med et oddetalls elektroner, og derfor relativt ustabile. To fragmenteringstyper kan normalt oppstå (Hoffmann & Stroobant, 2012d):

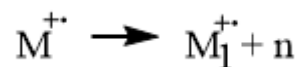
1. Den første fragmenteringen gir et radikal ( $R\cdot$ ) og et produktion ( $M$ ) med partalls elektroner, som vist i reaksjonen under.



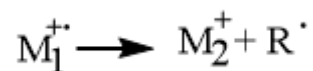
2. Produktionet kan videre fragmenteres ved å spalte av et nøytralt molekyl ( $n$ ).



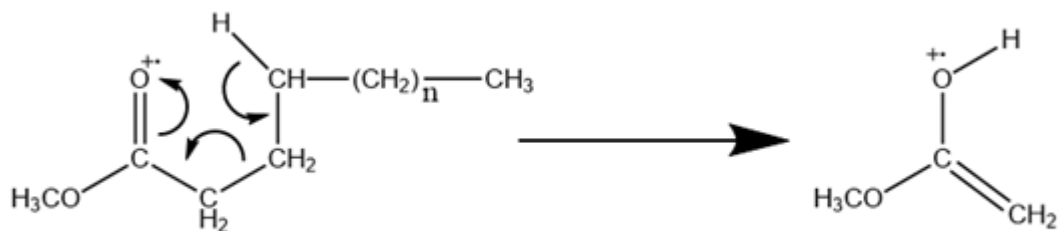
3. Den andre fragmenteringen gir et radikalion (oddetalls molekylion) og et nøytralt molekyl ( $n$ ).



4. Radikalionet kan fragmenteres videre ved å spalte av et radikal.

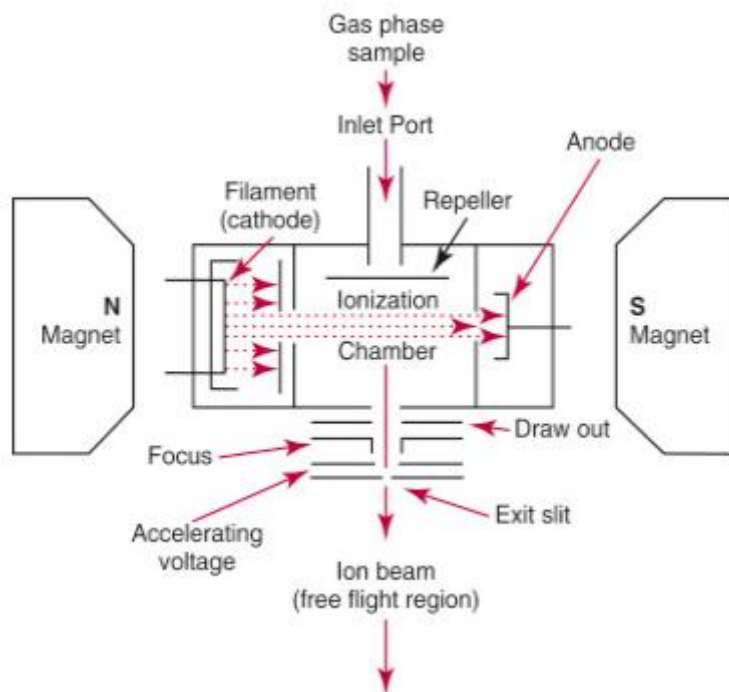


En sentral fragmenteringsmekanisme, spesielt for fettsyrer, er McLafferty omleiring, som vises i figur 2.3.6 (McLafferty, 1959). McLafferty omleiringsionet er sentral i identifisering av de fleste esterderivater av fettsyrer (Christie, 2020b). Omleiringen er stedsspesifikk og hydrogenatomet i posisjon 4 i den alifatiske kjeden migrerer til karbon-metoksigruppen vist i figuren. Figur 2.3.6 viser McLafferty omleiring i en FAME. Dette gir et McLafferty omleiringsion med  $m/z = 74$  (Christie, 2020b).



**Figur 2.3.6:** McLafferty omleiring av en FAME. Mclafferty omleiringsionet vil ha en  $m/z = 74$ .

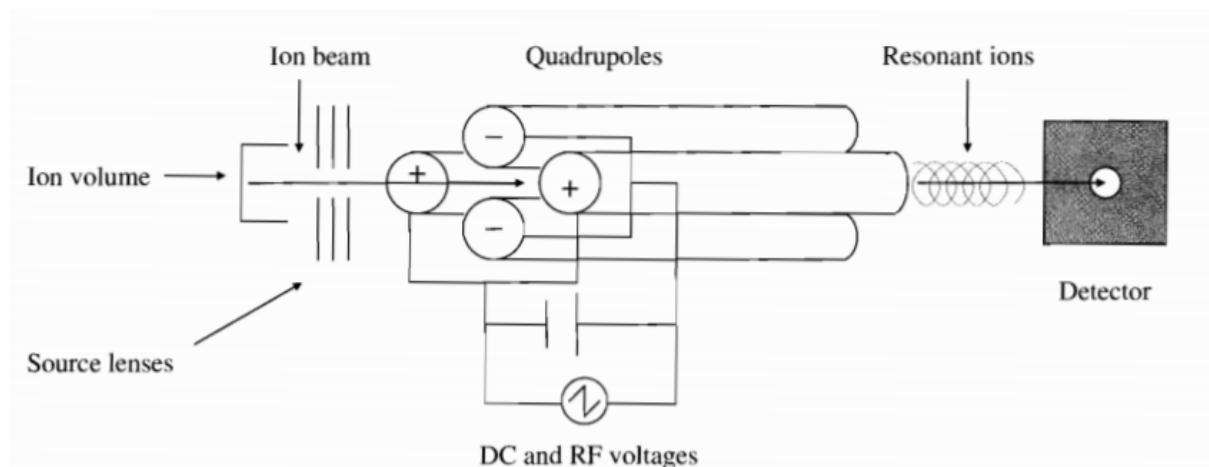
En EI-kilde består av et oppvarmet filament (katode) som sender ut en elektronstråle som fanges opp av en elektronfelle (anode). Elektronstrålen går foran er repeller. Repelleren har et høyere positivt potensiale enn resten av ionekilden og sender alle positivt ladete ioner fremover i ionekilden. En akselasjonsplaten akselererer ionene ut av ionekilden (Rockwood, Kushnir, & Clarke, 2018). EI kilden har også et pumpesystem som gir lavt trykk i systemet. Et typisk EI-system er skissert i figur 2.3.7.



**Figur 2.3.7:** Prinsippskisse av en EI-ionekilde (Rockwood et al., 2018).

### 2.3.5.2: Kvadrupolmassefilter

Et kvadrupolmassefilter består av fire stavformede poler festet parallelt til hverandre som danner et oscillerende elektrisk felt (Silverstein et al., 2005a). Det elektriske feltet genereres ved at polene påsettes en spenning med konstant likevektspotensiale, kombinert med en vekselspenning i radiofrekvensområde (RF-spenning) (Hoffmann & Stroobant, 2012e). Ionene introduseres inn i systemet og i ionene får en oscillerende bevegelse når de beveger seg igjennom kvadrupolen. Ioner med et bestemt  $m/z$ -forhold vil få stabil oscillasjon og kunne slippe igjennom kvadrupolen. De andre ionene vil forbli ustabile, og kollidere med veggen og utlades (Silverstein et al., 2005a). Man kan fortløpende bestemme hvilke  $m/z$  som skal slippes igjennom ved å justere/skane det elektriske feltet. Hele masseområde kan skannes iløpet av millisekunder (Silverstein et al., 2005a). Et typisk kvadrupolmassefilter vises i figur 2.3.8. Sammenlignet med for eksempel et magnetisk sektorinstrument har kvadrupolen både dårligere oppløsning og mindre masseområde (generelt lavere enn 5000  $m/z$ ) (Silverstein et al., 2005a). Fordelen med kvadrupolen er at den er billig og mindre i størrelse, slik at den er godt egnet som et *tabletop*-instrument. Instrumentet har høy sensitivitet og er best egnet på ioner med lav hastighet (Silverstein et al., 2005a).



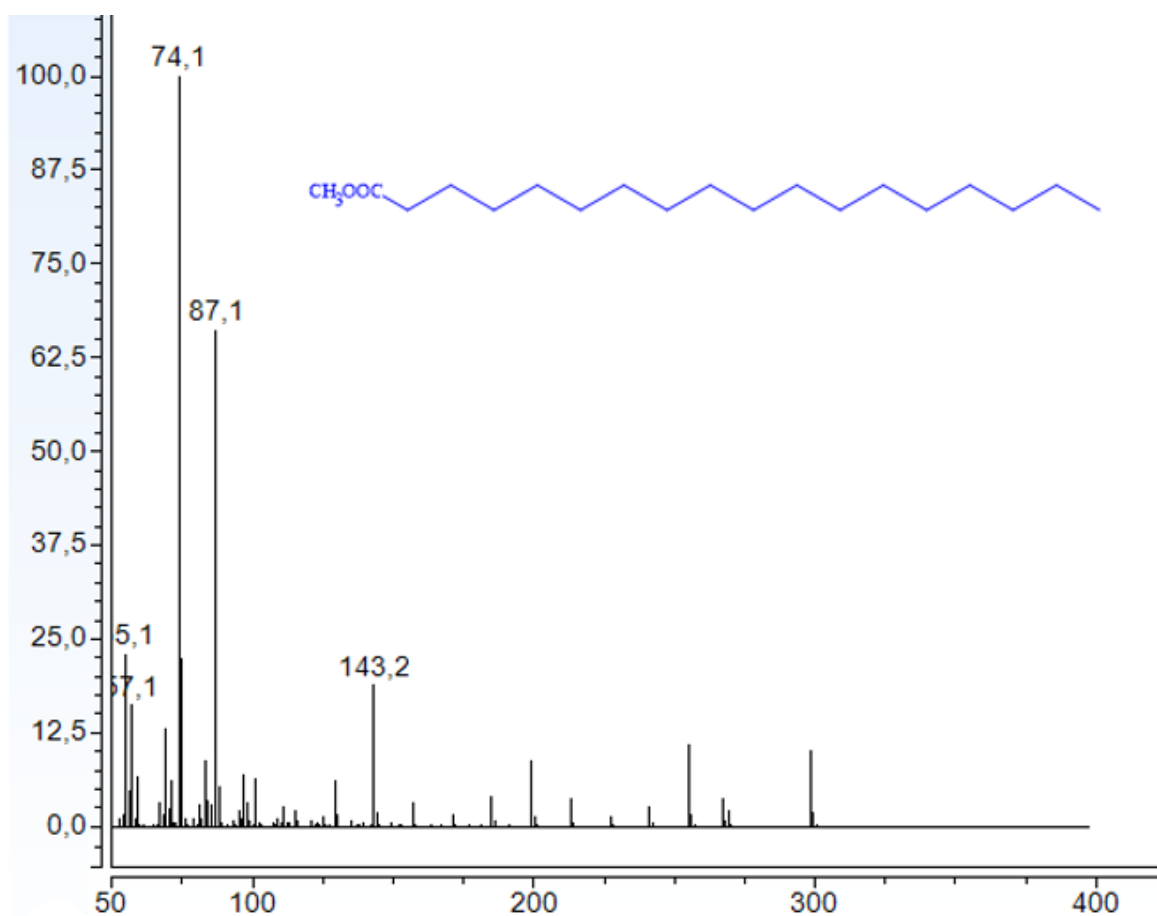
**Figur 2.3.8:** Prinsippkisse av et typisk masse kvadrupolmassefilter, sammen med en detektor (Silverstein et al., 2005a).

### 2.3.5.3: MS av FAME

Fragmenteringsmønstrene er spesifikke for hvert FAME og fettsyren identifiseres ut ifra fragmenteringsmønstre. Her er de mest vanlige fragmenteringstrendene for mettede, umettede og flerumettede fettsyrer i et EI-massespektrometer:

For mettede fettsyrer kan man ta utgangspunkt i spekteret til metylstearate (C18:0 FAME), som er vist i figur 2.3.9. Der kan man se molekylionet ved  $m/z = 298$ . Et annet signal ved 267

viser tap av en metoksi-gruppe  $[M-31]^+$ . Det mest dominerende signalet i mettet FAME vises ved  $m/z = 74$  og kommer av McLafferty omleiring ved ionet  $[\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$  (Mjøs, 2004). En annen typisk fragmenteringsserie er  $[(\text{CH}_2)_n\text{COOCH}_3]^+$ , med  $m/z = 87$  ( $n = 2$ ) er det vanligste fragmentet, etterfulgt av  $m/z = 143, 199$  og  $255$  ( $n = 6, 10$  og  $14$ ) (Mjøs, 2004). Serien kan observeres ved signaler med 14 AMU imellom seg (Christie, 2020b) & (Hoffmann & Stroobant, 2012c). I figur 4.3.9 kan dette observeres ved toppene på 87, 101, 115, 129, 143, 157, 199 osv. En annen typisk serie er  $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$ , hvor  $m/z = 43$  og  $57$  ( $n = 3$  og  $4$ ) er de mest utbredte ionene (Mjøs, 2004).

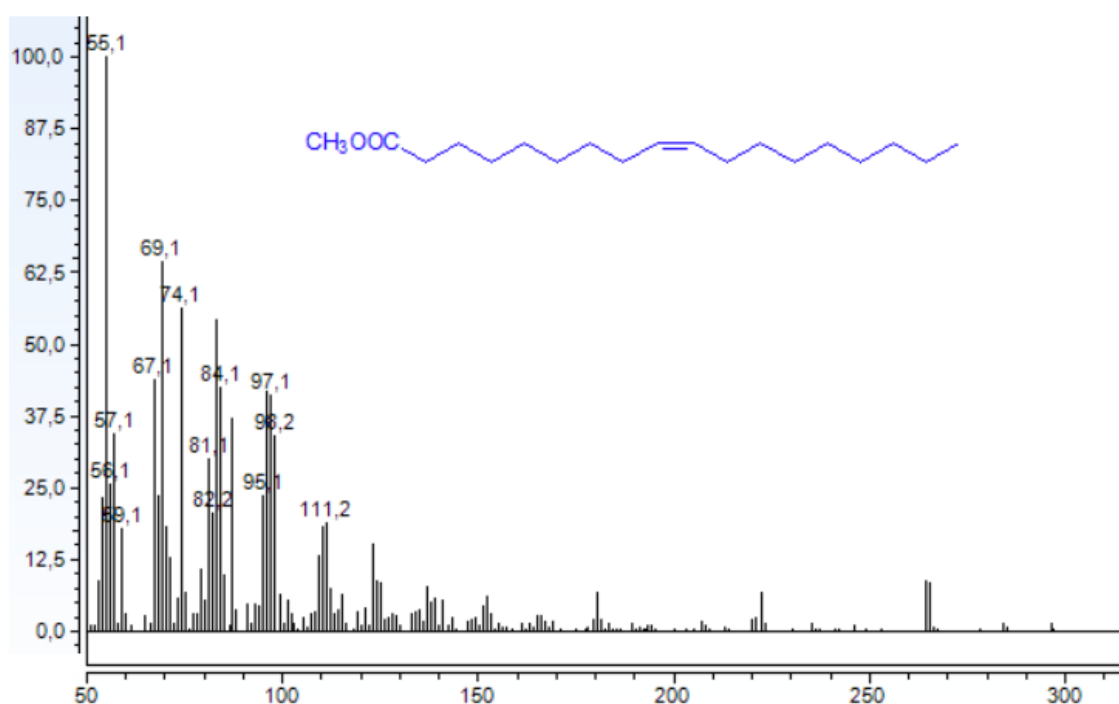


**Figur 2.3.9:** EI-spekter av metylstearate. Molekylionet ligger på 298. Tap av en metoksigruppe  $[M-31]^+$  kan ses ved 267. Tap av 14 AMU vises ved 87, 101, 115, 129, osv.  $m/z = 74$  viser McLafferty omleiring. Signalene ved 143, 199, 255 osv. kommer fra serien  $[(\text{CH}_2)_n\text{COOCH}_3]^+$ .

Umettede fettsyrer er noe vanskeligere å identifisere (Christie, 2020a). Figur 2.3.10 viser EI-spekteret til metyloleate (C18:1cis9 FAME). Både McLafferty omleiring ved 74 og tap av en metoksigruppe med  $[M-31]^+$  kan observeres. McLafferty ionet er svakere ved umettede fettsyrer enn med mettede. Når et molekyl ioniseres kan dobbeltbindingene migrere (Christie,



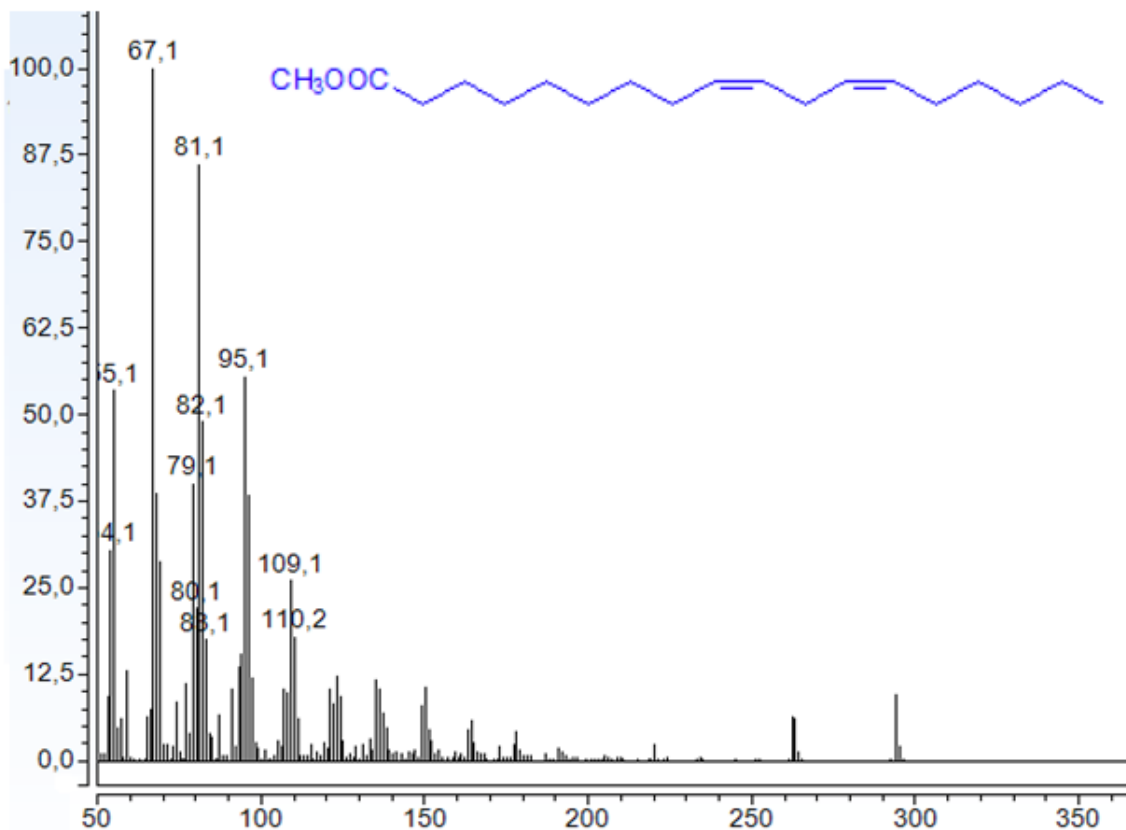
2020b) og når et hydrogenatom i posisjon 4 er substituert (for eksempel på grunn av dobbeltbinding), har McLafferty ionet lavere intensitet. Denne trenden øker ved økende grad av umettethet (Christie, 2020b). Det mest dominerende signalet kommer fra ionet  $[C_nH_{2n-1}]^+$  og vil være på  $m/z = 55$  ( $n = 4$ ) (Mjøs, 2004). Å bestemme posisjonen på dobbeltbindingene er utfordrende. I Mjøs hevdes det at posisjonen til den første dobbeltbindingen kan bestemmes ut ifra ionet  $[C_nH_{2n-4}]^+$ . Eksempelvis vil n-3 fettsyrer ha en topp ved  $m/z$  108, n-4 ved 122 og n-6 ved 150 (Mjøs, 2004). Christie (2020a) hevder at på bakgrunn av at dobbeltbåndene migrer når karbonylkjeden ioniseres, at dette er umulig. *Cis* og *trans* isomere er ofte vanskelige å skille imellom på grunn av veldig like spektra (Christie, 2020a).



**Figur 2.3.10:** EI-spekter av metylolate. Molekylion vises ved  $m/z = 296$ . Tap av en metoksigruppe  $[M-31]^+$  kan ses ved 265 (og 264 ved tap av metanol).  $m/z = 74$  viser McLafferty omleiring (og tap av McLafferty-ionet ved 222  $[M-74]^+$ ).  $[C_nH_{2n-1}]^+$  vises ved 55, 69, 83, 97, osv.

Flerumettete fettsyrer med 2 dobbeltbindinger vil følge serien  $[C_nH_{2n-3}]^+$ , med  $m/z = 67$  ( $n = 5$ ) og  $m/z = 81$  ( $n = 6$ ) som dominerende ioner (Mjøs, 2004). Figur 3.2.11 viser EI-spekteret til metyl-linoleate (C18:2n-6). Molekylionet kan ses ved  $m/z = 294$ . Et svakt signal av  $m/z = 74$  viser McLafferty-ionet. Tap av McLafferty-ion  $[M-74]^+$  kan observeres ved  $m/z = 220$ .  $[M-31]^+$  kan observeres ved  $m/z = 263$ . Den generelle formelen for hydrokarbon-ioner kan ses ved  $[C_nH_{2n-3}]^+$  i det lave masseområdet ved  $m/z = 67, 81, 95, 109, 123$  osv. For tre eller flere

dobbelbindinger følges serien  $[C_nH_{2n-5}]^+$ , og har ofte et dominerende signal ved  $m/z = 79$  (Mjøs, 2004).



**Figur 2.3.11:** EI-spekter av metyllinoleate. Molekylion vises ved  $m/z = 294$ . Tap av en metoksigruppe  $[M-31]^+$  kan ses ved 265 (og 264 ved tap av metanol).  $m/z = 74$  viser McLafferty omleiring (og tap av McLafferty-ionet ved 222  $[M-74]^+$ ).  $[C_nH_{2n-1}]^+$  vises ved 55, 69, 83, 97, osv.

### 2.3.6 Kjernemagnetisk resonans (NMR)

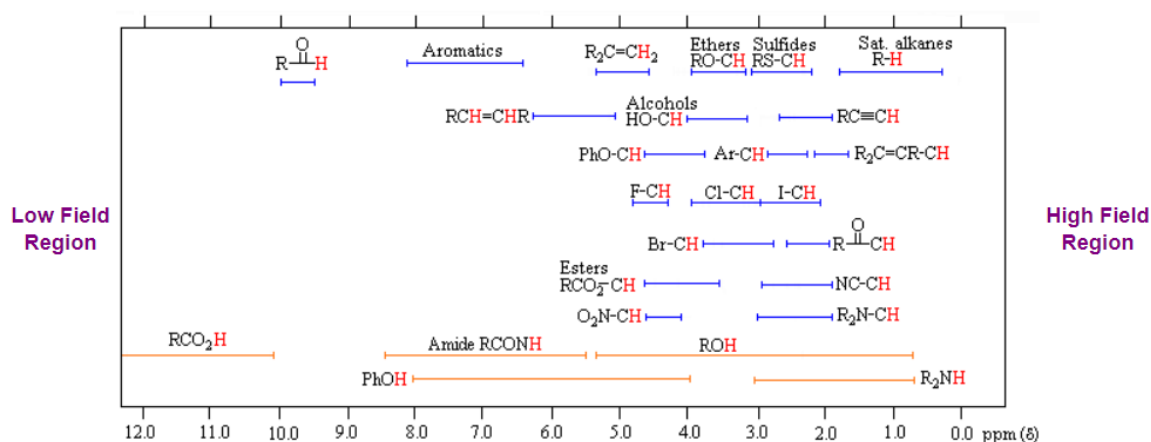
Kjernemagnetisk resonans (NMR) er en form for absorpsjonsspektroskopi hvor, under egnede forhold i et magnetisk felt, et molekyl kan absorbere elektromagnetisk stråling i radiofrekvensområdet etter karakteriserende trekk for molekylet (Silverstein, Webster, & Kiemle, 2005b). Absorpsjonen er en funksjon av utvalgte nuklider i molekylet. De mest brukte nuklidene er de med et kvantespinn på  $\frac{1}{2}$  og en uniform sfærisk ladningsfordeling som  $^1H$ ,  $^3H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^{19}F$ ,  $^{31}P$ . De mest utbredte metodene er  $^1H$ -NMR og  $^{13}C$ -NMR (Silverstein et al., 2005b).

I  $^1H$ -NMR benyttes  $^1H$  nukleonet til å bestemme strukturen til et molekyl. I et  $^1H$ -NMR-spekter plottes signalintensiteten mot det kjemiske skiftet ( $\delta$ ) til protonet. Det kjemiske skiftet

til et proton er differensen i resonansfrekvens imellom protonet og en referansestandard i et magnetisk felt. Ofte benyttes referansestandarder tetramethylsilane (TMS) til å beregne det kjemiske skiftet (Silverstein et al., 2005b). For eksempel hvis protontoppen har resonansfrekvens på 1200 Hz og instrumentfrekvensen er 300 MHz kan kjemisk skift beregnes slik:

$$\delta = \frac{\text{Signal frekvens} - \text{referansefrekvens}}{\text{Instrument frekvens}} * 10^6 = \frac{1200 \text{ Hz}}{300 \text{ MHz}} = 4 \text{ ppm}$$

Det kjemiske skiftet til et proton vil variere basert på det kjemiske miljøet det er i. Derfor gir «forskjellige» protoner forskjellige signaler. Eksempler på forskjellige kjemiske miljøer kan være atomet protonet er bundet til (som CH eller OH), antall nærliggende protoner (som CH<sub>2</sub> og CH<sub>3</sub>) eller posisjon i molekylet (Silverstein et al., 2005b). Figur 2.3.12 viser en oversikt over typiske kjemiske skift for protoner i forskjellige kjemiske miljøer.



**Figur 2.3.12:** Generelle området for kjemiske skift på utvalgte protoner i molekyler løst i CDCl<sub>3</sub> (Reusch, 2013).

Spin kobling er et annet fenomen som benyttes til å bestemme strukturen til et molekyl via <sup>1</sup>H-NMR. Spin kobling beskriver magnetiske interaksjoner mellom nabo, ikke-ekvivalente protoner. I første ordens spinsystemer er antall toppen protonet viser i spekteret bestemt ut ifra antall nabo-protoner (Silverstein et al., 2005b). Intensiteten til toppene kan beskrives via Pascals triangel, vist i figur 2.3.13. I henhold til figuren kan man se at en singlet vil bestå av 1 topp, dublett (1 nabo proton) vil bestå av to topper med 1:1-forhold, triplett (2 naboproton) vil ha tre topper med 1:2:1-forhold osv.

$n$ Multiplicity	Relative Intensity	Spins	Coupling Pattern
0 Singlet (s)	1		
1 Doublet (d)	1 1	$n = 1$ ↓ ↑	
2 Triplet (t)	1 2 1	$n = 2$ ↓ ↓ ↑	
3 Quartet (q)	1 3 3 1	$n = 2$ ↓ ↓ ↓ ↑	
4 Quintet	1 4 6 4 1	$n = 3$ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑	
5 Sextet	1 5 10 10 5 1	$n = 3$ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑	
6 Septet	1 6 15 20 15 6 1	$n = 3$ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑	
7 Octet	1 7 21 35 35 21 7 1	$n = 3$ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑	
8 Nonet	1 8 28 56 70 56 28 8 1	$n = 3$ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑	

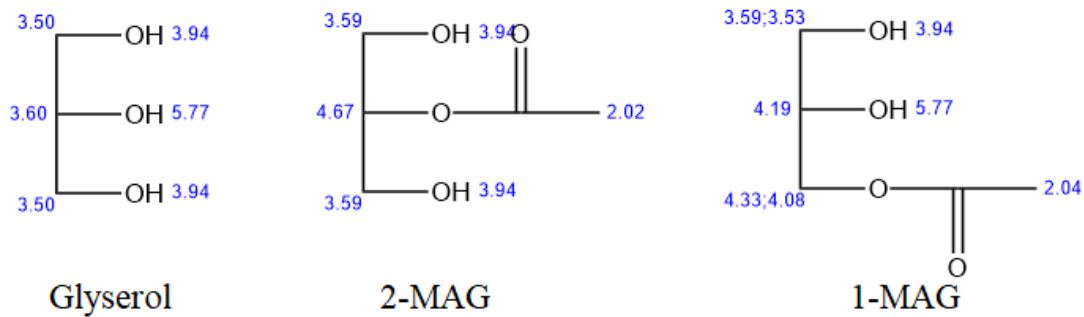
**Figur 2.3.13:** Pascals triangel beskriver hvordan den relative intensiteten til toppene i første ordens multipler.  $n =$  antall nabo proton. (Silverstein et al., 2005b).

### 2.3.6.1 $^1\text{H-NMR}$ monoacylglyserider

En del av masteroppgaven er å identifisere den stereospesifikke posisjonen til fettsyren i monoacylglyseridet etter fordøyelse. Teoretisk kan man identifisere den stereospesifikke posisjonen til fettsyren ut ifra det kjemiske skiftet ( $\delta$ ) til protonene i glyserolkjeden i område 3 – 5 ppm (Nieva-Echevarría, Goicoechea, Manzanos, & Guillén, 2014). Det er to teoretiske grunnlag som tilsier at dette er mulig:

- Symmetri: Grupper med lik symmetri vil absorberes på samme kjemisk skift. Dette kan observeres i glyserol hvor sn-1 og sn-3 posisjonene er like. Sn-1 og sn-3 vil derfor komme som et signal, mens sn-2 vil absorberes ved et annet skift. Det samme vil kunne observeres i 2-MAG, som har 2 symmetriske grupper i sn-1 og sn-3 posisjon. 1-MAG har ingen symmetri og vil få 3 forskjellige signaler. Dette kan observeres i figur 2.3.14
- Ester gir høyere skift til nærliggende protoner enn OH-grupper (Gottlieb, Kotlyar, & Nudelman, 1997).

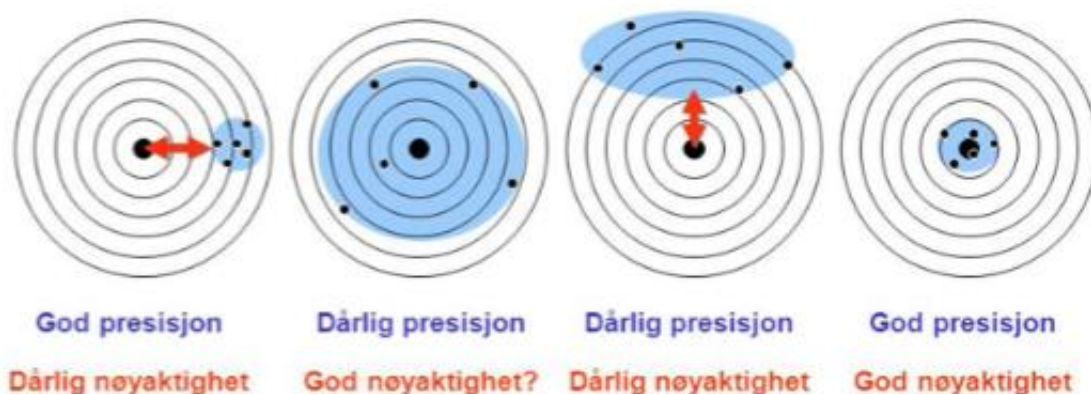
Ut ifra disse to grunnlagene vil det være mulig å skille imellom sn-1 og sn-2. 2-MAG vil ha to symmetriske  $\text{CH}_2\text{-OH}$  og en  $\text{CH-COOR}$  med et høyere skift. 1-MAG har ingen symmetri og vil derfor ha tre forskjellige signaler. Figur 2.3.14 viser teoretiske skift-verdier for glyserol, 1-MAG og 2-MAG.



**Figur 2.3.14:** Teoretiske skiftverdier for glyserol, 2-MAG og 1-MAG. For glyserol kan det observeres to symmetriske grupper (ved 3,5 ppm) og en ikke-symmetrisk gruppe (3,6 ppm). 2-MAG kan det samme observeres, men også at esterbindingen har et betydelig høyere skift. I 1-MAG er det ingen symmetri, og tre forskjellige skiftverdier.

## 2.4 Metodevalidering

Nøkkelen til analytisk kjemi er analysemetoder som gir nøyaktige og pålitelige måleresultater (Green, 1999). For å oppnå dette utføres en metodevalidering av analysen, som vil gi svar på hvor godt egnet metoden er til å analysere en gitt analytt (Miller & Miller, 2010b). Under valideringen utføres analyser av metodens diverse ytelsesparametere (Miller & Miller, 2010b). Hva slags parametere som undersøkes varierer, men følgende parametere er typiske for en metodevalidering. Figur 2.4.1 illustrerer presisjon og nøyaktighet.



