



## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ved Instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) i perioden august 2013 til desember 2014. Oppgaven ble utført hos forskningsgruppen for naturstoffkjemi og organisk analyse og utgjør 60 studiepoeng.

Jeg ønsker å takke min hovedveileder, Dag Ekeberg, for hjelp med utforming av oppgaven, for nyttige innspill, og for alltid å ta seg tid til å besvare spørsmål underveis. Jeg vil også takke min medveileder, Hanne Devle, for gode råd og konstruktive tilbakemeldinger både på laboratoriet og i skriveprosessen. En stor takk også til Carl Fredrik Næss-Andresen for å være en god og pedagogisk samtalepartner som utfordrer meg til å tenke litt lengre.

Tusen Takk til min pappa, for hjelp, støtte og motivasjon gjennom hele utdanningen min.

Tusen takk til min fantastiske mann for uvurderlig støtte og tålmodighet. Takk for hjelp med korrekturlesing og faglige innspill.

*Dediseres til min dypt savnede mamma. Takk for at du delte din undring og nysgjerrighet med meg. Uten deg hadde jeg aldri hatt troen på at jeg kunne klare dette.*

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, desember 2014

Anniken Liljeberg Jacobsen

## Sammendrag

Melk og fermenterte meieriprodukter fra ulike dyr har i flere tusen år blitt brukt som human næringskilde. Fettinnholdet i kumelk er 3-4 g/100 g, hvor omtrent 95-98 % er i form av triglyserider. Resten er små mengder diglyserider, monoglyserider, fosfolipider, steroler og frie fettsyrer. De siste årene har det blitt fokus på bedre forståelse av helseeffekten av lipidene vi får i oss gjennom kostholdet vårt. Det å studere fettsyreprofiler i ulike fett og oljer, samt hvordan de forskjellige komponentene brytes ned i fordøyelsessystemet kan gi svar på hvorfor noen typer fett er bedre for kroppens helse enn andre.

En metode for separasjon av triglyserider (TAG), diglyserider (DAG), og monoglyserider (MAG) ble utviklet og benyttet til å separere og analysere de nøytrale lipidene (NL) fra fordøyd kumelk ved fastfaseekstraksjon (SPE) og GC-MS.

Lipidene brukt var ekstrahert fra helmelk av Devle et al. (2014), som separerte nøytrale lipider, frie fettsyrer (FFA) og fosfolipider (PL) for å studere gjensidige effekter av *ex vivo* protein- og lipidfordøyelse av melk.

De nøytrale lipidene ble først separert fra FFA og PL ved SPE på en NH<sub>2</sub>-kolonne. Videre separasjon av TAG-, DAG-, og MAG-fraksjoner ble oppnådd ved å applisere NL i et lite volum på en ny NH<sub>2</sub>-kolonne. TAG ble eluert med 1,0 mL heptan:dietyler (93:7), DAG med 3,0 mL heptan:dietyler (93:7), og MAG med 3,0 mL kloroform:metanol (2:1).

Fettsyreprofilen i fraksjonene var i overensstemmelse med det funnet av Devle et al. (2014) og indikerer at separasjonsmetoden ga et tilfredsstillende utbytte. Det ble funnet at fettsyrenes massefordeling i ufordøyd helmelk var 91,6 % TAG, 6,3 % DAG, 0,2 % MAG og 1,9 % FFA. Fettsyrenes massefordeling i *ex vivo* fordøyd helmelk ble funnet til å være 10,7 % TAG, 25,4 % DAG, 14,9 % MAG og 49,0 % FFA.

## Abstract

Milk and fermented dairy products from different animals have been used as human source of nutrition for several millennia. The fat content of cow milk is 3-4 g/100 g, in which about 95-98 % are in the form of triglycerides. The rest consists of small amounts of diglycerides, monoglycerides, phospholipids, sterols and free fatty acids. In recent years, there has been focus on a better understanding of the health effects of lipids we consume through our diet. Studying amino acid profiles in various fats and oils, and how the various components are broken down in the digestive system, can provide answers to why some types of fats are better for human health than others.

A method for separation of triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), and monoacylglycerol (MAG) was developed and used to separate and analyse the neutral lipids (NL) from digested cow milk by solid-phase extraction (SPE) and GC-MS.

The lipids used were extracted from full fat milk by Devle et al. (2014), who separated neutral lipids, free fatty acids (FFA), and phospholipids (PL) to study the interacting effect of *ex vivo* protein- and lipid digestion of milk with different fat content.

The NLs were first separated from the FFAs and PLs by SPE on a NH<sub>2</sub> column. Further separation into TAG-, DAG-, and MAG fractions was accomplished by applying the NLs in a small volume on a new NH<sub>2</sub> column. TAG was eluted with 1,0 mL heptane:diethyl ether (93:7), DAG with 3,0 mL heptane:diethyl ether (93:7), and MAG with 3,0 mL chloroform:methanol (2:1).

The fatty acid composition in each fraction was in good correlation with the results found by Devle et al. (2014) and indicates a satisfying yield. The fatty acid distribution in full fat milk were found to be 91,6 % TAG, 6,3 % DAG, 0,2 % MAG and 1,9 % FFA. The fatty acid distribution in the *ex vivo* digested full fat milk were found to be 10,7 % TAG, 25,4 % DAG, 14,9 % MAG and 49,0 % FFA.

## Generelle bemerkninger

Alle løsemiddelblandinger er beskrevet med volumetriske forhold.

Alle skjema og molekylstrukturer er tegnet av meg i programmet ChemBioDraw Ultra 12.0.2 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) dersom ikke annen kilde er presisert.

Alle elueringsvolum pipettert av SPE-roboten er gitt i programmert volum. Volum prøveløsning og lipidmasse applisert på ekstraksjonskolonnen er gitt med reelle verdier.

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	I
Sammendrag .....	II
Abstract .....	III
Generelle bemerkninger .....	IV
Innholdsfortegnelse .....	V
1. Introduksjon .....	1
1.1 Lipider .....	2
1.1.1 Acylglyserider .....	2
1.1.2 Fettsyrer .....	4
1.1.3 Nomenklatur .....	5
1.1.4 Lipider i melk .....	6
1.2 Lipidanalyse .....	7
1.2.1 Basekatalysert omestring .....	7
1.2.2 Derivatisering ved syrekatalysert forestring.....	8
1.2.2 Gasskromatografi .....	9
1.2.3 Flammeionisasjonsdetektor .....	9
1.2.4 Massespektrometri .....	9
1.3 Fastfaseekstraksjon.....	11
1.3.1 Adsorbentegenskaper .....	13
1.3.2 Normalfaseekstraksjon .....	14
1.3.3 Eksisterende metoder for lipidseparasjon ved SPE .....	17
2. Materialer og Metode .....	19
2.1 Materialer og kjemikalier .....	19
2.2 Tillaging av løsninger.....	20
2.3 Metodeutvikling for separasjon av TAG, DAG, og MAG .....	21
2.3.1 Fastfaseekstraksjon .....	21
2.3.2 Identifisering av SPE-robotens systematiske feil.....	22
2.3.3 Basekatalysert omestring .....	22
2.3.4 Analyse av fettsyremetylestere.....	22
2.3.5 Validering av metoden .....	23
2.4 Separasjon og analyse av lipider fra melk .....	24
2.4.1 Lipidseparasjon ved SPE-SPE .....	24
2.4.2 Derivatisering til fettsyremetylestere.....	25
2.4.3 Analyse av fettsyremetylestere.....	25

3. Resultat og Diskusjon .....	27
3.1 Semivalidering av SPE-roboten.....	27
3.2 Separasjon av MAG, DAG, og TAG.....	28
3.2.1 Valg av ekstraksjonskolonne .....	28
3.2.2 Valg av løsemiddel i prøve.....	29
3.2.3 Prøvevolum.....	29
3.2.4 Kondisjonering.....	30
3.2.5 Retensjon .....	30
3.2.6 Eluering .....	31
3.2.7 Lipidmasse.....	33
3.2.4 Validering av metode .....	34
3.3 SPE-SPE av lipider fra helmelk .....	36
4. Konklusjon .....	44
5. Videre arbeid .....	45
6. Litteraturliste .....	46
Vedlegg 1 – Semivalidering av SPE-roboten .....	51
Vedlegg 2 - Eksisterende metoder .....	53
Vedlegg 3 – Test av eksisterende metoder .....	54
Vedlegg 4 – Elueringsmiddel .....	56
Vedlegg 5 - Lipidmasse .....	59
Vedlegg 6 – Validering av metode .....	61
Vedlegg 7 – FAME og IS.....	64
Vedlegg 8 – Beregninger ufordøyd melk .....	65
Vedlegg 9 – Beregninger fordøyd melk.....	70
Vedlegg 10 – Areal av internstandard .....	74
Vedlegg 11 – Total fettsyrekonsentrasjon i helmelk.....	75
Vedlegg 12 – Total molar fettsyrekonsentrasjon i helmelk .....	76
Vedlegg 13 – Molar lipidkonsentrasjon i helmelk .....	77

## 1. Introduksjon

Melk er en væske produsert av pattedyr for å tilføre næring til sine nyfødte og inneholder alle de nødvendige næringsstoffene, som mineraler, vitaminer, proteiner, og essensielle fettsyrer (Wijensinha-Bettoni et al., 2013). Helt tilbake til år 7000 f.Kr har melk og fermenterte meieriprodukter fra ulike dyr blitt brukt som human næringskilde (Stanton et al., 2013). Kumelk har blitt det vi hovedsakelig assosierer med "melk", selv om også melk fra andre dyr er mye brukt til meieriprodukter (Wijensinha-Bettoni et al., 2013).

Mange av komponentene i melk påvirker hverandres egenskaper, og har ikke den samme effekten hvis de konsumeres isolert. Et eksempel på dette er melkefett. Det tradisjonelle fett-paradigmet, utviklet på 60- og 70-tallet, sa at fett, og spesielt mettet fett, økte nivået av både total kolesterol og LDL-kolesterol i blodet, og førte til hjerte- og karsykdommer. De fleste internasjonale myndigheter anbefaler derfor inntak av fettreduserte meieriprodukter, selv om forskningen bak disse anbefalingene fortsatt er mangelfulle og svært debatterte. Det å betrakte alle mettede fettsyrer som én uniform gruppe av fett er en grov forenkling, da individuelle fettsyrer har spesifikke funksjoner som også avhenger av kjedelengde (Weaver et al., 2013).

De siste årene har det blitt fokus på bedre forståelse av helseeffekten av lipidene vi får i oss gjennom kostholdet vårt. Det å studere fettsyreprofiler i ulike fett og oljer, samt hvordan de forskjellige komponentene brytes ned i fordøyelsessystemet kan gi svar på hvorfor noen typer fett er bedre for kroppens helse enn andre.

Denne oppgaven bygger videre på Devle et al. (2014) sitt arbeid med å studere gjensidige effekter i nedbrytning av proteiner og lipider gjennom *ex vivo* fordøyelse av kumelk. De fant at lipolyse var neglisjerbar i den gastriske fordøyelsen, og at ca. 37 % av de nøytrale lipidene i helmelk var fordøyd etter 30 minutter, hvor fordøyelsen nådde likevekt (Devle et al., 2014). Det er ønskelig å separere de nøytrale lipidene i fordøyd melk og analysere både fettsyreprofilen av TAG, DAG, og MAG for å få et dypere innblikk i fordøyelsesmekanismen av disse.

Tradisjonelle metoder for lipidanalyse er tidkrevende og bruker store mengder giftige løsemidler. Mange forsøker derfor å finne nye metoder uten at kvaliteten av analysen svekkes. Dette har ført til en rekke publikasjoner hvor tynnsjikt-kromatografi som separasjonsteknikk for det meste er byttet ut med fastfaseekstraksjon.

Hensikten med denne oppgaven er å etablere en metode for å separere de nøytrale lipidene i tre fraksjoner, med henholdsvis triglyserider, diglyserider, og monoglyserider, ved bruk av



SPE-robot. Deretter skal metoden benyttes for å separere de nøytrale lipidene i ufordøyd og *ex vivo* fordøyd helmelk.

## 1.1 Lipider

Lipider er en gruppe naturlige forbindelser som inkluderer fett, oljer, voks, og steroler. Deres biologiske funksjon innebærer energilagring og signalisering, og de er byggeklosser i celledmembraner (McKee & McKee, 2003).

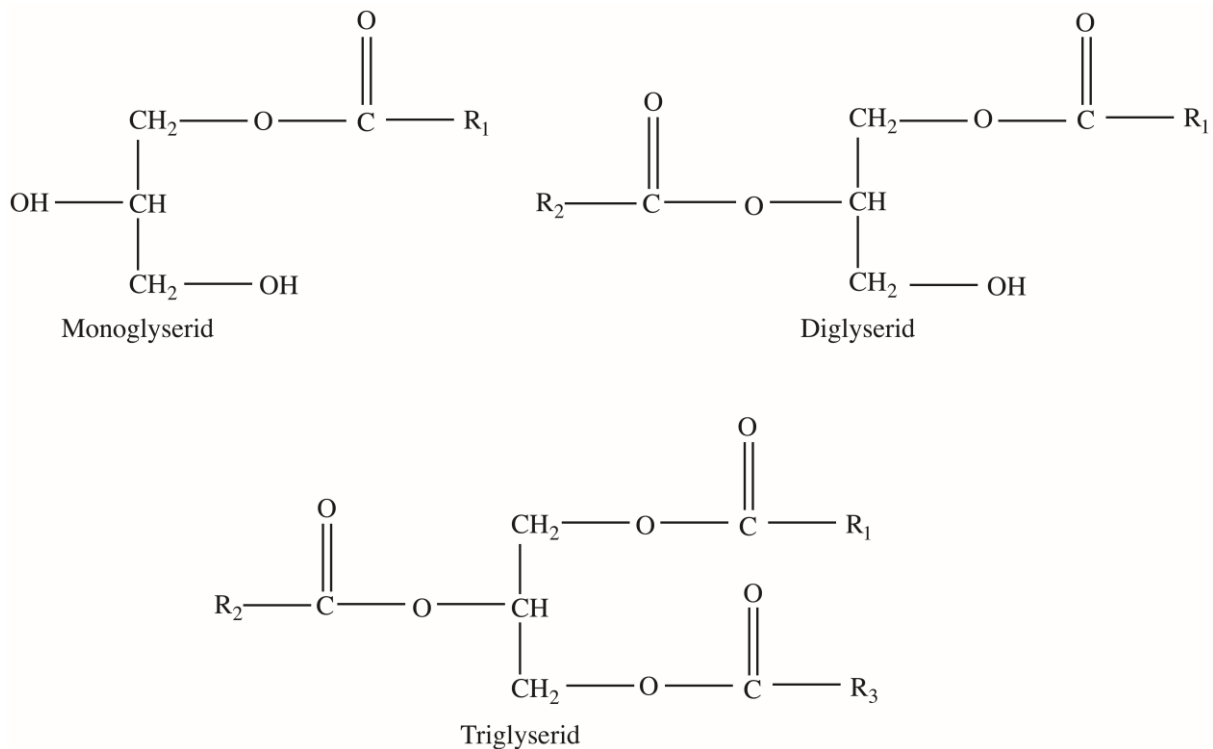
Det er ingen allmenn akseptert definisjon på lipider. En vanlig definisjon er at lipider er en gruppe av forbindelser som er løselige i organiske løsemidler som kloroform, hydrokarboner og aceton, men som ikke er løselig i vann (McKee & McKee, 2003). Gunstone (1996) definerer lipider som "forbindelser basert på fettsyrer eller nært relaterte forbindelser som de korresponderende alkoholer og sfingosinbasene". Ikke så forskjellig fra Christie (2013) som definerer lipider som "fettsyrer og deres derivater, og substanser som er biosyntetisk relatert eller funksjonelt relatert til disse forbindelsene".

### 1.1.1 Acylglyserider

Acylglyserider er estere av alkoholen glyserol (propan-1,2,3-triol) koblet til tre, to eller en fettsyrer og kalles henholdsvis tri-, di-, og monoglyserider (TAG, DAG, og MAG). Acylglyseridene inneholder fettsyrer med forskjellige lengder og grad av umettethet, og deres sammensetning avgjør acylglyseridets kjemiske- og fysikalske egenskaper. Siden acylglyseridene ikke har noen ladning, er de ofte referert til som nøytralt fett eller nøytrale lipider (NL) (McKee & McKee, 2003).

Glyserol er et prokiralt molekyl hvor det prokirale karbonatomet er koblet til to CH<sub>2</sub>OH-grupper. Når disse er acylert med forskjellige fettsyrer er molekylet kiralt og eksisterer i to enantiomere former. Ved representasjon av acylglyserid ved Fisherprosjeksjon (figur 1.1), med den sekundære hydroksylgruppen til venstre for det kirale karbonet (L-glyserol), er karbonatomene nummerert 1, 2 og 3 fra topp til bunn. Molekyler som er stereospesifikt nummerert på denne måten har prefiksen *sn*- direkte foran termen "glyserol". Prefiksen *rac*-foran navnet viser at det er en lik blanding av begge enantiomerer (Gunstone, 1996).

## Introduksjon



**Figur 1.1:** Kjemisk struktur av 1-monoglyserid, 1,2-diglyserid og 1,2,3-triglyserid, hvor R er en alifatisk kjede betegnet med stereospesifikk nummerering (*sn*).

## Triglyserider

Hovedreservene av lipider i dyr og planter er i form av triglyserider (TAG) (Gunstone, 1996). Hos mennesker og dyr er hovedoppgaven til triglyserider å lagre og transportere fettsyrer i kroppen (McKee & McKee, 2003). Triglyserider lagrer energi mer effektivt enn glykogen fordi triglyseridene ikke oksideres like lett som karbohydrater og frigjør mer energi (9 kcal per gram) når de degraderes, i forhold til karbohydrater (4 kcal per gram) (Masoro, 1968). Fett har dårlige varmeledningsegenskaper som gjør at det også fungerer som isolasjon og hindrer varmetap ved lave temperaturer (McKee & McKee, 2003).