**Figur 2.4.1:** Illustrasjon over presisjon og nøyaktighet (Visur, 2020).

**Nøyaktighet:** Et mål for systematiske feil i metoden (Miller & Miller, 2010a). Dette er effekter som fører til at analyseresultatet varierer fra referanseverdien (Hovind, 2006). Eksempler på systematiske effekter kan være interferenser fra andre forbindelser i matrisen, systematisk tap av analytt, og feil med måleutstyr (Hovind, 2006). Nøyaktighet bestemmes ved å sammenligne målte verdier med akseptable referanseverdier (Thompson, Ellison, & Wood, 2002). I denne oppgaven benyttes gjennomsnittet av flere analyseserier til å bestemme metodens nøyaktighet. Formel 2.4.1 benyttes til å beregne nøyaktighet

$$\text{Nøyaktighet (\%)} = \frac{(\text{Reell verdi} - \text{målt verdi})}{\text{Reell verdi}} * 100 \quad [2.4.1]$$

**Presisjon:** Et parameter som forteller oss om spredning imellom resultatene fra en serie med replikatprøver (Miller & Miller, 2010a). Spredning i resultatene kommer fra tilfeldige feil i

analyse, som for eksempel små forskjeller i volum, varierende kontaminering og ustabilitet hos måleinstrumenter (Miller & Miller, 2010a). Presisjon finnes via standard avvik og relativt standard avvik imellom replikatene (Thompson et al., 2002). Formel 2.4.2 og 2.4.3 ble benyttet til å beregne standard avvik og relativt standard avvik for denne oppgaven.

$$SD = \sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad [2.4.2]$$

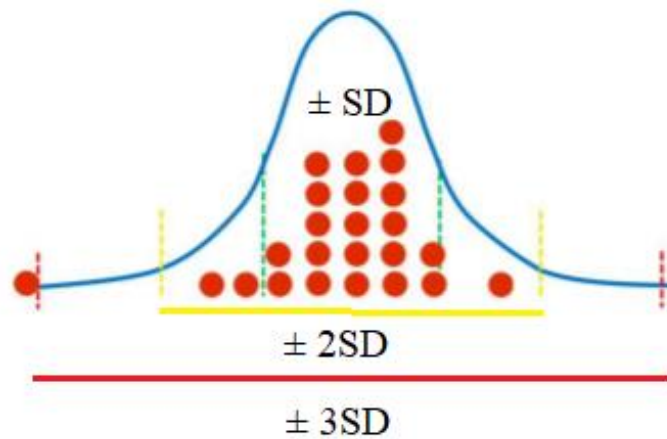
SD ( $\sigma$ ) er standard avvik for prøvene, X er antall prøver benyttet og  $\bar{x}$  er gjennomsnittsverdien til prøvene. Relativt standard avvik (RSD) er definert som  $(\sigma/x) * 100$ .

$$\%RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100 \quad [2.4.3]$$

To typer presisjon bør testes, nemlig metodens repeterbarhet (innen-serie presisjon) og reproduserbarhet. Repeterbarhet er presisjonen innenfor målingen av samme målestørrelse utført under like målebetingelser (Helse Bergen Lab for klinisk biokjemi, 2017). Analysene utføres på replikatprøver i løpet av samme dag, med samme reagenser og samme analytiker. Reproduserbarhet er presisjonen innenfor målingen av samme målestørrelse utført under endrede målebetingelser (Helse Bergen Lab for klinisk biokjemi, 2017). Dette kan for eksempel være over lengre tid, forskjellige reagensflasker og forskjellig utstyr.

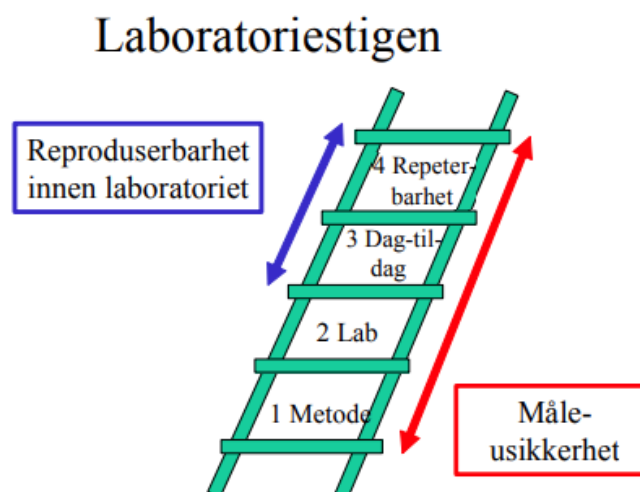
Reproduserbarheten påvirker av dag-til-dag variasjoner som skyldes ulike faktorer, men primært sett er tiden den største faktoren (Hovind, 2006).

Det vil være naturlig at en metode vil inneholde prosessvariasjoner. (Bjørger, u.d), og det er viktig å kunne skille imellom faktorer som gir store problemer for prosessen og ikke-eksisterende problemer (Bjørger, u.d). Sannsynligheten for at et analyseresultat skal falle innenfor de gitte grensene er ofte vist som en normalfordelingskurve, som vises i figur 2.4.2. Teorien tilsier at 68 % av analyseresultatene vil falle innenfor  $\pm$  SD fra middelveien, mens 95 % innenfor  $\pm$  2SD og 99,7 % innenfor 3SD (Bjørger, u.d) & (Hovind, 2006). Når man vurderer metodens repeterbarhet er det akseptabelt at 95 % av resultatene er innenfor 2SD (hvor 19 av 20 resultater bør ligge innenfor dette området) (Hovind, 2006).



**Figur 2.4.2:** Typisk normalfordeling av analyseresultat. 68 % av resultatene er innenfor  $\pm SD$  fra gjennomsnittet, 95 % er innenfor  $\pm 2SD$  og 99,7 % er innenfor  $\pm 3SD$  (Bjørngen, u.d).

**Måleusikkerhet:** Måleusikkerhet er en sammenslåing av nøyaktighet og presisjon (Hovind, 2006). Måleusikkerheten beskriver forholdet imellom måleresultatene og sann verdi til analytt. Usikkerheten beskriver område hvor det er høy sannsynlighet at reell verdi ligger (Hovind, 2006). For eksempel er måleusikkerheten 5 %, er det en høy sannsynlighet at reell verdi er  $\pm 5$  % fra målt verdi. Faktorer som påvirker måleusikkerhet etter laboratoriestigen vist i figur 2.4.3. Trinn 4 og 3 er henholdsvis repeterbarhet og reproduserbarhet. Steg 2 er laboratoriebias (laboratorienøyaktighet) og metodebias (metodenøyaktighet). I denne oppgaven blir måleusikkerheten vurdert ut ifra presisjon og nøyaktighet.



**Figur 2.4.3:** Laboriestigen som beskriver faktorer som påvirker måleusikkerhet (Hovind, 2006).



**Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense:** I et kromatogram er det viktig å kunne skille imellom analytiske topper og støy fra baselinjen. Deteksjonsgrensen (LOD) er definert som den laveste konsentrasjonen av analytt som med en vis grad av riktighet kan detekteres i kromatogrammet (Thompson et al., 2002). Signal/støy-forholdet for LOD bør være minimum 3:1 (Skoog, Holler, & Crouch, 2007b). LOD beregnes ut ifra formel 2.4.4 A, hvor [FAME] er konsentrasjonen av FAME og s/n er signal/støy-forhold.

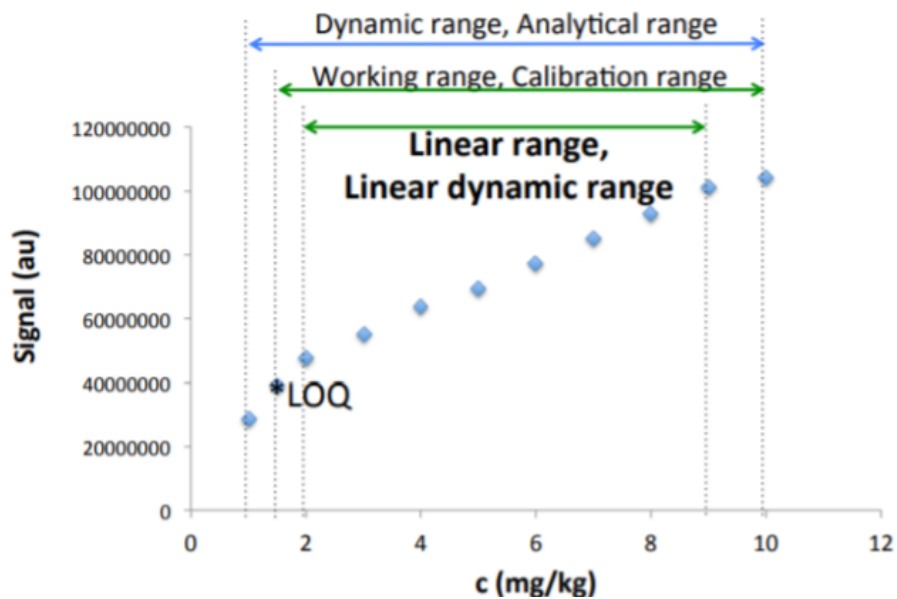
$$LOD = 3 \frac{[FAME]}{\frac{s}{n}} \quad [2.4.4 A]$$

Kvantifiseringsgrense (LOQ) er den laveste analyttkonsentrasjonen som kan kvantifiseres ved en gitt grad av riktighet (Green, 1999). Her skiller man mellom LLOQ, som er laveste kvantifiseringsgrense og ULOQ som er høyeste kvantifiseringsgrense. Signal/støy-forholdet for LOQ bør være minimum 10:1 (Hovind, 2006) & (Thompson et al., 2002). LOQ beregnes ut ifra formel 2.4.4 B.

$$LOQ = 10 \frac{[FAME]}{\frac{s}{n}} \quad [2.4.4 B]$$

**Identitetskriterier:** Identitetskriterier innebærer metodens evne til å analysere riktige analytt (Hibbert, 2007). Dette kan for eksempel være separasjonen mellom fettsyrer i en GC-kolonne eller å kunne skille mellom *cis-trans* isomerer (Hibbert, 2007). *Selektivitet og spesifisitet* er parameteren som benyttes for å måle disse. Selektivitet er metodens evne til å kunne identifisere analytten (Hibbert, 2007). Dette vil for eksempel si at et signal bare kommer fra den analytten (Hibbert, 2007). Hvis en metode er 100 % selektiv kalles dette en *spesifikk* metode for denne analytten (Hibbert, 2007).

**Kalibreringsparametere:** Metoden må kunne gi en direkte sammenligning fra responsen til detektor og konsentrasjonen til både kjente og ukjente analytter (Hibbert, 2007). Her benyttes ofte en kalibreringskurve, som er en konsentrasjonsgradient av standarder, *Linearitet og det lineære området* er metodens evne til å oppnå signaler som er direkte proporsjonal med konsentrasjonen av analytt og konsentrasjonsområde hvor dette er (Hibbert, 2007) & (Green, 1999). Fra figur 2.4.4 kan man se at det lineære området er hvor kurven er rett, det vil si en relativt høy R<sup>2</sup>-verdi.



**Figur 2.4.4:** Eksempel på kalibreringsparametere i en kalibreringskurve (Oldekop, u.d).

*Sensitivitet* er et parameter som beskriver hvor godt metoden håndterer endringer i konsentrasjonen til analytt (Hibbert, 2007). Innenfor det lineære området bør sensitiviteten være konstant (Hibbert, 2007).

**Robusthet:** Metodens robusthet er metodens evne til å holde seg upåvirket ved endringer av eksperimentelle forhold (som eksempel pH, temperatur, kjemikalierenhet og instrumentforhold) (Miller & Miller, 2010b). Robusthet testes ved å utføre små variable endringer i metoden (Thompson et al., 2002).

### 3. Materialer og metoder

#### 3.1 Kjemikalier, materiale og instrumenter

**Tabell 3.1.1:** Kjemikalier brukt i oppgaven med produsent, renhet og CAS-nummer.

<b>Produkt</b>	<b>Produsent</b>	<b>Renhet</b>	<b>CAS-nr.</b>
<b>Boron trifluoride-methanol</b>	Sigma Chemicals, Sveits	14 % BF <sub>3</sub> i metanol	373-57-9
<b>Dietyleter</b>	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA	≥99.8 %	60-29-7
<b>Eddiksyre</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	100 %	64-19-7
<b>Helium</b>	Aga, Norge	6,0	7740-59-7
<b>Iso-propanol</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	100,0 %	67-63-0
<b>Kloroform</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	100 %	67-66-3
<b>Kloroform-[D<sub>1</sub>]</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	99,8 % D	865-49-6
<b>Metanol</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	≥99.9 %	67-56-1
<b>Natrium (s)</b>	Merck, Darmstadt, Germany	Purum	7440-23-5
<b>Natriumklorid</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	100 %	7658-14-5
<b>Nitrogen</b>	Aga, Norge	5,0	7727-37-9
<b>n-Heksan</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	≥97 %	110-54-3
<b>n-Heptan</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	≥99 %	142-82-5
<b>Saltsyre</b>	VWR International AS, Radnor, PA, USA	37 %	7647-01-0

**Tabell 3.1.2:** Standarder brukt i oppgaven med produsent, renhet og CAS-nummer.

Navn	Fettsyre	Produsent	Renhet/grade	CAS
<b>Monoctanoin</b>	C8:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	26402-26-6
<b>Monoundecanoin</b>	C11:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	108652-83-1
<b>Monomyristin</b>	C14:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	589-68-4
<b>Monopalmitin</b>	C16:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	26657-96-5
<b>2-Monopalmitin</b>	C16:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>95 %	23470-00-0
<b>Monostearin</b>	C18:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	31566-31-1
<b>Monoolein</b>	C18:1 <i>cis</i> 9	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	25496-72-4
<b>Mononadecanoin</b>	C19:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	112340-30-4
<b>Monoeicosanoin</b>	C20:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99%	30208-87-8
<b>Ditridecanoin</b>	C13:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	121957-71-9
<b>Diolein</b>	C18:1 <i>cis</i> 9	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	25637-84-7
<b>Tridecanoin</b>	C12:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	638-53-9
<b>Tristearin</b>	C18:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	555-43-1
<b>Trinadecanoin</b>	C19:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	26536-13-0
<b>1,2-Dinadecanoyl-sn-</b>	C19:0	Larodan AB, Solna, Sverige	>99 %	95416-27-6

<b>Glycero-3-Phosphatidylcholine (19:0 PC)</b>				
<b>Supelco 37 Component FAME Mix</b>	Fettsyremiks	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA	CRF	602-004-00-3

**Tabell 3.1.3:** Materiale og utstyr brukt i oppgaven med produktnavn, produsent og spesifikasjoner.

<b>Produkt</b>	<b>Produktnavn</b>	<b>Produsent</b>	<b>Spesifikasjoner</b>
<b>Hamilton Pipetter</b>	Microliter™ Syringes	Hamilton	10, 50, 100 og 500 µL
<b>Reagensrør med skrukork</b>	Test tube with screw cap	DURAN®	GL14
<b>GC-kolonne</b>	RTX®-2330	Restek, Bellefonte, PA, USA	90 % biscyanopropyl og 10 % phenylcyanopropyl polysiloxane
<b>SPE-kolonne</b>	Discovery® DSC-NH <sub>2</sub> SPE Tube	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA	Bed wt. 500 mg, Volume: 3 mL
<b>SPE-kolonnetopp</b>	ASPEC Caps, Natural PE, 3 mL Column	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA	
<b>Reagensrør for SPE</b>			10*75mm
<b>Krympehetteglass</b>	Crimp-Top Vial	VWR International AS, Radnor, PA, USA	1,5 mL, 32x11,6 mm
<b>Krympehette</b>	Crimp-Top Cap	VWR International AS, Radnor, PA, USA	11 mm

<b>Pasteurpipette</b>	Disposable Glass Pasteur Pipettes	VWR International AS, Radnor, PA, USA	150 mm
<b>Sentrifuge</b>	Avanti™ centrifuge J-25	Beckman Coulter™	
<b>Sentrifugerør</b>	Falcon Conical Centrifuge Tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	50 mL og 15 mL
<b>Mikrovekt</b>	C2P2	Sartorius, Goettingen, Tyskland	Max. 2,1 g
<b>NMR-Sample tube</b>			
<b>Ristemaskin</b>	PSU 10-i	Biosan	
<b>Vannbad</b>	No 1004	GFL	
<b>Varmebløkk</b>			
<b>Nitrogenindamper</b>			

**Tabell 3.1.4:** Instrumenter og instrumentprogrammer brukt i oppgaven med produktnavn, produsent og spesifikasjoner.

<b>Produkt</b>	<b>Produktnavn</b>	<b>Produsent</b>	<b>Spesifikasjoner</b>
<b>Chromeleon</b>	Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) Software (v7.2.8)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Benyttet til styring og databehandling av GC-MS systemet.
<b>GC</b>	TRACE™ 1310 Gas Chromatograph	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
<b>MS</b>	ISQ™ Series Single Quadrupole GC-MS Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
<b>NMR</b>	Ascend™ 400 MHz Spectrometer	Bruker, Billerica, MA, USA	400 MHz
<b>SPE-robot</b>	GX-274 ASPEC™	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA	
<b>TopSpin</b>	TopSpin® software, 3.1	Bruker, Billerica, MA, USA	Benyttet til styring og databehandling av NMR systemet.

### 3.2 Løsninger

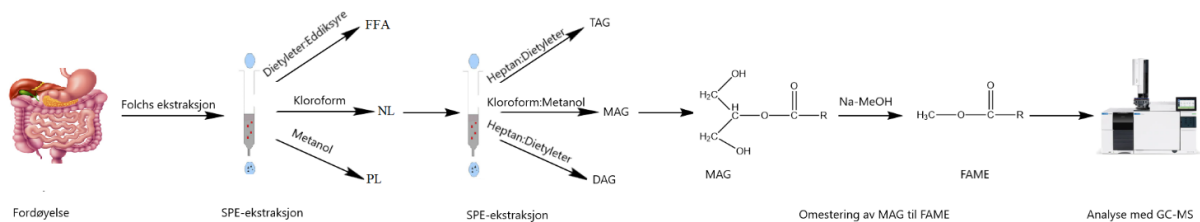
Blandinger av forskjellige løsemidler ble laget med egnede volumetriske målesylindere og målekolber. Løsningen ble overført til blåkorkflasker for videre bruk. Det ble primært unngått å bruke utstyr av plast så langt det var mulig.

- Standarder ble laget i stamløsninger. Fortynninger ble lagd ut fra stamløsninger.
- Natriummetanolat (3,3 mg/mL) ble lagd ved å løse 330 mg natrium (s) i 100 mL metanol.
- Kloroform:Metanol (2:1-volumforhold) ble laget ved å blande 600 mL kloroform og 300 mL metanol.
- Dietyleter med 2 % eddiksyre ble laget ved å tilsette 2 mL eddiksyre i 98 mL dietyleter. Denne blanding ble benyttet for hvert forsøk på grunn av de høyt damptrykk til dietyleter.
- Kloroform:heptan:metanol (6:90:4-v/v) ble tilsatt i oppgitt rekkefølge.



### 3.3 Metode

Analysemetoden innebar seks steg. Det er fordøyelse av prøvene, Folch-ekstraksjon av lipidene, SPE-fraksjonering til NL, FFA og PL, SPE-fraksjonering av NL til MAG, DAG og TAG, forestering av MAG til FAME og analyse på GC-MS. Denne prosessen er skissert i figur 3.3.1.



**Figur 3.3.1:** Prosesskise for metoden.

#### 3.3.1 Prøveopparbeidelse

Melkeprøver ble fordøyd av og i henhold til prosedyrer på Matvitenskap. Fordøyelsen ble utført i henhold til INFOGEST 2.0 fordøyelsesmodell. Spesifikasjoner vises i vedlegg 3. Kloroform:metanol (2:1) ble brukt for å inaktivere fordøyelsesenzymene og avslutte fordøyelsen.

#### 3.3.2 Lipidekstraksjon

Lipidekstraksjon ble utført i henhold til en tidligere utarbeidet metode (Devle et al., 2014). Den fordøyde prøven ble tilsatt 20 mL kloroform:metanol (2:1) og prøven ble ristet på ristebord (Biosan Ltd., PSU 10i) v/350 RPM i 20 min. Prøvene ble tilsatt 4 mL 0,9 % NaCl, ristet og sentrifugert på 2000 rpm i 5 min. Den øverste fasen ble fjernet med vakuumslange og den nederste fasen (kloroform-fasen) ble pipettert over til fordampningsrør. Prøven ble dampet til tørrhet ved 40 °C på en varmeblokk under nitrogengass.

#### 3.3.3 SPE-fraksjonering av NL, FFA og PL

SPE-fraksjonering av nøytrale-, polare- og fosfolipider ble utført på en automatisert SPE-robot (Gilson, GX-274 ASPEC, Middleton, WI, USA) etter Devle et al. (2014) sin metode. Fraksjoneringen ble utført med en strømningshastighet på 1,0 mL/min. Det ble benyttet SPE-kolonner med aminopropyl (Chromabond NH<sub>2</sub> polypropylene, MachereyNagel, 500 mg, 3

mL, Düren, Germany). Prøvene ble løst ut i 1 mL kloroform. Kolonnen ble kondisjonert med 7,5 mL heksan. 500 µL prøve ble applisert til kolonnen. Nøytrale lipider ble eluert med 5 mL kloroform. FFA ble eluert med 5 mL dietyleter:eddiksyre (98:2-forhold). PL ble eluert med 5 mL metanol. Fraksjonene ble overført til reagensrør med skrukork og løsemiddel ble dampet til tørrhet på varmeblokk under N<sub>2</sub>-gass ved 40 °C.

#### 3.3.4 SPE-fraksjonering av NL til MAG, DAG, TAG

SPE-fraksjonering av mono-, di- og triacylglyserider ble utført på en automatisert SPE-robot (Gilson, GX-274 ASPEC, Middleton, WI, USA) etter Haraldsen & Hausberg (2019) sin metode. Fraksjoneringen ble utført med en strømningshastighet på 1,0 mL/min. Det ble benyttet SPE-kolonner med aminopropyl (Chromabond NH<sub>2</sub> polypropylene, MachereyNagel, 500 mg, 3 mL, Düren, Germany). Den nøytrale lipidfraksjonen ble løst i 1,0 mL heksan:kloroform:metanol (90:6:4-forhold). Kolonnen ble kondisjonert med 7,5 mL heptan. 150 µL prøve ble applisert til kolonnen. TAG ble eluert ut med 1 mL heptan:dietyleter (93:7). DAG ble eluert ut med 3 mL heptan:dietyleter (93:7). MAG ble eluert ut med 3 mL kloroform:metanol (2:1). Fraksjonene ble overført til reagensrør med skrukork og løsemiddel ble dampet til tørrhet på varmeblokk med N<sub>2</sub>-gass ved 40 °C.

#### 3.3.5 Derivatisering til FAME

##### *3.3.5 A Derivatisering av MAG til FAME*

Derivatisering av MAG til FAME ble utført etter Devle et al. (2014) sin metode. Prøven ble tilsatt 2 mL heptan og 1,5 mL natriummetanolat (3,3 mg/mL). Prøvene ble ristet horisontalt på et ristebord (Biosan Ltd., PSU 10i) på 350 rpm i 30 min. Prøven ble sentrifugert på 3000 rpm i 5 min for å få et godt skille imellom metanolatfasen og heptanfasen. Heptanfasen ble overført til krympehetteglass (Crimp-Top Vial, 1,5 mL, VWR International). Prøvene ble lagret i -20°C før analyse på GC-MS.

##### *3.3.5 B Derivatisering av frie fettsyrer til FAME*

Prøven ble tilsatt 2 mL heptan og 1 mL BF<sub>3</sub>-MeOH (14 %) og satt på vannbad ved 80 °C i 20 min. Prøvene ble kjølt ned til romtemperatur og sentrifugert ved 3000 rpm i 5 min. Heptanfasen ble overført til krympehetteglass (Crimp-Top Vial, 1,5 mL, VWR International).

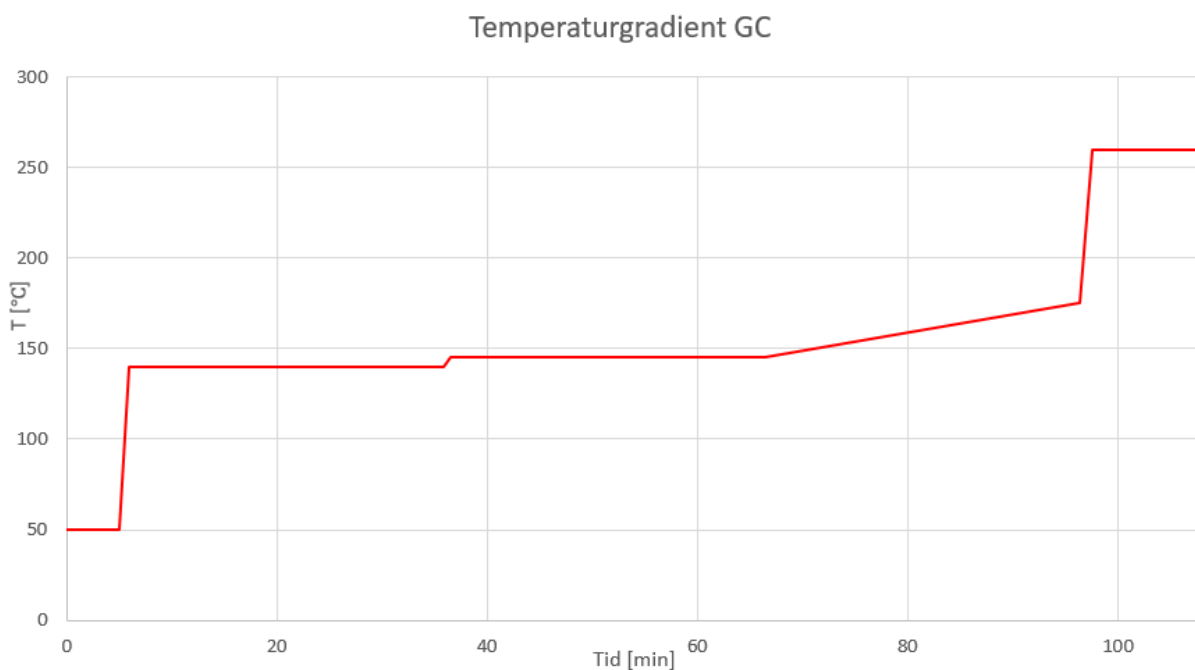
Prøvene ble lagret i -20°C før analyse på GC-MS.

### 3.3.5 C Kombinert derivatiseringsmetode

Lipidene ble ekstrahert i henhold til punkt 3.2.2. Lipidene ble løst i 1 mL heptan. 1 mL natriummetanolat (3,3 mg/mL) ble tilsatt og prøvene ble ristet på ristebord ved 350 rpm i 30 min. Prøvene ble tilsatt 1 mL BF<sub>3</sub>-MeOH (14 %) og satt på vannbad ved 80 °C i 20min. Prøvene ble kjølt ned og sentrifugert 3000 rpm i 5 min. Heptanfasen ble overført til krimpheetteglass (Crimp-Top Vial, 1,5 mL, VWR International). Prøvene ble lagret i -20°C før analyse på GC-MS.

### 3.3.6 Analyse med GC-MS

Analyse av fettsyre metylestere ble utført på Trace 1310 GC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) med en ISQ Series Single Quadrupole GC-MS System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Helium ble brukt som bæregass og kolonnen var en *fused silica* RTX-2330-kolone (RTX®-2330, Restek, Bellefonte, PA, USA) med *biscyanopropyl cyanopropylphenyl polysiloxane* (90 % *biscyanopropyl* og 10 % *phenylcyanopropyl polysiloxane*) som stasjonærfase med filmtykkelse 0,2 µm og indre diameter på 0,25 mm. En split-injektor ved 250°C og purgeflow på 5ml/min ble brukt. 1 mL/min strømningshastighet ble benyttet for analysene. Temperaturprogrammet er vist i figur 3.3.2. Elektronionisering (EI, 70 eV) dannet ionene i MS-systemet og masseområde var satt til 50-600 *m/z*.



**Figur 3.3.2:** Temperaturgradient for analysen.

Prøvene ble analysert sammen med en standardblanding bestående av 37 fettsyrer (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for å identifisere fettsyrene. Heptan ble benyttet for vasking av kolonnen. Chromeleon (Chromeleon™ Software (v7.2.8), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ble brukt som kontrollprogram for instrumentet. De kromatografiske toppene ble identifisert via bruk av retensjonstiden til fettsyrene i standardblandingen og bruk av NIST MS-bibliotek (NIST MS Search 2.0, U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, USA, 2017).

### 3.3.7 Kvantifisering og Databehandling

Analyseresultatene ble kvantifisert via internstandardmetoden og presentert som mg fettsyre per g prøve. Formelen 3.3.1 er utledet fra formel 2.3.1.

$$C_{FAME} = \frac{A_{FAME} * M_{IS}}{A_{IS} * M_{prøve}} * RRF \quad [3.3.1]$$

Hvor  $C_{FAME}$  er konsentrasjonen av fettsyren i prøven,  $A_{FAME}$  og  $A_{IS}$  er areal til henholdsvis FAME og internstandard,  $M_{IS}$  er mengde internstandard tilsatt i prøven (merk at det er mg FFA som benyttes og ikke MAG), RRF er instrumentets relative responsfaktor for den enkelte analytt og  $M_{prøve}$  er mengde prøve analysert (i gram). RRF ble funnet av Hanne Devle og

Eivind Mølversmyr (Mølversmyr, 2020) og vises i vedlegg 2. Det ble benyttet 2 internstandarder, monoundecanoin (C11:0 MAG) og monononadecanoin (C19:0 MAG). C11:0 MAG ble benyttet til å kvantifisere fettsyrene fra C4:0 til C10:0, mens C19:0 MAG ble benyttet på resterende fettsyrer.

### 3.4 Metodevalidering

Metodevalideringen ble utført med utvalgte MAG-standarder som representerer forskjellige typer fettsyrer. For kortkjedet fettsyrer (C4:0 til C10:0) ble C8:0 benyttet. For medium kjedete fettsyrer (C10:0 til C16:0) ble C14:0 og C16:0 benyttet. For langkjedete fettsyre (C18:0 og lengre) ble C18:0 og C20:0 benyttet. C18:1*cis*9 representerer én-umettede fettsyrer. C11:0 og C19:0 ble benyttet som internstandard til kvantifisering. I valideringen ble C11:0 benyttet til å kvantifisere C8:0, mens C19:0 for resterende fettsyrer

#### 3.4.1 Identitetskriterier

Identifikasjon av fettsyrene ble gjort ut ifra retensjonstiden til fettsyrene i FAME standardblanding (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) og ut ifra massespekteret. FAME-blandingen består av utvalgte mettede og umettede fettsyrer funnet i næringsmiddelindustrien og inneholder både *cis*- og *trans*-former. Andre standarder tilsettes blandingen ved behov. Massespektra sammenlignes med et NIST-bibliotek. Mettede fettsyrer har stor grad av likhet med spektrene i biblioteket, men for umettede fettsyrer er det en stor grad av usikkerhet. Fettsyrene blir derfor identifisert ut ifra utvalgte ioner. Valg av ionetopper baserer seg på Devle et al.'s (2009) artikkel og det ble her benyttet ioner fra den øvre delen av  $m/z$  området, på bakgrunn av at det var ønskelig å redusere faren for feilidentifisering (Devle et al., 2009). Valget av topper baserer seg generelt på typiske fragmenteringstyper, som tap av metoksy-gruppe (M-31), kløyving av alkylkjeden og molekylionet (Devle et al., 2009). For C4:0 og C6:0 ble McLafferty-omleiringsionet ( $m/z = 74$ ) valgt. I vedlegg 2 vises en tabell over retensjonstiden og utvalgte ioner til identifisering av fettsyrene i FAME standardblanding. For å identifisere eventuelle forurensinger fra opparbeidelsen ble det analysert blankprøver (rene løsemidler opparbeidet på lik linje med prøvene).

#### 3.4.2 LOD og LOQ

Deteksjonsgrensen (LOD) og kvantifiseringsgrensen (LOQ) ble beregnet ut ifra gjennomsnittet til to separate konsentrasjonsgradienter som har blitt opparbeidet og analysert igjennom hele metoden. Konsentrasjonsgradientene bestod av 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 mg/mL per standard. Signal/støy-forhold for standardene ble plottet mot konsentrasjonen og stigningstallet ( $m$ ) benyttet til å beregne LOD og LOQ. LOD og LOQ ble beregnet ved henholdsvis formel 3.4.1 og 3.4.2.

$$LOD = \frac{3}{m} [3.4.1]$$

$$LOQ = \frac{10}{m} [3.4.2]$$

### 3.4.3 Presisjon og nøyaktighet

To presisjonsparametere ble analysert, repeterbarhet og reproduserbarhet. Repeterbarhet ble analysert ved å utføre analyse av 10 prøver iløpet av samme dag. Det ble benyttet en konsentrasjon på 1 mg/mL per standard. Repeterbarhet ble beregnet ut fra formel 2.4.2 og 2.4.3. Reproduserbarhet ble analysert ved å analysere 26 standardprøver fordelt ut over en lengre periode. Reproduserbarheten ble vurdert ut ifra antall prøver som var innenfor 2SD fra gjennomsnittsverdien til prøvene.

Nøyaktighet ble analysert ved å analysere 26 standardprøver fordelt ut over en lengre periode. Nøyaktighet ble beregnet ved formel 2.4.1 hvor nøyaktighet beregnes som avviket imellom målt verdi og teoretisk verdi.

### 3.4.4 Linearitet

#### *3.4.4 A Metodelinearitet*

Linearitet til metoden ble analysert ved å analysere en konsentrasjonsgradient bestående av 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 og 30 mg/mL monomyristin-standard (C14:0 MAG). Prøvene ble fraksjonert og opparbeidet i henhold til 3.3.3, 3.3.4 og 3.3.5 A. Prøvene ble fortynnet 10 ganger før analyse på GC-MS. Areal ble plottet mot konsentrasjon og lineariteten ble vurdert ut ifra R<sup>2</sup>-verdien til kurven.

#### *3.4.4 B Instrumentlinearitet*

Linearitet til instrumentet ble analysert ved å analysere en konsentrasjonsgradient bestående av 50, 100, 200, 400, 600 og 800 µg/mL Supleco 37 Component FAME Mix. Areal ble plottet mot konsentrasjonen og lineariteten ble vurdert ut ifra R<sup>2</sup>-verdien til kurven.

### 3.5. $^1\text{H-NMR}$

NMRen benyttet en standardisert metode laget av instrumentleverandøren. Løsemiddel er brukt var deuterert kloroform ( $\text{DCCl}_3$ ). Temperatur benyttet var  $24\text{ }^\circ\text{C}$  og antall scanns ble fortløpende variert ut ifra matrisen som ble analysert (normalen var 16 scanns).

#### 3.5.1 Manuel SPE-fraksjonering ved $-20\text{ }^\circ\text{C}$

SPE-fraksjoneringen ble utført ved  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  på et fryserom på Bioteknologibyget ved NMBU. SPE-fraksjoneringen ble utført ved et vakuum manifold koblet opp til en pumpe. Aminopropylkolonnen ble kondisjonert med 7,5 mL heksan. 500  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 2-monopalmitin løst i kloroform ble applisert til kolonnen. Nøytrale lipider ble eluert med 5 mL kloroform. Prøvene ble videre opparbeidet og analysert i henhold til Anders Flytkjærs analysemetode (vises i vedlegg 8).



### 3.6 Kjemisk hydrolyse av melk

#### 3.6.1 Hydrolyse med HCl

1 g melk ble veid inn i 50 mL sentrifugerør (Falcon 50mL Conical Centrifuge Tubes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) og tilsatt 8 mL 8M HCl. Prøven ble varmet på varmebad ved 80 °C i 1 til 4 timer. Prøvene ble kjølt ned og lipidene ble videre ekstrahert som i punkt 3.3.2

#### 3.6.2 Hydrolyse med H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

1 g melk ble veid inn i 50 mL sentrifugerør (Falcon 50mL Conical Centrifuge Tubes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) og tilsatt 8 mL 12M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Prøven ble varmet på varmebad ved 80 °C i 20 min. Prøvene ble kjølt ned og lipidene ble videre ekstrahert som i punkt 3.3.2.

#### 3.6.3 Hydrolyse med NaOH

1 g melk ble veid inn i 50 mL sentrifugerør (Falcon 50mL Conical Centrifuge Tubes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) og tilsatt 8 mL 0,5 M NaOH. Prøven ble varmet på varmebad ved 80 °C i 10 minutter. Prøvene ble kjølt ned og lipidene ble videre ekstrahert som i punkt 3.3.2.

## 4. Nøkkelfresultater og diskusjon

### 4.1 Metodeutvikling

Analysemetoden for kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av fettsyrene i MAG-fraksjonen i fordøyde prøver kan deles inn i fem analysesteg, beskrevet nærmere i avsnitt 3.3.

Metodeutviklingen ble utført ved analyser av utvalgte MAG, DAG, TAG, FFA og PL-standarder, samt analyser av H-melk. Hvert analysesteg ble testet for bruk til egnet formål og H-melk ble benyttet for å analysere totalt sammenslått metode. En mer omfattende testing av metoden i sin helhet ble utført under metodevalideringen i avsnitt 4.2. Videre analyser av fordøyde meieriprodukter vises i avsnitt 4.3.

#### 4.1.1 Fordøyelse og ekstraksjon

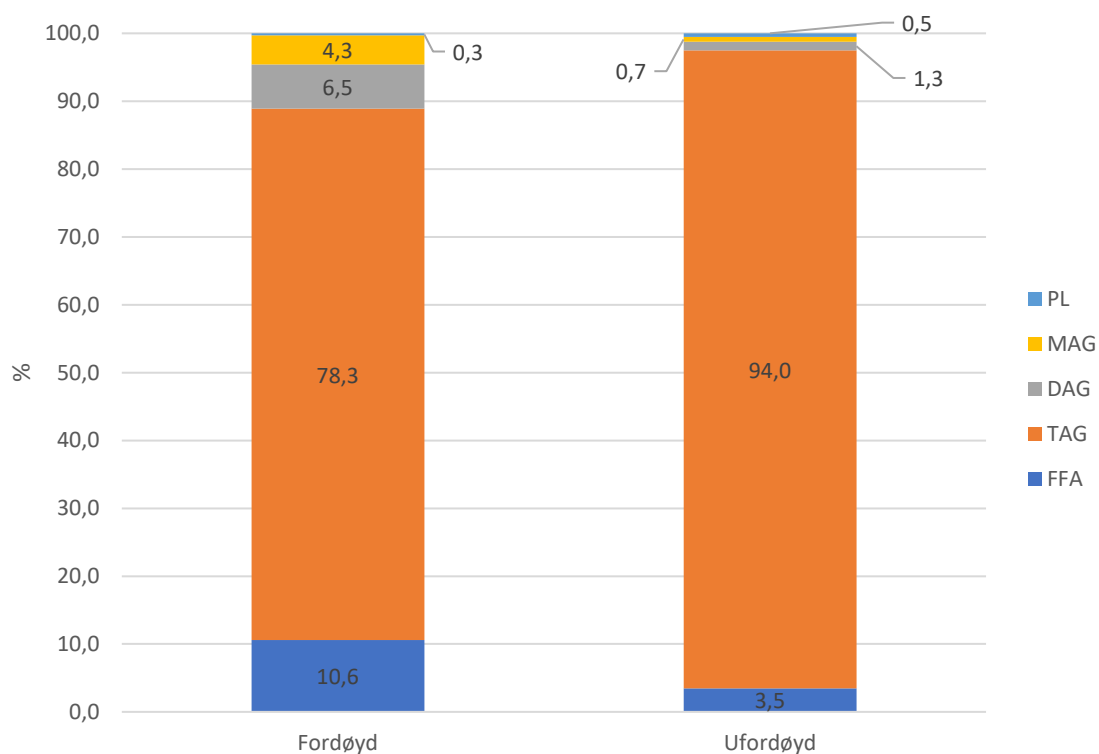
Fordøyelsen av prøvene ble utført av labpersonell tilknyttet Avdeling for matvitenskap.

Prøver av helmelk (3,5 % fett) ble benyttet for å undersøke kvaliteten på fordøyelsesmetoden.

Lipidklassene MAG, DAG, TAG, frie fettsyrer og fosfolipider, ble opparbeidet som i til 3.3.1

til 3.3.4. MAG, DAG, TAG og PL ble derivatisert i henhold til 3.3.5 A, mens FFA ble

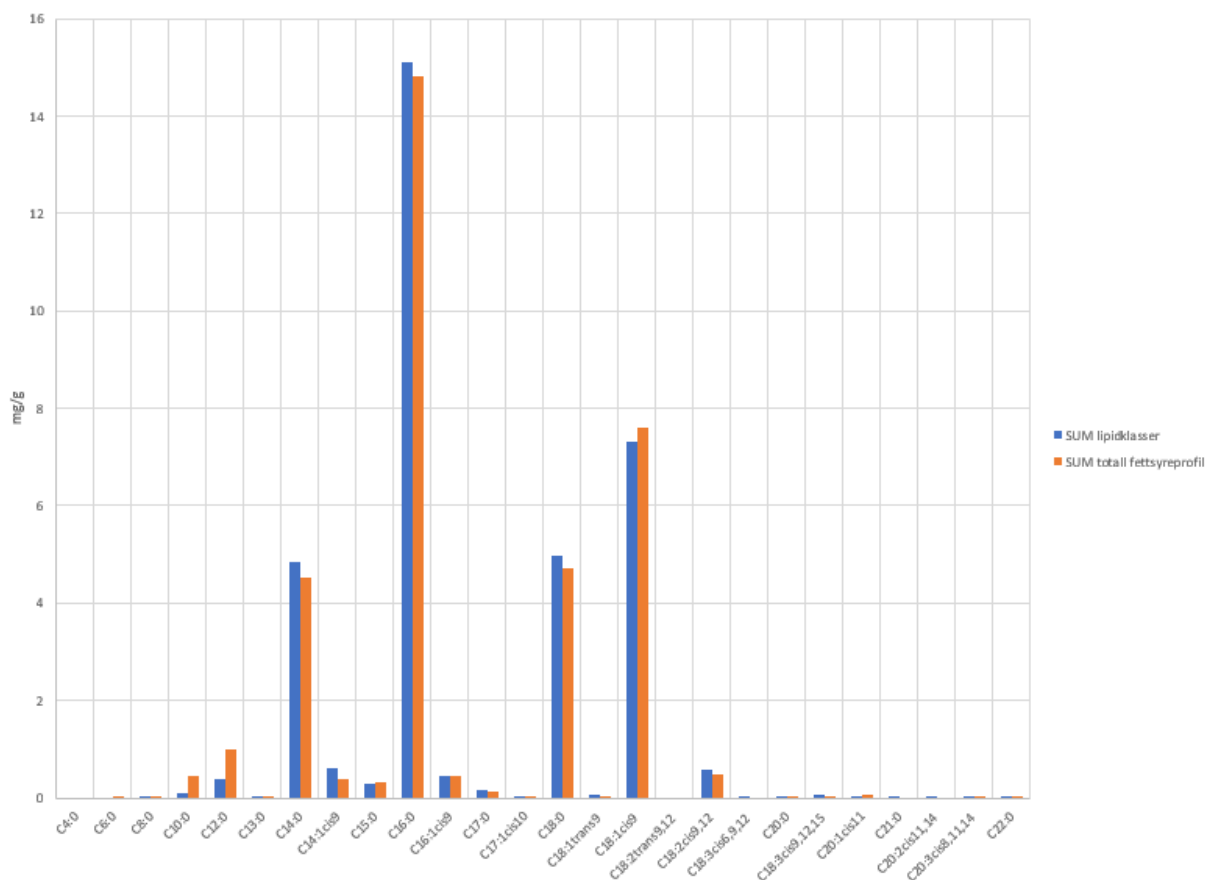
derivatisert i henhold til 3.3.5 B. Resultatene fra lipidklassefordelingen vises i figur 4.1.1.



**Figur 4.1.1:** Lipidklassefordeling i fordøyd og ufordøyd helmelk (i %).  $n = 1$ .

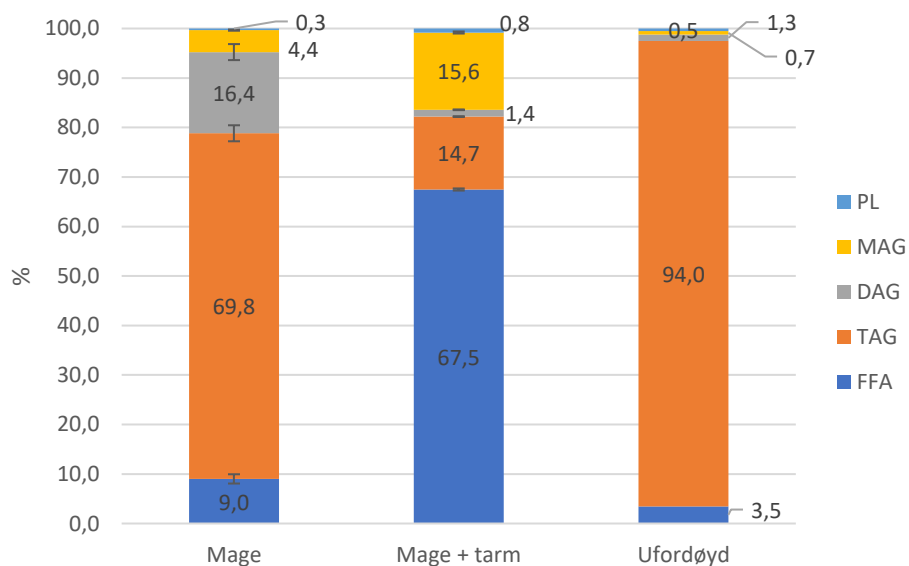
Den ufordøyde prøven består primært av TAG (95,8 %), med en mindre mengde FFA (3,5 %) og DAG (1,3 %). MAG og PL er begge mindre enn 1%. Den fordøyde prøven består også primær av TAG (78,3 %). FFA (10,6 %), DAG (6,5 %) og MAG (4,3 %) er noe høyere enn den ufordøyde prøven. Analysen viser generelt sett lite fordøyelse i prøven. Det mistenkes her at lipaseaktiviteten ikke har vært optimal på prøvene. Tidligere fordøyelsesforsøk har gitt en større grad av fordøyelse (Devle et al., 2014). Endring i fordøyelsesmetoden eller lite aktive enzymer kan være mulige forklaringen for den lave lipolysegraden i prøvene.

På bakgrunn av dette, ga forsøket svært lite informasjon om selve fordøyelsen, men resultatene forteller mye om selve analysemetoden. I figur 4.1.2 viser sammenslåtte verdier fra de 5 fraksjonene, sammenlignet med en total fettsyreprofilmetode (ingen fraksjonering, derivatiserer i henhold til avsnitt 3.3.5 C). Resultatene viser minimale forskjeller i fettsyremengde imellom metodene. Total sum fettsyrer er henholdsvis 35,1 mg/mL og 35,2 mg/mL for lipidklassemetoden og total fettsyre-metoden.



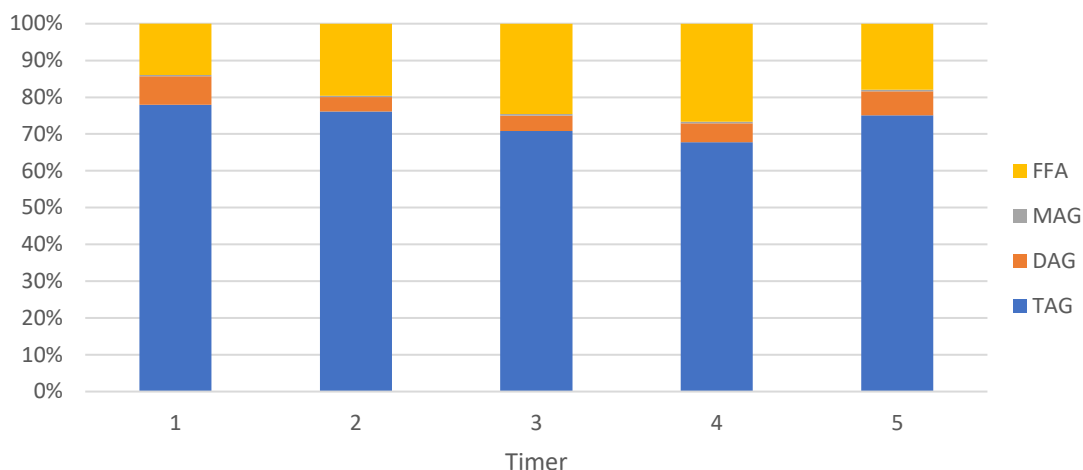
**Figur 4.1.2:** Fettsyreprofil (mg/g) for fordøyd helmelk analysert med fraksjoneringsmetoden og helmelk analysert via total fettsyremetoden.. n = 1.

Fordøyelsen skjer i to hovedsteg, gastrisk fordøyelse (mage) og pankreatisk fordøyelse (tarm). Det ble utført et forsøk på for å sammenligne lipolysegraden i disse to stegene. Det ble benyttet prøver av H-melk som gjennomgikk gastrisk fordøyelse samt gastrisk + pankreatisk fordøyelse. Lipidene ble fraksjonert inn i lipidklasser og analysert. Figur 4.1.3 viser lipidkonsentrasjonene i lipidklassene til H-melk fordøyd i mage, mage + tarm og ufordøyd. De ufordøyde prøvene, som tidligere beskrevet, består primært sett av TAG (94 %), med spor av FFA, MAG, DAG og PL. Under gastrisk fordøyelse hydrolyseres rundt 25 % av TAG i prøvene. TAG er fortsatt dominerende (69,8 %). Resultatene viser også at det er noe DAG (16,4 %) og FFA (9,0 %), samt en mindre mengde MAG (4,4 %) og PL (0,3 %). Den fulle fordøyelsesmetoden hydrolyserer rundt 79,3 % av TAG i prøven. FFA (67,5 %) er dominerende. Det er også en del TAG (14,7 %) og MAG (15,6 %) og en mindre mengde DAG (1,4 %) og PL (0,8 %).



**Figur 4.1.3:** Lipidklassefordeling i H-melk etter fordøyelse i mage og tarm + mage, samt ufordøyd H-melk. Resultatene er gjennomsnittet imellom 2 uavhengige paralleller.  $n = 2$ .

Det ble også utført et forsøk på å finne en kjemisk hydrolyseringsmetode for enklere tilgang til prøver med MAG. Det ble utført testing med HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og NaOH. Generelt sett ga hydrolyseforsøkene dårlige resultater, og lite MAG ble funnet igjen. Figur 4.1.4 viser resultatene fra syrehydrolyse med 8 M HCl i 1-5 timer. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> forkullet prøvene såpass at det ikke var mulig å ekstrahere ut fett og analysen med NaOH ga også lite MAG.



**Figur 4.1.4:** Lipidklassefordeling i melkeprøver etter syrehydrolyse med 8M HCl i 1 til 5 timer. n = 1.

#### 4.1.2. SPE-fraksjonering av nøytrale lipider, frie fettsyrer og fosfolipider

SPE-fraksjonering av nøytrale lipider, frie fettsyrer og fosfolipider ble testet ved å analysere en standardblanding bestående av standarder av MAG, DAG, TAG, FFA og PL. Det ble applisert total lipidmasse på 2,5 mg på SPE-kolonnene. Tabell 4.1.1 viser resultatene fra SPE-fraksjoneringen.

**Tabell 4.1.1:** Resultatene fra SPE-fraksjoneringen mellom NL, FFA og PL. n = 3.

Standard	AG	FA	NL-fraksjon	FFA-fraksjon	PL-fraksjon
			Areal	Areal	Areal
Tridecanoin	TAG	C10:0	147247,7 ± 4,5 %	-	-
Didecanoin	DAG	C13:0	108840,4 ± 3,5 %	-	-
Myristinsyre	FFA	C14:0	-	99777,7 ± 3,6 %	-
Monostearin	MAG	C18:0	141519,7 ± 3,5 %	-	-
C19:0 PC <sup>1</sup>	PL	C19:0	-	-	13386,3 ± 84,0 %

Resultatene fra analysen viser rene fraksjoner med små avvik mellom parallellene for de nøytrale lipidene og de frie fettsyrene. Fosfolipidene ga en ren fraksjon, men store avvik imellom parallellene. På bakgrunn av at formålet med metoden ikke er å analysere fosfolipider ble fraksjoneringsmetoden vurdert som godt egnet til videre arbeid.

<sup>1</sup> 1,2-Dinonadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine

#### 4.1.3 SPE fraksjonering av MAG, DAG og TAG

Metoden for fraksjonering av MAG, DAG og TAG ble vurdert ved å fraksjonere standardblanding bestående av forskjellige standarder av MAG, DAG og TAG etter metode 3.3.4. En total lipidmasse på 0,5 mg ble applisert på kolonnen. Tabell 4.1.2 viser resultatene fra fraksjoneringen.

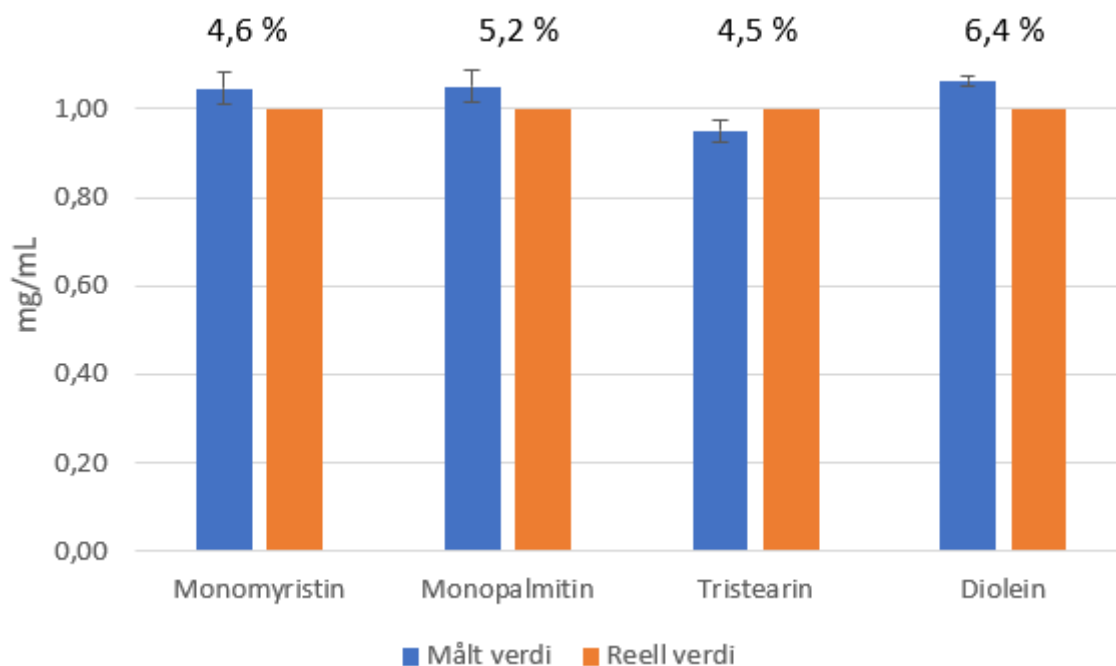
**Tabell 4.1.2:** Oversikt over fordeling av standarder av MAG, DAG og TAG i hver sine fraksjoner. Areal/1000 oppgis av fettsyrene i hver fraksjon. n = 2.

Standard	AG	FA	TAG-fraksjon	DAG-fraksjon	MAG-fraksjon
Monopalmatin	MAG	C16:0	0,0	0,0	56764,6 ± 0,87 %
Monomyrstein	MAG	C14:0	0,0	0,0	44479,8 ± 1,1 %
Diolein	DAG	C18:1 <sub>cis</sub> 9	14042,6 ± 2,4 %	28811,6 ± 1,1%	0,0
Tristearin	TAG	C18:0	36057,1 ± 0,8 %	0,0	0,0
Trinonadecanoin	TAG	C19:0	40427,3 ± 0,8 %	0,0	0,0

Resultatene viser at MAG-fraksjonen er helt ren. Det observeres krysskontaminering av DAG-standardene i TAG-fraksjonen, noe som også ble observert i Haraldsen og Hausbergs masteroppgave (Haraldsen & Hausberg, 2019). I Haraldsen & Hausberg (2019) anbefales det å benytte total lipidmasse på 0,5 mg på bakgrunn av økt krysskontaminering ved høyere verdier.

#### 4.1.4: Derivatisering av MAG, DAG og TAG til FAME

Derivatiseringsmetoden med bruk av natriummetanolat (Na-MeOH) innebærer omestering av acylglyseridene til FAME. En standardmikse bestående av 1mg/mL MAG, DAG og TAG-standarder ble derivatisert i henhold til avsnitt 3.3.5. Trinonadecanoin (C19:0 av TAG) ble benyttet som internstandard. Figur 4.1.5 viser målt verdi sammenlignet med teoretisk verdi. Resultatene viser at alle standardene, utenom diolein, har mindre enn 5 % avvik fra teoretisk verdi. Dette viser at omestering med Na-MeOH derivatiserer MAG, DAG og TAG til FAME på en god måte.



**Figur 4.1.5:** Resultatene fra derivatisering av MAG, DAG og TAG-standarder.  $n = 2$ .

#### 4.1.5 Analyse og kvantifisering

Som analyseinstrument ble det benyttet en singlekvadrupol GC-MS med EI-ionisering. Responsfaktoren til alle FAME i standardmiksen hadde tidligere blitt beregnet på instrumentet (Molversmyr, 2020). Instrumentet hadde en godt etablert FAME-analysemetode, som gir baselinjeseparasjon for de fleste fettsyrene. Det er noen fettsyrer som har litt dårligere separasjon ved høye konsentrasjoner. Dette gjelder for C18:1-isomerene, separasjon mellom C20:0 og C18:3*cis*9,12,15 og separasjon mellom C22:0 og C20:3*cis*11,14,17. Spesifikasjoner for instrumentmetoden er beskrevet i avsnitt 3.3.6.

Under metodeutviklingen ble lineariteten til instrumentet testet. Det ble her gjort analyser av Supelco 37 Component FAME Mix ved 50, 100, 200, 400, 600 og 800  $\mu\text{g/mL}$  total FAME konsentrasjon. Resultatene vises i tabell 6 i vedlegg 4. Analysen viser at instrumentet gir god linearitet. ( $R^2 > 0,990$ ) for de fleste fettsyrene i miksen. Fettsyrene C18:3*cis*9,12,15, C22:0 og C20:3*cis*11,14,17 gir noe lavere  $R^2$ -verdier. Dette kommer av at separasjonen mellom C20:0 og C18:3*cis*9,12,15 og separasjonen mellom C22:0 og C20:3*cis*11,14,17 er dårlig ved høyere konsentrasjoner. På bakgrunn av at fettsyrene i prøven vil ha forskjellige konsentrasjoner kan det ofte være utfordrende å finne en «optimal» analysekonsentrasjon, da lavkonsentrerte fettsyrer kan forsvinne i for lav konsentrasjon og kolonnen kan mettes ved for høye

konsentrasjoner. Det kan derfor være nyttig å analysere prøvene både ved høy og lav total konsentrasjon for å kvantifisere alle fettsyrene.

Fettsyrene kvantifiseres ut ifra internstandardmetoden vist i formel 3.3.1. Internstandardene benyttet for oppgaven er MAG av C11:0 og C19:0. C11:0 var tenkt i å benyttes for kortkjedete fettsyrer, C4:0 til C10:0, men under metodevalideringen ble det oppdaget at de korte fettsyrene systematisk underkvantifiseres ved C11:0 som internstandard. C11:0 vurderes derfor som lite egnet til kvantifisering av korte fettsyrer. Valideringen viser at C19:0 gir resultater nærmest sann verdi for resterende fettsyrer. Mer utfyllende forklaring gis i avsnitt 4.2.2.

#### 4.1.6 Oppsummering metodeutviklingen

Generelt sett fungerer hvert enkelt analysetrinn til egnet formål. Fordøyelsesmetoden oppnår rundt 79 % fordøyelse av TAG. Fraksjoneringsmetoden gir akseptable resultater både for fraksjonering av NL og FFA, samt fraksjonering av MAG. I DAG og TAG-fraksjonene observeres det noe forurensning. PL gir generelt sett ustabile resultater.

Derivatiseringsmetoden gir resultater innenfor 5 % av sann verdi for MAG, DAG og TAG-standardene analysert. En mer omfattende testing av den totale analysemetoden ble utført under metodevalideringen i avsnitt 4.2.



## 4.2. Metodevalidering

Metodevalideringen ble utført på MAG-standarder av C8:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0 og 18:1cis9. Bakgrunnen for valget av standarder var at de representerer korte, medium og lange fettsyrer, samt en-umettet. Fettsyrene er også representative for fettsyrer ofte funnet i melk og meieriprodukter. Valideringsparameterne undersøkt i oppgaven er LOD, LOQ, presisjon, nøyaktighet og linearitet.

### 4.2.1: LOD og LOQ

Deteksjonsgrensen (LOD) og kvantifiseringsgrensen (LOQ) ble vurdert ut ifra en konsentrasjonsgradient som gikk fra 0,001 til 0,3 mg/mL per standard. Signal/støy-forhold til prøvene ble plottet mot konsentrasjonen og kurvene vises i vedlegg 4. Tabell 4.2.1 viser LOD og LOQ for standardene.

**Tabell 4.2.1:** R<sup>2</sup>-verdi, regresjonsformel og beregnet LOD og LOQ for 8 utvalgte fettsyrer.

	R <sup>2</sup>	Regresjonsformel y=mx+b	LOD = 3/m µg/mL	LOQ = 10/m µg/mL
C8:0	0,9925	y = 848,6x+0	3,5	11,8
C11:0	0,9971	y = 764,8x+0	3,9	13,1
C14:0	0,9942	y = 823,9x+0	3,6	12,1
C16:0	0,9966	y = 660,4x+0	4,5	15,1
C18:0	0,9949	y = 300,1x+0	10,0	33,3
C18:1cis9	0,9902	y = 247,6x+0	12,1	40,4
C19:0	0,9918	y = 219,8x+0	13,6	45,5
C20:0	0,9923	y = 212,7x+0	14,1	47,0

Resultatene viser at LOD for C8:0 til C16:0 er på rundt 3,5 til 4,5 µg/mL. For C18:0 til C20:0 ligger LOD i område 10,0-14,1µg/mL. LOQ ligger i område 11,8 til 15,1 for C8:0 til C16:0, og C18:0 til C20:0 ligger imellom 33,3 til 47,0 µg/mL. Det kan observeres en trend hvor C8:0 til C16:0 ligger i et generelt lavt område og C18:0 til C20:0 ligger i et noe høyere område. LOD og LOQ ligger noe høyere enn andre forsøk med fettsyremetylestere (Molversmyr, 2020) & (Devle et al., 2009), men på bakgrunn av at opparbeidelsesprosessen er mer omfattende i denne metoden og prøven fraksjoneres to ganger er det forventet at verdiene er høyere.

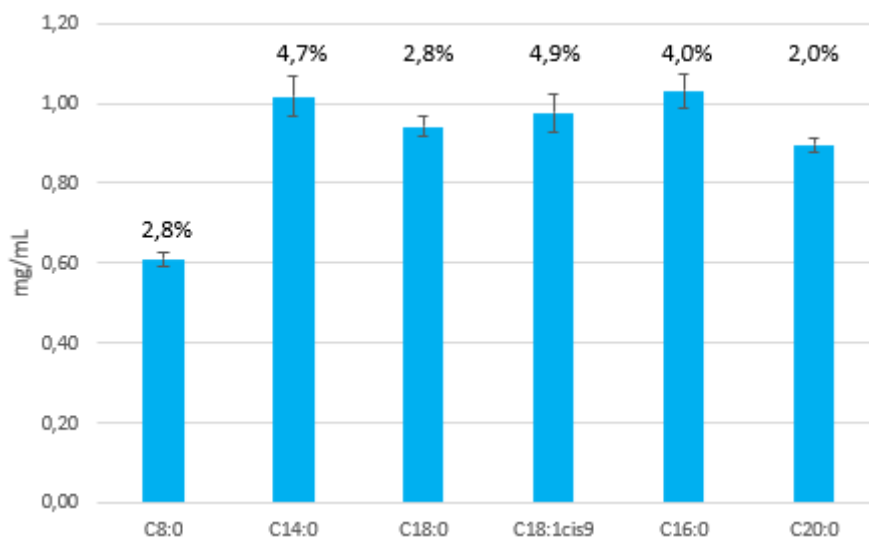
Signal/støy-forholdet ble funnet fra totalt ionekromatogram Det var ønskelig å benytte seg av EIC-mode (extracted ion chromatogram), hvor utvalgte ionetopper ville gitt mer sensitive

resultater (Hoffmann & Stroobant, 2012f), men på grunn av automatiseringen i Chromeloen-systemet oppstod det problemer som gjorde av EIC-mode ikke kunne brukes.

#### 4.2.2 Presisjon og nøyaktighet

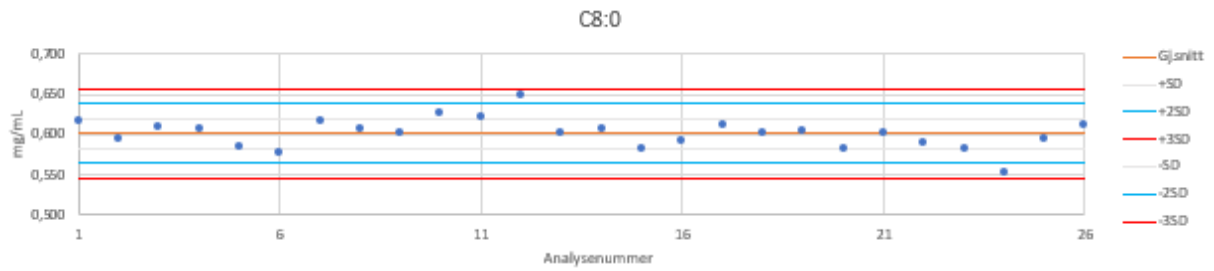
To presisjonsparameteret ble testet, henholdsvis repeterbarhet og reproduserbarhet.