I planter utgjør triglyseridene en viktig energireserve lokalisert i frukt og frø. Disse inneholder ofte mye umettede fettsyrer og blir referert til som planteolje (McKee & McKee, 2003).

## Di- og monoglyserider

Di- og monoglyserider (DAG og MAG) er også tilstede i mindre mengder i dyr og planter, og er viktige mellomprodukter i biosyntesen og katabolismen av triglyserider og andre lipider (Gunstone, 1996). Diglyseridene eksisterer i begge isomere former, men 1,2-isomeren har høyest forekomst. Monoglyseridene er hovedsakelig acylert i *sn2*-posisjon (Masoro, 1968).

Di- og monoglyserider er mye brukt som overflateaktive forbindelser som brukes for å stabilisere emulsjoner og for å tykne eller skumme olje (Gunstone, 1996).

Selv om diglyserider har en hydroksylgruppe, gjør de to acylkjedene molekylet i stor grad upolart og de har veldig like kjemiske og fysiske egenskaper som triglyseridene. Dette gjør disse vanskelig å separere.

### 1.1.2 Fettsyrer

Fettsyrer består av en karboksylgruppe og en alkylgruppe, oftest rettkjedet og med et like antall karbonatomer. Fettsyren kan enten være mettet (SFA), hvor alkylkjeden kun har enkeltbindinger, enumettet (MUFA) der alkylkjeden har én dobbeltbinding, eller flerumettet (PUFA) der alkylkjeden har to eller flere dobbeltbindinger (McKee & McKee, 2003). Dobbeltbindingene er oftest ikke-konjugerte, men konjugert linolsyre er et eksempel på at det også finnes unntak.

Karbon-karbon dobbeltbindingen kan ha *cis*- eller *trans*-konfigurasjon hvor de naturlige fettsyrer oftest forekommer i *cis*-konfigurasjon. En slik dobbeltbinding gir karbonkjeden en liten "knekk" og gjør at umettede fettsyrer ikke kan pakkes like tett sammen som mettede fettsyrer. Denne egenskapen gjør at det kreves mindre energi for å ødelegge de intermolekulære kreftene mellom de umettede fettsyrene. Umettede fettsyrer har derfor et lavere smeltepunkt enn mettede og forekommer i væskeform ved romtemperatur (McKee & McKee, 2003).

Under fysiologiske betingelser er karboksylgruppen ionisert, men de fleste fettsyrer er likevel ikke løselig i vann på grunn av den lange upolare karbonkjeden. I levende organismer inngår de fleste fettsyrene i forskjellige lipidmolekyler, men det finnes også spor av frie fettsyrer (FFA) (McKee & McKee, 2003).

Planter og bakterier kan syntetisere alle sine fettsyrer fra acetyl-CoA. Pattedyr får de fleste fettsyrene direkte gjennom kostholdet, men kan også syntetisere mettede- og noen enumettede fettsyrer eller modifisere enkelte fettsyrer ved å legge til to karbonenheter og legge til dobbeltbindinger. Fettsyrer som kan syntetiseres kalles ikke-essensielle fettsyrer. Siden pattedyr ikke produserer enzymet nødvendig for å syntetisere linolsyre og linolensyre, kalles disse essensielle fettsyrer som må tilføres gjennom kosten. I tillegg til å bidra til riktig membranstruktur er disse fettsyrene viktige metabolitter i kroppen (McKee & McKee, 2003).

### 1.1.3 Nomenklatur

Fettsyrene benevnes på flere forskjellige måter. Trivialnavnene blir ofte brukt, da disse ble gitt til forbindelsene før den kjemiske strukturen var kjent, og gjenspeiler ofte hvor fettsyren har høy forekomst (Gunstone, 1996).

Det mer systematiske navnet representerer strukturen til fettsyren, og antall karbonatomer og dobbeltbindinger utgjør grunnlaget for navnet. For plassering av dobbeltbindingene blir karbonatomet i karboksylsyren angitt som nummer 1, og de resterende karbonatomene nummereres i rekkefølge etter denne. Dobbeltbindinger blir angitt med det nummeret som hører til karbonatomet nærmest syregruppen.

En tredje måte å benevne fettsyrer på er et numerisk system. Det første tallet for antall karbonatom og det andre tallet er antall dobbeltbindinger. For eksempel kan linolsyre skrives C18:2. Hvis ingenting annet er nevnt antas det *cis*-konfigurasjon. Siden det er flere isomere forbindelser som kan representeres med disse tallene, legges det til ekstra beskrivelse for å vise hvor dobbeltbindingene sitter. Linolsyre kan for eksempel beskrives: 18:2(9,12), 18:2<sup>Δ<sup>9,12</sup></sup>, 18:2 (9c,12c), 18:2(9Z,12Z), 18:2(n-6). Med unntak av det siste eksempelet er karbonatomet på syregruppen nummer 1. Eksempel 2 og 3 bekrefter *cis*-/*Z*-konfigurasjon av dobbeltbindingene. Noen ganger er det nyttig å angi dobbeltbindingens posisjon med hensyn på metylgruppen. Dette gjøres med symbolene ω6 eller n-6 (Gunstone, 1996).

Det systematiske navnet gir opphav til lange kompliserte navn på fettsyrene. Trivialnavnene er ofte lettere å bruke, selv om de ikke gir noen indikasjon om strukturen. Det er derfor vanlig å bruke en kombinasjon av trivialnavn og numerisk benevning. Eksempler på benevning av fettsyrer er gitt i tabell 1.1.

Forgrenede alkylgrupper benevnes med prefiksen *iso* når terminalgruppen er en isopropyl, og *anteiso* når syren har en sekundær butyl terminalgruppe.

**Tabell 1.1:** Eksempler på trivialnavn, systematisk navn og numerisk benevnning av fettsyrer.

Numerisk	Systematisk navn	Trivialnavn
C10:0	Dekansyre	Kaprinsyre
C12:0	Dodekansyre	Laurinsyre
C14:0	Tetradekansyre	Myristinsyre
C16:0	Heksadekansyre	Palmitinsyre
C16:1	9-Heksadekansyre	Palmitoleinsyre
C18:0	Oktadekansyre	Stearinsyre
C18:1(9c)	cis-9-Oktadekansyre	Oleinsyre
C18:2(9c,12c)	cis-9,12-Oktadekadiensyre	Linolsyre
C18:3(9c,12c,15c)	cis-9,12,15-Oktadekatriensyre	Linolensyre

#### 1.1.4 Lipider i melk

Melkefett forekommer som små emulgerte dråper omsluttet av en membran bestående av proteiner og fosfolipider (Morrison, 1970). Fettinnholdet i kumelk er 3-4 g/100 g, hvor SFA utgjør 65-75 g/100 g av det totale FA-innholdet (Wijensinha-Bettoni et al., 2013). Omtrent 95-98 % av lipidene i melk er i form av triglyserider, resten er små mengder diglyserider, monoglyserider, fosfolipider, steroler og frie fettsyrer. DAG og MAG i melk kan være et resultat av lipolyse av TAG ved uegnet oppbevaring, og er mellomprodukter i biosyntesen av TAG (Gunstone, 1996; Christie, 1995).

Fett i melk har en kompleks fettsyresammensetning med et høyt innhold av kort- og mellomkjededede FA, inkludert små mengder *trans*-UFA. Det er funnet over 400 forskjellige fettsyrer i melk, men bare 12 av dem utgjør individuelt mer enn 1 %. Karbonkjeden i fettsyrene varierer fra C4 til C26, og er både mettede og umettede, rette og forgrenede (Gunstone, 1996). Fettsyreprofilen i melk er avhengig flere faktorer, blant annet: rase, melkedannelsesstadiet, antall kalvinger, sesongvariasjoner, alder, helse, og kosthold (Wijensinha-Bettoni et al., 2013). Fettsyrene med høyest forekomst i kumelk er gitt i tabell 1.2.

Fettsyrene er ikke tilfeldig distribuert i triglyseridene. Melk fra de fleste dyr har til felles at korte fettsyrer, stearinsyre og umettede fettsyrer har høyest forekomst posisjon *sn1* og *sn3*, palmitinsyre er litt mer tilfeldig distribuert, mens myristinsyre har en liten preferanse for posisjon *sn2*. *Trans*-fettsyrer finnes sjeldent i *sn2*-posisjon (MacGibbon & Taylor, 2006; Morrison, 1970). Stereospesifikk analyse av TAG fra melkefett har vist at hver av *sn*-posisjonene har en ganske konstant fettsyredistribusjon og er gitt i tabell 1.2.

**Tabell 1.2:** Sammensetningen av de høyest forekomne fettsyrene i triglyserider i kumelk og hver av de stereospesifikke posisjonenes fettsyredistribusjon (MacGibbon & Taylor, 2006)

FA	(%, w/w)	sn1 (mol %)	sn2 (mol %)	sn3 (mol %)
C4:0	3,1-4,4		0,4	30,6
C6:0	1,8-2,7		0,7	13,8
C8:0	1,0-1,7	0,3	3,5	4,2
C10:0	2,2-3,8	1,4	8,1	7,5
C12:0	2,6-4,2	3,5	9,5	4,5
C14:0	9,1-11,9	13,1	25,6	6,9
C14:1	0,5-1,1			
C15:0	0,9-1,4			
C16:0	23,6-31,4	43,8	38,9	9,3
C16:1	1,4-2,0			
C18:0	10,4-14,6	17,6	4,6	6,0
C18:1cis	14,9-22,0	19,7	8,4	17,1
C18:2	2,0-2,7			
C18:3	0,9-1,2			

## 1.2 Lipidanalyse

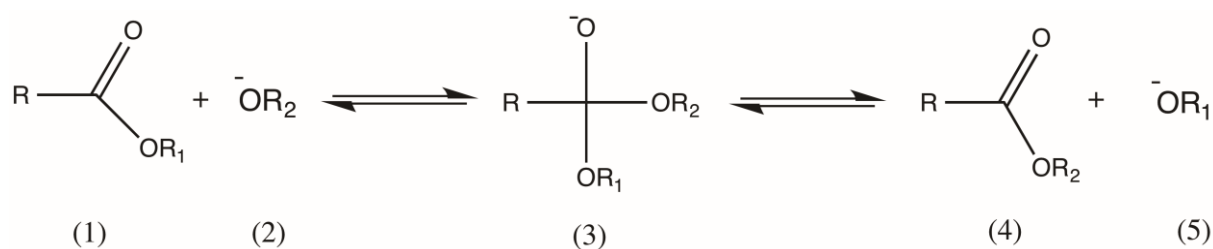
Hovedmålet med en analysemetode for lipider er å separere og kvantifisere komponentene på en måte som er representativt for prøven som skal analyseres. Det er etablerte metoder for separasjon og analyse av lipider ved bruk av både tynnsjikt-kromatografi (TLC) og væske-kromatografi (HPLC), men i mange år har gasskromatografi vært den mest brukte metode for å separere metylestere for kvantitative formål (Gunstone, 1996).

Da melk har mer enn 400 forskjellige fettsyrer kan de forekomme i 400<sup>3</sup> forskjellige TAG. Dette gjør både kvalitativ og kvantitativ analyse vanskelig dersom de analyseres direkte (Gunstone, 1996). Det kan derfor være mer hensiktsmessig å analysere fettsyrene som acylglyseridene består av. Fettsyrenes polaritet og høye kokepunkt gjør dem vanskelige å analysere på GC. Ved å omestrem NL og forestre FFA til deres korresponderende fettsyremetylestere (FAME), økes flyktigheten til lipidene og gjør dem lettere å identifisere og kvantifisere.

### 1.2.1 Basekatalysert omestring

En derivatiseringsmetode bør være rask, enkel og kvantitativ, uten endring av analyttens struktur. Den mest vanlige og effektive fremgangsmåten å omestrem acylglyseridenes fettsyrer til deres korresponderende FAME er ved basekatalysert omestring slik vist i skjema 1.1.

## Introduksjon

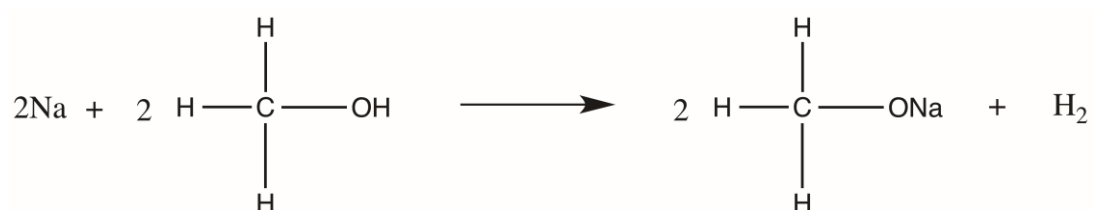


**Skjema 1.1:** Reaksjonslikning for basekatalysert omestring.

Ved tilstedeværelse av en base, som et alkoholanion (2), vil esteren danne et anionisk mellomprodukt (3) som kan dissosiere tilbake til den originale esteren eller danne en ny ester (4). Ved overskudd av alkoholanionet (2) vil likevekten forskyves slik at all den opprinnelige esteren er fullstendig omdannet til den nye produktesteren (4) (Christie, 1992b).

Dette er en rask metode som kan foregå ved romtemperatur. Ved normale og vannfrie betingelser skjer det ingen isomerisering av dobbeltbindinger i flerumettede fettsyrer (Christie, 1992b).

Det vanligste reagenset ved basekatalysert omestring er natriummetanolat. Det lages ved å løse metallisk natrium i vannfri metanol hvor det skjer en eksoterm reaksjon som gir  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , vist i skjema 1.2. Metanolatanionet vil i omeststringsprosessen ta plassen til glyserol i acylglyserolet, og det dannes FAME (Christie, 1992b).



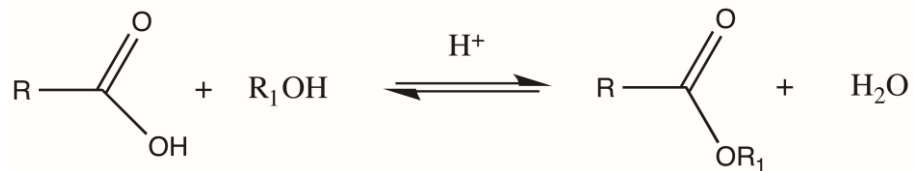
**Skjema 1.2:** Metallisk natrium reagerer med metanol og gir natriummetanolat og hydrogen gass i en eksoterm reaksjon.

### 1.2.2 Derivatisering ved syrekatalysert forestring

Frie fettsyrer kan ikke derivatiseres med basisk katalysator, da fettsyren vil være ionisert i basisk løsning og vil ikke bli angrepet av alifatiske alkoholer eller baser.

Ved syrekatalysert forestring vil fettsyrer reagere med alkohol og gi ester og vann slik vist i skjema 1.3.

## Introduksjon



**Skjema 1.3:** Reaksjonslikning for syrekatalysert forestring av en syre.

Bortrifluorid-kompleks i metanol er en effektiv syrekatalysator for frie fettsyrer. Komplette forestring oppnås med 12-14 % bortrifluorid ved kort oppvarming (Christie, 1972; Masoro, 1968).

### 1.2.2 Gasskromatografi

Gasskromatografi (GC) er en separasjonsteknikk gjennom et kromatografisk system hvor mobilfasen er en inert gass. Forbindelsene som analyseres må være flyktige og stabile ved temperaturene som benyttes. Separasjonsprinsippet er en kombinasjon av analyttenes forskjellige kokepunkt, og deres interaksjon med stasjonærfasen gjennom kolonnen (Rasmussen, 1994a).

### 1.2.3 Flammeionisasjonsdetektor

Flammeionisasjonsdetektor (FID) er en av de mest brukte detektorene i GC, og kan brukes på organiske forbindelser med ikke-oksiderte karbonatomer. Den relative responsfaktoren i FID er lineær og konstant over et stort område, og angis i form av det effektive karbontallet (ECN). ECN er avhengig av antall karboner, dobbeltbindinger, og heteroatomene oksygen, klor, og nitrogen (Rasmussen, 1994).

I en FID blandes bæregassen fra kolonnen med hydrogengass og forbrennes ved overskudd av luft som ledes inn i detektoren. Der er det en spenning mellom to elektroder: flamme-spissen, som er negativt ladet og kollektorelektroden, som er positivt ladet. Når en organisk komponent føres inn i flammen, vil den forbrennes og gi opphav til flere ioner og elektroner. Det vil gå en strøm i detektoren som er proporsjonal med mengde stoff som forbrennes og konsentrasjonen av ladede partikler i gassen. Strømmen blir forsterket av et elektrometer (Rasmussen, 1994a).

### 1.2.4 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analyseteknikk som brukes til identifikasjon, strukturbestemmelse, og massebestemmelse av kjemiske forbindelser. Analytten som skal



analyseres må være i gassfase og ioniseres i instrumentets ionekilde. Deretter separeres ionene i en masseanalysator ut fra forholdet mellom ionenes masse og deres formelle ladning ( $m/z$ ), før de detekteres i en detektor (Rønning, 2011).

### Elektronionisasjon

Elektronionisasjon (EI) er en av de mest brukte ionisasjonsmetodene i et massepektrometer. Her blir molekylene bombardert med høy-energiske elektroner som "slår ut" et elektron fra analyttmolekylet. Det blir da dannet et radikalkation, molekylionet ( $M^+$ ), og to termiske elektroner. Overskuddsenergien i molekylionet gjør at det er ustabil og brytes ned til mindre fragmentioner, radikaler, og nøytrale molekyler. Måten et molekylion fragmenterer på er karakteristisk for molekylet og betegnes som forbindelsens "fingeravtrykk".