Repeterbarhet er et mål for presisjon innenfor en kort periode. Resultatene fra analysen av repeterbarhet vises i figur 4.2.1. Resultatene viser generelt sett lav RSD for C8:0, C18:0 og C20:0 på 2,0 til 2,8 %. For C14:0, C18:1*cis*9 og C16:0 er RSD noe høyere med 4,0–4,9 %.

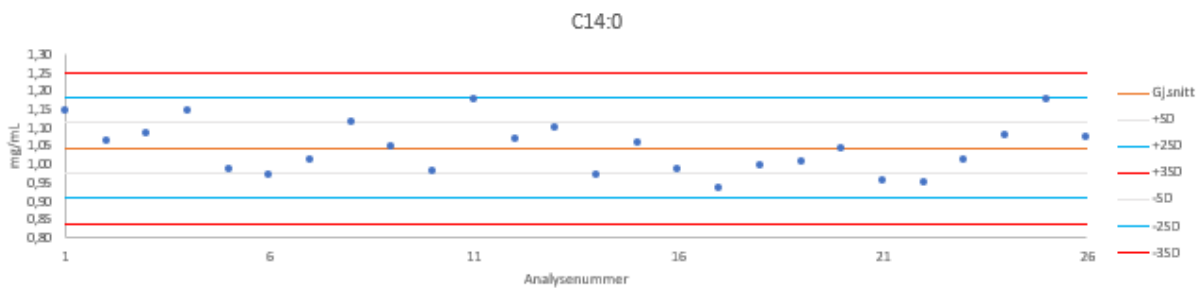


**Figur 4.2.1:** Metodens repeterbarhet med RSD imellom parallellene. C8:0, C14:0, C18:0 og C18:1*cis*9 er  $n = 10$ . C16:0 og C20:0 er  $n = 6$ .

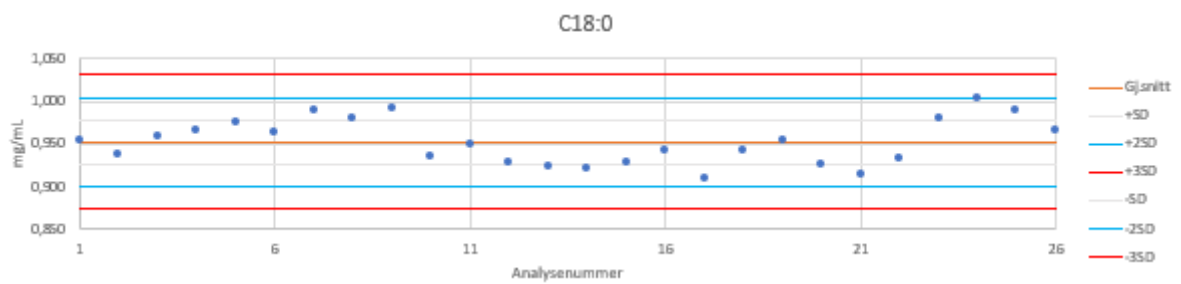
Reproduserbarhet er et mål for presisjon over en lengre periode. Reproduserbarheten vurderes som akseptabel hvis 95 % av analyseresultatene er innenfor  $\pm 2SD$ . Figur 4.2.2 til 4.2.7 viser resultatene for C8:0, C14:0, C18:0, C18:1*cis*9, C16:0 og C20:0. Figurene viser analyseresultatene, gjennomsnittet,  $\pm SD$ , samt første alarmgrense ( $\pm 2SD$ ) og andre alarmgrense ( $\pm 3SD$ ).



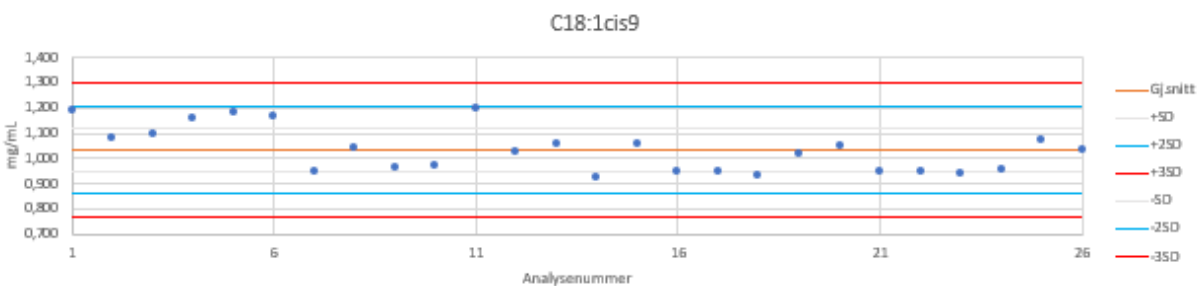
**Figur 4.2.2:** Resultatene fra 26 analyser av C8:0. Resultatene viser at 2 av 26 prøver ligger utenfor 2SD.



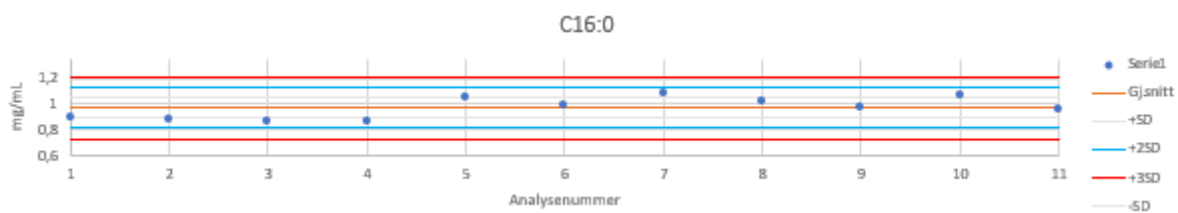
**Figur 4.2.3:** Resultatene fra 26 analyser av C14:0. Resultatene viser at 0 av 26 prøver ligger utenfor 2SD.



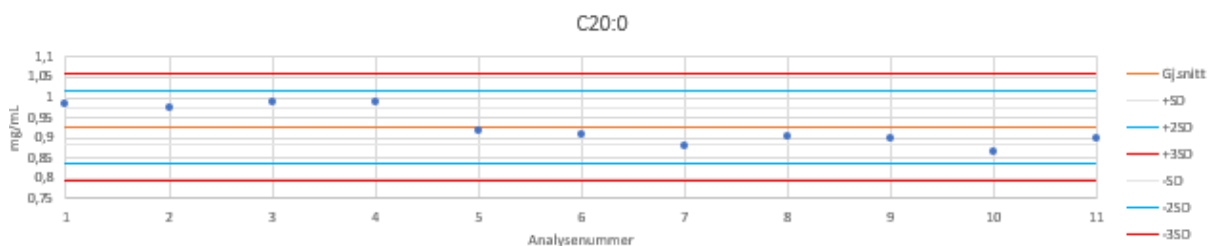
**Figur 4.2.4:** Resultatene fra 26 analyser av C18:0. Resultatene viser at 0 av 26 prøver ligger utenfor 2SD.



**Figur 4.2.5:** Resultatene fra 26 analyser av C18:1cis9. Resultatene viser at 0 av 26 prøver ligger utenfor 2SD.

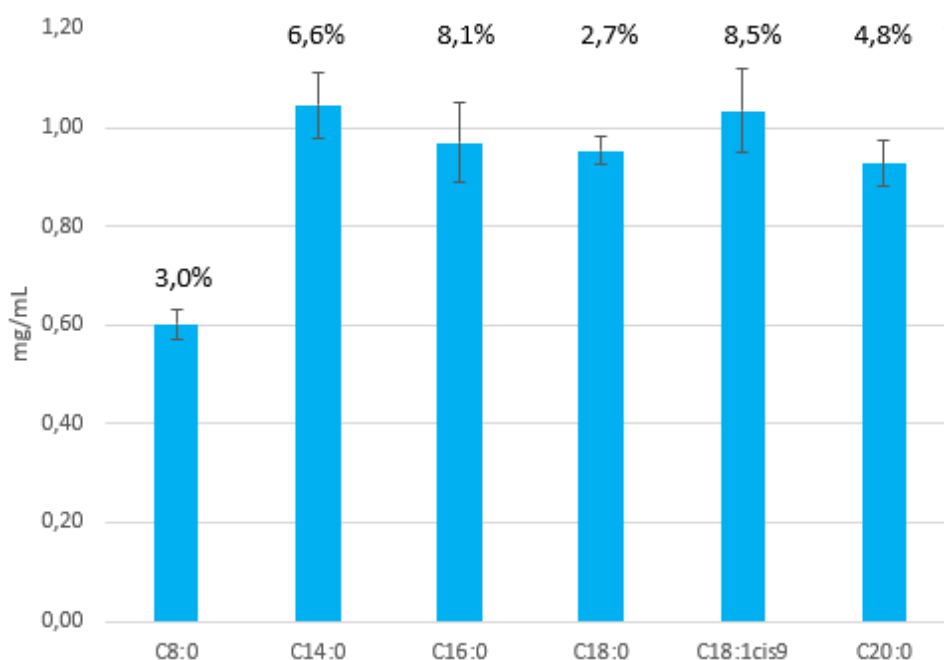


**Figur 4.2.6:** Resultatene fra 11 analyser av C16:0. Resultatene viser at 0 av 11 prøver ligger utenfor 2SD.



**Figur 4.2.7:** Resultatene fra 11 analyser av C20:0. Resultatene viser at 0 av 11 prøver ligger utenfor 2SD.

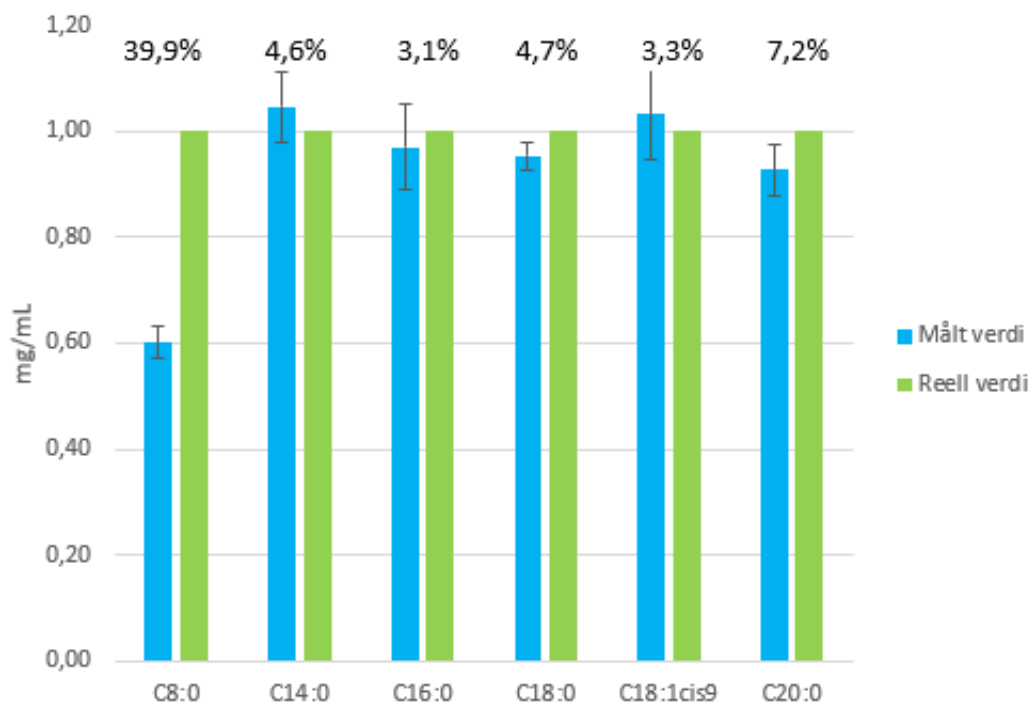
Resultatene viser at for C8:0 ligger 2 av 26 prøver utenfor 2SD. For resterende standarder er det ingen som har noen analyseresultater utenfor 2SD. Den totale RSD for analyseresultatene vises i figur 4.2.8. C8:0 og C18:0 har lav RSD imellom de 26 parallellene med henholdsvis 3,0 % og 2,7 %. C14:0 har RSD på 6,6 % og C20:0 har en RSD på 4,8 %. C16:0 og C18:1cis9 har RSD på 8,1 % og 8,5 %.



**Figur 4.2.8:** Gjennomsnitt og RSD for analyseresultatene i figur 4.2.2 til 4.2.7.  $n = 26$ .

Spredningen i resultatene er akseptable for alle standarder, men C8:0 er i grenseland med 2 prøver utenfor 2SD. RSD imellom duplikatprøvene er for alle standarder under 10 %.

Nøyaktighet baserer seg på hvor nær den målte verdien er mot den reelle verdien, og er et mål på systematiske feil i metoden. Sammenlignes de samme prøvene fra analysen av reproduserbarhet med sann verdi, viser analysen generelt sett at de fleste standardene holder seg under 5 % avvik fra reell verdi. Unntaket er C20:0 som har et avvik på 7,2 % og C8:0 som underkvantifiseres med 39,9 %. Figur 4.2.9 viser metodens nøyaktighet i forhold til sann verdi.



**Figur 4.2.9:** Gjennomsnittet av 26 (11) analyser av standardblanding sammenlignet med reell verdi.  $n = 26$ .

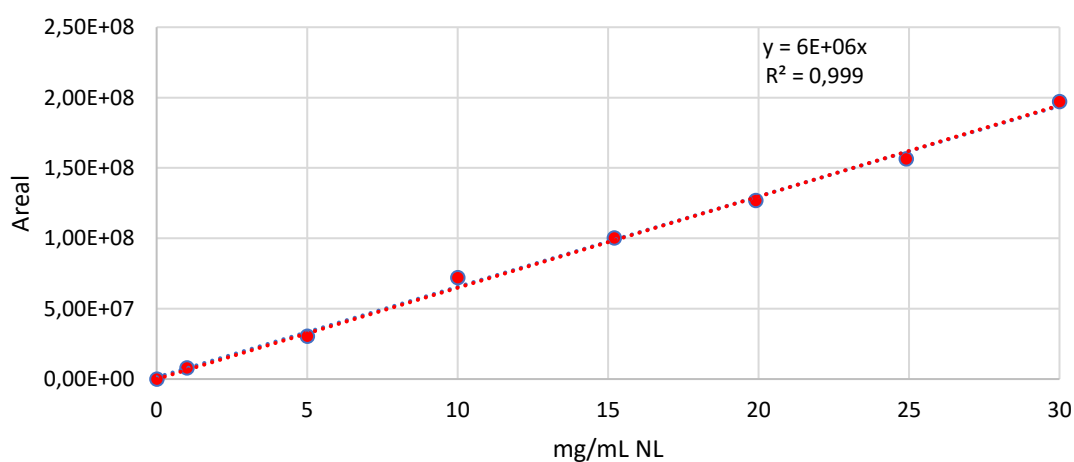
Den systematiske underkvantifiseringen av C8:0 er ikke uventet med tanke på den høye flyktigheten til de korte fettsyrene. Det er også en indikasjon på at C11:0 er lite egnet som internstandard til å kvantifisere de korte fettsyrene. Et mulig alternativ er å bruke C7:0 til kvantifisering av korte fettsyrer.

Metodens presisjon vises henholdsvis under 5 % spredning i dag til dag analyser og under 10 % spredning i analyser over lengre tid. Nøyaktigheten ligger under 5 % for alle standarder utenom C8:0 og C20:0. Metodens måleusikkerhet kan vurderes ut fra presisjon og nøyaktighet og resultatene indikerer at måleusikkerheten bør ligge imellom 5 og 10 %.

Det har også blitt utført en vurdering av de største bidragene til feilkilder i metoden. Internstandardkvantifisering vil kompensere for flere feilkilder i analysen, og de største bidragene til feilkilder vil være prøvens homogenitet, tilberedning og tilsetning av internstandard, variasjon i GCMS-instrumentets respons og integrasjon av toppene i kromatogrammet. Analysen vil være avhengig av at lipidene er jevnt fordelt i prøvematerialet for at prøven skal være representativ. Areal og konsentrasjon av internstandard benyttetes til kvantifisering og de må være så riktige og nøyaktige som mulig. På bakgrunn av at konsentrasjonen til fettsyrene i prøver er forskjellig kan det i stor grad være utfordrende å finne en prøvfortynning som både er både bra for høykonsentrerte fettsyrer og lavkonsentrerte fettsyrer. Det kan i noen tilfeller være nyttig å analysere prøvene i to forskjellige konsentrasjoner for å oppnå gunstige analyseresultater. Ved for høye konsentrasjoner kan det oppstå «tailing», samt koeluering av nærliggende analytter (spesielt kan C18:1-isomerene koeludere ved høye konsentrasjoner).

#### 4.2.3 Linearitet

Den øvre grensen av det lineære område begrenses av to faktorer, nemlig løseligheten til standarden i 1 mL kloroform (som gjøres etter ekstraksjonen og før første SPE-ekstraksjon), samt kapasiteten til SPE-kolonnen. For lineariteten ble det benyttet standarder med total lipidkonsentrasjon fra 0 til 30 mg/mL. Dette innebærer på det høyeste 15 mg lipidmasse applisert på kolonnen. Figur 4.2.10 viser lineariteten fra 0 til 30 mg/mL total lipidkonsentrasjon. Kurven viser god linearitet ( $R^2 = 0,999$ ) i område 0 – 30 mg/mL.



**Figur 4.2.10:** Areal plottet mot lipidkonsentrasjon. Analysen viser god linearitet mellom 0 og 30 mg/mL.

På bakgrunn av at det ble benyttet internstandard kvantifisering kan prøver med høy lipidkonsentrasjon fortynnes til mindre konsentrasjoner. SPE-kolonnene har, i henhold til produktspesifikasjonene, kapasitet på ca 20 mg applisert prøvemateriale. Dette betyr at prøver med konsentrasjon opp til 40 mg/mL kan fraksjoneres ved metoden av polare og nøytrale lipider. På bakgrunn av at kapasiteten varierer imellom kolonnepakkene anbefales det å benytte seg av en lavere konsentrasjon enn 40 mg/mL.

Det ble heller ikke observert noen problemer med løseligheten av MAG-standardene i 1 mL kloroform. Det er vært å merke seg at MAG-standardene med lengre kjedelengder (observert ved C20:0-MAG) bruker lengre tid på å løse seg i kloroformen, og det kan her anbefales å ha løsningen i en kort periode på ultralydbad for å forsikre seg om at stoffet har løst seg opp.

#### 4.2.4 Oppsummering metodevalidering

Metodevalideringen ble utført på utvalgte MAG-standarder bestående av korte, medium og lange fettsyrer, samt én-umettet fettsyrer. Analysen benyttet to metoder til å identifisere fettsyrene, hvor en er ut fra retensjonstiden til standarder og den andre er ut fra utvalgte ioner i massespekteret. LOD og LOQ til standardene analysert ligger henholdsvis imellom 3,5 til 14,1 µg/mL og imellom 11,8 og 47,0 µg/mL. Analysen av metodens presisjon viser at repeterbarheten ligger på under 5 % spredning og reproduserbarheten ligger på under 10 % spredning. Metodens nøyaktighet viser at alle standardene, bortsett fra to, har under 5 % avvik fra sann verdi. En systematisk underkvantifisering av de korte fettsyrene indikerer at C11:0 er lite egnet som internstandard for korte fettsyrer og det bør vurderes å benytte en alternativ standard. Metoden gir lineære resultater mellom 0 og 30 mg/mL total lipidkonsentrasjon.

### 4.3: Fordøyde meieriprodukter

For å teste ut hvordan metoden fungerer på reelle prøver ble det utført analyser på diverse fordøyde meieriprodukter. Fettsyreprofilen i melk har en del karakteristika som bør kunne gjenkjennes i våre analyser. I figur 2.2.1 i avsnitt 2.2 vises en typisk fordeling av fettsyrene i de stereospesifikke posisjonene i TAG. Ut ifra at det forventes at TAG fordøyes til 2-MAG, bør det forventes at fettsyreprofilen i MAG vil i hovedsak bestå av C14:0, C16:0 og 18:1<sub>cis</sub>9. Det vil også være naturlig å forvente at tilsvarende resultat i andre meieriprodukter fra kumelk.

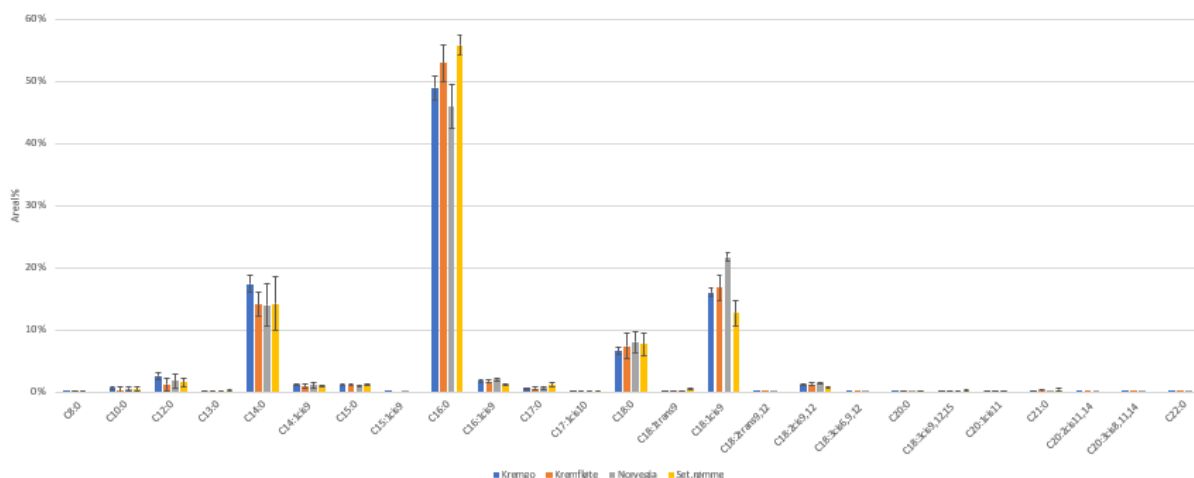
Fire meieriprodukter, Kremgo, Kremfløte, Norvegia Vellagret og Setersrømme, ble fordøyd av personale ved Avdeling for matvitenskap og lipidene ble ekstrahert med eter:heksan (1:1, v/v). Prøvene ble SPE-fraksjonert til nøytrale lipider og frie fettsyrer av samme personale. De nøytrale lipidfraksjonene ble tilsatt internstandarder og opparbeidet i henhold til punkt 3.3.4 og 3.3.5 A. pH-verdien til prøvene ble justert til henholdsvis 2 og 7 før lipidekstraksjonen. Det er ikke forventet at dette vil ha stor betydning for ekstraksjonen av nøytrale lipider.

På bakgrunn av at det ble benyttet et annet ekstraksjonsmiddel for disse prøvene enn kloroform:metanol (2:1) er det mulig at det kan oppstå forskjeller imellom de to metodene. På bakgrunn av at internstandarder ble tilsatt seint i prøveoppbeidelsen kan det også forventes usikkerhet rundt nøyaktigheten til kvantifiseringen av fettsyrene. Fettsyreprofilen presenteres derfor som areal% av totalt areal. Vedlegg 5 viser en oversikt over fettsyrene kvantifisert ut ifra internstandardmetoden.

#### 4.3.1 Fettsyreprofil i MAG

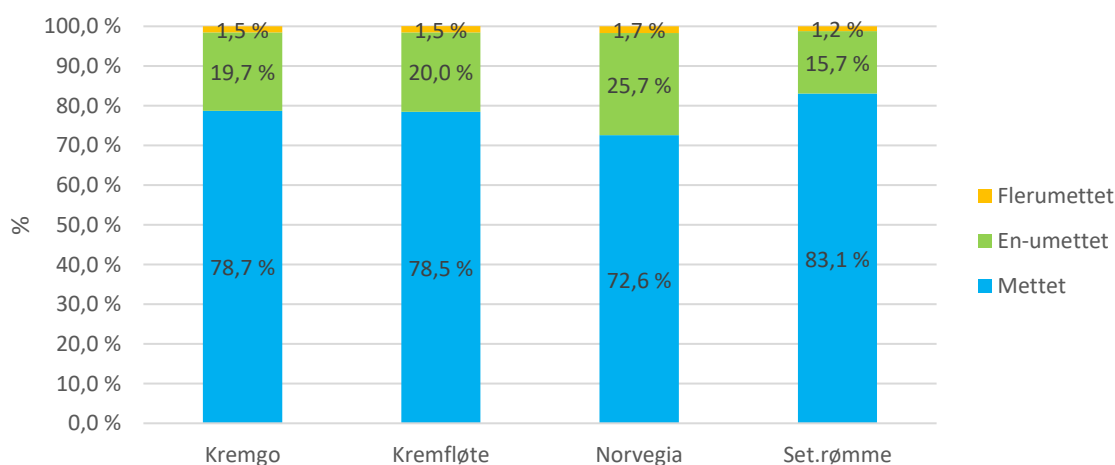
Fra MAG-fraksjonen til Kremgo, Kremfløte, Norvegia ble 25 forskjellige fettsyrer identifisert. 12 av dem er mettede fettsyrer, 7 er én-umettede og 6 er flerumettede. For Seterrømme ble det identifisert 17 forskjellige fettsyrer, hvorav 10 er mettede, 4 én-umettede og 3 fler-umettede. Figur 4.3.1 viser areal% av fettsyrene funnet i MAG-fraksjonene.





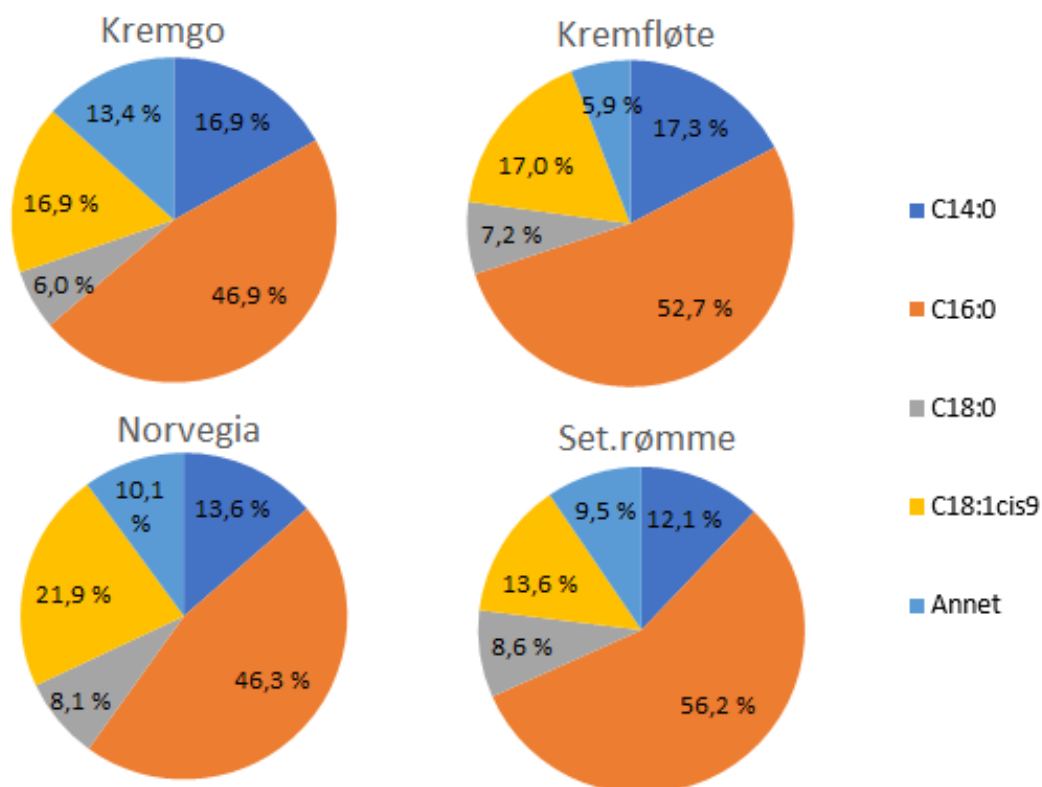
**Figur 4.3.1:** Fettsyreprofilen i MAG fra forskjellige meieriprodukter. Resultatene vises i areal% av den totale mengden fettsyrer. Rundt 90 % av profilen består av C14:0, C16:0, C18:0 og 18:1cis9. n = 4.

Analysen identifiserer fettsyrer fra C8:0 til C22:0. Primærdelen (ca. 90 % av total mengde) består av fettsyrene C14:0 (12-16 %) C16:0 (45-55 %), C18:0 (6-8 %) og 18:1cis9 (13-21 %). Resten består av C12:0 (1,3 til 2,6 %), C18:2cis9,12 (0,95 til 1,4 %) og 19 fettsyrer på under 1 %. Fordeling av fettsyreklassene vises i figur 4.3.2. Figuren viser at prøvene inneholder 72 – 83 % mettet fett, 15 til 25 % én-umettet og 1,2 til 1,7 % flerumettet.



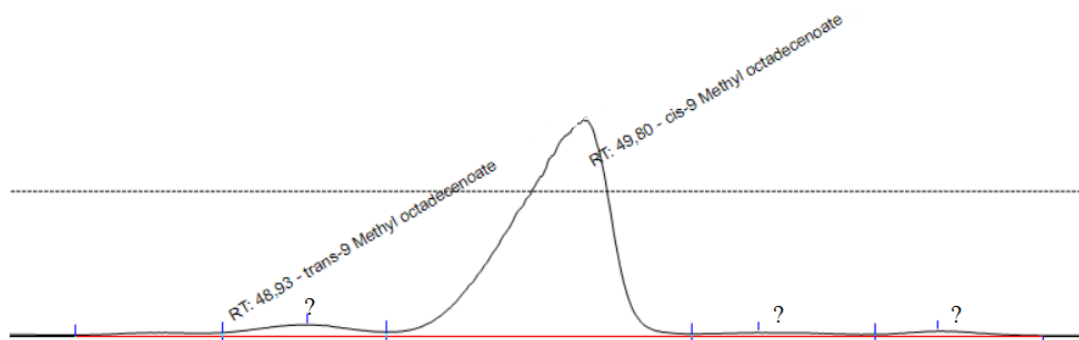
**Figur 4.3.2:** Fordeling av mettet, én-umettet og flerumettet fettsyrer i MAG fra fordøyd Kremgo, Kremfløte, Norvegia og Setersrømme.

I teorien hydrolyseres TAG til 2-MAG under fordøyelsen, og i henhold til teorien beskrevet i avsnitt 2.2 vil de tre mest utbredte fettsyrene 2-MAG være C16:0, C18:1 og C14:0. Dette stemmer godt overens med hva som ble funnet i analysen. Spesielt den større mengden med C14:0, samt den mindre mengden C18:0 gir god indikasjon på at det er 2-MAG og ikke 1-MAG tilstede i prøvemateriale. 3-MAG kan utelukkes på grunn av mangelen på C4:0 og C6:0 i fraksjonen. Fordeling av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9 vises i figur 4.3.3.



**Figur 4.3.3:** Fordeling av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9 i MAG-fraksjonen til Kremgo, Kremfløte, Norvegia og Setersrømme.

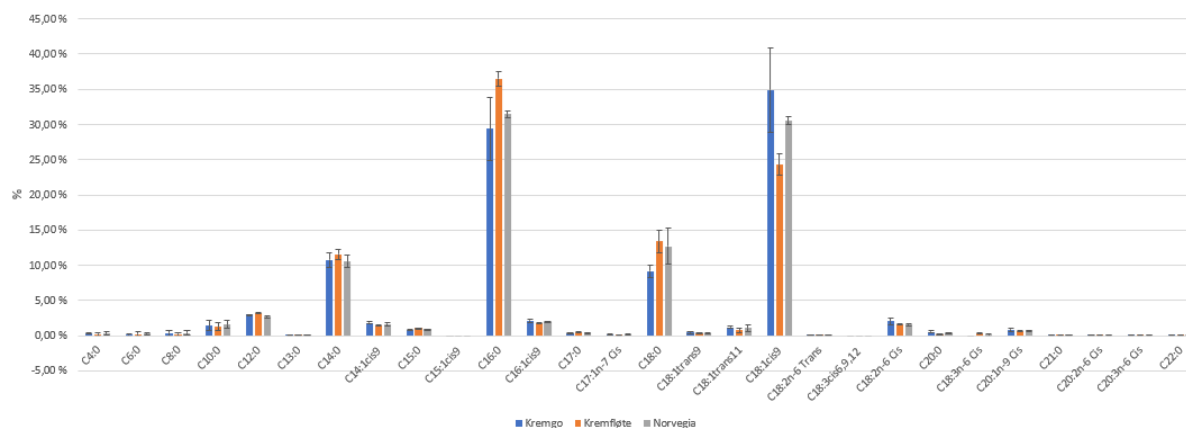
Rundt C18:1*cis*9 observeres det flere ukjente topner som mistenkes å være andre C18:1 isomerer. Her har alle  $m/z = 296$  som molekylion og  $m/z = 55$  som dominerende ion, noe som indikerer at det er énumettede fettsyrer med 18 karbonatomer. Arealet på de ukjente monoerene er små nok til å ikke gi signifikante forskjeller i den totale fettsyreprofilen. Figur 4.3.4 viser et utklipp av kromatogrammet i område rundt C18:1-isomerene. Figuren viser 3 ukjente signaler i tillegg til *cis* og *trans*-isomerene til C18:1n9.



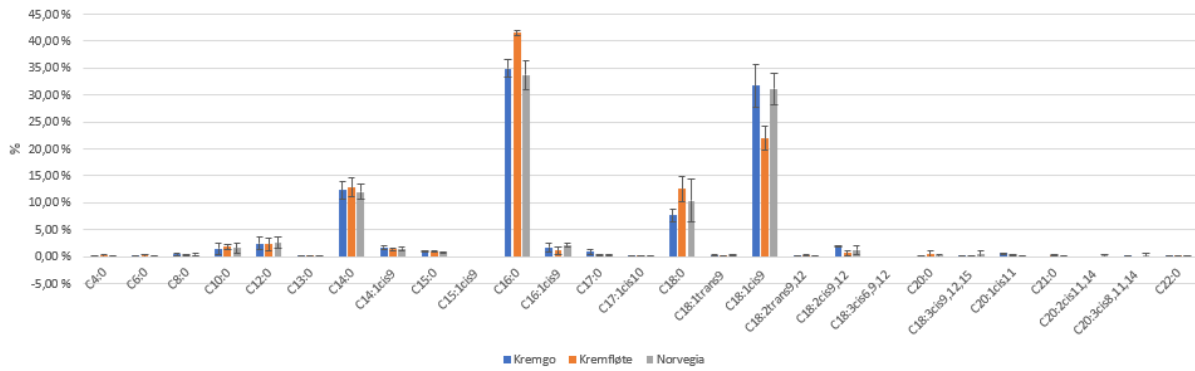
**Figur 4.3.4:** Utklipp av område i kromatogrammet som viser C18:1-isomerene i Norgeia.

#### 4.3.2 Fettsyreprofil DAG og TAG

DAG og TAG fraksjonen for prøvene ble også analysert. Fettsyreprofilen for TAG og DAG vises i henholdsvis figur 4.3.5 og 4.3.6. I begge fraksjonene ble det identifisert 27 forskjellige fettsyrer, hvorav 14 er mettet, 7 er én-umettet og 6 er flerumettet. Fettsyrene identifisert er de samme som ble funnet i MAG-fraksjon. Det ble i tillegg identifisert C4:0 og C6:0 i DAG/TAG. Fordelingen av fettsyreklassene vises i figur 4.3.7.

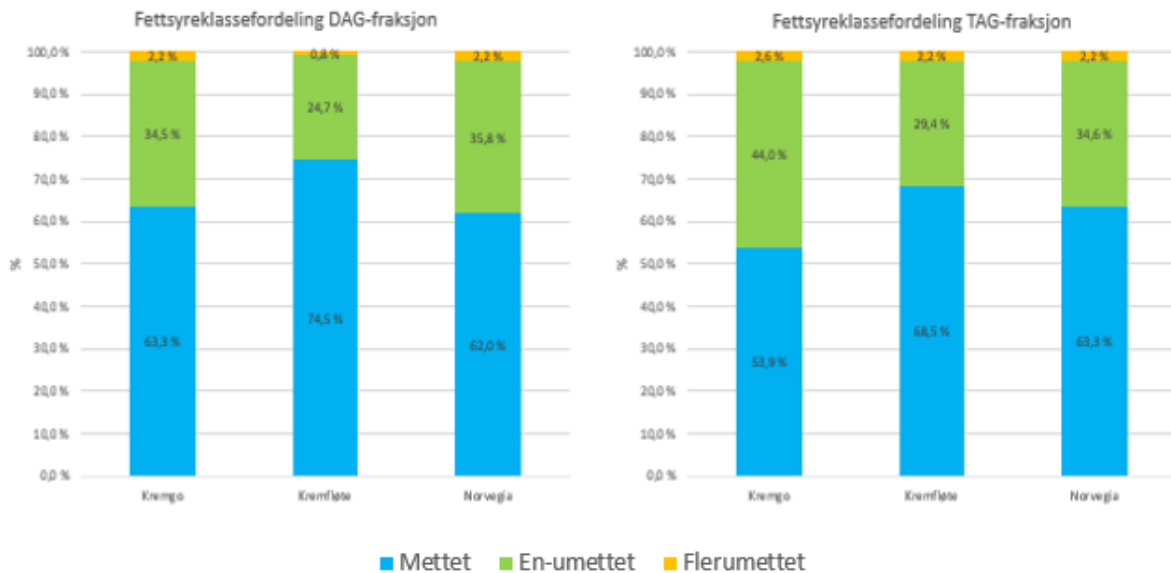


**Figur 4.3.5:** Fettsyreprofil for TAG-fraksjon fra Kremgo, Kremfløte og Norgeia. Det ble identifisert 27 forskjellige fettsyrer i fraksjonen. Rundt 85 % av fraksjonene består av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1cis9.



**Figur 4.3.6:** Fettsyreprofil for DAG-fraksjon fra Kremgo, Kremfløte og Norvegia. Det ble identifisert 27 forskjellige fettsyrer i fraksjonen. Rundt 85 % av fraksjonen består av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1cis9.

TAG-fraksjonen inneholdt 55 – 68 % mettet fett, 29 til 44% én-umettet og 2,2 til 2,6 flerumettet. DAG-fraksjonen inneholdt 62 – 74 % mettet fett, 24 til 46 % én-umettet og 0,8 til 2,2 flerumettet. Fettsyreprofilen til begge fraksjonene består av rundt 85 % C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1cis9. Forholdet imellom C16:0 og C18:1cis9 er mer likt enn ved MAG-fraksjonen (begge rundt 30 %). Det samme gjelder for forholdet mellom C14:0 og C18:0 (begge rundt 10 %). Det observeres også en større variasjon imellom matrisene enn i MAG-fraksjonen.



**Figur 4.3.7:** Fettsyrekassefordeling i DAG og TAG-fraksjonen. av Kremgo, Kremfløte og Norvegia.

#### 4.3.3 Oppsummering analyse av meieriprodukter

Analysen av MAG fraksjonen viser at 25 forskjellige fettsyrer kan finnes igjen i MAG-fraksjonen etter fordøyelse. Rundt 90 % av den totale fettsyremengden består av C16:0, C14:0, C18:0 og C18:1*cis*9. I DAG/TAG-fraksjonen identifiseres C4:0 og C6:0 i tillegg til de 25 fettsyrene funnet i MAG-fraksjonen. DAG/TAG-fraksjonen består også primært av C16:0, C14:0, C18:0 og C18:1*cis*9. Det observeres at mengden C16:0 synker og mengde C18:1*cis*9 øker i DAG/TAG sammenlignet med MAG. Dette er også forventet da forholdet mellom C18:1 og C16:0 i er bortimot lik i TAG fra melk (Fox et al., 2015b). Meieriprodukter bør inneholde en større mengde C4:0 enn hva som ble funnet i TAG (og til en viss grad DAG). Dette gir indikasjon på at opparbeidelsesmetoden taper mye av de korte fettsyrene før analyse. Underkvantifisering av kortkjedete fettsyrer ble også observert under metodeutviklingen og valideringen. Dette kan komme av at de korte fettsyrene er svært flyktige, spesielt som FAME.

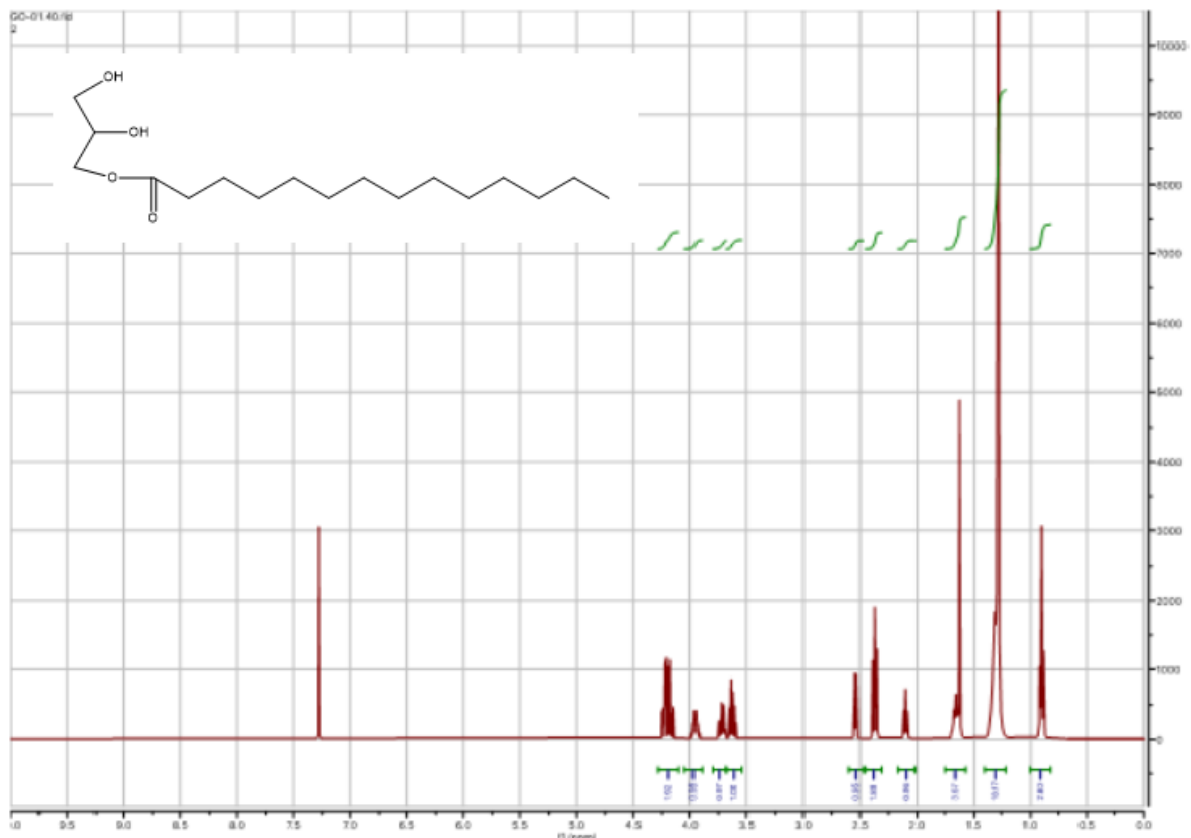
Metoden benyttet vil ikke gi noen informasjon om den stereospesifikke posisjoneringen til fettsyren i MAG, men sammenlignes resultatene med hva teorien sier om den stereospesifikke posisjoneringen til fettsyrer i TAG fra meieriprodukter, gir dette god indikasjon på at fordøyd MAG-fraksjonene inneholder 2-MAG.

#### 4.4 Bestemmelse av stereospesifikk posisjon til MAG etter fordøyelse

For å påvise at fettsyrene er plassert i sn-2 posisjon etter fordøyelse ble det utført et forsøk på å skille imellom sn-1 og sn-2 posisjonert MAG ved bruk av  $^1\text{H-NMR}$ . Det teoretiske grunnlaget rundt forsøket er beskrevet i avsnitt 2.3.6.1.

##### 4.4.1: Analyse av standarder

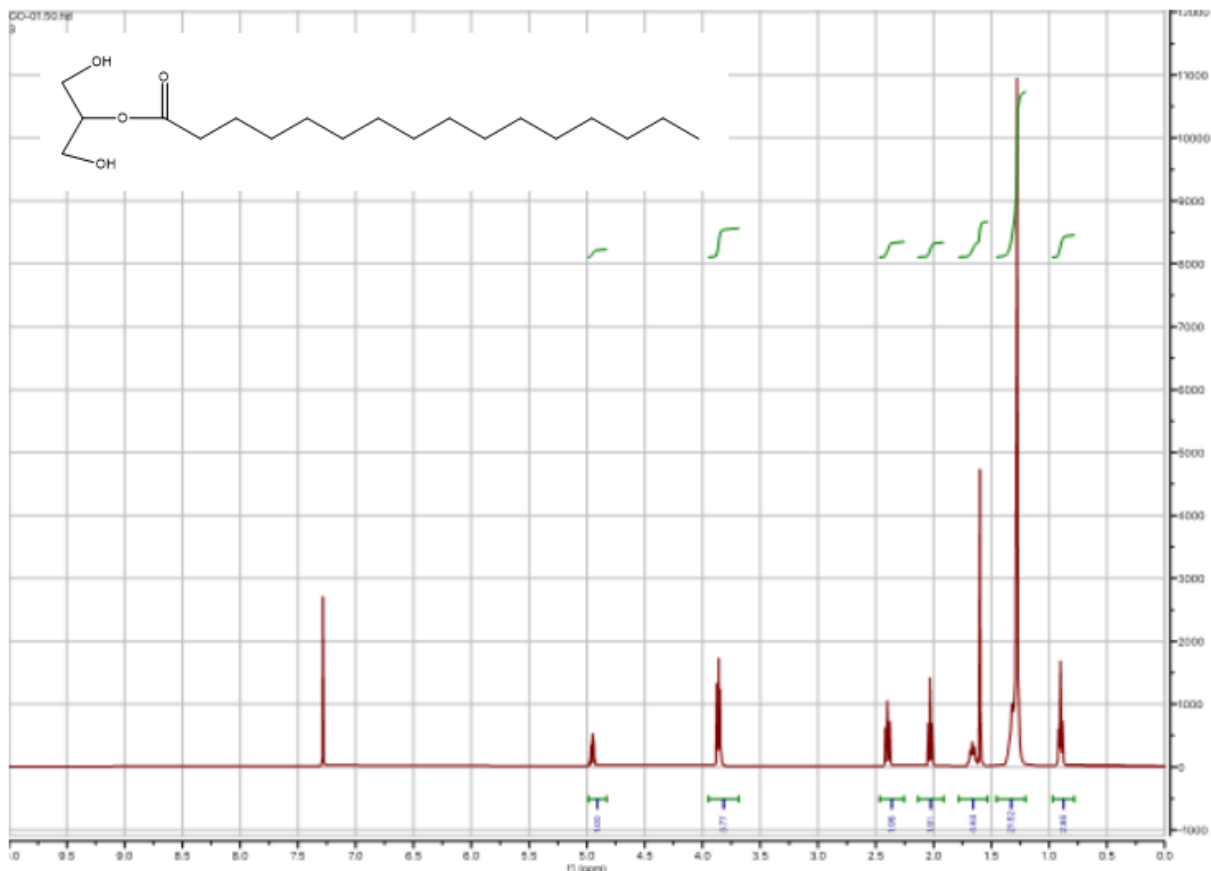
For å teste ut om teorien fungerer ble det utført analyser på utvalgte standarder. Figur 4.4.1 viser 1-monomyristin. Tre signaler kan observeres i område 3,5 til 4,5 ppm i 2:1:1:1-mønster.  $\text{ROCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$  kan observeres ved rundt 3,6.  $\text{ROCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$  kan ses ved ca 3,9 og  $\text{ROCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$  kan ses ved ca 4,2. Det er tydelig at det er forestering i sn-1 posisjon og 1-MAG.



**Figur 4.4.1:**  $^1\text{H-NMR}$ -spekter av 1-monomyristin. 2:1:1:1-mønsteret viser tegn på sn-1 forestering.

Figur 4.4.2 viser  $^1\text{H-NMR}$ -spekter for 2-monopalmitin. Spekteret viser et 4 protons signal ved 3,7 ppm ( $\text{HOCH}_2\text{-CH(OR)-CH}_2\text{OH}$ ) og et 1 protons signal ved 4,9 ppm ( $\text{HOCH}_2\text{-CH(OR)-CH}_2\text{OH}$ ). Dette indikerer at det er to symmetriske grupper og 1 esterifiserte gruppe. Dette tilsier at dette er en sn-2 posisjonert MAG. Ut fra forsøket kan man se at det er tydelige

forskjeller i mønstre imellom 1-MAG og 2-MAG og det er mulig å skille imellom dem med  $^1\text{H-NMR}$ .



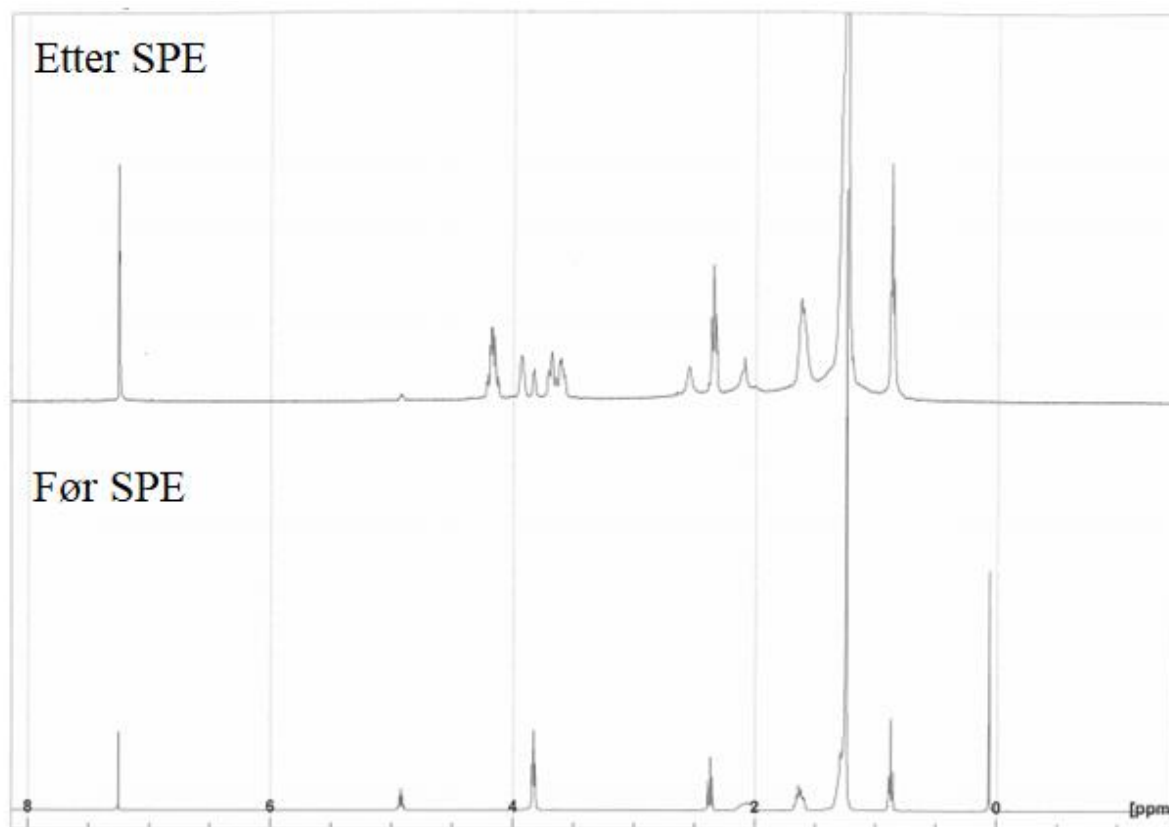
**Figur 4.4.2:**  $^1\text{H-NMR}$ -spekter av 2-monopalmitin. Foresteringen vises ca. 4,9 ppm, mens en symmetrisk gruppe kan ses ved ca. 3,7 ppm.

#### 4.4.2 Integring av SPE-fraksjonering inn i $^1\text{H-NMR}$ -metoden

For å kunne identifisere sn-posisjonen til MAG fra fordøyde prøver er vi nødt til å separere MAG fra de andre lipidene. Primært sett var det ønskelig å kunne gjøre dette via samme metode som blir brukt i den utviklede metoden. En problemstilling som da dukket opp var konseptet acylmigring, som er isomerisering av acylgruppene i MAG. Dette innebærer endring i sn-posisjon i monoacylglyseridet, som for eksempel fra sn-2 til sn-1 posisjon.

Det er flere aspekter som kan fremme acylmigring (beskrevet nærmere i avsnitt 2.1.3), i hovedsak kommer acylmigringen i metoden fra SPE-fraksjoneringen ved bruk av aminopropylkolonne. Aminopropylkolonnen er svakt basisk, noe som fremmer acylmigring. Graden av acylmigring under SPE-fraksjoneringen ble testet  $^1\text{H-NMR}$ -analyse av 2-monopalmitin før og etter SPE-fraksjonering. Resultatene vises i Figur 4.4.3. Spekteret før SPE-fraksjoneringen viser ren 2-monopalmitin hvor acyleringen kan tydelig ses ved 4,9 ppm.

Etter SPE vises det i hovedsak 2:1:1:1-mønstre observert ved 1-MAG. Et lite signal ved 4,9 ppm viser litt 2-MAG til stede, men det er i hovedsak 1-MAG i prøven. Dette er et tydelig tegn på SPE-kolonnen øker graden isomerisering fra 2-MAG til 1-MAG.

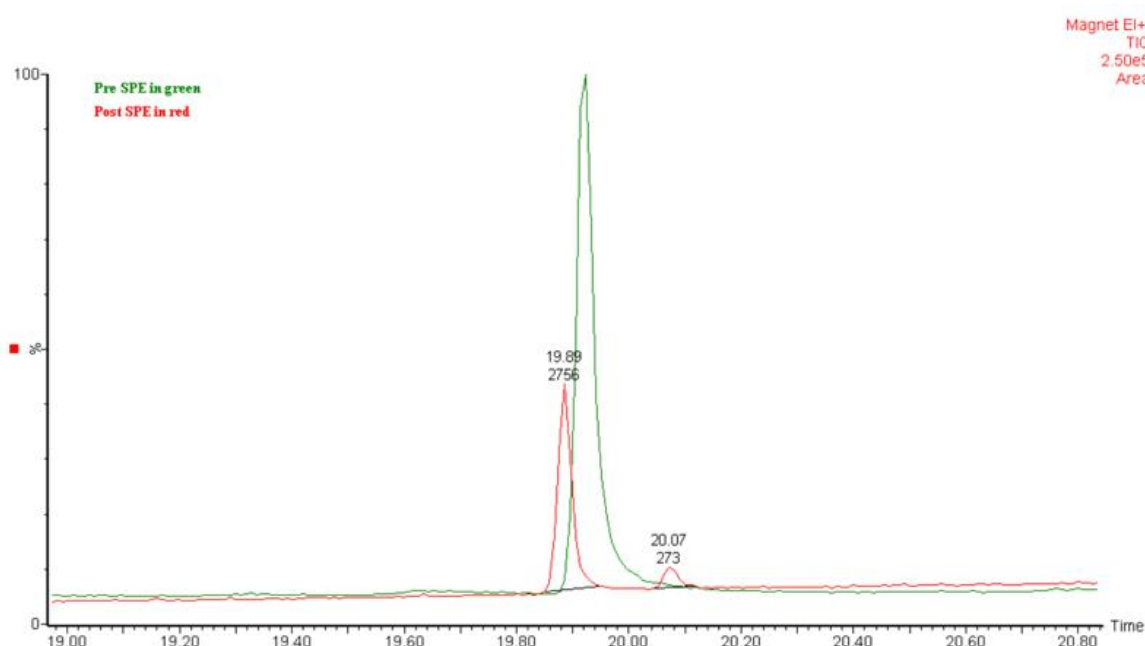


**Figur 4.4.3:** <sup>1</sup>H-NMR spekter av 2-monopalmitinstandard før og etter SPE-fraksjonering. En stor grad av acylmigring kan observeres i spekteret.

#### 4.3.3 SPE-fraksjonering ved -20 C

Et videre forsøk, i samarbeid med Anders Flytkjær, ble utført for å se om acylmigringen hemmes av lavere temperaturer. 2-monopalmitin ble fraksjonert manuelt ved -20°C i henhold til 3.4.1. Figur 4.4.4 viser 2-monopalmitinstandarden før og etter SPE. Resultatet viser ca. 10 % acylmigring i løpe av SPE-fraksjoneringen.





**Figur 4.4.4:** Kromatogram av 2-monopalmitinstandard før og etter SPE-fraksjonering ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Prøvene er derivatisert i henhold til Anders Flytkjær sin masteroppgave.

#### 4.3.4 Diskusjon og forslag til videre arbeid

Både teorien og analysen viser at det er fullt mulig å skille mellom sn-1 og sn-2 posisjonert MAG med  $^1\text{H-NMR}$ . I rene standarder vises det er klart forskjell i mønstre imellom de to isomerene. I en blanding vil det være mulig å identifisere isomere med høyest konsentrasjon. Ulempen med denne metoden er at vi vil ikke kunne identifisere identiteten til monoglyseridet, samt skille mellom dem i en blanding. Dette vil være et problem hvis det er en andel sn-1 og en andel sn-2 etter fordøyelse. Det vil være naturlig å anta at den mest dominerende MAG vil kunne godt representere resterende MAG i blandingen.

Isomerisering av 2-MAG til 1-MAG under SPE-fraksjoneringen gjør det vanskelig å benytte metoden i praksis. Det var heller ikke mulig å senke isomeriseringsgraden godt nok ved å utføre SPE i  $-20^{\circ}\text{C}$ . Det kunne videre vært mulig å prøve fraksjoneringen på enda lavere temperaturer, men dette er ofte praktisk vanskelig.

I tidligere litteratur ble det ikke oppdaget isomerisering i Silica-diolkolonner, og testing av en slik kolonne kan være mulig (Fagan et al., 2004). Det kan også være mulig å «blokkere» isomeriseringen ved å derivatisere sn-1 og sn-3 posisjonen i 2-MAG. Her foreslås det å for eksempel bruke chlorotrimethylsilane (TMCS). Utfordringen her er at både molekylvekten og polariteten til stoffet øker, noe som tilsier mye arbeid ved å optimalisere en SPE-metode. På

bakgrunn av at kilden til isomeriseringen er SPE-fraksjoneringen kan også være mulig å benytte en metode uten SPE. For eksempel bruk av LC-MS eller en «shotgun»-MS metode kan være mulig. På bakgrunn av at ca 90 % av MAG består av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9, vil det være mulig å kunne identifisere sn-posisjonen til MAG ut ifra fragmenteringsmønstret i MAG-standarder av disse fettsyrene.

#### 4.5. Oppsummering diskusjon og videre arbeid

I oppgaven ble det utført analyser på to separate sett med fordøyde H-melk prøver, samt analyse av MAG, DAG og TAG fra flere meieriprodukter som ble fordøyd til et annet prosjekt. I analysen av H-melk var det første settet med prøver lite fordøyd. I det andre settet ble det utført analyser etter gastrisk fordøyelse og etter fordøyelse i både mage og tarm. Analysen viste at hoveddelen av fordøyelsen skjer i tarm. Det ble observert at TAG ble i stor grad hydrolysert til FFA og MAG. I analysene av fordøyde meieriprodukter var det mye fett i MAG-fraksjonen og fordøyelsesmetoden vil i stor grad gi god nok fordøyelse til å gi en indikasjon på hva slags fettsyrer som er i MAG etter fordøyelse. Den stereospesifikke posisjoneringen til fettsyren i MAG skulle primært bestemmes ved bruk av  $^1\text{H-NMR}$ . En metode for å skille imellom 1-MAG og 2-MAG ut ifra antall signaler i område 3 – 5 ppm ble laget, men på grunn av isomerisering av 2-MAG til 1-MAG i SPE-kolonnen gjorde det vanskelig å benytte metoden i praksis. Fettsyreprofilen i MAG-fraksjonene indikerer at det er 2-MAG etter fordøyelse ut ifra mengden C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9. Ifølge teorien vil C16:0, C18:1*cis*9 og C14:0 være de mest utbredte fettsyrene i sn 2-posisjonen i TAG fra melk, og dette stemmer godt overens med hva som ble funnet i prøvene. I sn-1 posisjon ville det vært en større mengde C18:0 og en mindre mengde C14:0 enn hva som ble funnet i prøvene.

I valideringen av metoden ble det benyttet MAG-standarder med fettsyrene C8:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1*cis*9 og C20:0. Disse skal i henholdsvis representere korte fettsyrer (C8:0), medium lange fettsyrer (C14:0, C16:0 og C18:0), lange fettsyrer (C20:0) og én-umettede fettsyrer (C18:1*cis*9). Standardene ble også valgt ut med bakgrunnen for at flere av disse fettsyrene vil være til stede i melk og meieriprodukter. LOD og LOQ ble henholdsvis funnet til å være imellom 3,5 til 14,1  $\mu\text{g/mL}$  og imellom 11,8 og 47,0  $\mu\text{g/mL}$ . LOD og LOQ ligger noe høyere enn andre forsøk med FAME (Molversmyr, 2020) & (Devle et al., 2009), men på bakgrunn av at opparbeidelsesmetoden fraksjonerer to ganger er det ikke uforventet at verdiene er høyere.

Metodens presisjon ble målt i både repeterbarhet og reproduserbarhet. Det ble henholdsvis funnet at alle standardene hadde en repeterbarhet bedre enn 5 % og en reproduserbarhet bedre enn 10 %. Det var heller ingen av standardene som hadde en repeterbarhet dårligere enn  $95\% \pm 2\text{SD}$ . Analyse av metodens nøyaktighet viser at alle standardene uten 2 hadde mindre enn 5 % avvik fra sann verdi. C20:0 (7,2 % avvik) og C8:0 (39,9 % avvik) lå over 5 %. Spesielt C8:0 hadde stor grad av underkvantifisering, noe som tyder på at internstandard, C11:0, er

lite egnet for kvantifisering av korte fettsyrer. Det ble planlagt et forsøk med bruk av C7:0 MAG som internstandard, men på grunn av Covid 19 restriksjoner ble det problemer med levering av standarden og tid til laboratorieanalyser.

#### 4.5.1 Videre arbeid

##### **Metodeutvikling og validering**

Videre testing av valideringsparameterne vil gi kunne kvalitetssikre analyseresultatene bedre. Under valideringen ble det benyttet en konsentrasjon på 1 mg/mL standard, men videre testing av andre konsentrasjonsområder vil være nyttig i å kvalitetssikre metoden. Analyser i lav, middels og høye konsentrasjonsområder vil gi en bedre validering av metoden.

Standardene benyttet i valideringen ble begrenset til 8 standarder som representerer fettsyrene funnet i melk. Det ble ikke utført noen analyser av flerumettede standarder eller standarder kortere enn C8:0 og lengre enn C20:0. Det ble observert en lav grad av underkvantifisering ved C20:0 og det kan være nyttig å se om lengre fettsyrer også blir underkvantifisert. På grunn av Covid 19 restriksjoner ble det gjort færre analyser av C16:0 og C20:0 enn planlagt og det hadde vært ønskelig å validere disse standardene i samme grad som de andre. Det samme gjelder for bruk av C7:0 som internstandard til korte fettsyrer. Det ble heller ikke utført noen spesifikk undersøkelse av metodens robusthet på grunn av dette.

##### **Meieriprodukter**

Videre forsøk på melk og meieriprodukter vil gi mer informasjon om metodens evne til å håndtere mulige matrikseffekter. Det vil spesielt være nyttig å utføre analyser på fordøyde produkter som inneholder MAG.

##### **Stereospesifikk posisjonering i MAG**

I punkt 4.3.5 foreslås det flere mulige forsøk som kan utføres for å identifisere om det er 1-MAG eller 2-MAG etter fordøyelse. Uttesting av diverse andre SPE-kolonner, som Silica-diol, samt bruk av shotgun-MS kan være mulig alternativer.

## 5. Konklusjon

Hovedmålet med denne masteroppgaven var å utvikle en analysemetode for å identifisere og kvantifisere fettsyren i sn-2 posisjon i MAG ekstrahert fra enzymatisk fordøyde meieriprøver. Analysen innebærer fordøyelse med humane enzymer og lipidekstraksjon med Folchs ekstraksjon. Lipidblandingen fraksjoneres med automatisert SPE til NL, FFA og PL. NL fraksjoneres videre ved SPE til MAG, DAG og TAG-fraksjoner. MAG-fraksjonen derivatiseres til FAME og analyseres på GC-MS. Analysemetoden vil kunne identifisere og kvantifiserer fettsyrene i MAG-fraksjonen, men vil si lite om den stereospesifikke posisjonen til fettsyrene i MAG. Det ble derfor også utviklet en metode for å skille imellom 1-MAG og 2-MAG ved  $^1\text{H-NMR}$ .