Ionene akselereres ut av ionekilden og videre inn i et massefilter. Alle ionene får den samme kinetiske energien ut av ionekilden, men siden hastigheten er omvendt proporsjonal med molekylionets masse, vil små ioner få en større hastighet enn større ioner (Rønning, 2011).

### Magnetisk og elektrostatisk masseanalysator

Massefiltre bruker ionenes forskjell i  $m/z$ -verdi eller bevegelsesmengde til å filtrere bort de ionene som ikke har "riktig verdi". Ofte brukes deres oppførsel i et elektrisk- og/eller magnetisk felt for å oppnå dette.

En magnetsektor er en magnet utformet som sirkelsektor, hvor de ladede partiklene blir utsatt for en kraft som påvirker ionenes bane. For en gitt styrke på magnetfeltet vil bare ioner med en bestemt  $m/z$ -verdi følge banen som når frem til detektoren. Ved å variere magnetfeltet, justeres fortløpende hvilke ioner som detekteres (Rønning, 2011).

Avhengig av hvor ionene dannes, akselereres de over forskjellige strekninger i ionekilden. Dette fører til en liten spredning i ionenes kinetiske energi,  $E_k$ , når de forlater ionekilden. Denne spredningen i  $E_k$  gir spredning i sirkelbanen i magnetsektoren og fører til at identiske ioner avbøyes ulikt i magnetsektoren og får en spredning i den registrerte  $m/z$ -verdien. Dette gir en betydelig reduksjon i oppløsningsevnen. Ved å montere en elektrostatisk analysator (ESA) foran eller bak magnetsektoren (hhv. EB- og BE-geometri) vil den største spredningen i kinetisk energi filtreres bort. ESA er formet som en sirkelsektor slik at ionene må følge en sirkelbane med radius  $r_e$  for å slippe gjennom. ESA bruker et elektrisk felt slik at bare ioner med en bestemt kinetisk energi vil oppfylle kravene for å følge sirkelbanen. Slik virker ESA som et energifilter og oppløsningsevnen til instrumentet blir betydelig bedre (Rønning, 2011).

I denne oppgaven benyttes en MS utstyrt med en ESA både før og etter magnetsektoren (EBE-geometri).

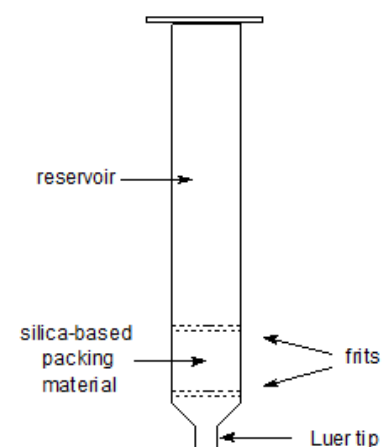
### 1.3 Fastfaseekstraksjon

Fastfaseekstraksjon (SPE) er en prøveopparbeidingsmetode som isolerer og konsentrerer analytter fra en væskefase ved adsorpsjon på en fastfase – en adsorbent. Komponentenes fysikalske- og kjemiske egenskaper bestemmer deres affinitet til adsorbenten og utgjør grunnlaget for ekstraksjonen. Ved oppkonsentrering- eller separasjon av analytter må analyttene ha retensjon i kolonnen; de må ha større affinitet til adsorbenten enn de har til løsemiddelet i prøven slik at analytten akkumuleres i adsorbentoverflaten mens de andre komponentene i prøven blir vasket ut (Simpson & Van Horne, 1993).

SPE er basert på de samme prinsippene som LC, hvor sterke men reversible interaksjoner mellom analytt og stasjonærfase skjer i kolonnen (Ruiz-Gutiérrez et al., 2000). Den store forskjellen er at i LC separeres komponentene med en kontinuerlig gjennomstrømning av mobilfase, mens i SPE adsorberes analyttene på fastfasen mens resten av prøveløsningen renner gjennom (Thurman & Mills, 1998). Wells og Michael (1987) beskriver SPE som en av/på LC; hemmeligheten er å finne den rette bryteren som slår retensjonen av og på.

Over de siste tiårene har SPE utviklet seg til å bli et kraftig verktøy innenfor kjemisk analyse og spiller en sentral rolle i forskjellige applikasjoner; fra prøveopparbeiding av sporanalytter, til industriell skala kjemisk isolasjon (Simpson & Van Horne, 1993). SPE har i stor grad erstattet tradisjonell prøveopparbeiding ved væske-væske-ekstraksjon (LLE) og er en trygg og effektiv metode som krever lite tid og løsemidler. Det er en selektiv metode som oppkonsentrerer, fjerner uønsket matriks, er lett å automatisere og er kompatibel med kromatografiske analysemetoder (Thurman & Mills, 1998; Ruiz-Gutiérrez et al., 2000).

Etter at ferdigpakkede engangskolonner ble introdusert på 1970-tallet har SPE blitt en etablert laboratorieteknikk og det har etter hvert kommet et bredt spekter av ferdigpakkede kolonner på markedet (Poole et al., 2000). Ekstraksjonskolonnene er enten av plast eller av glass og produseres i forskjellige størrelser. Kolonnene består av et løsemiddelreservoar, en adsorbent og et filter over og under sorbenten som vist i figur 1.2. Mengde adsorbent varierer fra 50 mg til flere gram, og velges etter mengde analytt som skal

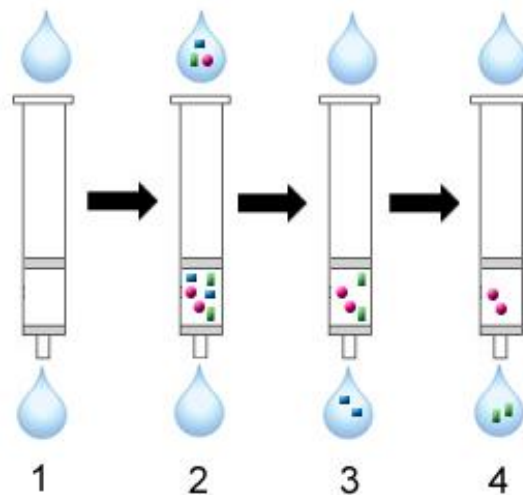


**Figur 1.2:** Skisse av en SPE-kolonne (Christie, 1992a).

## Introduksjon

ekstraheres. En tommelfingerregel er at adsorbenten har en kapasitet på ca. 5 % av sin masse. Ferdigpakkede engangskolonner gjør at sorbenten blir mer homogent pakket og gir bedre separasjoner og reproduserbarhet. Den store variasjonen av størrelser og pakkematerialet gjør SPE til en fleksibel og selektiv separasjonsmetode og har blitt et populært verktøy i moderne analytiske laboratorier (Ebeler & Shibamoto, 1994).

Ekstraksjonen består hovedsakelig av fire trinn, illustrert i figur 1.3: (1) Vask og kondisjonering av kolonneadsorbenten. Dette er viktig for å fjerne urenheter i kolonnen og gi kolonnen økt reproduserbarhet av analyttretensjon. (2) Applisering av prøve. Løsemiddelet i prøven bør ha lav eluotropisk styrke i ekstraksjonssystemet. (3) Dersom nødvendig, kan kolonnen vaskes med et løsemiddel for å fjerne uønskede matrikskomponenter. Vaskeløsningen må ha en lav eluotropisk styrke, slik at ikke analytter går tapt i dette trinnet. (4) Eluering av analyttene. Til slutt skal analyttene elueres fra kolonnen. Her må det brukes et løsemiddel som har høy nok eluotropisk styrke til å fortrenge analytten fra adsorbenten, og den må i tillegg være svak nok til at eventuelt andre analytter eller matrikskomponenter som er sterkere bundet til stasjonærfasen ikke følger med. Elueringsmiddelet må også være et godt løsemiddel for analytten (Thurman & Mills, 1998; Ebeler & Shibamoto, 1994; Simpson & Van Horne, 1993).

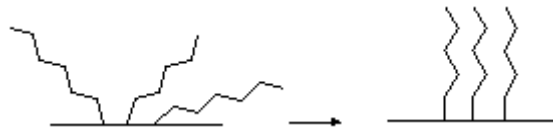


**Figur 1.3:** Skisse av generell SPE-prosedyre.

### 1.3.1 Adsorbentegenskaper

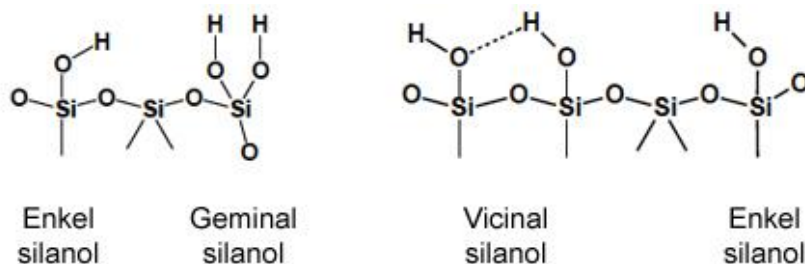
Adsorbentene som brukes i kolonnene er ofte silikabaserte, og består av silikapartikler (silikagél) med størrelse på 50-70  $\mu\text{m}$  (Poole et al., 2000). Silikamaterialet er godt egnet fordi det er stabilt i alle organiske løsemidler og kan brukes over hele pH-området. Ulike funksjonelle grupper kan kovalent bindes til silikapartiklene for å endre adsorbentens egenskaper (Simpson & Van Horne, 1993).

På mikroskopisk nivå vil silikaadsorbenten likne en skog av funksjonelle grupper, sammensveiset gjennom et rotsystem av siloksanbroer. Disse bindingene, og silikaen under, gir opphav til sekundærinteraksjoner med analyttmolekyler. Kondisjonering gjør at de funksjonelle gruppene "reiser seg" på overflaten slik at den aktive overflaten til sorbenten blir større og mer tilgjengelige for analytten slik vist i figur 1.4. Dette er viktig for å få reproducerbare resultater. Kolonnen bør derfor aldri være tørr under ekstraksjonen (Simpson & Van Horne, 1993).



**Figur 1.4:** Ved å kondisjonere kolonnen vil de funksjonelle gruppene på adsorbenten reise seg og bli mer tilgjengelige for analyttene og kolonnen får økt reproducerbarhet (Christie, 1992a).

Silikapartikelen inneholder ubundne silanol- og siloksangrupper. Silanolgruppen (Si-OH) er et sterk adsorpsjonssete mens siloksan (Si-O-Si) er hydrofob. Silanoler på overflaten kan være i enkel, geminal eller vicinal form, vist i figur 1.5. Dette gir tre forskjellige styrker for hydrogenbindinger (Thurman & Mills, 1998).



**Figur 1.5:** Enkel-, geminal- og vicinal silanol som forekommer på overflaten av silikapartikkelen (www.chromacademy.com).

Det er variasjoner av adsorbentegenskapene fra batch til batch av ferdigpakkedekolonner, men variasjonene minimaliseres dersom man bruker samme produsent (Ebeler & Shibamoto, 1994). Hvordan kolonnemateriale er produsert, ratio av funksjonelle grupper til frie silanolgrupper og partikkel og pore størrelsen kan variere. Sammen med ekstraksjonskolonnene følger det ofte med et dokument fra produsenten som spesifiserer og verifiserer kolonnens egenskaper (Christie, 1992a).

### 1.3.2 Normalfaseekstraksjon

Det er tre separasjonsprinsippmekanismer i SPE: Normalfase, omvendt fase og ionebytter. Ved normalfaseekstraksjon består systemet av en polar fastfase og en upolar mobilfase, mens et omvendt fase-system består av en upolar stasjonærfase og polar mobilfase. Ionebyttere har funksjonelle grupper som, når aktivert, vil gi retensjon for forbindelser med motsatt ladning (Dean, 2009). I denne oppgaven vil metoden utvikles til et normalfase-system.

SPE ved normalfase er adsorpsjon av analytt til en polar overflate. Den kalles "normal" fordi dette var oppsettet ved en standard type separasjon utført av klassisk LC (Thurman & Mills, 1998). Normalfaseadsorbenter har polare funksjonelle grupper, for eksempel amino-, cyano-, diolgruppe, eller ubundet silika, og benyttes til ekstraksjon av analytter i upolare organiske løsemidler (Dean, 2009).

SPE er adsorpsjonskromatografi som følger en konkurransemodell, hvor analyttmolekylene og løsemiddelmolekylene konkurrerer om plass på adsorbentens overflate. Denne konkurransen er en likevektsprosess hvor hvert analyttmolekyl må fortrenge ett eller flere løsemiddelmolekyler fra fastfasen og bli adsorbent. Det er viktig at forholdene blir lagt til rette slik at analyttmolekylene får minst mulig "konkurranse" under prøvepåsettelsen. (Rasmussen, 1994b).

### Retensjon

Retensjon i et normalfasesystem er fenomenet som oppstår når en analytt har større affinitet til sorbenten enn til løsemiddelet i mobilfasen og fester seg på adsorpsjonsmaterialet ved polare interaksjoner. De polare interaksjonene er H-bindinger, dipol-dipol-interaksjoner, pi-pi-interaksjoner og induert dipol-dipol-interaksjoner. Interaksjonsstyrken ved adsorpsjon er lav til moderat, og retensjonen er en funksjon av faktorene: analytt, løsemiddel, og adsorbent. (Thurman & Mills, 1998). Fordelingskoeffesienten,  $K$ , for adsorpsjonsprosessen er gitt ved

## Introduksjon

likning 1.1, hvor  $[A]_{sp}$  er konsentrasjonen av adsorbent analytt, og  $[A]_{mp}$  er konsentrasjon analytt i mobilfasen.

$$K = \frac{[A]_{sp}}{[A]_{mp}} \quad (1.1)$$

Likning 1.2 viser hvordan K varierer med adsorbent, mobilfase og analytt:

$$\log K = \log V_a + \alpha (S^\circ - A_s \epsilon^\circ) \quad (1.2)$$

hvor  $\epsilon^\circ$  er løsemiddelstyrken,  $V_a$  er adsorbentens overflatevolum (bed-volum) og  $\alpha$  er adsorpsjonsaktivitetsfunksjonen.  $S^\circ$  er adsorpsjonsenergien av analytt fra en pentanløsning, og øker med analyttens polaritet.  $A_s$  er det molekylære areal som kreves for adsorpsjon av en analytt på overflaten av adsorbenten. Vanligvis vil  $A_s$  være større for større molekyler, og et gitt løsemiddel vil derfor ha mindre K (mindre retensjon) for større molekyler. Og en endring i løsemiddelstyrken vil ha en større effekt på større enn på små analytter (Rasmussen, 1994b). I SPE er det ønskelige at K enten er 0 eller uendelig stor, slik at analytten enten blir sittende fast i adsorbenten eller eluert ut (Simpson & Wells, 2000).

Retensjonseffektiviteten påvirkes også av adsorbentens antall aktive seter og strømningshastigheten av prøven og løsemidler. Dersom kolonnens kapasitet overstiges vil det skje gjennomblødning. Strømningshastighet av prøven gjennom adsorbenten er viktig for å få tid til adsorbent-analytt-interaksjoner (Dean, 2009).

Vann kan ikke forekomme i normalfasekolonner, da vann vil oppta aktive seter på sorbenten og redusere interaksjonsmulighetene mellom analytt og sorbent (Simpson & Van Horne, 1993).

Et løsemiddels eluotropiske styrke er løsemiddelstyrken i et gitt system. Tabell 1.3 viser løsningsmidler og deres eluotropiske styrke typisk brukt i normalfaseekstraksjon (Thurman & Mills, 1998).

**Tabell 1.3:** Løsningsmiddels eluotropiske styrke  $E^\phi$  og polaritet  $p'$  (Thurman & Mills, 1998).

	$E^\phi$	$p'$
<i>Eddiksyre</i>	>0,73	6,2
<i>Vann</i>	>0,73	10,2
<i>Metanol</i>	0,73	6,6
<i>1-Propanol</i>	0,63	4,3
<i>Pyridin</i>	0,55	5,3
<i>Acetonitrill</i>	0,50	6,2
<i>Etylacetat</i>	0,45	4,3
<i>Aceton</i>	0,43	5,4
<i>Dietyleter</i>	0,38	2,8
<i>Metylenklorid</i>	0,32	3,4
<i>Kloroform</i>	0,31	4,4
<i>Toluen</i>	0,22	2,4
<i>Sykloheksan</i>	0,03	0,0
<i>n-Heksan</i>	0,00	0,06

Retensjon er generelt sterk nok når 20 bed-volumer av en vaskeløsning kan passere gjennom kolonnen uten analytteluering. Eluering skal optimalt sett ikke trenge mer enn 5 bed-volumer med elueringsmiddel (Simpson & Van Horne, 1993). Et bed-volum er så mye løsemiddel som skal til for å fylle alle porer og indre rom av partiklene i en gitt adsorbent. For en silika-adsorbent med partikkel- og porestørrelse på henholdsvis 40  $\mu\text{m}$  og 60  $\text{\AA}$ , er bed-volumet på størrelsen 120 mL per 100 mg sorbent (Hennion & Pinchon, 1994).

### Eluering

Eluering av analytt fra en normalfaseadsorbent er en funksjon av eluotropisk styrke og polaritet av elueringsmiddelet. Elueringsmiddelet må ha egenskaper som klarer å bryte de polare interaksjonene mellom funksjonelle grupper på analytten og adsorbentoverflaten. (Thurman & Mills, 1998). Dette skjer både fordi elueringsmiddelet har høyere eluotropisk styrke (sterkere affinitet til adsorbenten) og er et godt løsemiddel for analytten som skal elueres (Rasmussen, 1994b).