Metodeutviklingen, etterfulgt av en metodevalidering, har gitt omfattende testing av analysemetoden i sin helhet. Valideringen ble utført på utvalgte standarder som representerer korte, medium, lange og umettede fettsyrer, samt fettsyrer ofte funnet i melk og meieriprodukter. Resultatene fra analysen av fordøyelsesmetoden viser at metoden i stor grad hydrolyserer melkefettet. Metoden ga rundt 70 % FFA og 15 % MAG ved fordøyelse av H-melk. SPE-fraksjoneringsmetodene gir generelt sett rene fraksjoner under anbefalte forhold. Metodevalideringen ble utført på utvalgte fettsyrer, som både skal representere korte, medium, lange og umettede fettsyrer, samt fettsyrer funnet i melk og meieriprodukter. Valideringen viser at LOD og LOQ henholdsvis ligger imellom 3,5 til 14,1  $\mu\text{g/mL}$  og imellom 11,8 og 47,0  $\mu\text{g/mL}$  for fettsyrene. Analysen av metodens presisjonsparameteret viser at metoden har en repeterbarhet med under 5 % spredning og reproducerbarhet med under 10 % spredning. Metoden gir også under 5 % avvik fra reelle verdier for alle standardene utenom 2. Metoden underkvantifiseres kortkjedete fettsyrer, men en mer egnet internstandard vil løse dette problemet. Metoden gir også lineære resultater opp til 30  $\text{mg/mL}$  total lipidkonsentrasjon.

I analysen av MAG-fraksjonen fra fordøyde prøver av Kremgo, Kremfløte, Norvegia og Seterrømme ble det identifisert 25 forskjellige fettsyrer, hvor 12 er mettede fettsyrer, 7 er én-umettede og 6 er flerumettede. Rundt 90 % av den totale fettsyremengden i prøvene bestod av C14:0, C16:0, og C18:1*cis*9, samt en mindre mengde C18:0. Fettsyreprofilen stemmer godt overens med hva forskningen sier om fettsyrene som foresterer seg i sn-2 posisjon i TAG i melkefett. Dette gir derfor indikasjon på at det er 2-MAG etter fordøyelse.

Den stereospesifikke posisjonen til MAG skulle bestemmes ved bruk av  $^1\text{H-NMR}$ . I område 3 – 5 ppm vil 1-MAG ha 3 separate signaler, mens 2-MAG vill ha 2 signaler på grunn av symmetri. Denne metoden fungerte på standarder, men på bakgrunn av at 2-MAG isomeriseres til 1-MAG i SPE-kolonnene var det vanskelig å benytte metoden i praksis.

Oppsummert kan det konkluderes med at metoden gir akseptable resultater når det kommer til fraksjonering, identifisering og kvantifisering fettsyrene i MAG-fraksjonen. Metoden gir akseptable resultater for medium (C10 – C18) og lange fettsyrer (> C18), samt én-umettede fettsyrer. Metoden underkvantifiserer korte fettsyrer (< C10), men dette problemet kan løses ved å benytte en bedre egnet internstandard. Bestemmelse av den stereospesifikke posisjonen til fettsyren i MAG er vanskelig på grunn av isomeriseringen i SPE-kolonnen, men fettsyreprofilen til MAG-fraksjonen fra meieriproduktene analysert indikerer sterkt at prøvene er 2-MAG etter fordøyelse.

## 6. Referanser

### Referanser

- Agilent. (u.d). HP-88 Columns. Retrieved from <https://www.agilent.com/en/product/gc-columns/application-specific-gc-columns/hp-88-columns>
- Anthias Consulting. (2021). A simplified diagram of a gas chromatograph showing: (1) carrier gas, (2) autosampler, (3) inlet, (4) analytical column, (5) detector and (6) PC. . In.
- Astrup, A., Magkos, F., Bier, D. M., Brenna, T., Otto, M. C. d. O., Hill, J. O., . . . Krauss, R. M. (2020). Saturated Fats and Health: A Reassessment and Proposal for Food-Based Recommendations: JACC State-of-the-Art Review. *THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY*, 76(7), 844-857. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.05.077>
- Athenstaedt, K., & Daum, G. (2006). The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63, 1355-1362. doi:10.1007/s00018-006-6016-8
- Bergström, B. (1993). Luminal Digestion of Fats. In e. a. Vay Liang W (Ed.), *The Pancrease: Biologi, Pathology abd Disease* (2 ed., pp. 475-486). New York: Raven Press.
- Bernard, L., Muriel Bonnet, Delavaud, C., Delosiere, M., Ferlay, A., Fougere, H., & Graulet, B. (2018). Milk Fat Globule in Ruminant: Major and Minor Compounds, Nutritional Regulation and Differences Among Species. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(5), 2-3. doi:10.1002/ejlt.201700039
- Berry, S. E. E. (2009). Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews*, 3-14. doi:10.1017/S0954422409369267
- Bjørngen, M. (u.d). *Bruk av kontrollkort: Hvordan og hvorfor*. Retrieved from Oslo Metropolitan University: <https://www.akkreditert.no/contentassets/c85041e2a38848ffaf982ac8c67b0924/3-kontrollkort.pdf>
- Blasi, F., Lombardi, G., Damiani, P., Simonetti, M. S., Giua, L., & Cossignani, L. (2012). Triacylglycerol stereospecific analysis and linear discriminant analysis for milk speciation. *Journal of Dairy Research*, 80(2). doi:10.1017/S0022029912000635
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8). doi:10.1139/o59-099
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., . . . Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14, 1-6. doi:<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Calder, P. (2016). Fatty Acids: Metabolism. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 632-644).
- Carrière, F., Barrowman, J. A., Verger, R., & René, L. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*, 105(3), 876-888. doi:10.1016/0016-5085(93)90908-u
- Chiu, H.-H., & Kuo, C.-H. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28, 60-73. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.003>
- Christie, W. (1992). *Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids*. Retrieved from Invergowrie, Dundee, Skotland: <https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/solid-phase-extraction-columns-in-the-analysis-of-lipids>
- Christie, W. (2020a). Mass Spectrometry of Methyl Esters: Monoenoic Fatty Acids. Retrieved from [https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb\\_html/ms/methesters/me-1db/index.htm](https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/methesters/me-1db/index.htm)
- Christie, W. (2020b). Mass Spectrometry of Methyl Esters: Normal Saturated Fatty Acids. Retrieved from [https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb\\_html/ms/methesters/me-0db/index.htm](https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/methesters/me-0db/index.htm)

- Christie, W., & Clapperton, J. (1982). Structures of the triglycerides of cows' milk, fortified milks (including infant formulae), and human milk. *International Journal of Dairy Technology*, 35(1). doi:<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1982.tb02259.x>
- Compton, D. L., Laszlo, J. A., & Evans, K. O. (2013). Influence of Solid Supports on Acyl Migration in 2-Monoacylglycerols: Purification of 2-MAG via Flash Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 1397-1403. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-013-2274-4>
- Devle, H., Rukke, E.-O., Naess-Andresen, C. F., & Ekeberg, D. (2009). A GC - Magnetic sector MS method for identification and quantification of fatty acids in ewe milk by different acquisition modes. *Journal of Separation Science*. doi:10.1002/jssc.200900455
- Devle, H., Ulleberg, E. K., Naess-Andresen, C. F., Elling-Olav Rukke, Vegarud, G., & Ekeberg, D. (2014). Reciprocal interacting effects of proteins and lipids during ex vivo digestion of bovine milk. *International Dairy Journal*, 36. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.008>
- Embleton, J. K., & Pouton, C. W. (1997). Structure and function of gastro-intestinal lipases *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25, 15-32. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00488-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00488-7)
- Fagan, P., Wijesundera, C., & Watkins, P. (2004). *Determination of mono- and di-acylglycerols in milk lipids*. Retrieved from Werribee, Australia:
- Fischer, E., Bergmann, M., & Bärwind, H. (1920). Neue Synthese von  $\alpha$ -Monoglyceriden. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 53(9), 1589-1605. doi:<https://doi.org/10.1002/cber.19200530902>
- Flurkey, W. H. (2006). Use of solid phase extraction in the biochemistry laboratory to separate different lipids. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(5), 357-360. Retrieved from <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.2005.49403305357>
- Folch, J., M. Lees, & Stanley, G. H. S. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015a). Biologically Active Compounds in Milk. In *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 415-497). New York: Springer International Publishing.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015b). Milk Lipids. In *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 69-143). New York: Springer International Publishing.
- Fureby, A., Virto, C., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1996). Acyl group migrations in 2-monoolein. *Biocatalysis and Biotransformation*, 14, 89-111. doi:<https://doi.org/10.3109/10242429609106879>
- Gebruers, K., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2009). Quantification of Arabinoxylans and Their Degree of Branching Using Gas Chromatography. In *Healthgrain Methods* (pp. 177-189).
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., & Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*, 62, 7513-7514. doi:<https://doi.org/10.1021/jo971176v>
- Green, M. (1999). *A Practical Guide to Analytical Method Validation*. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac961912f?src=recsys>
- Greibrokk, T., Karlsen, J., Rasmussen, K. E., & Lundanes, E. (1998a). Gasskromatografi. In *Kromatografi: Seperasjon og deteksjon* (pp. 109-153). Oslo: Pensumtjeneste.
- Greibrokk, T., Karlsen, J., Rasmussen, K. E., & Lundanes, E. (1998b). Kromatografisk teori. In *Kromatografi: Seperasjon og deteksjon* (pp. 6-24). Oslo: Pensumtjeneste.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J., & Michell, R. H. (2016a). Important biological lipids and their structures. In *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health, 6th Edition* (pp. 13-43). West Sussex, UK: Wiley Blackwell.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J., & Michell, R. H. (2016b). Lipid assimilation and transport. In *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health, 6th Edition* (pp. 253-285). West Sussex, UK: Wiley Blackwell.



- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J., & Michell, R. H. (2016c). Lipids in food. In *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health, 6th Edition* (pp. 229-249). West Sussex, UK: Wiley Blackwell.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J., & Michell, R. H. (2016d). Lipids: definitions, naming, methods and a guide to the content of this book. In *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health, 6th Edition* (pp. 1-12): Wiley Blackwell.
- Hamilton, J. A., & Kamp, F. (2000). How Are Free Fatty Acids Transported in Membranes. *Diabetes*, 48(12), 2255-2269. doi:10.2337/diabetes.48.12.2255
- Haraldsen, S., & Hausberg, I. (2019). *Videreutvikling av metode for fastfase ekstraksjon (SPE) av mono-, di- og triacylglyseroler ved bruk av automatisert SPE* (Master). NMBU,
- Harris, C. P., Berg, A. v., Berdel, D., Bauer, C.-P., Schikowski, T., Koletzki, S., . . . Standl, M. (2019). Dietary saturated fat and low-grade inflammation modified by accelerometer-measured physical activity in adolescence: results from the GINIplus and LISA birth cohorts. *BMC Public Health*, 19. doi:<https://doi.org/10.1186/s12889-019-7113-6>
- Haug, A. (2017). *Effekt av lipider i kjøtt og meieriprodukter på fordøyelse og lavgrad betennelse i celler, dyr og mennesker*. Retrieved from <https://www.mn.uio.no/kjemi/english/research/about/infrastructure/nmr/manuals/miscellaneous/lipidinflammagenes.-nov-2017.pdf>
- Helse Bergen Lab for klinisk biokjemi. (2017). *Validering/verifisering av analyseinstrumenter og -metoder*. Retrieved from <https://www.merrell.com/m/file/GetFile.ashx?id=71265978&version=0>
- Helsedirektoratet. (2018). Kosthold ved hjerte- og karsykdom. Retrieved from <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kosthold-ved-diagnoser-og-sykdomstilstander/rad-om-kosthold-ved-ulike-diagnoser-og-sykdomstilstander/kosthold-ved-hjerte-og-karsykdom#null-praktisk>
- Hibbert, B. (2007). *Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory*. Oxford: Oxford University Press.
- Hoffmann, E. d., & Stroobant, V. (2012a). Analysis of Biomolecules: Lipids. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (Vol. 3, pp. 371-382). Chichester, England: Wiley & Sons.
- Hoffmann, E. d., & Stroobant, V. (2012b). Analytical Information: Quantitative Data. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (Vol. 3, pp. 260-272). Chichester, England: Wiley & Sons.
- Hoffmann, E. d., & Stroobant, V. (2012c). Fragmentation Reactions. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (Vol. 3, pp. 273-298). Chichester, England: Wiley & Sons.
- Hoffmann, E. d., & Stroobant, V. (2012d). Ion Sources. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (Vol. 3, pp. 1-17). Chichester, England: Wiley & Sons.
- Hoffmann, E. d., & Stroobant, V. (2012e). Mass Analyser: Quadrupole Analysers. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (Vol. 3, pp. 88-99). Chichester, England: Wiley & Sons.
- Hoffmann, E. d., & Stroobant, V. (2012f). Mass Spectrometry/Chromatography Coupling: Chromatography Data Acquisition Modes. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (Vol. 3, pp. 228-230). Chichester, England: Wiley & Sons.
- Hovind, H. (2006). *Intern kvalitetskontroll*. Retrieved from <https://docplayer.me/41004037-Intern-kvalitets-kon-troll-handbok-for-kjemiske-laboratorier.html>
- Kemppinen, A. (2018). *Chromatographic and Mass Spectrometric Determination of Molecular Species of Short-Chain Triacylglycerols in Butterfat* (pHd). University of Helsinki, Retrieved from <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/233956>
- Kildahl-Andersen, G., Gjerlaug-Enger, E., Rise, F., Haug, A., & Egelanddal, B. (2020). Quantification of Fatty Acids and their Regioisomeric Distribution in Triacylglycerols from Porcine and Bovine Sources Using <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy. *Lipids*, 56(1). doi:<https://doi.org/10.1002/lipid.12277>

- Kodali, D. R., Tercyak, A., Fahey, D. A., & Small, D. M. (1990). Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol. *Chemistry and Physics of Lipids, Volume 52*, 163-170. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0009308490901114>
- Lichtenstein, A. H. (2016). Trans Fatty Acid. In *The Health of Populations* (pp. 645-648): Elsevier Inc.
- Lordan, R., Tsoupras, A., & Zabetakis, I. (2017). Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*, 22(11), 1-32. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules22111964>
- Lumen. (u.d). Digestive System Processes. Retrieved from <https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/digestive-system-processes/>
- Lunn, J., & Theobald, H. E. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin*, 31(3), 178-224. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2006.00571.x>
- Mattson, F. H., & Volpenhein, R. A. (1963). The Digestion and Absorption of Triglycerides. *Journal of Biological Chemistry*, 239(9), 2772-2777. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93813-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93813-5)
- McLafferty, F. W. (1959). Mass Spectrometric Analysis. Molecular Rearrangements. *Anal. Chem*, 31(1), 82-87. doi:<https://doi.org/10.1021/ac60145a015>
- Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L., Roussel, A., Rivière, M., Carrière, F., . . . Verger, R. (2020). Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. *Biochimie*, 82, 973-986. doi:[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01179-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01179-2)
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010a). Introduction. In *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (pp. 1-16). Harlow, England: Pearson Education Limited.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010b). The quality of analytical measurements. In *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (pp. 74-107). Harlow, England: Pearson Education Limited.
- Mitchell, D. A., Rodriguez, J. A., Carriere, F., & Krieger, N. (2008). Determination of the quantitative stereoselectivity fingerprint of lipases during hydrolysis of a prochiral triacylglycerol. *Journal of Biotechnology*, 135(2), 168-173. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.03.013>
- Mjøs, S. A. (2004). The prediction of fatty acid structure from selected ions in electron impact mass spectra of fatty acid methyl esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(8), 550-560. doi: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200401013>
- Molvørsmyr, E. (2020). *Identification and quantitation of lipid in Atlantic mackerel (Scomber scombrus), wild and farmed Atlantic salmon (Salmo salar), and salmon feed by GC-MS*. (Master). NMBU, Retrieved from <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2722629>
- Mu, H., & Porsgaard, T. (2005). The metabolism of structured triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 44(6), 430-448. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.09.002>
- Nasjonalt råd for ernæring. (2017). *Kostråd om fett - en oppdatering og vurdering av kunnskapsgrunnlaget*. Retrieved from [https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/kostrad-om-fett-en-oppdatering-og-vurdering-av-kunnskapsgrunnlaget/Kostr%C3%A5d%20om%20fett%20%E2%80%93%20En%20oppdatering%20og%20vurdering%20av%20kunnskapsgrunnlaget.pdf/\\_attachment/inline/6dc3e4d8-3336-45e3-9088-ceaa1beb1278:ed565ff9547d5dd31fed7f46605a9ff3c9d5895f/Kostr%C3%A5d%20om%20fett%20%E2%80%93%20En%20oppdatering%20og%20vurdering%20av%20kunnskapsgrunnlaget.pdf](https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/kostrad-om-fett-en-oppdatering-og-vurdering-av-kunnskapsgrunnlaget/Kostr%C3%A5d%20om%20fett%20%E2%80%93%20En%20oppdatering%20og%20vurdering%20av%20kunnskapsgrunnlaget.pdf/_attachment/inline/6dc3e4d8-3336-45e3-9088-ceaa1beb1278:ed565ff9547d5dd31fed7f46605a9ff3c9d5895f/Kostr%C3%A5d%20om%20fett%20%E2%80%93%20En%20oppdatering%20og%20vurdering%20av%20kunnskapsgrunnlaget.pdf)
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2014). A method based on 1H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *Food Research International*, 66, 380-386. doi:10.1016/j.foodres.2014.09.031
- NMBU. (2018). Effects of lipids' composition and structure in meat and dairy foods on digestibility and low-grade inflammation in cells, animals and humans (LipidInflammaGenes). Retrieved from <https://www.nmbu.no/en/projects/node/34902>

- Oldekop, M.-L. (u.d). Estimating the linear range. Retrieved from [https://sisu.ut.ee/lcms\\_method\\_validation/33-estimating-linear-range](https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/33-estimating-linear-range)
- Parodi, P. W. (1979). Stereospecific distribution of fatty acids in bovine milk fat triglycerides. *Journal of Dairy Research*, 46(1). doi:<https://doi.org/10.1017/S0022029900016873>
- Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619-627. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Premier Biosoft. (u.d). Components of a Mass Spectrometer. In.
- Rarokar, N., Menghani, S., Kerzare, D., & Khedekar, P. B. (2017). Progress in Synthesis of Monoglycerides for Use in Food and Pharmaceuticals. *Exp Food Chem*, 3(3). doi:10.4172/2472-0542.1000128
- Restek. (u.d). Rtx-2330 Columns. Retrieved from <https://www.restek.com/catalog/view/1439>
- Reusch, W. (2013). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Retrieved from <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/nmr/nmr1.htm>
- Rockwood, A. L., Kushnir, M. M., & Clarke, N. J. (2018). Mass Spectrometry. In *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry* (pp. 33-65).
- Rod-in, W., Monmai, C., Shin, I.-s., You, S., & Park, W. J. (2020). *Neutral Lipids, Glycolipids, and Phospholipids, Isolated from Sandfish (Arctoscopus japonicus) Eggs, Exhibit Anti-Inflammatory Activity in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells through NF-κB and MAPKs Pathways*. Retrieved from
- Ruiz-Núñez, B., Dijck-Brouwer, D. A. J., & Muskiet, F. A. J. (2016). The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 36, 11-14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.12.007>
- Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2001). *Fatty Acids: Structures and Properties*. Retrieved from Oslo: [https://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/nedlagte-emner/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty\\_acids.pdf](https://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/nedlagte-emner/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty_acids.pdf)
- Sandoval, M. A. (u.d). General steps for solid phase extraction (SPE). In.
- Santos, S., Oliveira, A., & Lopes, C. (2013). Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines. *Nutrition Research*, 33(9), 687-695. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.07.002>
- Scrimgeour, C. M., & Harwood, J. L. (2007). Fatty Acid and Lipid Structure. In *The Lipid Handbook* (3 ed., pp. 1-36): CRC Press.
- Serdarevich, B. (1967). Glyceride Isomerization in Lipid Chemistry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44, 381-393. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02666775>
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005a). Mass Spectrometry. In *Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th edition*. New York: Wiley.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005b). Proton Magnetic Resonance Spectrometry. In *Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th edition* (pp. 127-175). New York: Wiley.
- Siri-Tarino, P., Sun, Q., Hu, F., & Krauss, R. (2010). Saturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease: Modulation by Replacement Nutrients. *Current Atherosclerosis Reports*, 12(6), 384-390. doi:10.1007/s11883-010-0131-6
- Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2007a). Gas Chromatography. In *Principles of Instrumental Analysis* (6 ed., pp. 788-811): Brooks/Cole.
- Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2007b). Introduction. In *Principles of Instrumental Analysis* (6 ed., pp. 788-811): Brooks/Cole.
- Thompson, M., Ellison, S., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74, 835-855. doi:10.1351/pac200274050835
- Totland, T. H., Melnæs, B. K., Lundberg-Hallén, N., Helland-Kigen, K. M., Lund-Blix, N. A., Myhre, J. B., . . . Andersen, L. F. (2012). *Norkost 3: En landsomfattende kostholdsundersøkelse blant menn og kvinner i Norge i alderen 18-70 år, 2010-11*. Retrieved from <https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/norkost-3-en-landsovmfattende->

[kostholdsundersokelse-blant-menn-og-kvinner-i-norge-i-alderen-18-70-ar-2010-11/Norkost%20en%20landsomfattende%20kostholdsundersokelse%20blant%20menn%20og%20kvinner%20i%20Norge%20i%20alderen-18-70%20%C3%A5r%202010-11.pdf/ /attachment/inline/b7bafaab-6059-4450-8d76-c3ed9f3eaf3f:be251cd1153cf1ae8e4c46eedddc13b36da3d11d/Norkost%20en%20landsomfattende%20kostholdsundersokelse%20blant%20menn%20og%20kvinner%20i%20Norge%20i%20alderen-18-70%20%C3%A5r%202010-11.pdf](https://www.matermat.no/wp-content/uploads/2016/09/Thesis-Kristi-Ekrann-Aarak.pdf)

- Vik, A., & Hansen, T. (2016). Fatty Acids and their Derivatives. In *From Biosynthesis to Total Synthesis* (pp. 130-161). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Visur, E.-M. (2020). *Måleusikkerhet, nøyaktighet og presisjon*. Retrieved from <https://docplayer.me/184021850-Maleusikkerhet-noyaktighet-og-presisjon.html>
- Walstra, P., Wouters, J., & Geurts, T. (2006a). Milk Components. In *Dairy Science and Technology 2nd edition* (pp. 17-108). Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.
- Walstra, P., Wouters, J., & Geurts, T. (2006b). Milk: Main Characteristics. In *Dairy Science and Technology 2nd edition* (pp. 3-16). Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.
- Wang, X., Zhao, X., Yang, Z., Wang, X., & Wang, T. (2020). Effect of Solvent on Acyl Migration of 2-Monoacylglycerols in Enzymatic Ethanolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68. doi:10.1021/acs.jafc.0c05578
- Yaqoob, P. (2013). Role of Lipids in Human Nutrition. In *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (pp. 655-677). Boston, MA: Springer.
- Aarak, K. E. (2013). *Release of fatty acids from salmon oil and muscle during in vitro digestion – impact of a meal composition*. (Philosophiae Doctor (PhD) Thesis). University of Life Sciences Retrieved from <https://www.matermat.no/wp-content/uploads/2016/09/Thesis-Kristi-Ekrann-Aarak.pdf> (2013:65)

## Vedlegg

### Vedlegg 1 Supelco 37 Component FAME Mix

**Tabell 1:** Oversikt over fettsyrer i Supelco 37 Component FAME Mix, med konsentrasjon og fordeling.

FAME	Fettsyre	Kons.	Fordeling
		µg/mL	Wt%
Butanoic acid	C4	400	4,00
Hexanoic acid, methyl ester	C6:0	400	4,00
Octanoic acid, methyl ester	C8:0	400	4,00
Decanoic acid, methyl ester	C10:0	400	4,00
Undecanoic acid, methyl ester	C11:0	200	2,00
Dodecanoic acid, methyl ester	C12:0	400	4,00
Tridecanoic acid, methyl ester	C13:0	200	2,00
Methyl tetradecanoate	C14:0	400	4,00
Methyl myristoleate	C14:1 <i>cis</i> 9	200	2,00
Pentadecanoic acid, methyl ester	C15:0	200	2,00
Methyl (Z)-10-pentadecenoate	C15:1 <i>cis</i> 10	200	2,00
Hexadecanoic acid, methyl ester	C16:0	600	6,00
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	C16:1 <i>cis</i> 9	200	2,00
Heptadecanoic acid, methyl ester	C17:0	200	2,00
<i>cis</i> -10-Heptadecenoic acid, methyl ester	C17:1 <i>cis</i> 10	200	2,00
Methyl stearate	C18:0	400	4,00
( <i>trans</i> -9) Methyl octadecenoate	C18:1 <i>trans</i> 9	200	2,00
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	C18:1 <i>cis</i> 9	400	4,00
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	C18:2 <i>trans</i> 9,12	200	2,00
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	C18:2 <i>cis</i> 9,12	200	2,00
6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	C18:3 <i>cis</i> 6,9,12	400	4,00
Eicosanoic acid, methyl ester	C20:0	200	2,00
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	C18:3 <i>cis</i> 9,12,15	200	2,00
Methyl 11-eicosenoate	C20:1 <i>cis</i> 11	200	2,00
Heneicosanoic acid, methyl ester	C21:0	200	2,00
<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	C20:2 <i>cis</i> 11,14	200	2,00
8,11,14-Eicosatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	C20:3 <i>cis</i> 8,11,14	400	4,00
Docosanoic acid, methyl ester	C22:0	200	2,00
11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	C20:3 <i>cis</i> 11,14,17	200	2,00
13-Docosenoic acid, methyl ester	C22:1 <i>cis</i> 13	200	2,00
5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester	C20:4 <i>cis</i> 5,8,11,14	200	2,00
Tricosanoic acid, methyl ester	C23:0	200	2,00
<i>cis</i> -13,16-Docasadienoic acid, methyl ester	C22:2 <i>cis</i> 13,16	200	2,00
Tetracosanoic acid, methyl ester	C24:0	400	4,00
5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl ester, (all-Z)-	C20:5 <i>cis</i> 5,8,11,14,17	200	2,00
15-Tetracosenoic acid, methyl ester	C24:1 <i>cis</i> 15	200	2,00

4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester, (all-Z)-	C22:6 <i>cis</i> 4,7,10,13,16, 19	200	2,00
---	--------------------------------------	-----	------

## Vedlegg 2 RRF og utvalgte ionetopper for identifisering av fettsyren.

**Tabell 2:** Oversikt over relativ responsfaktor for fettsyrene i standardmiksen, med retensjonstid og fragmentioner benyttet til å identifisere riktig fettsyre.

FAME	Fettsyre	RT min	RRF	Ioner m/z
Butanoic acid	C4	6,48	0,63	74, 87, 101
Hexanoic acid, methyl ester	C6:0	8,44	0,65	74, 87, 99, 101
Octanoic acid, methyl ester	C8:0	9,79	0,95	87, 115, 127, 129
Decanoic acid, methyl ester	C10:0	11,18	1,08	143, 155, 157, 186
Undecanoic acid, methyl ester	C11:0	12,15	1,00	143, 155, 157, 186
Dodecanoic acid, methyl ester	C12:0	13,47	1,11	171, 183, 185, 214
Tridecanoic acid, methyl ester	C13:0	15,29	0,65	185, 197, 199, 228
Methyl tetradecanoate	C14:0	16,92	1,11	199, 211, 213, 242
Methyl myristoleate	C14:1 <i>cis</i> 9	17,85	1,08	166, 208, 209 240
Pentadecanoic acid, methyl ester	C15:0	21,47	1,14	213, 225, 227, 256
Methyl (Z)-10-pentadecenoate	C15:1 <i>cis</i> 10	24,85	1,00	180, 222, 223, 254
Hexadecanoic acid, methyl ester	C16:0	26,61	1,09	227, 239, 241, 270
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	C16:1 <i>cis</i> 9	30,28	0,84	194, 236, 237, 256
Heptadecanoic acid, methyl ester	C17:0	33,91	0,91	241, 253, 255, 284
<i>cis</i> -10-Heptadecenoic acid, methyl ester	C17:1 <i>cis</i> 10	38,35	0,87	208, 250, 251, 282
Methyl stearate	C18:0	42,61	0,99	255, 267, 269, 298
( <i>trans</i> -9) Methyl octadecenoate	C18:1 <i>trans</i> 9	45,78	0,88	222, 264, 265, 296
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	C18:1 <i>cis</i> 9	46,90	1,03	222, 264, 265, 296
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	C18:2 <i>trans</i> 9,1 2	53,07	0,87	220, 262, 263, 294
Nonadecanoic acid, methyl ester	C19:0	58,29	1,00	227, 269, 281, 312
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	C18:2 <i>cis</i> 9,12	59,71	1,20	220, 262, 263, 294
6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	C18:3 <i>cis</i> 6,9,1 2	63,83	0,99	143, 227, 283, 326

Eicosanoic acid, methyl ester	C20:0	69,09	1,16	175, 177, 194, 220
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	C18:3 <i>cis</i> 9,12,15	69,43	1,16	250, 292, 293, 324
Methyl 11-eicosenoate	C20:1 <i>cis</i> 11	72,73	1,01	175, 236, 261, 292
Heneicosanoic acid, methyl ester	C21:0	77,05	0,98	283, 297, 309, 340
<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	C20:2 <i>cis</i> 11,14	77,72	1,04	290, 291, 309, 322
8,11,14-Eicosatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	C20:3 <i>cis</i> 8,11,14	80,91	0,97	311, 323, 335, 354
Docosanoic acid, methyl ester	C22:0	83,48	1,06	222, 263, 289, 320
11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	C20:3 <i>cis</i> 11,14,17	83,59	1,21	278, 320, 321, 352
13-Docosenoic acid, methyl ester	C22:1 <i>cis</i> 13	86,11	1,07	264, 289, 291, 320
5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester	C20:4 <i>cis</i> 5,8,11,14	90,87	1,33	203, 207, 219, 233
Tricosanoic acid, methyl ester	C23:0	91,17	1,10	325, 337, 368, 369
<i>cis</i> -13,16-Docosadienoic acid, methyl ester	C22:2 <i>cis</i> 13,16	92,11	1,44	318, 319, 320, 350
Tetracosanoic acid, methyl ester	C24:0	97,78	1,30	339, 351, 382, 383
5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl ester, (all-Z)-	C20:5 <i>cis</i> 5,8,11,14,17	98,33	1,32	175, 180, 201, 220
15-Tetracosenoic acid, methyl ester	C24:1 <i>cis</i> 15	99,70	1,24	306, 348, 349, 380
4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester, (all-Z)-	C22:6 <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19	102,01	1,26	105, 119, 133, 145



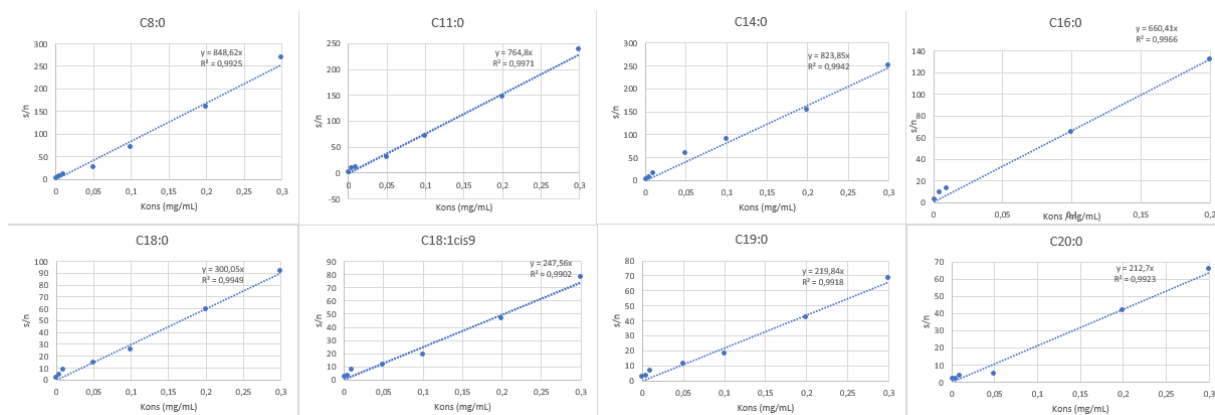
### Vedlegg 3 Fordøyelsesprosessen

**Tabell 3:** Spesifikasjoner for fordøyelsesprosessen.

<b>Oral digestion step</b>			
Duration (time amylase is active in food)	2 mins		<b>H-melk</b>
Quantity of food (g)			1 g
Volume of [5/4] salivary fluid (SSF)			0,8 ml
Volume of 0.3M CaCl <sub>2</sub>			5,0 µL
Salivary Amylase solution			0 ml
Water required to	2,0 mL	=	0,195 ml
Sampling volume (if any)			0 ml
Final Volume oral phase			2 ml
<b>Gastric digestion step</b>			
Duration	120 mins		
<i>Fixed volumes</i>			
			<b>H-melk</b>
volume of liquid food			2,00 ml
volume of [5/4] gastric juice (SGF)			1,60 ml
volume of RGE solution			0,10 ml
volume of pepsin solution			0,10 ml
volume of 0.3M CaCl <sub>2</sub>			1,0 µL
<i>Variable volumes</i>			
volume of HCl to pH 3.0 at	1 M		0,15 ml
water required to	4,00 mL	=	0,049 ml
total volume to be removed for sampling during gastric stage (ml)			0 ml
final gastric volume			4,00 ml
<b>Small intestinal digestion step (Pancreatin)</b>			
Duration	120,0 mins		<b>H-melk</b>
volume of liquid food			4,00 ml
volume of [5/4] duodenal juice (SIF)			1,70 ml
Pancreatin			1,00 ml
Bile			0,50 ml

volume of 0.3M CaCl <sub>2</sub>		8,0 μL
vol of 1M HCl for pH 7.0		0,035 ml
vol of 1M NaOH for pH 7.0		
water required to	8,00 ml	0,757 ml
total volume to be removed for sampling during intestinal stage (ml)		0,00 ml
final intestinal volume		<u>8,00 ml</u>

## Vedlegg 4 Metodevalidering



**Figur 1:** Grafer av konsentrasjonsgradient benyttet for beregning av LOQ og LOD. Verdiene kan finnes igjen i tabell 4.

**Tabell 4:** Signal/støy-forhold for konsentrasjonsgradientene.

Gjennomsnitt ± SD							
Kons	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3
C8:0	0,8	6,5	9,7	24,9 ± 8,1	71,1 ± 11,5	160,3 ± 2,3	268,3 ± 1,7
C11:0	1,5	8,7	10,5	30,2 ± 2,8	70,25 ± 6,35	147,85 ± 5,25	237,1 ± 3,5
C14:0	2,7	6,8	15,1	58,7 ± 5,4	89,65 ± 2,15	152,9 ± 5,4	249,45 ± 2,25
C16:0	2,7	9,2	12,5		65,3	132	
C18:0	1,7	3,7	8,5	13,9 ± 0,6	25,15 ± 0,15	59,55 ± 5,35	91,9 ± 1,8
C18:1cis9	2,0	3,0	7,4	11,05 ± 1,15	19,1 ± 1,8	46,7 ± 8,6	78,05 ± 3,85
C19:0	2,4	3,3	6,8	11,15 ± 1,95	17,75 ± 0,35	42,3 ± 8,3	68,25 ± 2,45
C20:0	1,7	2	3,8	4,6		41,4	65,5

**Tabell 5:** Resultater benyttet i validering av presisjon og nøyaktighet. Tabellen viser resultatene fra C8:0, C14:0, C18:0, C18:1cis9, C16:0 og C20:0, samt dato analysert. Resultatene merket gult ble benyttet til å beregne repeterbarhet.

Dato	C8:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1cis9	C20:0
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
22.01.2021	0,62	1,15	X	0,95	1,19	X
22.01.2021	0,59	1,07	X	0,94	1,08	X
22.01.2021	0,61	1,08	X	0,96	1,10	X
22.01.2021	0,61	1,15	X	0,97	1,16	X
21.01.2021	0,58	0,99	X	0,98	1,19	X
21.01.2021	0,58	0,97	X	0,96	1,17	X
21.01.2021	0,61	1,12	X	0,98	1,04	X
21.01.2021	0,62	1,18	X	0,95	1,20	X
02.02.2021	0,62	1,01	X	0,99	0,95	X
02.02.2021	0,60	1,05	X	0,99	0,96	X
02.02.2021	0,63	0,98	X	0,94	0,97	X
02.02.2021	0,65	1,07	X	0,93	1,03	X
02.02.2021	0,60	1,10	X	0,92	1,06	X
02.02.2021	0,61	0,97	X	0,92	0,93	X
02.02.2021	0,58	1,06	X	0,93	1,06	X
02.02.2021	0,59	0,99	X	0,94	0,95	X
02.02.2021	0,61	0,94	X	0,91	0,95	X
02.02.2021	0,60	1,00	X	0,94	0,93	X
08.02.2020	0,60	1,01	X	0,95	1,02	X
08.02.2020	0,58	1,05	X	0,93	1,05	X
08.02.2020	0,60	0,96	X	0,91	0,95	X
08.02.2020	0,59	0,95	X	0,93	0,95	X
22.02.2020	0,56	1,01	X	0,98	0,94	X
22.02.2020	0,55	1,08	X	1,00	0,96	X
22.02.2020	0,59	1,18	X	0,99	1,07	X
22.02.2020	0,61	1,08	X	0,97	1,03	X
22.02.2021	X	X	0,87	X	X	0,99
22.02.2021	X	X	0,86	X	X	0,99
22.02.2021	X	X	1,06	X	X	0,92
22.02.2021	X	X	0,99	X	X	0,91
22.02.2021	X	X	1,09	X	X	0,88
22.02.2021	X	X	1,02	X	X	0,90
22.02.2021	X	X	0,97	X	X	0,90
23.02.2021	X	X	0,90	X	X	0,98
23.02.2021	X	X	0,89	X	X	0,98
03.03.2021	X	X	1,07	X	X	0,86
03.03.2021	X	X	0,96	X	X	0,90
Gj.snitt	0,60	1,04	0,98	0,98	1,04	0,92
SD	0,02	0,07	0,08	0,08	0,08	0,04
RSD	3,31 %	6,61 %	8,06 %	8,20 %	7,86 %	4,60 %

Avvik fra sann verdi	39,60 %	-3,96 %	2,32 %	1,70 %	-3,79 %	7,82 %
----------------------	---------	---------	--------	--------	---------	--------

**Tabell 6:** Linearitet til Supelco 37 Component FAME Mix på instrumentet benyttet til metoden. Verdiene ble benyttet for å vurdere instrumentets linearitet.

	50	100	200	400	600	800	Mx	b	R <sup>2</sup>
C4	2,44E+04	5,01E+04	2,46E+06	5,75E+06	9,19E+06	1,17E+07	14550	0	0,993
C6:0	1,53E+05	1,95E+05	4,28E+06	1,02E+07	1,58E+07	2,03E+07	25295	0	0,994
C8:0	1,61E+05	1,24E+05	6,13E+06	1,45E+07	2,24E+07	2,87E+07	35877	0	0,993
C10:0	1,48E+05	2,01E+05	7,30E+06	1,73E+07	2,68E+07	3,45E+07	42908	0	0,994
C11:0	7,88E+04	9,33E+04	3,71E+06	9,14E+06	1,43E+07	1,85E+07	22906	0	0,995
C12:0	1,43E+05	1,97E+05	8,15E+06	1,98E+07	3,04E+07	3,94E+07	48970	0	0,994
C13:0	5,32E+04	7,76E+04	3,97E+06	1,00E+07	1,58E+07	2,07E+07	25471	0	0,996
C14:0	1,42E+05	1,63E+05	8,44E+06	2,14E+07	3,39E+07	4,39E+07	54211	0	0,995
C14:1cis9	1,09E+05	1,18E+05	3,70E+06	9,86E+06	1,60E+07	2,09E+07	25567	0	0,996
C15:0	4,20E+04	6,69E+04	3,93E+06	1,08E+07	1,75E+07	2,27E+07	27862	0	0,995
C15:1cis10	4,66E+04	8,20E+04	3,36E+06	9,69E+06	1,62E+07	2,13E+07	25845	0	0,996
C16:0	1,61E+05	1,99E+05	1,30E+07	3,56E+07	5,76E+07	7,39E+07	91216	0	0,995
C16:1cis9	5,30E+04	7,14E+04	3,16E+06	9,30E+06	1,60E+07	2,14E+07	25633	0	0,996
C17:0	6,20E+04	7,78E+04	3,39E+06	1,04E+07	1,80E+07	2,41E+07	28782	0	0,995
C17:1cis10	3,60E+04	5,61E+04	3,02E+06	9,65E+06	1,65E+07	2,21E+07	26471	0	0,995
C18:0	6,63E+04	1,04E+05	7,25E+06	2,27E+07	3,76E+07	4,93E+07	59795	0	0,995
C18:1trans9	3,69E+04	3,65E+04	2,77E+06	9,50E+06	1,65E+07	2,22E+07	26406	0	0,994
C18:1cis9	9,04E+04	1,23E+05	7,43E+06	2,31E+07	3,82E+07	5,01E+07	60773	0	0,995
C18:2trans9,12	3,79E+04	5,67E+04	2,25E+06	8,10E+06	1,46E+07	1,99E+07	23429	0	0,993
C18:2cis9,12	1,02E+05	1,06E+05	2,59E+06	9,03E+06	1,61E+07	2,18E+07	25767	0	0,993
C18:3cis6,9,12	3,38E+04	5,64E+04	2,14E+06	7,78E+06	1,40E+07	1,90E+07	22362	0	0,993
C20:0	8,33E+04	1,09E+05	6,06E+06	2,28E+07	4,26E+07	5,85E+07	68199	0	0,991
C18:3cis9,12,15	5,39E+04	8,67E+04	3,04E+06	8,84E+06	1,07E+07	1,22E+07	16796	0	0,939
C20:1cis11	2,74E+04	4,63E+04	2,48E+06	9,44E+06	1,65E+07	2,22E+07	26330	0	0,993
C21:0	3,58E+04	4,65E+04	2,50E+06	9,30E+06	1,64E+07	2,22E+07	26267	0	0,993
C20:2cis11,14	1,23E+04	3,70E+04	2,71E+06	9,99E+06	1,74E+07	2,33E+07	27719	0	0,994
C20:3cis8,11,14	2,79E+04	4,04E+04	2,26E+06	8,69E+06	1,55E+07	2,08E+07	24657	0	0,992
C22:0	3,76E+04	8,01E+04	9,47E+06	9,50E+06	1,56E+07	2,14E+07	26570	0	0,926
C20:3cis11,14,17	6,28E+04	7,49E+04	3,42E+06	3,44E+07	5,69E+07	7,45E+07	89279	0	0,981
C22:1cis13	1,51E+04	4,15E+04	2,34E+06	9,01E+06	1,58E+07	2,17E+07	25488	0	0,993
C20:4cis5,8,11,14	3,86E+04	3,86E+04	1,97E+06	7,99E+06	1,42E+07	1,94E+07	22817	0	0,992
C23:0	1,74E+04	4,16E+04	2,73E+06	9,52E+06	1,63E+07	2,22E+07	26289	0	0,995
C22:2cis13,16	2,53E+04	4,03E+04	2,34E+06	9,29E+06	1,63E+07	2,24E+07	26282	0	0,993
C24:0	3,99E+04	5,10E+04	4,93E+06	1,69E+07	2,93E+07	4,00E+07	47312	0	0,994
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00E+00	2,00E+04	2,67E+06	9,68E+06	1,64E+07	2,22E+07	26430	0	0,999
C24:1cis15	1,66E+05	1,42E+05	2,34E+06	8,61E+06	1,48E+07	2,08E+07	24299	0	0,993

## Vedlegg 5 Fordøyd meieriprodukter

### MAG

**Tabell 7:** mg fettsyre per g prøver fra MAG-fraksjonen til Kremgo pH 7. Resultatene, gjennomsnittet, standard avvik og relativt standard avvik vises i tabell.

FA	Kremgo A mg/g	Kremgo B mg/g	Gj.Snitt mg/g	SD mg/g	RSD %
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	22,54
C10:0	0,03	0,03	0,03	0,00	0,41
C12:0	0,17	0,14	0,16	0,01	8,35
C13:0	0,02	0,02	0,02	0,00	4,16
C14:0	1,60	1,19	1,40	0,20	14,57
C14:1cis9	0,09	0,07	0,08	0,01	9,71
C15:0	0,12	0,08	0,10	0,02	16,11
C15:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	38,71
C16:0	5,06	3,52	4,29	0,77	18,00
C16:1cis9	0,07	0,08	0,08	0,00	3,44
C17:0	0,04	0,03	0,04	0,00	11,03
C17:1cis10	0,01	0,01	0,01	0,00	3,74
C18:0	0,40	0,38	0,39	0,01	3,27
C18:1trans9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,25
C18:1cis9	0,90	0,91	0,91	0,01	0,95
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2cis9,12	0,07	0,07	0,07	0,00	2,31
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	14,96
C18:3cis9,12,15	0,01	0,01	0,01	0,00	22,50
C20:1cis11	0,01	0,01	0,01	0,00	3,75
C21:0	0,01	0,01	0,01	0,00	0,94
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	8,13
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	41,71
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
SUM	8,63	6,60	7,61	1,01	13,32

**Tabell 8:** mg fettsyre per g prøver fra MAG-fraksjonen til Kremgo pH = 2. Resultatene, gjennomsnittet, standard avvik og relativt standard avvik vises i tabell.

FA	Kremgo C mg/g	Kremgo D mg/g	Gj.Snitt mg/g	SD mg/g	RSD %
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
C8:0	0,01	0,01	0,01	0,00	3,61
C10:0	0,13	0,13	0,13	0,00	1,63
C12:0	0,57	0,52	0,54	0,02	4,53
C13:0	0,04	0,04	0,04	0,00	2,53
C14:0	3,79	3,30	3,55	0,24	6,86
C14:1cis9	0,25	0,24	0,24	0,01	2,37
C15:0	0,26	0,22	0,24	0,02	8,68
C15:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	3,27
C16:0	9,47	7,87	8,67	0,80	9,21
C16:1cis9	0,18	0,26	0,22	0,04	17,63
C17:0	0,07	0,09	0,08	0,01	12,08
C17:1cis10	0,02	0,03	0,02	0,00	19,64
C18:0	0,75	0,86	0,81	0,05	6,77
C18:1trans9	0,02	0,02	0,02	0,00	4,89
C18:1cis9	1,72	2,50	2,11	0,39	18,29
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	17,72
C18:2cis9,12	0,15	0,21	0,18	0,03	18,55
C18:3cis6,9,12	0,00	0,01	0,00	0,00	56,65
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	23,75
C18:3cis9,12,15	0,02	0,01	0,01	0,01	59,27
C20:1cis11	0,02	0,03	0,02	0,00	13,52
C21:0	0,01	0,03	0,02	0,01	46,60
C20:2cis11,14	0,00	0,01	0,01	0,00	68,04
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
SUM	17,49	16,38	16,94	0,56	3,29

**Tabell 9:** mg fettsyre per g prøver fra MAG-fraksjonen til Kremfløte. Resultatene, gjennomsnittet, standard avvik og relativt standard avvik vises i tabell.

FA	Kremfløte A mg/g	Kremfløte B mg/g	Kremfløte C mg/g	Gj.Snitt mg/g	SD mg/g	RSD %
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	141,42
C8:0	0,00	0,05	0,00	0,02	0,02	138,01
C10:0	0,03	0,20	0,43	0,22	0,17	74,92
C12:0	0,16	0,42	0,00	0,19	0,17	89,93
C13:0	0,04	0,00	0,00	0,01	0,02	141,42
C14:0	2,66	2,24	4,14	3,01	0,82	27,14
C14:1cis9	0,15	0,19	1,49	0,61	0,62	101,91
C15:0	0,24	0,17	0,82	0,41	0,29	70,53
C15:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	10,94	5,87	8,22	8,35	2,07	24,83
C16:1cis9	0,14	0,26	0,00	0,13	0,11	80,33
C17:0	0,06	0,26	0,00	0,10	0,11	105,87
C17:1cis10	0,02	0,00	0,00	0,01	0,01	141,42
C18:0	0,73	3,10	2,13	1,99	0,97	49,00
C18:1trans9	0,01	0,10	0,00	0,04	0,04	115,33
C18:1cis9	1,68	3,53	1,62	2,28	0,88	38,86
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	141,42
C18:2cis9,12	0,13	0,21	0,00	0,11	0,09	76,31
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,01	0,13	0,00	0,04	0,06	132,19
C18:3cis9,12,15	0,01	0,11	0,00	0,04	0,05	118,11
C20:1cis11	0,02	0,00	0,00	0,01	0,01	141,42
C21:0	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	141,42
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	141,42
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	141,42
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	141,42
SUM	17,04	16,87	18,85	17,59	0,89	5,08



**Tabell 10:** mg fettsyre per g prøver fra MAG-fraksjonen til Norvegia. Resultatene, gjennomsnittet, standard avvik og relativt standard avvik vises i tabell.

FA	Norvegia A mg/g	Norvegia B mg/g	Norvegia C mg/g	Gj.snitt mg/g	SD mg/g	RSD %
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	91,52
C8:0	0,00	0,02	0,02	0,01	0,01	73,38
C10:0	0,02	0,21	0,21	0,15	0,09	59,57
C12:0	0,18	0,73	0,69	0,54	0,25	46,63
C13:0	0,04	0,04	0,03	0,04	0,00	5,91
C14:0	3,32	4,67	4,12	4,04	0,55	13,73
C14:1cis9	0,21	0,38	0,34	0,31	0,07	22,66
C15:0	0,31	0,33	0,26	0,30	0,03	9,20
C15:1cis9	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	22,83
C16:0	13,67	11,38	9,34	11,47	1,77	15,42
C16:1cis9	0,39	0,48	0,43	0,44	0,04	8,32
C17:0	0,19	0,14	0,11	0,15	0,03	21,71
C17:1cis10	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00	3,99
C18:0	2,44	1,72	1,24	1,80	0,49	27,50
C18:1trans9	0,06	0,06	0,04	0,05	0,01	14,17
C18:1cis9	5,52	5,25	4,71	5,16	0,33	6,49
C18:2trans9,12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	4,17
C18:2cis9,12	0,35	0,38	0,33	0,35	0,02	6,64
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	19,74
C20:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	25,06
C18:3cis9,12,15	0,04	0,07	0,06	0,06	0,01	15,44
C20:1cis11	0,06	0,08	0,06	0,07	0,01	9,18
C21:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	11,45
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,62
C20:3cis8,11,14	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	13,29
C22:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	14,25
Sum	26,93	26,02	22,12	25,02	2,09	8,34

**Tabell 11:** mg fettsyre per g prøver fra MAG-fraksjonen til Seterrømme. Resultatene, gjennomsnittet, standard avvik og relativt standard avvik vises i tabell.

FA	Set. Rømme A mg/g	Set. Rømme B mg/g	Set. Rømme C mg/g	Gj.snitt mg/g	SD mg/g	RSD %
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C10:0	0,02	0,02	0,06	0,03	0,02	48,86
C12:0	0,03	0,09	0,30	0,14	0,11	99,36
C13:0	0,02	0,02	0,03	0,02	0,00	22,16
C14:0	0,51	0,84	2,51	1,28	0,88	86,40
C14:1cis9	0,04	0,06	0,15	0,08	0,05	69,48
C15:0	0,05	0,06	0,17	0,09	0,05	68,19
C15:1cis9	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	173,21
C16:0	3,00	3,09	7,00	4,36	1,98	53,37
C16:1cis9	0,79	0,06	0,04	0,30	0,32	126,92
C17:0	0,06	0,07	0,06	0,07	0,01	20,16
C17:1cis10	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	102,50
C18:0	0,42	0,49	0,47	0,46	0,09	22,66
C18:1trans9	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01	22,09
C18:1cis9	0,60	0,80	0,90	0,77	0,19	28,09
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2cis9,12	0,04	0,06	0,08	0,06	0,02	38,30
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	108,85
C18:3cis9,12,15	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	63,90
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C21:0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	5,49
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SUM	5,68	5,73	5,71	5,71	0,02	0,34

## TAG

**Tabell 12:** % FA av total fettsyremengde i TAG-fraksjonen til Kremgo.

FA	Kremgo A	Kremgo B	Kremgo C	Kremgo D	Gj.snitt	SD	RSD
C4	0,00 %	0,00 %	0,35 %	0,45 %	0,40 %	0,05 %	13,30 %
C6:0	0,00 %	0,00 %	0,43 %	0,00 %	0,11 %	0,19 %	173,21 %
C8:0	0,00 %	0,00 %	0,73 %	0,69 %	0,35 %	0,35 %	100,08 %
C10:0	0,70 %	0,71 %	2,15 %	2,22 %	1,44 %	0,74 %	51,46 %
C12:0	3,02 %	2,97 %	2,97 %	3,05 %	3,00 %	0,04 %	1,20 %
C13:0	0,07 %	0,07 %	0,09 %	0,08 %	0,08 %	0,01 %	7,00 %
C14:0	9,84 %	9,63 %	11,55 %	11,98 %	10,75 %	1,03 %	9,59 %
C14:1cis9	2,03 %	1,82 %	1,75 %	1,65 %	1,81 %	0,14 %	7,80 %
C15:0	0,73 %	0,83 %	0,89 %	0,90 %	0,84 %	0,07 %	8,21 %
C15:1cis9	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	
C16:0	23,62 %	26,59 %	33,09 %	34,37 %	29,42 %	4,46 %	15,17 %
C16:1cis9	2,45 %	2,19 %	1,92 %	1,82 %	2,10 %	0,24 %	11,66 %
C17:0	0,25 %	0,33 %	0,38 %	0,40 %	0,34 %	0,06 %	17,56 %
C17:1n-7 Cis	0,23 %	0,22 %	0,18 %	0,19 %	0,21 %	0,02 %	8,86 %
C18:0	7,82 %	9,61 %	9,01 %	10,20 %	9,16 %	0,88 %	9,58 %
C18:1trans9	0,61 %	0,60 %	0,41 %	0,12 %	0,43 %	0,20 %	46,25 %
C18:1trans11	1,38 %	1,03 %	1,25 %	1,13 %	1,20 %	0,13 %	11,14 %
C18:1cis9	42,49 %	38,99 %	29,98 %	28,15 %	34,90 %	6,00 %	17,20 %
C18:2n-6 Trans	0,12 %	0,13 %	0,07 %	0,07 %	0,10 %	0,03 %	28,29 %
C18:3cis6,9,12	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C18:2n-6 Cis	2,69 %	2,36 %	1,63 %	1,54 %	2,06 %	0,49 %	23,62 %
C20:0	0,66 %	0,65 %	0,35 %	0,39 %	0,51 %	0,14 %	27,97 %
C18:3n-6 Cis	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:1n-9 Cis	1,06 %	1,05 %	0,60 %	0,59 %	0,83 %	0,23 %	27,83 %
C21:0	0,01 %	0,02 %	0,02 %	0,00 %	0,01 %	0,01 %	64,20 %
C20:2n-6 Cis	0,05 %	0,06 %	0,06 %	0,00 %	0,04 %	0,02 %	58,02 %
C20:3n-6 Cis	0,10 %	0,08 %	0,06 %	0,00 %	0,06 %	0,04 %	63,69 %
C22:0	0,06 %	0,06 %	0,08 %	0,00 %	0,05 %	0,03 %	59,60 %
C20:3cis11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:1cis13	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C23:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:2cis13,16	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:1cis15	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

**Tabell 13:** % FA av total fettsyremengde i TAG-fraksjonen til Kremfløte.

FA	Kremfløte A	Kremfløte B	Kremfløte C	Gj.snitt	SD	RSD
C4	0,01 %	0,54 %	0,01 %	0,19 %	0,25 %	135,02 %
C6:0	0,00 %	0,66 %	0,00 %	0,22 %	0,31 %	141,42 %
C8:0	0,00 %	0,58 %	0,02 %	0,20 %	0,27 %	135,78 %
C10:0	0,69 %	2,09 %	1,08 %	1,28 %	0,59 %	46,01 %
C12:0	3,16 %	3,30 %	3,10 %	3,19 %	0,08 %	2,65 %
C13:0	0,10 %	0,09 %	0,09 %	0,09 %	0,00 %	4,38 %
C14:0	11,68 %	12,40 %	10,52 %	11,53 %	0,77 %	6,71 %
C14:1cis9	1,49 %	1,41 %	1,40 %	1,44 %	0,04 %	2,84 %
C15:0	1,10 %	1,06 %	1,04 %	1,07 %	0,03 %	2,35 %
C15:1cis9	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C16:0	36,51 %	37,83 %	35,25 %	36,53 %	1,05 %	2,89 %
C16:1cis9	1,82 %	1,79 %	1,76 %	1,79 %	0,03 %	1,44 %
C17:0	0,53 %	0,45 %	0,55 %	0,51 %	0,04 %	8,62 %
C17:1n-7 Cis	0,17 %	0,17 %	0,16 %	0,17 %	0,00 %	2,69 %
C18:0	13,99 %	11,25 %	14,91 %	13,38 %	1,55 %	11,60 %
C18:1trans9	0,41 %	0,29 %	0,45 %	0,38 %	0,07 %	17,52 %
C18:1trans11	0,48 %	1,23 %	0,54 %	0,75 %	0,34 %	45,38 %
C18:1cis9	24,81 %	22,23 %	25,82 %	24,28 %	1,51 %	6,23 %
C18:2n-6 Trans	0,08 %	0,07 %	0,11 %	0,09 %	0,02 %	18,10 %
C18:3cis6,9,12	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C18:2n-6 Cis	1,60 %	1,43 %	1,66 %	1,56 %	0,10 %	6,38 %
C20:0	0,20 %	0,18 %	0,19 %	0,19 %	0,01 %	5,63 %
C18:3n-6 Cis	0,36 %	0,25 %	0,43 %	0,35 %	0,07 %	20,67 %
C20:1n-9 Cis	0,63 %	0,51 %	0,70 %	0,62 %	0,08 %	12,55 %
C21:0	0,02 %	0,01 %	0,02 %	0,02 %	0,00 %	23,37 %
C20:2n-6 Cis	0,03 %	0,04 %	0,04 %	0,04 %	0,00 %	13,56 %
C20:3n-6 Cis	0,05 %	0,05 %	0,06 %	0,05 %	0,00 %	8,91 %
C22:0	0,10 %	0,09 %	0,11 %	0,10 %	0,01 %	6,66 %
C20:3cis11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:1cis13	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C23:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:2cis13,16	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:1cis15	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

**Tabell 14:** % FA av total fettsyremengde i TAG-fraksjonen til Norvegia.

FA	Norvegia A	Norvegia B	Norvegia C	Gj.snitt	SD	RSD
C4	0,00 %	0,40 %	0,49 %	0,30 %	0,21 %	71,97 %
C6:0	0,00 %	0,40 %	0,44 %	0,28 %	0,20 %	70,90 %
C8:0	0,00 %	0,60 %	0,56 %	0,39 %	0,27 %	70,88 %
C10:0	0,80 %	1,97 %	1,94 %	1,57 %	0,54 %	34,61 %
C12:0	2,49 %	2,93 %	2,67 %	2,69 %	0,18 %	6,68 %
C13:0	0,07 %	0,11 %	0,00 %	0,06 %	0,04 %	75,47 %
C14:0	9,39 %	11,11 %	11,19 %	10,56 %	0,83 %	7,85 %
C14:1cis9	1,29 %	1,78 %	1,84 %	1,64 %	0,25 %	15,12 %
C15:0	0,97 %	0,83 %	0,90 %	0,90 %	0,06 %	6,22 %
C15:1cis9	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C16:0	31,58 %	30,78 %	32,01 %	31,45 %	0,51 %	1,61 %
C16:1cis9	1,79 %	1,92 %	1,92 %	1,88 %	0,06 %	3,33 %
C17:0	0,48 %	0,43 %	0,47 %	0,46 %	0,02 %	5,28 %
C17:1n-7 Cis	0,19 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,01 %	2,76 %
C18:0	16,28 %	10,59 %	11,26 %	12,71 %	2,54 %	19,97 %
C18:1trans9	0,40 %	0,28 %	0,18 %	0,28 %	0,09 %	31,55 %
C18:1trans11	0,48 %	1,50 %	1,27 %	1,08 %	0,44 %	40,54 %
C18:1cis9	30,31 %	31,24 %	30,03 %	30,53 %	0,52 %	1,70 %
C18:2n-6 Trans	0,11 %	0,11 %	0,07 %	0,10 %	0,02 %	18,22 %
C18:3cis6,9,12	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C18:2n-6 Cis	1,69 %	1,49 %	1,43 %	1,53 %	0,11 %	7,22 %
C20:0	0,31 %	0,37 %	0,34 %	0,34 %	0,02 %	6,78 %
C18:3n-6 Cis	0,33 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %	0,16 %	141,42 %
C20:1n-9 Cis	0,82 %	0,73 %	0,71 %	0,75 %	0,05 %	6,93 %
C21:0	0,02 %	0,15 %	0,10 %	0,09 %	0,05 %	57,50 %
C20:2n-6 Cis	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,02 %	141,42 %
C20:3n-6 Cis	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,03 %	141,42 %
C22:0	0,12 %	0,10 %	0,00 %	0,07 %	0,05 %	72,08 %
C20:3cis11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:1cis13	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C23:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:2cis13,16	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:1cis15	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

## DAG

Tabell 15: FA av total fettsyremengde i DAG-fraksjonen til Kremgo.