Dersom flere forskjellige analytter skal separeres, må det brukes et løsningsmiddel hvor bare én av analyttene elueres ut mens de andre forblir i kolonnen. Det må derfor utvikles spesifikke metoder som er tilpasset hver enkel prøvetype og de analytter som skal separeres (Simpson & Van Horne, 1993). I denne oppgaven, hvor MAG, DAG, og TAG skal

separeres, er utfordringen at DAG og TAG viser seg å ha veldig like retensjonsegenskaper, i tillegg til at det innenfor hver gruppe er stor variasjon i fysikalske egenskaper.

### 1.3.3 Eksisterende metoder for lipidseparasjon ved SPE

Bare et par år etter at Waters promoterte de første tørrpakkede silika-baserte engangskolonnene, kom de første publikasjonene om bruk av SPE i lipidanalyse. Separasjon av lipider kan enten være enkel og resultere i en polar og en upolar fraksjon, eller kompleks, hvor det separeres triglyserider, frie fettsyrer, steroler, sterylestere, glykolipider, og fosfolipider (Ebeler, 1994).

Lipider ekstrahert fra naturlige kilder består av mange forskjellige lipidklasser. Det er få eller ingen metoder som kan isolere hver enkelt av dem i én operasjon. Det er oftest lettere å først separere enkeltklasser etter en fraksjonering av enkle lipider, fosfolipider og glykolipider (Christie, 1992a). I mange studier vil det være interessant også å separere de nøytrale lipidene videre i MAG, DAG, og TAG.

TLC, HPLC, og GC har alle blitt brukt til å bestemme TAG, MAG, og DAG i fett og oljer. Ved TLC blir TAG, DAG, og MAG separert fra hverandre og kvantifisert ved gravimetri eller densimetri. TLC er enkel å utføre, men er tidkrevende og kan ikke måle individuelle lipider. HPLC er benyttet for separasjon og bestemmelse av TAG, DAG, og MAG (inkludert isomerposisjon) i blant annet vegetabiliske oljer (Fagan, 2004; Marcato & Ceccin, 1996). Direkte GC av silylerte acylglyserider er også en etablert og fungerende teknikk for separasjon av TAG, DAG, og MAG. Dette er separasjonsmetoden standardisert av IUPAC Commission on Oils, Fats and Derivatives, som består av direkte injisering av silylert olje på en GC med en kapillærkolonne med lav polaritet. (Ruiz-Gutiérrez et al., 2000; Plank & Lorbeer, 1995). Disse direkte analysene på GC og HPLC er ikke godt egnet for melkeprøver, da melk inneholder over 400 forskjellige fettsyrer og vil gi opphav til altfor mange forskjellige acylglyserider til at de kan identifiseres og kvantifiseres. Fagan et al. (2004) brukte likevel denne GC-metoden og MS i sin karakterisering av DAG og MAG i melkeprøver. De fjernet først TAG ved SPE for å unngå interferens og overbelastning i GC-analysen. DAG ble kun separert i grupper etter karbontall, men identifiserte 18 DAG med høyest forekomst. De fant at konsentrasjonen av MAG og DAG i helmelk var henholdsvis 0,78 og 9,52 mg/g (Fagan et al., 2004).

Det er også publisert flere artikler hvor SPE er brukt til å separere de nøytrale lipidene. Kaluzny et al. (1985) separerte opp til ti forskjellige lipidklasser, med tilfredsstillende renhet og utbytte, ved eluering av løsemidler med økende polaritet. Lipidene ble løst i kloroform og separerte først de nøytrale lipidene fra de andre på en aminopropylkolonne. De nøytrale lipidene ble reløst i 0,5 mL heksan og påsatt en ny kolonne. TAG ble eluert ut med 5 mL



## Introduksjon

heksan:diklormetan:dietyleter (89:10:1), DAG med heksan:etylacetat (85:15) og tilslutt MAG med kloroform:metanol (2:1). Denne metoden har blitt mye brukt og modifisert av andre (Pernet et al., 2006; Pérez-Camino et al., 1996; Pacheco et al., 1998) og er dessuten brukt som eksempel på lipidseparasjon ved bruk av SPE i bøker (Thurman et al., 1998; Simpson & Van Horne, 1993). Det er i senere tid vist seg at deres kvantitative utbytte av fosfolipider var feil (Christie, 1992a) og det er vanskelig å reprodusere separasjonen på andre laboratorier. Flere har prøvd i flere år uten å lykkes (Flurkey, 2005; Pinkart et al., 1998; Christie, 1992a). Det ser ut til at oppløsningsevnen til de små kolonnene presses til det ytterste, og små endringer i lokale betingelser, som temperatur, luftfuktighet, og batch-variasjoner av adsorbenten, kan slå uheldig ut på prosedyren (Christie, 1992a).

Pinkart et al. (2002) utviklet en annen metode for separasjon av mikrobielle lipider. Disse lipidene hadde andre egenskaper enn de tidligere separert av Kaluzny et al. (1985), og oppnådde ikke separasjon ved bruk av deres metode. I denne metoden ble prøven løst i heksan:kloroform:metanol (95:3:2) og påsatt kolonnen i 150 µL. TAG ble eluert ut med 5 mL heksan:diklormetan:kloroform (88:10:2), DAG eluert ut med heksan:etylacetat (15:85) og MAG med kloroform:metanol (2:1). Deres fraksjoner ble kontrollert ved å analysere FAME på GC-FID (Pinkart et al., 1998).

Flere publiserte metoder for separasjon av NL ved bruk av SPE er listet i vedlegg 2.

Sammenlikning av silika-, diol-, amino- og C18-kolonner ved lipidseparasjon er utført i flere publikasjoner (Hopia et al., 1992; Giacometti et al. 2002; Pérez-Camino et al., 1996). Aminopropyl viser seg å ha de beste egenskapene for en vellykket separasjon, da den er litt mindre polar og fuktighet i kolonnen har derfor mindre effekt på kapasiteten av lipidadsorpsjonen (Hopia et al., 1992). Det er rapportert at bruk av amino- og silika-kolonner gir 1,3->1,2 - og 1,2->1,3 - isomerisering av DAG. Isomerisering forekom også av MAG (Fagan et al., 2004; Koprivnjak et al., 1996; Pérez-Camino et al., 1996). I denne oppgaven vil denne isomeriseringen være ubetydelig da lipidene skal omestres til FAME før videre analyse.

## 2. Materialer og Metode

### 2.1 Materialer og kjemikalier

Kjemikalier benyttet i denne oppgaven er gitt i tabell 2.1. Forbruksmateriell og apparatur er gitt i tabell 2.2. Referanselipider benyttet i metodeutviklingen er gitt i tabell 2.3.

**Tabell 2.1:** Kjemikalier og gass brukt i oppgaven og deres spesifikasjoner.

Produkt	Produsent	Renhet	CAS-nr.
n-Heksan	Sigma-Aldrich	Chromasolv® , ≥99,9%	110-54-3
n-Heptan	Sigma-Aldrich	Chromasolv® , ≥99%	142-82-5
Kloroform	Sigma-Aldrich	Chromasolv® , ≥99,8%	67-66-3
Diklormetan	Sigma-Aldrich	≥99,8%	75-09-2
Metanol	Sigma-Aldrich	Chromasolv® , ≥99,9%	67-56-1
Dietyleter	Sigma-Aldrich	≥99,8%	60-29-7
Etylacetat	Sigma-Aldrich	>99,5%	141-78-6
Eddiksyre	Sigma-Aldrich	96%	64-19-7
Isopropanol	VWR Chemicals	99,9%	67-63-0
Nitrogen (g)	AGA, Norge	5.0	
Helium (g)	AGA, Norge	6.0	

**Tabell 2.2:** Forbruksmateriell og apparatur brukt i oppgaven og deres spesifikasjoner.

Produkt	Navn	Produsent	Spesifikasjoner
Eppendorfrør	Plastibrand® Micro Tubes	Brand	1,5 mL
Pasteurpipette	Disposable glass pasteur pipettes	VWR International	150 mm
Veieskip	Aluminum micro weighing dishes	VWR International	Oval; 10 x 4 x 4,5 mm
Reagensrør	Fisherbrand® Culture Tubes	Fisher Scientific	12 x 75 mm
Krymphetteglass	Crimp-Top Vial	VWR International	1,5 mL, 32 x 11,6 mm
Krymphetteglass	Crimp-Top Vial, Glass Insert	Chromacol	300 µL, 32 x 12 mm
Krymphette	Crimp-Top Cap	VWR International	alu cl 11 mm
Varmeblakk	Dri-Block DB-3	Techne	

Fordampingsstativ	Pierce Reacti-Vap III	Thermo Scientific	
Automatpipette	Finnpipette® F2	Thermo Scientific	10 - 100 µL
Automatpipette	Finnpipette® F2	Thermo Scientific	100 - 1000 µL
Automatpipette	Finnpipette®	Thermo Scientific	1 - 5 mL

**Tabell 2.3:** Acylglyserider benyttet som referansestoffer under metodeutviklingen.

Trivialnavn	Fettsyre	Systematisk navn	Produsent	Renhet
Dikaprylin	C8:0	Dioktanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Monokaprylin	C8:0	Monooktanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Dikaprin	C10:0	Didekanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Trilaurin	C12:0	Tridodekanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Monomyristin	C14:0	Monotetradekanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Dipalmitin	C16:0	Diheksadekanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Tristearin	C18:0	Trioktadekanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Monoolein	C18:1(9Z)	Monooktadekenoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99%
Diolein	C18:1(9Z)	Dioktadekenoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99+%
Triolein	C18:1(9Z)	Trioktadekanoïn	Larodan AB, Malmö, Sverige	99+%

## 2.2 Tillaging av løsninger

### Standardløsninger

Standardløsninger med forskjellige konsentrasjoner og sammensetninger ble tillaget ved å veie inn ønsket vekt av en eller flere acylglyserider gitt tabell 2.3 på en mikrovækt (CP2P, Sartorius, Tyskland) og kvantitativt overført til en målekolbe av ønsket volum. Løsningen ble fortynnet til merket med heksan:kloroform:metanol 90:6:4.

Acylglyserider med like fettsyrer ble ikke benyttet i samme standardløsning.

### Natriummetanolat

Natriummetanolatløsning ble laget ved å løse metallisk natrium (Purum, Merck, Darmstadt, Tyskland) i metanol til en konsentrasjon på 3,3 mg/mL.

## 2.3 Metodeutvikling for separasjon av TAG, DAG, og MAG

### 2.3.1 Fastfaseekstraksjon

Fastfaseekstraksjon ble utført av en SPE-robot (Gilson, GX-274 ASPEC, Middleton, WI, USA) hvor separasjonsmetode ble forhåndsprogrammert i robotens programvare (Trilution®).h).

Det ble benyttet ekstraksjonskolonner med aminopropyladsorbent (Bond Elut NH<sub>2</sub>, 500 mg / 3 mL, Agilent Technologies, CA, USA), med gjennomsnittlig partikkel- og porestørrelse på henholdsvis 51 µm og 69 Å. Kolonnen ble påsatt et lokk slik at prøven og løsemidlene ble drevet gjennom adsorbenten ved påføring av et svakt positivt trykk.

Standardprøve ble laget ved å overføre 150 µL av standardløsningen til et krymphetteglass. Kontrollprøve ble laget ved å overføre 150 µL av standardløsningen til et reagensrør med skrukork.

Standardprøve i 3 paralleller ble plassert i kildeområdet på roboten, kolonner og reagensrør ble plassert på henholdsvis kolonne- og oppsamlingsområdet. Løsemiddelbeholderne ble fylt med løsemidler brukt til kondisjonering og eluering i metoden. Det ble kjørt 20 mL isopropanol gjennom pumper, slanger og nåler for å fjerne eventuelle luftbobler og rense systemet før metoden ble igangsatt.

Det ble benyttet standardprøver med ulike sammensetninger og konsentrasjoner av referanselipidene gitt i tabell 2.3. Parametere som ble variert gjennom metodeutviklingen er gitt i tabell 2.4.

**Tabell 2.4:** Parametre variert i utvikling og optimalisering av metoden og min.- og max.-verdier.

Parameter	Min. – max.
Strømningshastighet (mL/min)	0.1 - 2.5
Likevektstid <sup>1</sup> (min)	0.1 - 5
Volum applisert prøve (mL)	0.1 - 0.5
Masse applisert NL (mg)	0.01 - 10

1) Tid prøven ble liggende på sorbenten før eluering startet.

### 2.3.2 Identifisering av SPE-robotens systematiske feil

Det ble mistenkt at SPE-roboten pipetterte et signifikant lavere volum enn det som ble programmert. Det ble utført et forsøk for å kvantifisere robotens reelle pipetteringsvolum og avdekke dens systematiske- og tilfeldige feil.

Siden robotens nåler er styrt av en stempelpumpe, er volumet den pipetterer avhengig av temperatur og type løsemiddel. Temperaturen var stabil på 22 °C i perioden oppgaven ble utført.

12 eppendorfrør ble merket og veid. Fire paralleller med heksan ble plassert i robotens prøveområdet, og 4 eppendorfrør ble plassert i kolonneområdet. Roboten ble programmert til å pipettere 4 paralleller 150 µL heksan til eppendorfrørene. Dette ble utført 3 ganger. Eppendorfrørene ble deretter veid på nytt, og vekt av pipettert heksan ble funnet. Gjennomsnittsvolum, standardavvik (tilfeldige feil) og avvik fra programmert volum (systematisk feil) ble beregnet.

Det ble i tillegg pipettert 150 µL heksan med en automatpipette i tre merkede og forhåndsveide eppendorfrør for å sjekke de systematiske- og tilfeldige feilene ved manuell pipettering.

### 2.3.3 Basekatalysert omestring

For å analysere acylglyseridene på GC ble de omestret til deres mer flyktige korresponderende fettsyremetylestere (FAME). Basekatalysert omestring ble utført slik beskrevet av Devle et al. (2014).

Fraksjonene etter SPE ble kvantitativt overført til reagensrør med skrukork (Duran 12x100 mm, Mainz, Tyskland) og løsningsmidlene ble dampet bort under N<sub>2</sub>-gass ved 40 °C. Acylglyseridene ble reløst i 2,0 mL heksan og tilsatt 1,5 mL natriummetanolat. Rørene ble ristet horisontalt på et ristebord (Biosan Ltd., PSU 10i, Riga, Latvia) ved 350 rpm i 30 minutter.

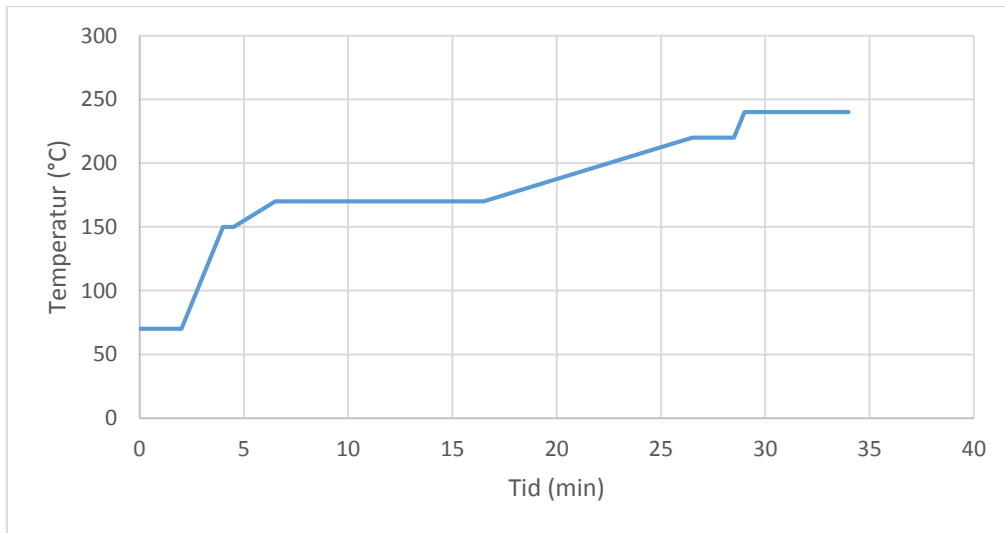
Rørene ble plassert vertikalt i 10 minutter slik at metanol- og heksanfasen ble separert. Den øvre heksanfasen, som inneholdt FAME, ble overført til krympetteglass for videre analyse.

### 2.3.4 Analyse av fettsyremetylestere

Under utviklingen av SPE-metoden ble GC-FID benyttet for FAME-identifikasjon, da dette var rask og enkel prosedyre med tilstrekkelig sensitivitet og selektivitet for dette formålet. FAME ble identifisert ved sammenlikning av retensjonstid. Utbytte ble kalkulert ved analyse av en kontrollprøve identisk med prøven separert ved SPE.

## Materialer og Metode

Det ble benyttet en Finnigan Trace gasskromatograf (Thermo Scientific) utstyrt med en 50 m Varian CP-Sil 88 kapillærkolonne med filmtykkelse 0,2  $\mu\text{m}$  og ID 0,25 mm. Temperaturprogrammet til GC-ovnen er gitt i figur 2.1. Helium ble brukt som bæregass med trykk på 150 kPa, split flow 10 mL/min og purge flow på 0,1 mL/min. Injektoren var en split/splitless med en temperatur på 280  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figur 2.1:** Temperaturprogrammet til GC-ovnen ved analyse av FAME på GC-FID.

Gasskromatografen var koblet til en flammeionisasjonsdetektor med en temperatur på 290  $^{\circ}\text{C}$ , luftstrømhastighet på 350 mL/min og  $\text{H}_2$ -strømhastighet på 35 mL/min.

### 2.3.5 Validering av metoden

Da en metode var etablert, ble metoden testet ved å separere to prøveløsninger med totalmasse på 3 mg, se tabell 2.5. Fraksjonene etter separasjon og en kontrollprøve ble deretter omestret og analysert på GC-MS slik beskrevet i avsnitt 2.3.3 og 2.4.3.

**Tabell 2.5:** Acylglyseridene i standardløsning 1 og 2 benyttet ved validering av separasjonsmetoden.

1			2		
Standard	FA	m (mg)	Standard	FA	m (mg)
Trilaurin	C12:0	0,72	Triolein	C18:1	1,26
Tristearin	C18:0	0,14	Dipalmitin	C16:0	1,27
Diolein	C18:1	0,68	Dikaprylin	C8:0	0,21
Dikaprin	C10:0	0,74	Monostearin	C18:0	0,23
Monokaprylin	C8:0	0,75	Monomyristin	C14:0	0,22
Sum		3,03	Sum		3,19

## 2.4 Separasjon og analyse av lipider fra melk

Lipider ekstrahert fra *ex vivo* fordøyd helmelk (HDJ120min) av Devle et al. (2014) og en kontrollprøve med lipider ekstrahert fra ufordøyd helmelk av Devle et al. (2014) ble benyttet i denne delen av oppgaven. Prøvene bestod av omtrent en 20 mg lipider løst i 0,5 mL kloroform.

### 2.4.1 Lipidseparasjon ved SPE-SPE

Fastfaseekstraksjon ble utført av en SPE-robot med en strømningshastighet på 1,0 mL/min. NL, FFA og PL ble separert i henhold til Devle et al. (2014). Det ble overført 150  $\mu$ L av lipidprøven til 3 parallelle krymphetteglass. Ekstraksjonskolonnene ble kondisjonert med 7,5 mL heksan før prøven ble applisert. NL ble eluert ut med 5,0 mL kloroform og FFA ble eluert ut med 5,0 mL dietyleter:eddiksyre (98:2).

Fraksjonene med NL og FFA ble overført til reagensrør med skrukork og løsemiddelet ble fordampet under  $N_2$ -gass ved 40 °C. De nøytrale lipidene ble reløst i 150  $\mu$ L heksan:kloroform:metanol (90:6:4). Nye ekstraksjonskolonner ble kondisjonert med 7,5 mL heksan før prøven med NL ble applisert. TAG ble eluert ut med 1,0 mL heptan:dietyleter (93:7), DAG med 3,0 mL heptan:dietyleter (93:7) og MAG med 3,0 mL kloroform:metanol (2:1).

Fraksjonene med TAG, DAG og MAG ble overført til reagensrør med skrukork, og løsemiddelet ble fordampet under  $N_2$ -gass ved 40 °C.

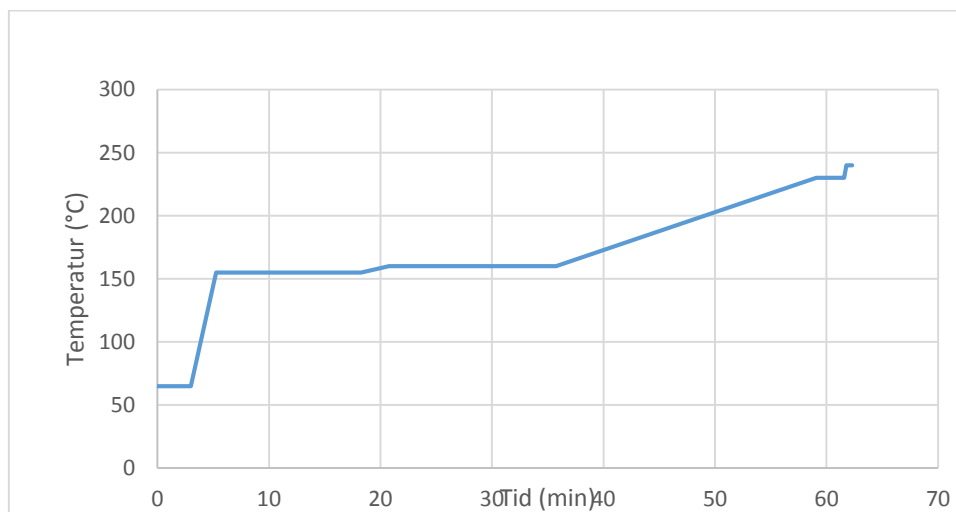
### 2.4.2 Derivatisering til fettsyremetylestere

Acylglyceridene ble omestret ved bruk av basekatalysator slik beskrevet i 2.3.3.

De frie fettsyrene ble forestret ved bruk av syrekatalysator slik beskrevet av Devle et al. (2014). Reagensrørene med FFA ble tilsatt 1,0 mL  $\text{BF}_3$ -metanol (14%, Alderich) og varmet i vannbad ved 70 °C i 5 minutter. Det ble tilsatt 1,0 mL heksan hvert rør og blandet. Da fasene var adskilt, ble heksanfasen, som inneholdt FAME, overført til krympchetteglass for videre analyse.

### 2.4.3 Analyse av fettsyremetylestere

Analyse av FAME ble utført i henhold til Devle et al. (2012) ved bruk av en Agilent 6890 Series gasskromatograf (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) utstyrt med en CTC PAL Auto sampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Sveits) og 50 m CP-Sil 88 kapillær WCOT fused silika kolonne med filmtykkelse 0,2  $\mu\text{m}$  og ID 0,25 mm. (Varian, Middelburgh, Nederland). Helium ble brukt som bæregass med konstant flow på 1 mL/min. Det ble brukt splittinjektor med injeksjonsvolum på 1  $\mu\text{L}$  og en split-ratio på 1:10. Temperatur i injektor var 245 °C. Temperaturprogrammet til GC-ovnen er gitt i figur 2.2.



**Figur 2.2:** Temperaturprogrammet til GC-ovnen ved analyse av FAME på GC-MS.

Gasskromatografen var koblet til en Autospec Ultima GC-MS (Micromass Ltd. Manchester, England). Massespektrometeret var utstyrt med EI-ionekilde som produserte elektroner med 70 eV og hadde en akselerasjonsspenning på 8 kV. Masseanalytoren i instrumentet var av typen trippelsektor i EBE-konfigurasjon med en oppløsning på 1200 og et masseområde på 40 til 600  $m/z$ .



## Materialer og Metode

De kromatografiske toppene til hver FAME ble identifisert ved hjelp av søk i MS-biblioteket (NIST MS Search 2.0) og ved sammenlikning av retensjonstid med en referansemiks bestående av 38 fettsyremetylestere (Food Industry Fame Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA). Deteksjonsgrensen (LOD) og kvantifiseringsgrensen (LOQ) for FAME ved denne analysemetoden i full scan-modus var henholdsvis 3,8-24,2 ng/mL og 13,0-80,7 ng/mL (Devle et al., 2009).

Kvantifiseringen ble utført ved hjelp av intern standard metode, og bruk av de relative responsfaktorene (RRF) funnet av Devle et al. (2009). Internstandardene triundekanoin, trinonadekanoin, undekansyre, og nonadekansyre var tilsatt av Devle et al. (2013) før lipidene ble ekstrahert fra den *ex vivo* fordøyde melken.

### 3. Resultat og Diskusjon

I denne oppgaven er det opparbeidet en metode for separasjon av tri-, di- og monoglyserider ved bruk av automatisert fastfaseekstraksjon.

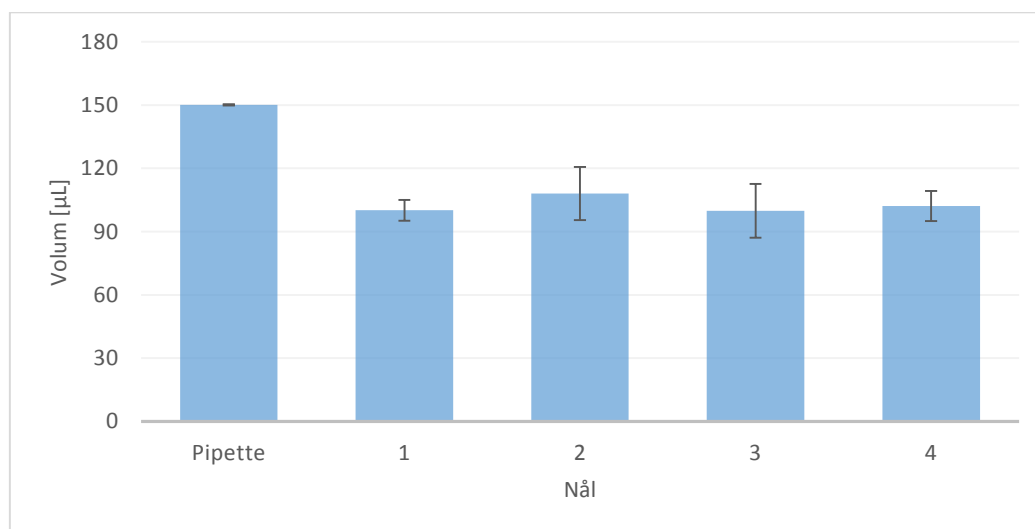
Metoden ble benyttet for å separere de nøytrale lipidene i ufordøyd- og *ex vivo* fordøyd helmelk, hvor deres korresponderende fettsyremetylestere ble analysert på GC-MS.

#### 3.1 Semivalidering av SPE-roboten

SPE-robotens nøyaktigheten er ifølge produsenten >98 % ved volum mellom 100  $\mu\text{L}$  og 25 mL. Det ble utført et forsøk for å finne SPE-robotens systematiske feil. Vekt av pipettert heksan og beregninger er gitt i vedlegg 1. Gjennomsnittlig pipettert volum, avvik og standardavvik er gitt i tabell 3.1 og figur 3.1.

**Tabell 3.1:** Gjennomsnittlig volum heksan pipettert av en automatpipette og SPE-robotens fire nåler i tre replikater, med beregnet standardavvik og avvik fra programmert volum.

Nål	Volum ( $\mu\text{L}$ )	Avvik (%)
Pipette	150,1 $\pm$ 0,3	+0,1
1	100 $\pm$ 5	-33
2	108 $\pm$ 13	-28
3	100 $\pm$ 13	-33
4	102 $\pm$ 7	-32



**Figur 3.1:** Gjennomsnittlig volum heksan pipettert av en automatpipette og SPE-robotens fire nåler i tre replikater og deres standard avvik.

Resultatet viser et stort systematisk avvik fra det programmerte volumet. Det systematiske avviket kan skyldes at det er en stund siden kalibrering og/eller at den er kalibrert med et annet løsemiddel enn heksan.

I tillegg til den systematiske feilen, var det også betydelig høyere tilfeldige feil enn ved manuell pipettering. Denne var mer problematisk, da den er vanskelig å kompensere for og gjorde det utfordrende å utføre tre identiske parallelle separasjoner og kalkulering av utbytte. Ved applisering av prøveløsning ble denne tilfeldige feilen minimalisert ved å pipettere ønsket prøvevolum med en automatpipette til et krymphetteglass, hvor SPE-roboten ble programmert slik at den tok all prøven i glasset. Dette bidro til at den tilfeldige feilen i volum og masse applisert ble redusert til den tilfeldige feilen i automatpipetten.

### 3.2 Separasjon av MAG, DAG, og TAG

Det skulle utvikles en metode for å separere TAG, DAG, og MAG ved bruk av SPE. Den generelle fremgangsmåten er å først finne et kjemisk miljø som gir analyttene tilstrekkelig retensjon i kolonnen. Deretter må eluering optimaliseres ved å finne løsemidler som har elueringsstyrke og selektivitet til å eluere ut én av analyttene av gangen.

Separasjon av TAG, DAG, og MAG er beskrevet i flere publikasjoner, listet i vedlegg 2. Alle disse metodene er testet, men separasjon av TAG og DAG ble ikke oppnådd (se vedlegg 3). Da disse metodene er ufullstendig beskrevet i publikasjonene, ble disse metodene også testet med varierende av separasjonsbetingelsene. Parameterne variert og deres verdier er gitt i tabell 2.4.

Det ble ikke funnet et løsemiddel for kondisjonering og prøveløsning som ga retensjon av DAG på aminopropylkolonnen. Utfordringen ble derfor å finne betingelser som lot det gjøre at all TAG ble eluert ut først og at all DAG kom etter, uten krysseluering. Det ble funnet at TAG kunne, ved de rette betingelsene, bli fullstendig isolert ved å eluering med 1,0 mL heksan:dietyleter (93:7). Betingelsene for separasjonssystemet ble funnet ved iterativ tilnærming, og er beskrevet under.

#### 3.2.1 Valg av ekstraksjonskolonne

Lipider er løselige i kloroform og andre upolare organiske løsemidler. Det var derfor naturlig å velge et normalfasesystem for fastfaseekstraksjonen.

Lipidmassen mest praktisk å benytte er 0-20 mg (da dette er mengden fett i 0,5 mL melk) og det ble derfor valgt å bruke en kolonnetype med 500 mg sorbent, som har en teoretisk kapasitet på ca. 25 mg (5 % av adsorbentmassen) (Ebeler & Shibamoto, 1994).

Det ble tatt utgangspunkt i å utvikle en metode ved bruk av aminopropylkolonne. Dette fordi det er kolonnen anbefalt for lipidseparasjon, i tillegg til at metoden er en utvidelse av den allerede eksisterende metoden til å separere lipidgruppene NL, FFA og PL, og det var ønskelig å bruke den samme kolonnetypen. Metoder med diol- og silikakolonner, og aminopropylkolonne fra en annen produsent ble også testet.

### 3.2.2 Valg av løsemiddel i prøve

Lipidstandardene ble først forsøkt løst i heksan, da dette er løsemiddelet med lavest eluotropisk styrke, og er brukt i de fleste etablerte metoder for separasjon av acylglyserider, (se vedlegg 2). Det viste seg at mange av standardlipidene ikke var løselige i heksan.

Det ble deretter prøvd med kloroform, da dette er et utmerket løsemiddel for acylglyserider. Dette viste seg å være et *for* godt løsemiddel, og gjorde at selv de polare acylglyseridene hadde dårlig retensjon i kolonnen. Det samme resultatet ble funnet ved bruk av diklormetan, som er publisert av Fagan et al. (2004).

Det ble derfor forsøkt å ta utgangspunkt i heksan, for å oppnå mest mulig retensjon i kolonnen. Pinkart et al. (1998) løste lipidene i heksan:kloroform:metanol (95:3:2). Denne blandingen ga bedre løselighet, men ga fortsatt litt utfelling ved romtemperatur (22 °C). Andel kloroform og metanol ble doblet og blandingen heksan:kloroform:metanol (90:6:4) ga tilfredsstillende løselighet uten negativ innvirkning på separasjonen. Dersom andelen heksan ble mindre enn 90 %, ble retensjonen av DAG for dårlig til at separasjon var mulig.

Det kan se ut til at det er fettsyrens natur, og ikke antall acylerte hydroksylgrupper, som bestemmer acylglyseridenes løselighet. For eksempel er monoolein (C18:1) og triolein (C18:1) løselig i heksan, mens tristearin (C18:0) og monostearin (C18:0) ikke er det.

### 3.2.3 Prøvevolum

Det ble i hele første del av metodeutviklingen applisert 0,5 mL prøveløsning på kolonnen, da dette er det normale volum brukt på SPE-kolonner av denne størrelsen. Ved å applisere et mindre volum ble separasjonen bedre, og 150 µL ble brukt videre.

En bedre separasjon ved mindre prøvevolum kan skyldes at en økt mengde kloroform og metanol i kolonnen vil ha negativ innvirkning på den allerede dårlige retensjonen av DAG.

Men økt volum på kolonnen ga også økt gjennomblødning av TAG. Det vil si at noe TAG kom senere ut av kolonnen ved bruk av 0,5 mL prøve i forhold til bruk av 0,15 mL. Dette kan skyldes at et mindre applisert prøvevolum vil gi mindre båndspredning i kolonnen (Henry, 2000).

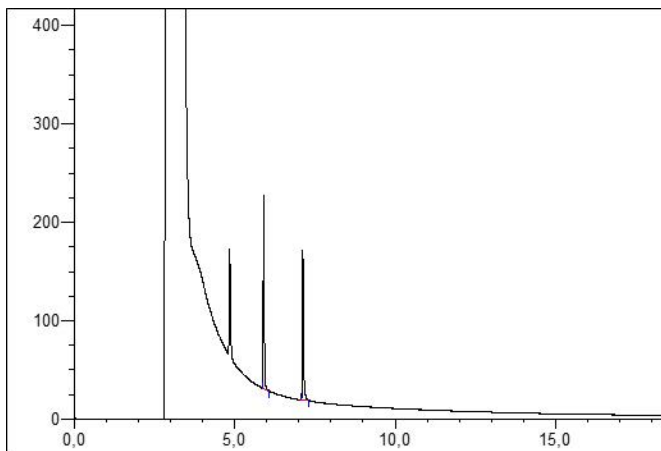
### 3.2.4 Kondisjonering

I et normalfasesystem bør kolonnen kondisjoneres med et løsemiddel med lav eluotropisk styrke slik at det blir gode betingelser for polare interaksjoner mellom analytt og sorbent i kolonnen (Simpson & Van Horne, 1993). Under metodeutviklingen ble mange kondisjonerings-midler testet, men det ble stort sett benyttet heksan eller samme løsningsmiddel som standardprøven var løst i. Det ble konkludert med at heksan var det best egnede kondisjoneringsmiddelet for separasjon av TAG og DAG.

### 3.2.5 Retensjon

Retensjon er et fenomen som oppstår når det er en tiltrekning mellom sorbenten og analyttmolekylene, slik at de adsorberes på overflaten. Dersom retensjon for alle analyttene ikke lar seg gjøre, kan det være tilstrekkelig at alle utenom én setter seg fast og likevel oppnå separasjon. Det ble ikke funnet betingelser i aminopropylkolonnen hvor dette skjedde.

Verken TAG eller DAG hadde tilstrekkelig retensjon, og selv med kun heksan som løsemiddel i kolonnen blir disse eluert ut umiddelbart, vist i figur 3.2. Dette resulterte i at det måtte utvikles mer kompliserte metoder for å få disse separert.



**Figur 3.2:** Kromatogram av fettsyremetylestere analysert på GC-FID etter eluering av trilaurin, dicaprin og dicaprylin (løst i heksan) gjennom aminopropylkolonne med 3 mL heksan.

Flere publikasjoner påpeker viktigheten av at kolonnen må være vannfri for å få god nok retensjon (Hopia et al., 1992). Det ble derfor forsøkt å utføre separasjonen med tørkede ekstraksjonskolonner uten at dette ga noen endring i resultatet.

### 3.2.6 Eluering

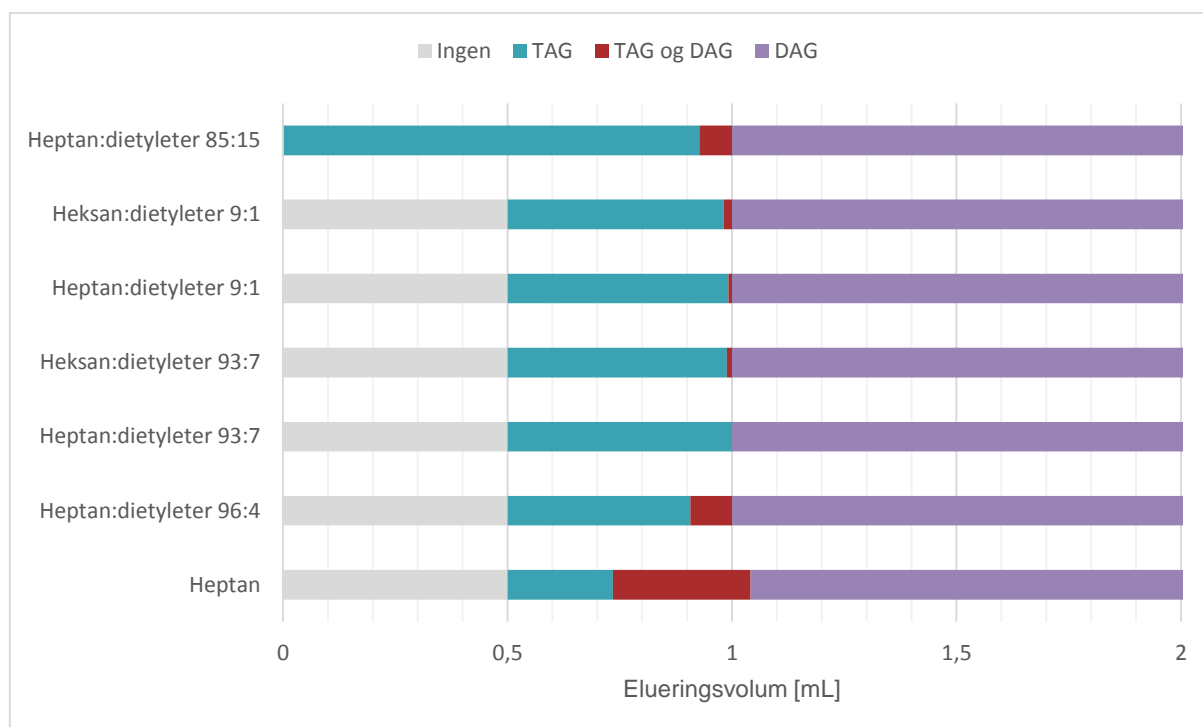
I et normalfasesystem, vil det være naturlig å eluere ut TAG først, da disse ikke har en hydroksylgruppe og er den mest polare av acylglyseridene. De har tre estergrupper og ulik grad av umettethet som kan gi opphav til polare interaksjoner med adsorbenten.

DAG er en vanskelig analytt å ha kontroll over. Den har en hydroksylgruppe, men den har lange alifatiske karbonkjeder som gjør at den har mest upolar karakter og er svært lik TAG i fysikalske- og kjemiske egenskaper. De forskjellige kjedelengdene og andel umettethet gjør også at egenskapene varierer veldig for de ulike diglyseridene.

Både TAG og DAG viste seg å ha liten eller ingen retensjon i kolonnen og ble eluert ut uansett hvilke løsemidler og normalfasekolonne som ble benyttet.

Ved fraksjonering av 0,5 mL løsemiddel ble det kartlagt at noen løsemiddelblandinger hadde en bedre selektivitet og elueringsegenskaper enn andre. Ved bruk av løsemiddelblandingene heksan:diklormetan:kloroform (88:10:2) og heksan:diklormetan:dietyleter (89:10:1) var selektiviteten dårlig og både DAG og TAG ble eluert ut av kolonnen i løpet av 0,5 mL. Ved eluering med heksan:dietyleter (9:1) fikk DAG en mye bedre retensjon, samtidig som TAG ble eluert ut i løpet av 1,0 mL. Videre sammenlikning med heptan:dietyleter (9:1) viste at dette løsemiddelet ga bedre separasjon. Det ble utført et forsøk for å kartlegge optimalt blandingsforhold ved bruk av disse løsemidlene.

Det ble igjen fraksjonert med 0,5 mL-fraksjoner. I dette forsøket ble det benyttet standardløsninger som kun inneholdt enten TAG eller DAG, da det var viktig at metoden fungerte også når det var lite TAG tilstede. Resultatene er gitt i vedlegg 4 og er illustrert i figur 3.3, og viser at heptan:dietyleter 93:7 hadde best selektivitet ved separasjon av TAG og DAG.



**Figur 3.3:** Mengde løsemiddel som eluerer ut di- og triglyserier (hvv. DAG og TAG). Det røde området er der begge elueres ut samtidig og størrelsen er beregnet ut fra hvor mange prosent av DAG og TAG som hadde gjennomblødning i fraksjonene.

Ved bruk av heksan:dietyleter 93:7 ble alle TAG eluert ut i løpet av 1,0 mL elueringsmiddel. Det teoretiske bed-volumet er ca. 0,6 mL for en 500 mg silikaadsorbent (Hennion & Pinchon, 1994). Dersom det tas høyde for at SPE-roboten pipetterer omtrent 70 % av det programmerte volumet og at aminopropylkolonnen, grunnet større partikler og større porer, har et litt større bed-volum, kan det se ut til at all TAG elueres ut i kolonnens bed-volum.

Ved bruk av heksan:dietyleter 93:7 vil DAG ikke bli eluert ut før 1,0 mL, uansett om det er mye eller ingen TAG i kolonnen. Dessverre kommer DAG umiddelbart etter TAG ut av kolonnen. For å unngå gjennomblødning av disse, må det brukes nøyaktige volum. Bruk av en SPE-robot med store tilfeldige feil, gjør denne metoden vanskelig.

For å eluere ut de polare acylglyseridene, var det nødvendig med et mer polart løsemiddel. Ifølge Hopia et al. (1992), gir ikke bruk av kun metanol et tilfredsstillende utbytte (60-80 %). Blandingen kloroform:metanol (2:1) gir derimot et bedre resultat og er brukt i flere etablerte metoder. Eluering med 3,0 mL kloroform:metanol (2:1) ga tilfredsstillende utbytte og det ble derfor ikke viet noe tid til å optimalisere elueringen av MAG videre.

## 3.2.7 Lipidmasse

Det er ikke kjent hvor stor andel av de nøytrale lipidene i den *ex vivo* fordøyde melken som forekommer som TAG, DAG, og MAG. Metoden bør derfor fungere både ved stor andel TAG, stor andel DAG, og ved lite eller ingen TAG.

Under metodeutviklingen ble det ofte benyttet ca. 1 mg lipid på kolonnen. Dersom det ikke er TAG i prøven, vil DAG likevel ikke elueres ut i bed-volumet. All TAG elueres ved 1,0 mL uansett om det er DAG i prøven eller ikke. Da bed-volumet er såpass liten i en 500 mg aminopropyladsorbent, vil det ved store mengder TAG forekomme gjennomblødning til DAG-fraksjonen. Det ble utført en test av hvor mye TAG og DAG som kunne påføres kolonnen før gjennomblødning oppsto.

Gjennomsnittlige kromatografiske arealer ved analyse av omestrede TAG og DAG i de to fraksjonene og beregnet gjennomsnittlig gjennomblødning med standardavvik er gitt tabell 3.2 og 3.3, og i figur 3.4. Disse separasjonene er utført med TAG og DAG hver for seg.

**Tabell 3.2:** Areal av kromatografiske topper etter analyse av FAME på GC-MS i 1. og 2. fraksjon og beregnet gjennomblødning etter test av SPE-metode med 1 - 3 mg DAG på kolonnen.

	Diglyserid	A <sub>1</sub> . fraksjon	A <sub>2</sub> . fraksjon	Gj.blødning (%)
1 mg	Dicaprin	n.d. <sup>1</sup>	13221 ± 226	-
	Dirolein	trace	17279 ± 126	-
2 mg	Dicaprin	n.d.	21272 ± 3080	-
	Dirolein	188 ± 264	34942 ± 6785	0,5 ± 0,7
3 mg	Dicaprin	n.d.	30023 ± 1499	-
	Dirolein	705 ± 143	57144 ± 5231	1,2 ± 0,4

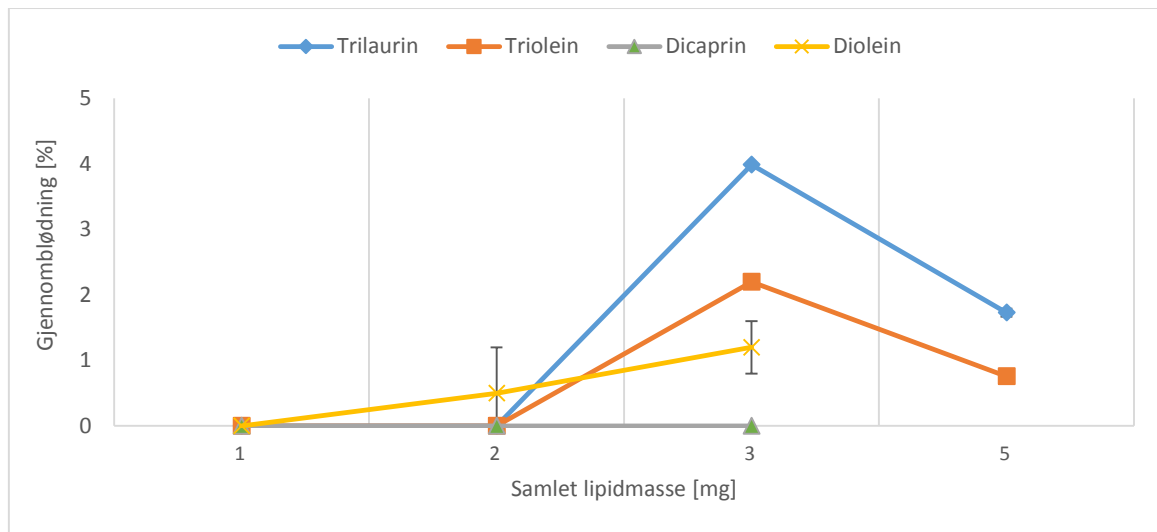
1) n.d. = not detected

**Tabell 3.3:** Areal av kromatografiske topper etter analyse av FAME på GC-MS og GC-FID i 1. og 2. fraksjon og beregnet gjennomblødning etter test av SPE-metode med 1 - 5 mg TAG på kolonnen.

	Triglyserid	A <sub>1</sub> . fraksjon	A <sub>2</sub> . fraksjon	Gj.blødning (%)
1 mg*	Trilaurin	15	n.d. <sup>1</sup>	-
	Triolein	38	n.d.	-
2 mg*	Trilaurin	30	n.d.	-
	Triolein	71	n.d.	-
3 mg	Trilaurin	10727 ± 584	446 ± 25	3,987 ± 0,004
	Triolein	128976 ± 9068	2878 ± 342	2,2 ± 0,1
5 mg	Trilaurin	17650 ± 1488	311 ± 37	1,73 ± 0,06
	Triolein	212445 ± 19544	1624 ± 138	0,759 ± 0,005

1) n.d. = not detected \*) Analyse av FAME utført på GC-FID





**Figur 3.4:** Beregnet gjennomblødning etter test av SPE-metode med 1 - 5 mg di- og triglyserider påsatt kolonnen.

Som vist i figur 3.4, er det ikke observert gjennomblødning ved 1 mg DAG og TAG på kolonnen. Ved økning av massen, øker også gjennomblødningen. Selv om det er observert at gjennomblødningen blir mindre ved å øke massen av TAG fra 3 mg til 5 mg, kan dette også skyldes tilfeldige feil ved bruk av SPE-roboten.

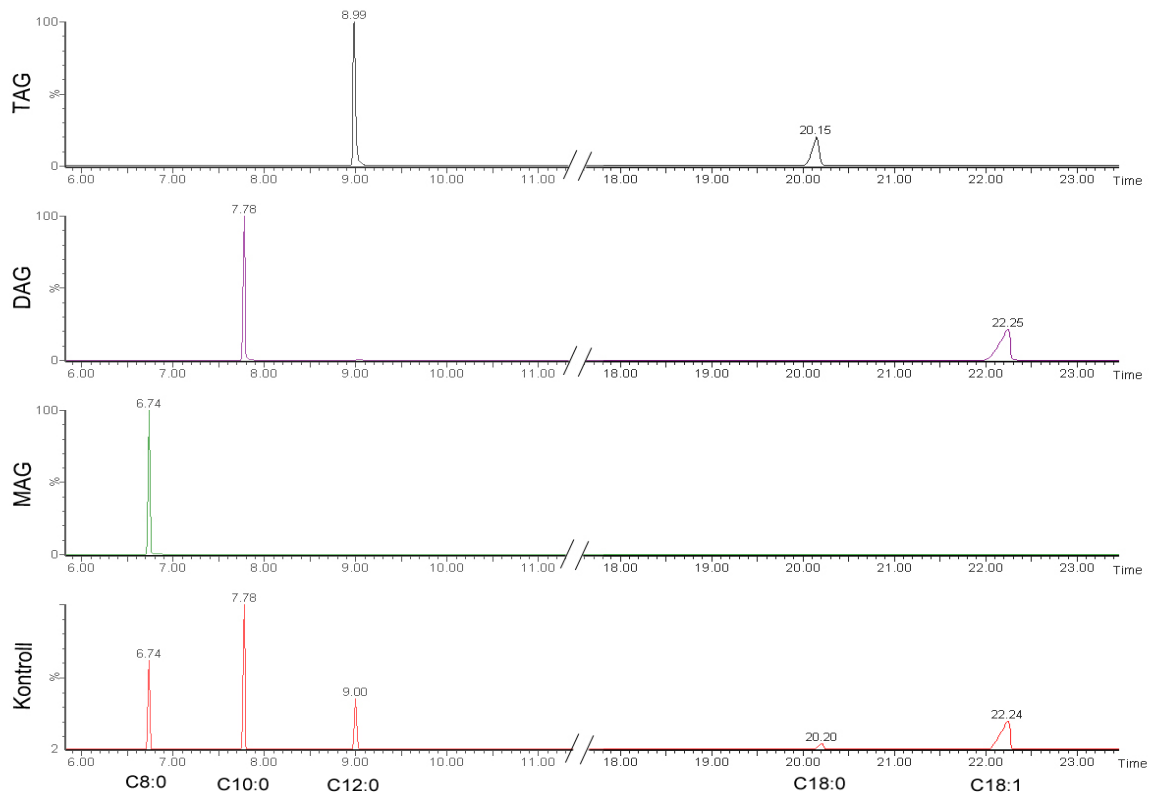
Det er en forskjell på gjennomblødningen av kort- og langkjedede TAG og DAG. Trilaurin har en større tendens til gjennomblødning enn triolein, mens diolein har en større gjennomblødning enn dicaprin. Dette kan skyldes at det også foregår størrelsesekklusjonseffekter i kolonnen, hvor de større molekylene kommer litt raskere ut enn de mindre.

I følge likning 1.2 er  $K$  avhengig av analyttens størrelse, og ved bruk av samme elueringsmiddel, vil  $K$  være større for små molekyler enn for store, og derfor de minste ha sterkere retensjon i kolonnen (Rasmussen, 1994b).

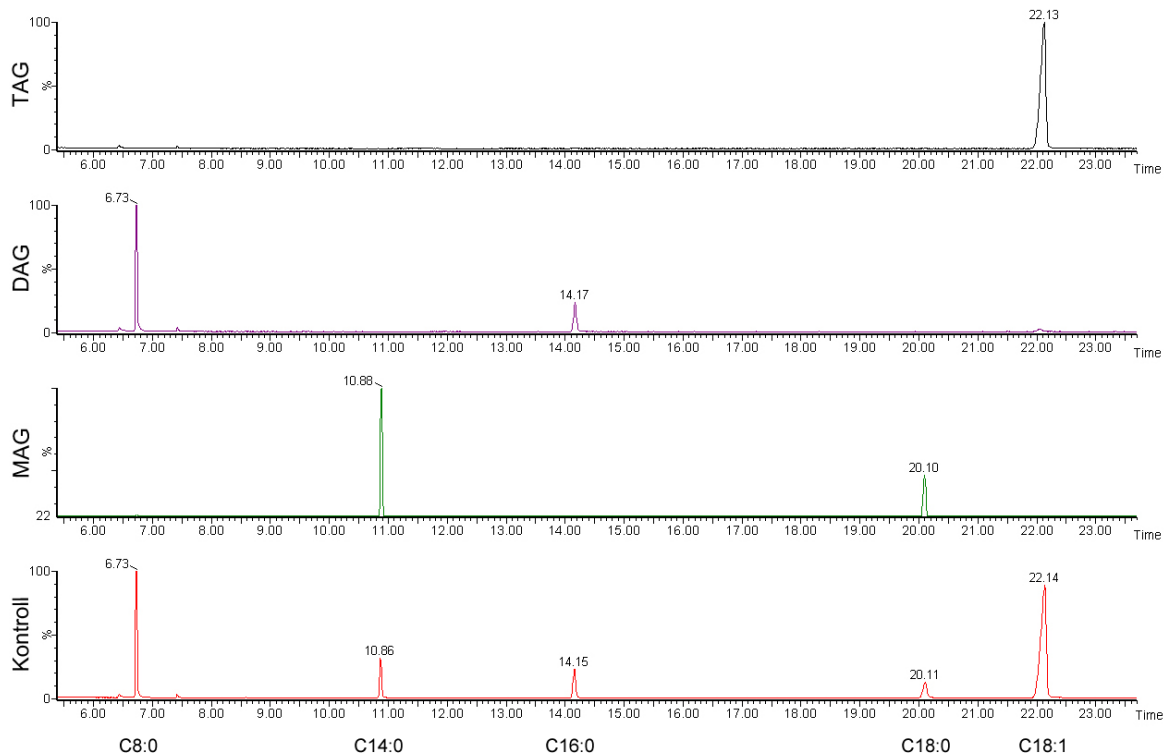
### 3.2.4 Validering av metode

Metoden ble testet ved å separere to standardprøver i 3 paralleller, med 3 mg samlet lipidmasse hver. Acylglyseridene i hver fraksjon ble omestret og analysert på GC-MS. En kontrollprøve av hver prøveløsning ble omestret og analysert på GC-MS og benyttet til å beregne utbytte. Resultatet er gitt i figur 3.5 og 3.6, hvor det vises at TAG, DAG og MAG er separert. De kromatografiske arealene og den beregnede gjennomblødningen og utbytte er gitt i tabell 3.4.

## Resultat og Diskusjon



**Figur 3.5:** Kromatogram av de omestrede acylglyseridene (tristearin 18:0, trilaurin 12:0, diolein 18:1, dikaprin 10:0 og monokaprylin 8:0) analysert på GC-MS etter separasjon ved SPE.



**Figur 3.6:** Kromatogram av de omestrede acylglyseridene (triolein 18:1, dipalmitin 16:0, dikaprylin 8:0, monostearin 18:0 og monomyristin 14:0) analysert på GC-MS etter separasjon ved SPE.

**Tabell 3.4:** Gjennomsnittlig kromatografiske areal og standardavvik for omestrede TAG, DAG, og MAG i 1., 2. og 3. fraksjon og beregnet gjennomblødning etter separasjon av 3 mg acylglyserider ved SPE.

Acylglyserid	FA	A <sub>1</sub> .fraksjon	A <sub>2</sub> .fraksjon	A <sub>3</sub> .fraksjon	Utbytte (%)	Gj.blødning (%)
<i>Trilaurin</i>	C12:0	1915 ± 146	64,5 ± 0,7	n.d. <sup>1</sup>	92 ± 7	3,3 ± 0,2
<i>Tristearin</i>	C18:0	987 ± 149	12 ± 1	n.d.	98 ± 14	1,2 ± 0,3
<i>Triolein</i>	C18:1	2656 ± 224	38 ± 7	n.d.	96 ± 8	1,4 ± 0,4
<i>Dicaprylin</i>	C8:0	n.d.	1615 ± 77	n.d.	99 ± 5	-
<i>Dicaprin</i>	C10:0	n.d.	4665 ± 300	n.d.	97 ± 6	-
<i>Dipalmitin</i>	C16:0	n.d.	336 ± 37	n.d.	95 ± 11	-
<i>Diolein</i>	C18:1	29 ± 11	5658 ± 313	n.d.	99 ± 5	0,5 ± 0,2
<i>Monocaprylin</i>	C8:0	n.d.	n.d.	2734 ± 145	96 ± 5	-
<i>Monomyristin</i>	C14:0	n.d.	n.d.	336 ± 25	99 ± 7	-
<i>Monostearin</i>	C18:0	n.d.	n.d.	286 ± 4	77 ± 1	-

1) n.d. = not detected

Resultatene bekrefter gjennomblødningen funnet tidligere og tyder på at den er konstant i dette masseområdet. Dette viser også at elueringsvolumene i metoden gir lik gjennomblødning når det er både TAG og DAG i prøven som når bare én av dem er tilstede. Utbyttet er >95 % for alle lipidene utenom monostearin. Det store standardavviket i utbytte er grunnet SPE-robotens store usikkerhet i pipetteringsvolum og det antas, grunnet dårlig retensjon, at oppimot alle lipidene elueres ut av kolonnen.

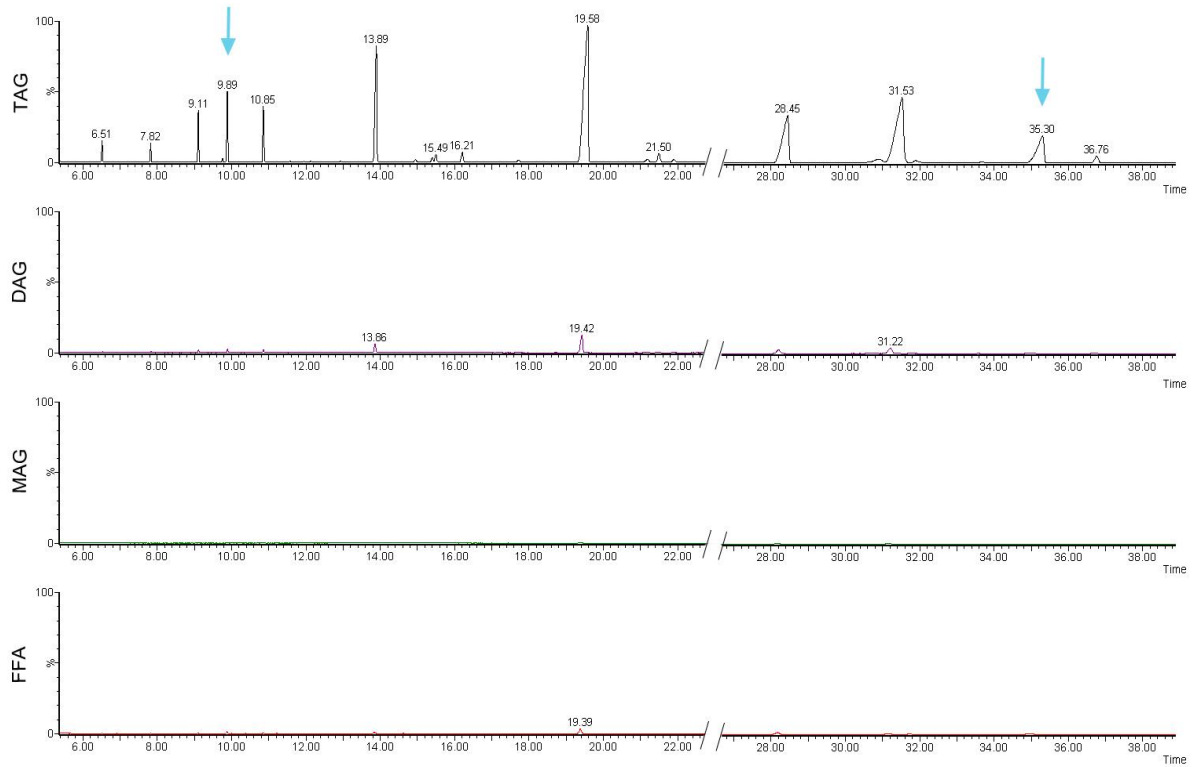
### 3.3 SPE-SPE av lipider fra helmelk

Lipidprøven benyttet var ekstrahert av Devle et al. (2014) fra 1,0 mL helmelk fra ku, etter fordøyelse i et statisk *ex vivo* fordøyelsessystem i 120 minutter. Det ble også brukt en kontrollprøve av lipider ekstrahert fra 1,0 mL ufordøyd helmelk. Ekstraksjonsutbytte og lipidkonsentrasjonen i prøvene var ikke kjent, men kan ha vært oppimot 40 mg/mL.

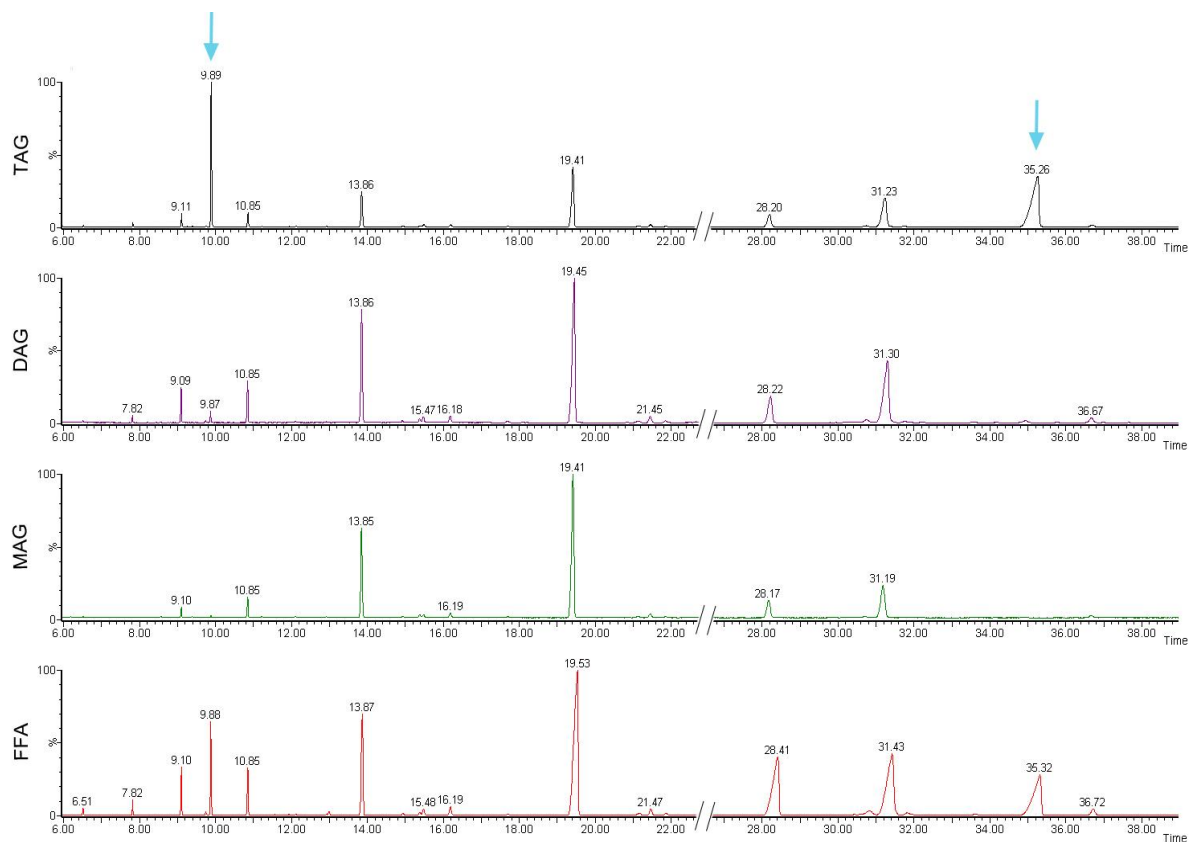
Forsøket ble først utført ved bruk av 3 mg teoretisk samlet lipidmasse i 3 paralleller. Dette ga et resultat uten gjennomblødning, men mange fettsyremetylestere hadde for små kromatografiske areal ved GC-MS analyse til at de kunne identifiseres og kvantifiseres.

Den teoretiske samlede lipidmassen ble økt til 6 mg i 3 paralleller. FFA ble isolert fra NL ved SPE, forestret og analysert på GC-MS. NL ble separert i tre fraksjoner ved SPE, omestret og analysert på GC-MS. Kromatogrammene av FAME i TAG-, DAG-, MAG- og FFA-fraksjonen i ufordøyd og fordøyd helmelk er vist i figur 3.7 og 3.8. De kromatografiske arealene og beregnede konsentrasjoner er gitt i vedlegg 8 og 9.

## Resultat og Diskusjon



**Figur 3.7:** Kromatogram etter GC-MS analyse av omestrede acylglyserider (TAG, DAG og MAG) og forestrede frie fettsyrer (FFA) etter separasjon av ufordøyde lipider fra helmelk. De blå pilene markerer de kromatografiske toppene til internstandardene C11:0 og C19:0.



**Figur 3.8:** Kromatogram etter GC-MS analyse av omestrede acylglyserider (TAG, DAG og MAG) og forestrede frie fettsyrer (FFA) etter separasjon av ex vivo fordøyde lipider fra helmelk. De blå pilene

*markerer de kromatografiske toppene til internstandardene C11:0 og C19:0.*

Kromatogrammene i figur 3.7 og 3.8 viser en gjennomblødning av internstandardene, triundekanoïn (11:0) og trinonadekanoïn (19:0), til DAG-fraksjonen. De kromatografiske arealene av internstandardenes FAME i TAG- og DAG-fraksjonene og beregnet gjennomblødning er gitt i vedlegg 10. C11:0 hadde en gjennomsnittlig gjennomblødning på  $(6,2 \pm 1,5)$  %, mens C19:0 hadde en gjennomsnittlig gjennomblødning på  $(2,1 \pm 0,6)$  %. Det langkjedede triglyseridet hadde en mindre andel gjennomblødning til DAG-fraksjonen enn det kortkjedede, og stemmer overens med resultatet funnet ved separasjon av standardprøver. Resultatet tyder også på at parallell nummer 2 har mindre gjennomblødning enn de to andre og er ganske lik resultatet funnet ved test av standardprøver. Dette skyldes at de tre parallellene ble eluert ut med litt forskjellig volum av SPE-roboten. Det viser at de små forskjellene i elueringsvolum av robotens nåler er av stor betydning, og den totale gjennomblødningen ville vært mindre dersom SPE-roboten hadde eluert med like volum i alle parallellene.

Gjennomblødningene av internstandardene var like for de ufordøyde og fordøyde prøvene. Da det er mye mer NL i de ufordøyde enn de fordøyde lipidprøvene, ser det ut til at gjennomblødningen var konstant i dette masseområdet.

Triglyseridenes ulikheter fysikalske- og kjemiske egenskaper grunnet forskjellige fettsyre-sammensetninger gjør at det ikke kan slås fast at de andre triglyseridene oppfører seg som standardene undersøkt. Alle TAG-standardene kontrollert har tre like fettsyrer, og hvordan TAG oppfører seg ved miksede sammensetninger er uvisst. Siden det ikke er noen internstandard i form av DAG i prøven, har vi ingen indikasjon på andel gjennomblødning av DAG i TAG-fraksjonen.

Kvantifiseringen av fettsyrene ble utført ved hjelp av intern standard metode og de inverse relative responsfaktorene,  $RRF_{FAME}^{-1}$ . Konsentrasjonen av en gitt FAME,  $C_{FAME}$ , ble beregnet ved bruk av likning 3.1:

$$C_{FAME} = \frac{A_{FAME} \cdot C_{IS}}{A_{IS} \cdot RRF^{-1}} \quad (3.1)$$

$A_{FAME}$  og  $A_{IS}$  er det kromatografiske arealet til henholdsvis fettsyremetylesteren og internstandard og  $C_{IS}$  er konsentrasjonen av internstandard i melkeprøven.  $C_{IS}$ ,  $RRF^{-1}$

og fettsyremetylesternes molekylvekt er gitt i vedlegg 7. Siden det ikke er internstandard av DAG og MAG tilsatt i prøvene, benyttes internstandard i TAG-fraksjonen til kvantifisering av DAG og MAG. Det antas det at utbytte og tap av analytt er lik i alle fraksjoner under fastfaseekstraksjon og omestring av de nøytrale lipidene.

Beregnet gjennomsnittlig konsentrasjon av fettsyrer i acylglyserider og frie fettsyrer i ufordøyd melk og *ex vivo* fordøyd melk er gitt i tabell 3.5 og tabell 3.6.

**Tabell 3.5:** Beregnet gjennomsnittlig konsentrasjon og standardavvik av fettsyrene identifisert i de fire fraksjonene etter fastfaseekstraksjon av ufordøyd helmelk.

Ufordøyd helmelk				
<b>FA</b>	<b>TAG</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	<b>DAG</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	<b>MAG</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	<b>FFA</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )
C6:0	287 ± 7	19 ± 5	n.d.	2,4 ± 0,5
C8:0	252 ± 3	16 ± 4	3 ± 3	2,7 ± 0,2
C10:0	810 ± 17	52 ± 12	3 ± 1	8 ± 2
C12:0	1156 ± 23	83 ± 18	7 ± 2	20 ± 2
C13:0	27 ± 2	8 ± 1	n.d.	1 ± 2
C14:0	4643 ± 74	364 ± 86	16 ± 6	53 ± 8
C15:0 iso	35 ± 2	2,4 ± 0,4	n.d.	2,4 ± 0,7
C15:0 anteiso	66 ± 5	4 ± 1	n.d.	n.d.
C15:0	157 ± 8	16 ± 4	n.d.	3,2 ± 0,5
C16:0 iso	108 ± 11	13 ± 5	n.d.	n.d.
C16:0	14125 ± 424	1125 ± 373	44 ± 17	316 ± 28
C17:0 iso	86 ± 5	7,5 ± 0,8	n.d.	n.d.
C17:0 anteiso	71,5 ± 0,9	4 ± 1	n.d.	n.d.
C17:0	84 ± 1	6 ± 4	n.d.	n.d.
C18:0	2810 ± 176	170 ± 33	9 ± 3	118 ± 5
C20:0	38 ± 2	0,6 ± 0,9	n.d.	15 ± 11
<b>Sum SFA</b>	<b>24760 ± 527</b>	<b>1758 ± 335</b>	<b>82 ± 27</b>	<b>542 ± 40</b>
C14:1	106 ± 8	7 ± 1	n.d.	1,4 ± 0,3
C16:1	194 ± 9	12 ± 3	n.d.	n.d.
C18:1	477 ± 28	20 ± 2	n.d.	20,0 ± 0,6
C18:1c9	5013 ± 250	285 ± 58	2 ± 3	60 ± 6
C18:2c9,12	295 ± 9	14 ± 4	n.d.	1 ± 2
C18:3c9,12,15	66 ± 1	2 ± 3	n.d.	2 ± 3
C18:2c9,t11	125 ± 2	2 ± 2	n.d.	0,4 ± 0,6
<b>Sum UFA</b>	<b>6277 ± 308</b>	<b>369 ± 68</b>	<b>2 ± 3</b>	<b>85 ± 10</b>

**Tabell 3.6:** Beregnet gjennomsnittlig konsentrasjon og standardavvik av fettsyrene identifisert i de fire fraksjonene etter fastfaseekstraksjon av *ex vivo* fordøyd helmelk.

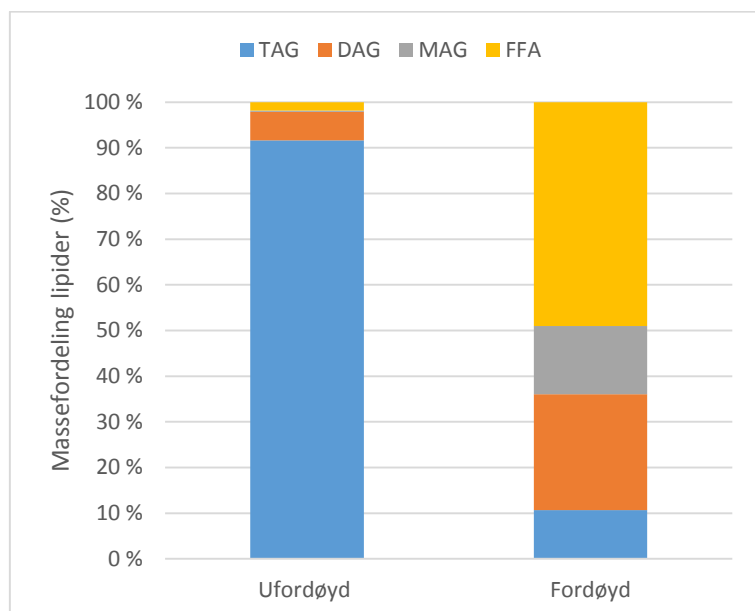
<i>Ex vivo</i> fordøyd helmelk				
<b>FA</b>	<b>TAG</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	<b>DAG</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	<b>MAG</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	<b>FFA</b> ( $\frac{\mu g}{mL}$ )
C6:0	8,2 ± 0,3	11 ± 1	6,88 ± 0,04	66 ± 6
C8:0	25 ± 4	41,7 ± 0,5	4 ± 2	110 ± 4
C10:0	104 ± 2	246 ± 4	77 ± 14	408 ± 19
C12:0	151 ± 6	381 ± 10	181 ± 29	552 ± 38
C13:0	6,1 ± 0,8	13 ± 1	8 ± 2	12 ± 1
C14:0	612 ± 28	1667 ± 62	1121 ± 179	1983 ± 172
C15:0 iso	4,4 ± 0,1	11,4 ± 0,9	7,0 ± 0,5	13 ± 4
C15:0 anteiso	7,8 ± 0,1	23 ± 2	15 ± 2	22 ± 7
C15:0	16 ± 1	46 ± 8	27 ± 4	76 ± 21
C16:0 iso	12,9 ± 0,8	33 ± 2	27 ± 10	38 ± 2
C16:0	1611 ± 62	3992 ± 98	2805 ± 6415	7596 ± 292
C17:0 iso	10,3 ± 0,5	24 ± 2	13 ± 1	43 ± 4
C17:0 anteiso	8,0 ± 0,7	19 ± 1	9 ± 2	34 ± 3
C17:0	6,8 ± 0,4	16 ± 1	10 ± 1	52 ± 5
C18:0	230 ± 10	444 ± 30	201 ± 24	2312 ± 113
C20:0	3,4 ± 0,2	4 ± 3	1 ± 2	28 ± 2
<b>Sum SFA</b>	<b>2824 ± 99</b>	<b>6921 ± 221</b>	<b>4516 ± 687</b>	<b>13344 ± 662</b>
C14:1	15,2 ± 0,7	34 ± 3	13 ± 2	49 ± 15
C16:1	25 ± 2	62 ± 4	32 ± 5	87 ± 10
C18:1	40 ± 4	90 ± 4	21 ± 6	255 ± 18
C18:1c9	688 ± 20	1404 ± 96	442 ± 60	2678 ± 206
C18:2c9,12	41 ± 2	90 ± 8	34 ± 6	170 ± 13
C18:3c9,12,15	8,1 ± 0,8	17 ± 1	6 ± 1	34 ± 3
C18:2c9, t11	14,0 ± 0,6	30 ± 22	7 ± 1	66 ± 3
<b>Sum UFA</b>	<b>816 ± 27</b>	<b>1710 ± 117</b>	<b>555 ± 81</b>	<b>3339 ± 264</b>

Konsentrasjonene av de identifiserte fettsyrene er i overenstemmelse med resultatet funnet av Devle et al. (2014), og tyder på at separasjonsmetoden gir et like godt utbytte i alle fraksjonene.

Ved fullstendig lipolyse av et triglyserid med humane fordøyelsesenzymmer dannes det to frie fettsyrer og ett *sn2*-monoglyserid (Armand, 2007). Konsentrasjonen av fettsyrene i MAG-fraksjonen er i overenstemmelse med fettsyrene vi forventer at skal være i *sn2*-posisjon. Både UFA, korte SFA (C6:0 og C8:0) og lange SFA (C18:0 og C20:0) har lav forekomst og indikerer at MAG er isolert.

## Resultat og Diskusjon

Det ble funnet at fettsyrenes massefordeling i de fire fraksjonene i ufordøyd helmelk var 91,6 % TAG, 6,3 % DAG, 0,2 % MAG og 1,9 % FFA. Fettsyrenes massefordeling i fordøyd melk ble funnet til å være 10,7 % TAG, 25,4 % DAG, 14,9 % MAG og 49,0 % FFA. Massefordelingen er illustrert i figur 3.9.



**Figur 3.9:** Massefordeling av fettsyrene i TAG-, DAG-, MAG-, og FFA-fraksjonen i ufordøyd- og fordøyd helmelk.

Den totale fettsyrekonsentrasjonen før og etter fordøyelse, og differansen mellom disse, i FFA-, TAG-, DAG-, og MAG- fraksjonen er gitt i tabell 3.7 og 3.8. Den totale reduksjonen av fettsyrer i NL ble også beregnet.

**Tabell 3.7:** Gjennomsnittlig konsentrasjon av fettsyrene i triglyserider (TAG), diglyserider (DAG), monoglyserider (MAG) og frie fettsyrer (FFA) i ufordøyd og fordøyd helmelk og differansen mellom dem.

	TAG ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	DAG ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	MAG ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	NL ( $\frac{\mu g}{mL}$ )	FFA ( $\frac{\mu g}{mL}$ )
Ufordøyd	31036 ± 606	2127 ± 347	84 ± 27	33248 ± 484	627 ± 44
Fordøyd	3641 ± 124	8631 ± 337	5072 ± 768	17116 ± 843	16684 ± 905
Differanse	-27396 ± 568	6504 ± 67	5000 ± 786	-16127 ± 158	16057 ± 871



**Tabell 3.8:** Gjennomsnittlig molar konsentrasjon av fettsyrene i triglyserider (TAG), diglyserider (DAG), monoglyserider (MAG) og frie fettsyrer (FFA) i ufordøyd og fordøyd helmelk og differansen mellom dem.

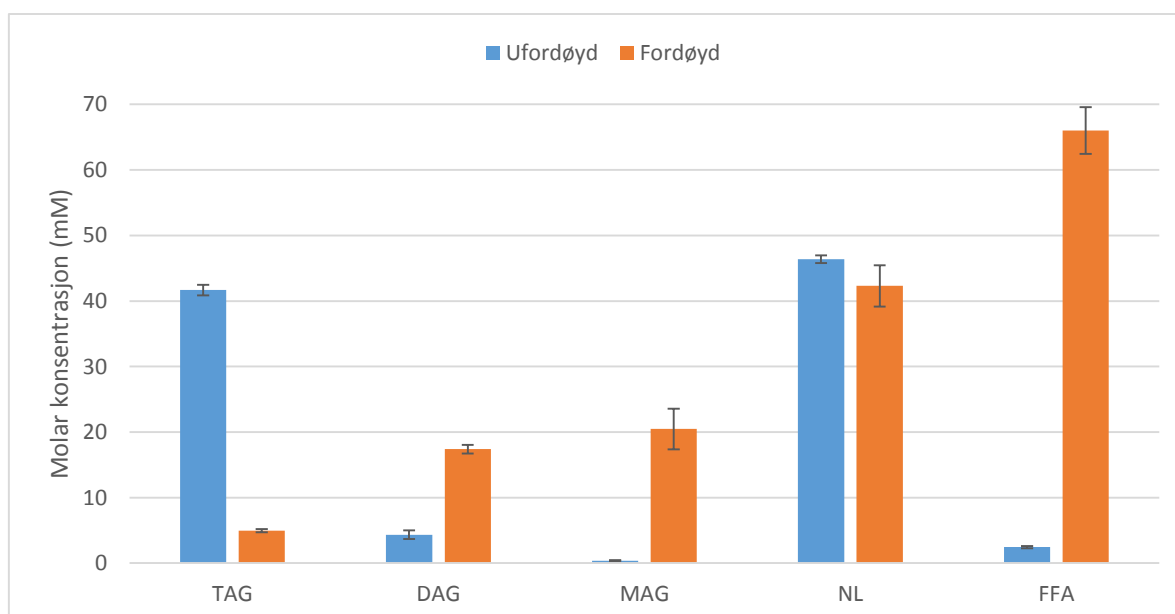
	<b>TAG (mM)</b>	<b>DAG (mM)</b>	<b>MAG (mM)</b>	<b>NL (mM)</b>	<b>FFA (mM)</b>
Ufordøyd	125 ± 2	9 ± 1	0,4 ± 0,1	134 ± 2	2,4 ± 0,2
Fordøyd	14,8 ± 0,7	35 ± 1	20 ± 3	69 ± 3	66 ± 4
Differanse	-110 ± 2	26,1 ± 0,2	20 ± 3	-65 ± 1	64 ± 3

Resultatene gitt i tabell 3.7 og 3.8 viser at det er overenstemmelse mellom reduksjon av FA i NL og økning av FA i FFA.

I tabell 3.9 er den molare konsentrasjonen av fettsyrene omregnet til molar konsentrasjon av TAG, DAG, MAG, og FFA i ufordøyd- og fordøyd helmelk, og er illustrert i figur 3.10.

**Tabell 3.9:** Total molar konsentrasjon av triglyserider (TAG), diglyserider (DAG), monoglyserider (MAG) og frie fettsyrer (FFA) i fordøyd og ufordøyd helmelk og differansen mellom dem.

	<b>TAG (mM)</b>	<b>DAG (mM)</b>	<b>MAG (mM)</b>	<b>NL (mM)</b>	<b>FFA (mM)</b>
Ufordøyd	42 ± 3	4,3 ± 0,7	0,4 ± 0,1	46,4 ± 0,6	2,4 ± 0,2
Fordøyd	4,9 ± 0,2	17,4 ± 0,7	20 ± 3	42 ± 3	66 ± 4
Differanse	-36,7 ± 0,8	13,1 ± 0,1	20 ± 3	-3,9 ± 2	64 ± 3



**Figur 3.10:** Molar konsentrasjon av TAG, DAG, MAG, og FFA og den sammenlagte molare konsentrasjonen av de nøytrale lipidene (NL) i ufordøyd og fordøyd helmelk.

## Resultat og Diskusjon

Resultatene i tabell 3.9 viser en liten uoverensstemmelse mellom antall nøytrale lipider i de to prøvene. Dette skyldes at det er en liten gjennomblødning av di- og triglyserider under fastfaseekstraksjonen, og beregning av mol TAG og DAG ut ifra mol fettsyrer blir derfor unøyaktig. Resultatet viser at omtrent 80-88 % av alle triglyserider i den ufordøyde melken er omgjort til mono- og diglyserider under fordøyelsen.

## 4. Konklusjon

En metode for separasjon av mono-, di-, og triglyserider ved bruk av automatisert fastfaseekstraksjon ble etablert og brukt på lipider ekstrahert fra ufordøyd- og *ex vivo* fordøyd helmelk.

Fullstendig separasjon av mono-, di- og triglyserider ble oppnådd ved å applisere acylglyserider, løst i 150 µL heksan:kloroform:metanol (90:6:4), på en 500 mg aminopropyl-kolonne pre-kondisjonert med 7,5 mL heksan. Triglyseridene ble eluert med 1,0 mL heptan:dietyleter (93:7). Diglyseridene ble eluert med 3,0 mL heptan:dietyleter (93:7), og tilslutt ble monoglyseridene eluert med 3,0 mL kloroform:metanol (2:1).

Metoden ga et utbytte på >95 % i alle fraksjoner. Ved lipidmasser høyere enn 2 mg ble det observert opp til 4 % gjennomblødning av triglyserider i diglyseridfraksjonen. Triglyserider med korte karbonkjeder hadde større andel gjennomblødning enn triglyserider med lengre karbonkjeder.

Metoden ble benyttet for separasjon av lipider ekstrahert fra *ex vivo* fordøyd- og ufordøyd helmelk. Ved bruk av 6 mg lipidmasse ble det observert en gjennomblødning på  $(6,2 \pm 1,5)$  % for triundekanoin, mens trionadekanoin hadde en gjennomsnittlig gjennomblødning på  $(2,1 \pm 0,6)$  %. Gjennomblødning ble ikke observert ved bruk av 3 mg samlet lipidmasse.

Det ble funnet at fettsyrenes massefordeling i ufordøyd helmelk var 91,6 % TAG, 6,3 % DAG, 0,2 % MAG og 1,9 % FFA. Fettsyrenes massefordeling i *ex vivo* fordøyd helmelk ble funnet til å være 10,7 % TAG, 25,4 % DAG, 14,9 % MAG og 49,0 % FFA.

## 5. Videre arbeid

### Metodeutvikling

Metoden utviklet for separasjon av mono-, di-, og triglyserider kan optimaliseres videre og teste flere løsemiddelkombinasjoner for en bedre selektivitet. Det bør også gjøres flere tester for å kartlegge gjennomblødning ved forskjellige masser av TAG og DAG.

### Separasjon av nøytrale lipider i melk

Siden det kan se ut til at triglyseridene elueres ut i bed-volumet, og det ikke ble observert gjennomblødning ved lav masse, kan metoden testes med en større kolonne. Ved en slik oppskalering er det kanskje mulig å separere de nøytrale lipidene i melk uten gjennomblødning og fortsatt få ønskede kromatografiske topper over LOQ.

Videre bør også forsøket gjøres med internstandard i form av di- og monoglyserid i tillegg til triglyserid for å kompensere for tap av analytt i disse fraksjonene.

## 6. Litteraturliste

- Aluyor, E.O., Ozigagu, C.E., Oboh, O.I. & Aluyor, P. (2009). Chromatographic Analysis of Vegetable Oils: A Review. *Scientific Research and Essay*, 14(4), s. 191-197.
- Armand, M. (2007). Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10 (2), s.156-164.
- Bareth, A., Strohmair, W., Kitzelmann, E. (2003). Gas chromatographic determination of mono- and diglycerides in milk and milk produkts. *European Food Research and Technology*, 216, s. 365- 368.
- Christie, W.W. (1972). The preparation of Alkyl Esters from Fatty Acids and Lipids. I: Gunstone, F. D. (red.), *Topics in Lipid Chemistry*, Vol. 3, Paul Elek (Science books) Limited, Great Britain.
- Christie, W. W. (1992a). Solid-Phase Extraction Columns in the Analysis of Lipids, I: Christie, W. W. (red.), *Advances in lipid methodology*, Vol. 1, The Oily Press, Scotland.
- Christie, W. W. (1992b). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic Analysis, I: Christie, W. W. (red.), *Advances in lipid methodology*, Vol. 2, The Oily Press. Scotland.
- Christie, W.W. (1995). Composition and structure of milk lipids, I: Fox, P.F. (red.) *Advanced dairy chemistry: Lipids*, Vol. 2, Chapman & Hall, Elsevier Applied Science, London, s 1-28.
- Christie, W.W. (2013). *What is a Lipid?* Dundee, Scotland. Tilgjengelig fra: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatlip/file.pdf> (lest 08.12.2014).
- Dean, J.R. (2009). *Extraction Techniques in Analytical Science*. Wiley. UK.
- Devle, H., Rukke, E. O., Naess-Andresen, C. F., Ekeberg, D. (2009). A GC-magnetic sector MS method for identification and quantification of fatty acids in ewe milk by different acquisition modes. *Journal of Separation Science*, 32 (21), s. 3738-3745.
- Devle, H., Vetti, I., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E. O., Vegarud, G., Ekeberg, D. (2012). A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and non-ruminant milk. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114 (9), s.1036-1043.
- Devle, H., Ulleberg, E. K., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vegarud, G., Ekeberg, D. (2014). Reciprocal interacting effects of proteins and lipids during *ex vivo* digestion of bovine milk. *International Dairy Journal*, 36 (1), s.6-13.

- Ebeler, S.E. & Shibamoto, T. (1994). Overview and Recent Developments in Solid-Phase Extraction for Separation of Lipid Classes, I: Shibamoto, T. (red.), *Lipid Chromatographic Analysis*, Chromatographic Science Series, Vol. 65, CRC Press, USA.
- Fagan, P., Wijesundera, C., Watkins, P. (2004). Determination of mono- and diacylglycerols in milk lipids. *Journal of Chromatography*, 1054, s.251-259.
- Flurkey