	Kremgo A	Kremgo B	Kremgo C	Kremgo D	Gj.snitt	SD	RSD
C4:0	0,00 %	0,00 %	0,11 %	0,09 %	0,05 %	0,05 %	100,45 %
C6:0	0,04 %	0,03 %	0,24 %	0,21 %	0,13 %	0,10 %	74,08 %
C8:0	0,11 %	0,08 %	0,71 %	0,67 %	0,39 %	0,30 %	75,55 %
C10:0	0,39 %	0,58 %	2,60 %	2,50 %	1,52 %	1,04 %	68,35 %
C12:0	1,03 %	1,51 %	3,61 %	3,60 %	2,44 %	1,18 %	48,44 %
C13:0	0,05 %	0,06 %	0,09 %	0,10 %	0,08 %	0,02 %	25,89 %
C14:0	9,86 %	11,95 %	13,78 %	13,88 %	12,37 %	1,64 %	13,25 %
C14:1cis9	1,32 %	1,57 %	1,89 %	1,90 %	1,67 %	0,24 %	14,49 %
C15:0	0,81 %	0,94 %	1,01 %	1,03 %	0,95 %	0,09 %	9,32 %
C15:1cis9	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C16:0	33,74 %	37,72 %	34,08 %	34,18 %	34,93 %	1,62 %	4,63 %
C16:1cis9	1,97 %	0,26 %	2,31 %	2,32 %	1,71 %	0,85 %	49,74 %
C17:0	0,25 %	1,70 %	0,74 %	0,83 %	0,88 %	0,52 %	59,61 %
C17:1cis10	0,20 %	0,26 %	0,24 %	0,24 %	0,24 %	0,02 %	9,02 %
C18:0	8,51 %	9,15 %	6,63 %	6,52 %	7,70 %	1,15 %	14,92 %
C18:1trans9	0,39 %	0,11 %	0,36 %	0,36 %	0,30 %	0,11 %	36,94 %
C18:1cis9	38,45 %	31,37 %	28,52 %	28,66 %	31,75 %	4,03 %	12,69 %
C18:2trans9,12	0,04 %	0,04 %	0,10 %	0,09 %	0,07 %	0,03 %	40,70 %
C18:2cis9,12	2,06 %	1,86 %	2,11 %	1,98 %	2,00 %	0,09 %	4,71 %
C18:3cis6,9,12	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C20:0	0,08 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,03 %	173,21 %
C18:3cis9,12,15	0,04 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,02 %	100,49 %
C20:1cis11	0,58 %	0,60 %	0,67 %	0,67 %	0,63 %	0,04 %	6,30 %
C21:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C20:2cis11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,05 %	0,07 %	0,08 %	0,08 %	0,07 %	0,01 %	17,66 %
C22:0	0,03 %	0,11 %	0,11 %	0,10 %	0,09 %	0,03 %	35,38 %
C20:3cis11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:1cis13	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C23:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:2cis13,16	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:1cis15	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

**Tabell 16:** FA av total fettsyremengde i DAG-fraksjonen til Norvegia.

	Kremfløte A	Kremfløte B	Kremfløte C	Gj.snitt	SD	RSD
C4:0	0,09 %	0,00 %	0,58 %	0,22 %	0,25 %	115,16 %
C6:0	0,03 %	0,03 %	0,57 %	0,21 %	0,25 %	120,15 %
C8:0	0,25 %	0,23 %	0,53 %	0,34 %	0,14 %	40,24 %
C10:0	1,63 %	1,39 %	2,33 %	1,78 %	0,40 %	22,49 %
C12:0	1,63 %	1,39 %	3,86 %	2,29 %	1,11 %	48,52 %
C13:0	0,15 %	0,06 %	0,10 %	0,10 %	0,04 %	34,26 %
C14:0	11,65 %	11,45 %	15,32 %	12,81 %	1,78 %	13,91 %
C14:1cis9	1,22 %	1,21 %	1,52 %	1,31 %	0,14 %	10,92 %
C15:0	1,01 %	1,03 %	1,15 %	1,06 %	0,06 %	5,64 %
C15:1cis9	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C16:0	41,25 %	42,12 %	41,26 %	41,54 %	0,41 %	0,99 %
C16:1cis9	1,56 %	0,11 %	1,77 %	1,15 %	0,74 %	64,35 %
C17:0	0,41 %	0,14 %	0,38 %	0,31 %	0,12 %	39,87 %
C17:1cis10	0,15 %	0,06 %	0,15 %	0,12 %	0,04 %	36,27 %
C18:0	13,90 %	14,60 %	9,23 %	12,58 %	2,38 %	18,95 %
C18:1trans9	0,26 %	0,15 %	0,11 %	0,18 %	0,06 %	36,16 %
C18:1cis9	22,76 %	24,36 %	18,83 %	21,98 %	2,32 %	10,58 %
C18:2trans9,12	0,12 %	0,25 %	0,29 %	0,22 %	0,07 %	33,57 %
C18:2cis9,12	1,23 %	0,43 %	0,20 %	0,62 %	0,44 %	71,50 %
C18:3cis6,9,12	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C20:0	0,09 %	0,11 %	1,24 %	0,48 %	0,54 %	111,21 %
C18:3cis9,12,15	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,04 %	141,42 %
C20:1cis11	0,41 %	0,32 %	0,26 %	0,33 %	0,06 %	19,44 %
C21:0	0,00 %	0,50 %	0,32 %	0,28 %	0,21 %	75,34 %
C20:2cis11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C22:0	0,09 %	0,06 %	0,00 %	0,05 %	0,04 %	75,22 %
C20:3cis11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:1cis13	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C23:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:2cis13,16	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:1cis15	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

**Tabell 17:** FA av total fettsyremengde i DAG-fraksjonen til Norvegia.

	Norvegia A	Norvegia B	Norvegia C	Gj.snitt	SD	RSD
C4:0	0,04 %	0,11 %	0,10 %	0,08 %	0,03 %	34,87 %
C6:0	0,02 %	0,18 %	0,15 %	0,12 %	0,07 %	58,35 %
C8:0	0,04 %	0,54 %	0,49 %	0,36 %	0,22 %	62,61 %
C10:0	0,18 %	2,32 %	2,14 %	1,55 %	0,97 %	62,68 %
C12:0	1,05 %	3,44 %	3,20 %	2,56 %	1,07 %	41,87 %
C13:0	0,05 %	0,08 %	0,08 %	0,07 %	0,01 %	20,43 %
C14:0	10,08 %	13,04 %	12,89 %	12,00 %	1,36 %	11,33 %
C14:1cis9	1,07 %	1,74 %	1,67 %	1,49 %	0,30 %	19,96 %
C15:0	0,96 %	0,95 %	0,94 %	0,95 %	0,01 %	1,04 %
C15:1cis9	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C16:0	37,59 %	31,78 %	31,89 %	33,75 %	2,71 %	8,03 %
C16:1cis9	1,71 %	2,33 %	2,30 %	2,11 %	0,28 %	13,44 %
C17:0	0,47 %	0,34 %	0,33 %	0,38 %	0,07 %	17,31 %
C17:1cis10	0,19 %	0,25 %	0,23 %	0,22 %	0,03 %	12,69 %
C18:0	15,94 %	7,50 %	7,67 %	10,37 %	3,94 %	37,99 %
C18:1trans9	0,42 %	0,17 %	0,20 %	0,26 %	0,11 %	43,45 %
C18:1cis9	27,02 %	33,01 %	33,47 %	31,17 %	2,94 %	9,44 %
C18:2trans9,12	0,05 %	0,08 %	0,08 %	0,07 %	0,02 %	21,57 %
C18:2cis9,12	0,07 %	1,86 %	1,81 %	1,25 %	0,83 %	66,49 %
C18:3cis6,9,12	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	#DIV/0!
C20:0	0,59 %	0,04 %	0,05 %	0,22 %	0,26 %	114,48 %
C18:3cis9,12,15	1,37 %	0,04 %	0,05 %	0,49 %	0,63 %	129,03 %
C20:1cis11	0,00 %	0,06 %	0,05 %	0,04 %	0,03 %	71,59 %
C21:0	0,12 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,06 %	141,42 %
C20:2cis11,14	0,34 %	0,03 %	0,04 %	0,13 %	0,14 %	106,30 %
C20:3cis8,11,14	0,61 %	0,05 %	0,06 %	0,24 %	0,26 %	108,84 %
C22:0	0,00 %	0,09 %	0,10 %	0,06 %	0,04 %	71,04 %
C20:3cis11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:1cis13	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C23:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:2cis13,16	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:0	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C24:1cis15	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %



## Vedlegg 6 Fordøyd helmelk

**Tabell 18:** Lipidklassefordeling i fordøyd H-melk. (Batch 1).

	FFA mg/g	TAG mg/g	DAG mg/g	MAG mg/g	PL mg/g	Tot mg/g	
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,04
C10:0	0,05	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,11
C12:0	0,05	0,28	0,04	0,02	0,00	0,00	0,39
C13:0	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03
C14:0	0,30	3,67	0,45	0,39	0,05	0,05	4,86
C14:1cis9	0,01	0,38	0,21	0,00	0,00	0,00	0,61
C15:0	0,03	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31
C16:0	1,07	11,76	1,32	0,86	0,09	0,09	15,10
C16:1cis9	0,02	0,37	0,04	0,00	0,01	0,01	0,44
C17:0	0,02	0,08	0,07	0,00	0,00	0,00	0,17
C17:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	0,95	3,42	0,37	0,19	0,04	0,04	4,96
C18:1trans9	0,01	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
C18:1cis9	0,54	6,24	0,35	0,14	0,03	0,03	7,31
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2cis9,12	0,09	0,40	0,09	0,00	0,00	0,00	0,58
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
C18:3cis9,12,15	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C21:0	0,00	0	0	0	0	0	0,00
C20:2cis11,14	0,00	0	0	0	0	0	0,00
C20:3cis8,11,14	0,00	0	0	0	0	0	0,00
C22:0	0,03	0	0	0	0	0	0,03
SUM	3,23	26,98	3,03	1,64	0,22	0,22	35,10

**Tabell 19:** Lipidklassefordeling i ufordøyd H-melk. (Batch 1).

	FFA mg/g	TAG IF mg/g	DAG UF mg/g	MAG UF mg/g	PL_UF mg/g	Tot sum mg/g
C4:0	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,18
C6:0	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,19
C8:0	0,00	0,26	0,00	0,02	0,00	0,28
C10:0	0,01	0,91	0,00	0,00	0,00	0,92
C12:0	0,03	1,30	0,01	0,00	0,00	1,34
C13:0	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02
C14:0	0,14	5,36	0,04	0,07	0,00	5,61
C14:1cis9	0,02	0,51	0,01	0,00	0,00	0,54
C15:0	0,02	0,36	0,01	0,00	0,00	0,38
C16:0	0,70	13,66	0,09	0,04	0,00	14,49
C16:1cis9	0,01	0,42	0,00	0,00	0,00	0,44
C17:0	0,01	0,09	0,01	0,00	0,00	0,11
C17:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	0,42	3,27	0,02	0,05	0,00	3,76
C18:1trans9	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,08
C18:1cis9	0,26	6,43	0,02	0,03	0,00	6,73
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2cis9,12	0,02	0,37	0,01	0,00	0,00	0,39
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:3cis9,12,15	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,06
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3cis8,11,14	0	0	0	0	0	0,00
C22:0	0	0	0	0	0	0,00
SUM	1,66	33,45	0,22	0,20	0,00	35,53

**Tabell 20:** Total fettsyreprofil fordøyd H-melk (batch 1).

	Fordøyd mg/g	Ufordøyd mg/g	
C4:0		0,00	0,08
C6:0		0,01	0,15
C8:0		0,05	0,21
C10:0		0,46	0,85
C12:0		0,99	1,40
C13:0		0,02	0,03
C14:0		4,52	5,53
C14:1 <i>cis</i> 9		0,39	0,50
C15:0		0,34	0,41
C16:0		14,83	16,45
C16:1n-7 <i>Cis</i>		0,45	0,37
C17:0		0,12	0,10
C17:1n-7 <i>Cis</i>		0,03	0,03
C18:0		4,71	3,18
C18:1n-9 <i>Trans</i>		0,02	0,03
C18:1n-9 <i>Cis</i>		7,62	6,10
C18:2 <i>trans</i> 9,12		0,00	0,00
C18:2 <i>cis</i> 9,12		0,48	0,35
C18:3 <i>cis</i> 6,9,12		0,00	0,00
C20:0		0,02	0,02
C18:3 <i>cis</i> 9,12,15		0,05	0,06
C20:1n-9		0,08	0,09
C21:0		0,00	0,01
C20:2 <i>cis</i> 11,14		0,00	0,02
C20:3 <i>cis</i> 8,11,14		0,01	0,01
C22:0		0,02	0,02
SUM		35,20	35,99

**Tabell 21:** FFA etter gastrisk fordøyelse.

	FFA mg/mL	FFA mg/mL	Gj.snitt mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C6:0	0,02	0,01	0,01	0,00	32,01 %
C8:0	0,10	0,09	0,09	0,00	3,88 %
C10:0	0,48	0,43	0,45	0,03	6,07 %
C12:0	0,37	0,27	0,32	0,05	15,50 %
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	18,68 %
C14:0	0,57	0,29	0,43	0,14	33,06 %
C14:1cis9	0,07	0,04	0,06	0,02	28,40 %
C15:0	0,03	0,01	0,02	0,01	40,51 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C16:0	1,22	0,54	0,88	0,34	38,89 %
C16:1cis9	0,03	0,01	0,02	0,01	45,47 %
C17:0	0,01	0,01	0,01	0,00	34,27 %
C17:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	65,35 %
C18:0	0,46	0,21	0,34	0,12	36,34 %
C18:1trans9	0,00	0,00	0,00	0,00	54,77 %
C18:1cis9	0,60	0,23	0,42	0,19	44,21 %
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C18:2cis9,12	0,05	0,02	0,03	0,02	49,17 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	18,13 %
C18:3cis9,12,15	0,01	0,00	0,01	0,00	34,24 %
C20:1cis11	0,01	0,00	0,00	0,00	34,70 %
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	5,97 %
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	35,74 %
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	4,04	2,17	3,11	0,94	30,17 %

**Tabell 22:** TAG etter gastrisk fordøyelse.

	TAG mg/mL	TAG mg/mL	Gj.snitt mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,05	0,08	0,07	0,02	22,11 %
C6:0	0,03	0,07	0,05	0,02	33,47 %
C8:0	0,08	0,11	0,09	0,01	13,42 %
C10:0	0,30	0,38	0,34	0,04	11,80 %
C12:0	0,56	1,79	1,18	0,62	52,58 %
C13:0	0,01	0,01	0,01	0,00	13,68 %
C14:0	2,80	3,45	3,13	0,33	10,45 %
C14:1cis9	0,25	0,34	0,30	0,04	14,13 %
C15:0	0,21	0,27	0,24	0,03	12,55 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C16:0	7,74	9,57	8,65	0,92	10,59 %
C16:1cis9	0,27	0,33	0,30	0,03	9,32 %
C17:0	0,08	0,09	0,09	0,01	8,68 %
C17:1cis10	0,03	0,03	0,03	0,00	8,20 %
C18:0	2,90	3,47	3,18	0,29	8,97 %
C18:1trans9	0,01	0,03	0,02	0,01	42,47 %
C18:1cis9	5,30	6,25	5,77	0,48	8,28 %
C18:2trans9,12	0,01	0,01	0,01	0,00	7,90 %
C18:2cis9,12	0,35	0,41	0,38	0,03	8,85 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:0	0,03	0,03	0,03	0,00	1,21 %
C18:3cis9,12,15	0,07	0,08	0,08	0,01	7,45 %
C20:1cis11	0,11	0,01	0,06	0,05	89,81 %
C21:0	0,00	0,01	0,00	0,00	16,97 %
C20:2cis11,14	0,00	0,01	0,00	0,00	100,00 %
C20:3cis8,11,14	0,00	0,01	0,00	0,00	100,00 %
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,02	0,03	0,03	0,00	15,53 %
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	10,56 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	21,23	26,89	24,06	2,94	12,24 %

**Tabell 23:** DAG etter gastrisk fordøyelse.

	DAG mg/mL	DAG mg/mL	Gj.snitt mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,01	0,01	0,01	100,00 %
C6:0	0,01	0,01	0,01	0,00	3,07 %
C8:0	0,03	0,03	0,03	0,00	12,04 %
C10:0	0,13	0,11	0,12	0,01	8,44 %
C12:0	0,21	0,10	0,16	0,06	35,26 %
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	31,73 %
C14:0	1,09	0,63	0,86	0,23	27,16 %
C14:1cis9	0,07	0,05	0,06	0,01	18,87 %
C15:0	0,08	0,05	0,07	0,02	28,91 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C16:0	3,17	1,79	2,48	0,69	27,79 %
C16:1cis9	0,08	0,04	0,06	0,02	28,60 %
C17:0	0,03	0,02	0,02	0,01	36,19 %
C17:1cis10	0,01	0,00	0,00	0,00	32,04 %
C18:0	0,93	0,46	0,69	0,23	33,98 %
C18:1trans9	0,00	0,00	0,00	0,00	17,66 %
C18:1cis9	1,26	0,68	0,97	0,29	30,10 %
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C18:2cis9,12	0,09	0,04	0,07	0,02	35,16 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:0	0,01	0,00	0,00	0,00	42,01 %
C18:3cis9,12,15	0,02	0,01	0,01	0,01	42,47 %
C20:1cis11	0,02	0,00	0,01	0,01	100,00 %
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	23,50 %
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	7,27	4,04	5,65	1,61	28,57 %

**Tabell 24:** MAG etter gastrisk fordøyelse.

	MAG mg/mL	MAG mg/mL	Gj.snitt mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C8:0	0,01	0,01	0,01	0,00	5,87 %
C10:0	0,01	0,01	0,01	0,00	9,92 %
C12:0	0,04	0,02	0,03	0,01	26,76 %
C13:0	0,01	0,00	0,01	0,00	24,04 %
C14:0	0,43	0,25	0,34	0,09	27,56 %
C14:1cis9	0,03	0,00	0,01	0,01	100,00 %
C15:0	0,02	0,01	0,02	0,01	34,72 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C16:0	0,85	0,48	0,67	0,18	27,54 %
C16:1cis9	0,03	0,01	0,02	0,01	44,39 %
C17:0	0,01	0,01	0,01	0,00	17,04 %
C17:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:0	0,17	0,11	0,14	0,03	21,81 %
C18:1trans9	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:1cis9	0,36	0,14	0,25	0,11	42,40 %
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:2cis9,12	0,03	0,01	0,02	0,01	44,82 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,01	0,00	0,00	16,97 %
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:3cis9,12,15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	1,99	1,07	1,53	0,46	30,22 %

**Tabell 25:** PL etter gastrisk fordøyelse.

	PL mg/mL	PL mg/mL	Gj.snitt mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C14:0	0,01	0,01	0,01	0,00	22,05 %
C14:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C16:0	0,03	0,03	0,03	0,00	0,88 %
C16:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	18,32 %
C17:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C17:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:0	0,01	0,01	0,01	0,00	0,45 %
C18:1trans9	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:1cis9	0,04	0,04	0,04	0,00	0,76 %
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:2cis9,12	0,01	0,01	0,01	0,00	6,08 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:3cis9,12,15	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	0,11	0,11	0,11	0,00	2,01 %



**Tabell 26:** FFA etter gastrisk og pankreatisk fordøyelse.

	FFA mg/mL	FFA mg/mL	FFA mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C6:0	0,01	0,01	0,01	0,00	1,27 %
C8:0	0,09	0,10	0,10	0,00	2,04 %
C10:0	0,76	0,77	0,77	0,00	0,27 %
C12:0	0,76	0,79	0,77	0,01	1,73 %
C13:0	0,01	0,01	0,01	0,00	1,24 %
C14:0	2,97	2,98	2,98	0,01	0,20 %
C14:1cis9	0,26	0,26	0,26	0,00	0,33 %
C15:0	0,22	0,23	0,22	0,00	0,80 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	4,80 %
C16:0	8,39	8,35	8,37	0,02	0,27 %
C16:1cis9	0,26	0,26	0,26	0,00	1,50 %
C17:0	0,08	0,08	0,08	0,00	1,38 %
C17:1cis10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,67 %
C18:0	3,28	3,23	3,25	0,03	0,79 %
C18:1trans9	0,02	0,01	0,01	0,01	40,94 %
C18:1cis9	4,93	4,62	4,78	0,16	3,31 %
C18:2trans9,12	0,01	0,01	0,01	0,00	5,53 %
C18:2cis9,12	0,50	0,46	0,48	0,02	3,44 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:0	0,03	0,03	0,03	0,00	1,47 %
C18:3cis9,12,15	0,08	0,07	0,07	0,00	2,67 %
C20:1cis11	0,08	0,08	0,08	0,00	1,20 %
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37 %
C20:2cis11,14	0,01	0,00	0,01	0,00	4,67 %
C20:3cis8,11,14	0,01	0,01	0,01	0,00	0,39 %
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,02	0,02	0,02	0,00	1,09 %
C22:1cis13	0,01	0,00	0,01	0,01	100,00 %
C20:4cis5,8,11,14	0,01	0,01	0,01	0,00	2,89 %
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	9,22 %
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	22,83	22,40	22,61	0,22	0,95 %

**Tabell 27:** TAG etter gastrisk og pankreatisk fordøyelse.

	TAG mg/mL	TAG mg/mL	TAG mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	8,10 %
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	37,02 %
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	19,72 %
C10:0	0,00	0,01	0,01	0,00	7,00 %
C12:0	0,03	0,04	0,04	0,00	2,98 %
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	5,06 %
C14:0	0,53	0,52	0,53	0,01	0,97 %
C14:1cis9	0,09	0,08	0,08	0,01	6,53 %
C15:0	0,04	0,04	0,04	0,00	1,30 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C16:0	1,77	1,62	1,70	0,08	4,60 %
C16:1cis9	0,07	0,06	0,07	0,01	9,93 %
C17:0	0,02	0,02	0,02	0,00	4,37 %
C17:1cis10	0,01	0,01	0,01	0,00	10,57 %
C18:0	0,64	0,66	0,65	0,01	1,05 %
C18:1trans9	0,00	0,00	0,00	0,00	5,02 %
C18:1cis9	1,81	1,37	1,59	0,22	13,95 %
C18:2trans9,12	0,01	0,00	0,00	0,00	8,03 %
C18:2cis9,12	0,21	0,08	0,15	0,06	41,83 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:0	0,01	0,01	0,01	0,00	12,25 %
C18:3cis9,12,15	0,02	0,01	0,02	0,01	31,56 %
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	27,35 %
C21:0	0,01	0,01	0,01	0,00	4,51 %
C20:2cis11,14	0,01	0,01	0,01	0,00	13,44 %
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	34,21 %
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22 %
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	5,32	4,55	4,94	0,38	7,72 %

Tabell 28: DAG etter gastrisk og pankreatisk fordøyelse.

	DAG mg/mL	DAG mg/mL	DAG mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C10:0	0,01	0,01	0,01	0,00	4,60 %
C12:0	0,01	0,01	0,01	0,00	21,49 %
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	18,81 %
C14:0	0,07	0,09	0,08	0,01	16,89 %
C14:1cis9	0,01	0,02	0,02	0,00	11,14 %
C15:0	0,00	0,01	0,01	0,00	11,90 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C16:0	0,15	0,20	0,17	0,03	15,91 %
C16:1cis9	0,01	0,01	0,01	0,00	23,53 %
C17:0	0,00	0,01	0,00	0,00	24,71 %
C17:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:0	0,03	0,04	0,03	0,00	13,56 %
C18:1trans9	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:1cis9	0,09	0,12	0,11	0,02	15,59 %
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:2cis9,12	0,01	0,01	0,01	0,00	11,08 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C18:3cis9,12,15	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	0,39	0,53	0,46	0,07	15,79 %

**Tabell 29:** MAG etter gastrisk og pankreatisk fordøyelse.

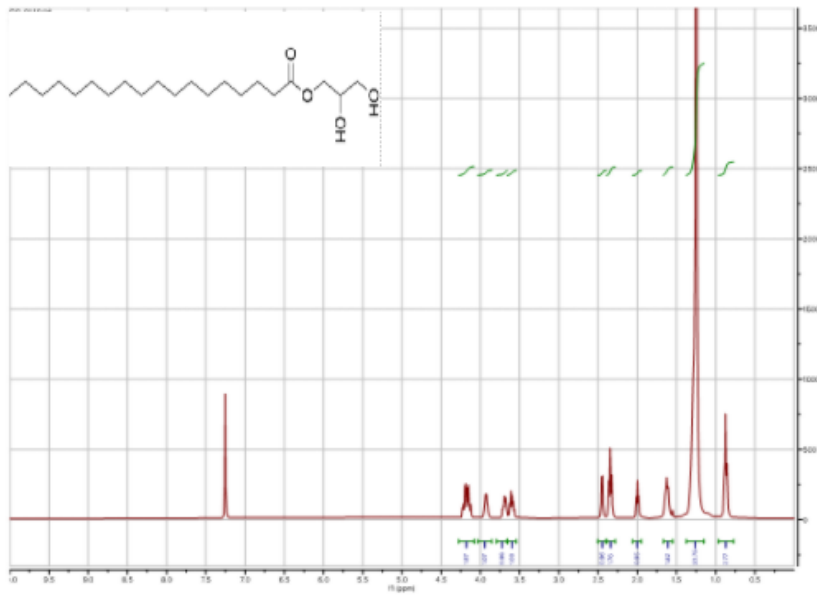
	MAG mg/mL	MAG mg/mL	MAG mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00 %
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	2,89 %
C10:0	0,01	0,01	0,01	0,00	3,54 %
C12:0	0,10	0,10	0,10	0,00	0,56 %
C13:0	0,01	0,01	0,01	0,00	4,98 %
C14:0	1,03	1,13	1,08	0,05	4,72 %
C14:1cis9	0,03	0,03	0,03	0,00	4,04 %
C15:0	0,06	0,08	0,07	0,01	14,02 %
C15:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C16:0	2,94	3,13	3,03	0,10	3,17 %
C16:1cis9	0,04	0,05	0,04	0,00	8,49 %
C17:0	0,04	0,04	0,04	0,00	0,02 %
C17:1cis10	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:0	0,39	0,43	0,41	0,02	4,35 %
C18:1trans9	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:1cis9	0,34	0,40	0,37	0,03	7,66 %
C18:2trans9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:2cis9,12	0,03	0,03	0,03	0,00	5,91 %
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:3cis9,12,15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	5,02	5,44	5,23	0,21	3,95 %

**Tabell 30:** PL etter gastrisk og pankreatisk fordøyelse.

	PL mg/mL	PL mg/mL	PL mg/mL	SD mg/mL	RSD %
C4	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 %
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 %
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 %
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 %
C14:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 %
C14:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C15:1cis10	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00 %
C16:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C16:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C17:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C17:1cis10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00 %
C18:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:1trans9	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00 %
C18:1cis9	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:2trans9,12	0,22	0,22	0,22	0,00	0,00 %
C18:2cis9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:3cis6,9,12	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C18:3cis9,12,15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:1cis11	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:2cis11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:3cis11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:1cis13	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:4cis5,8,11,14	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:2cis13,16	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C20:5cis5,8,11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C24:1cis15	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!
SUM	0,27	0,27	0,27	0,00	0,00 %

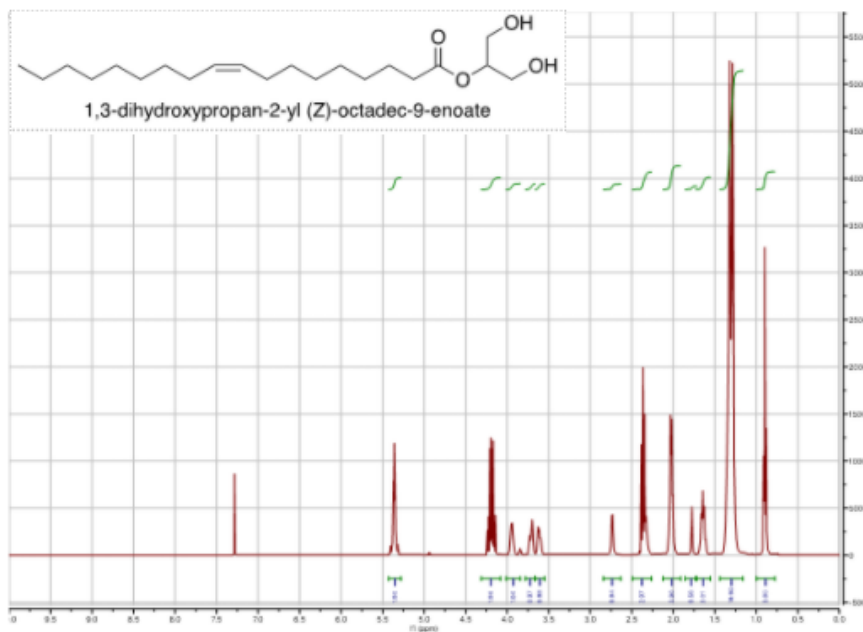
## Vedlegg 7 $^1\text{H-NMR}$ spektra

### 1. Monostearin



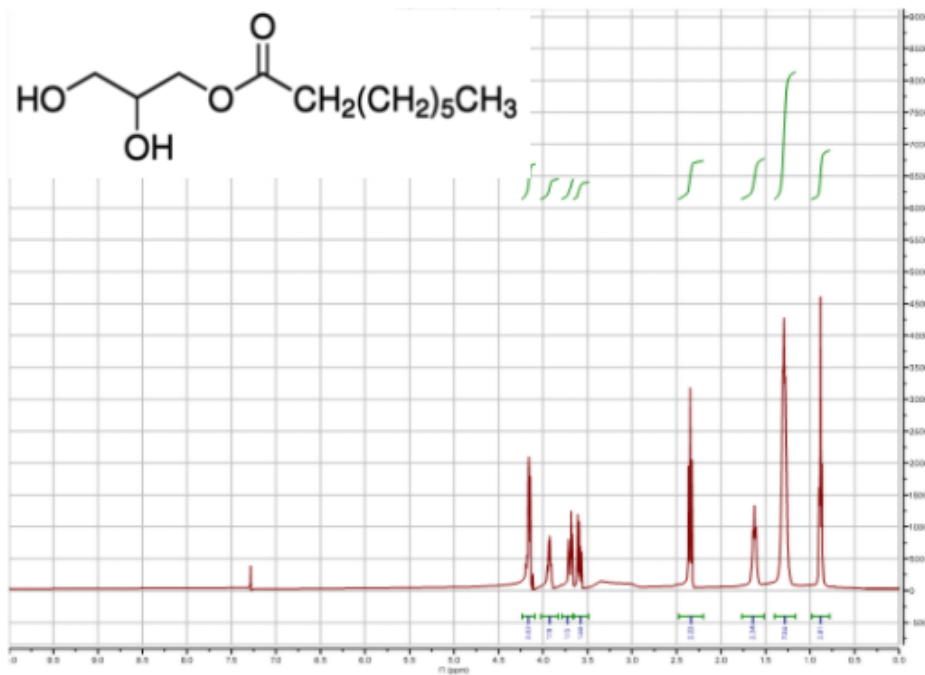
**Figur 2:**  $^1\text{H-NMR}$  spekter av monostearin. 2:1:1:1-mønstre mellom 3,5 og 4,5 ppm indikerer at det er sn-1.

### 2. Monoolein



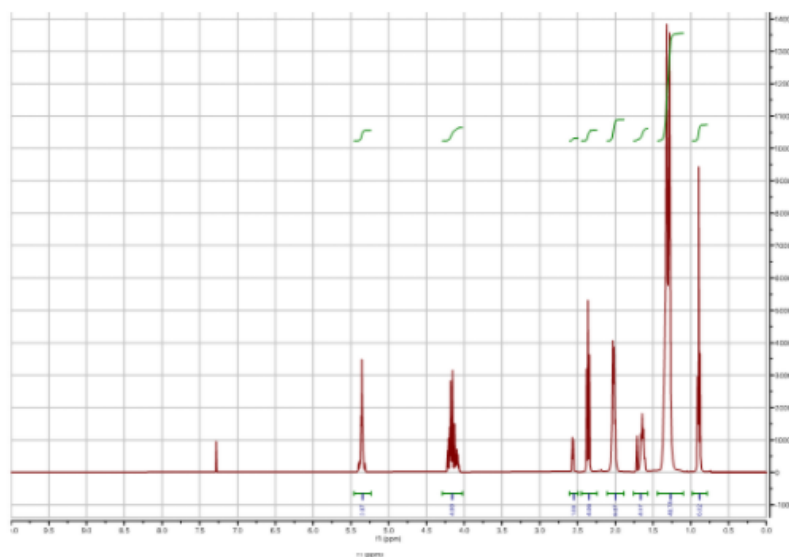
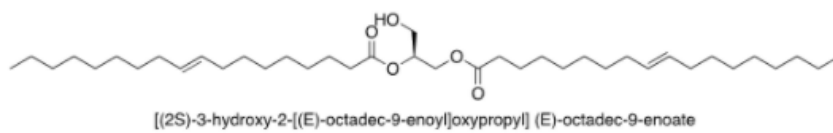
**Figur 3:**  $^1\text{H-NMR}$  spekter av monoolein. 2:1:1:1-mønstre mellom 3,5 og 4,5 ppm indikerer at det er sn-1.

### 3. Monocaprylin



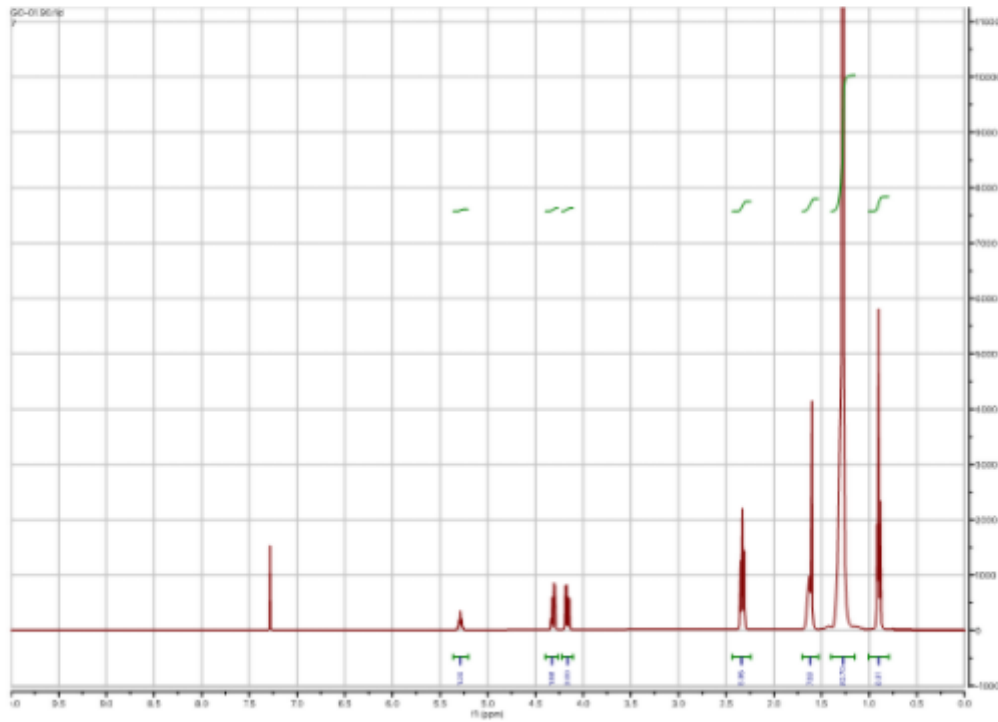
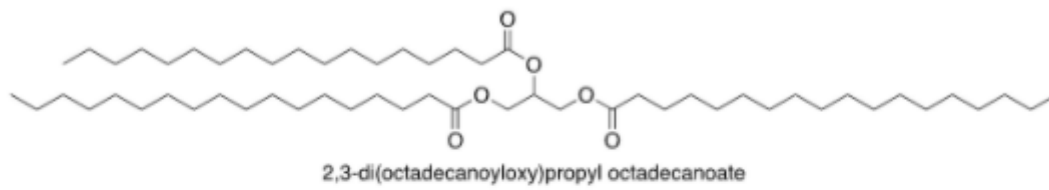
**Figur 4:**  $^1\text{H-NMR}$  spekter av monocaprylin. 2:1:1:1-mønstre mellom 3,5 og 4,5 ppm indikerer at det er sn-1.

### 4. Diolein



**Figur 5:**  $^1\text{H-NMR}$  spekter av diolein. Vanskelig å tolke, men ser ut til å være sn1 og sn2 forestering. Signalet til  $\text{CH}_2\text{OH}$  krasjer med signalet til sn-2.

## 5. Tristearin



**Figur 6:**  $^1\text{H-NMR}$  spekter av tristearin. Skift over 5 ppm er tegn på acylering i sn-2. sn-1 og sn-2 er også høyere enn ved OH-gruppe, noe som tyder på tre esterifiserte grupper.



## Vedlegg 8 Derivatisering av 2-monopalmitin med BSTFA:TMCS

Prøvene ble fraksjonert i henhold til 3.5.1 og dampet til tørrhet på varmeblokk under nitrogengass. Prøvene ble tilsatt 50 µL BSTFA:TMCS (99:1), 50 µL pyridin og varmet på 80 °C i 40 min. Prøven ble fortynnet i 1 mL heptan og analysert ved GC-MS.



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway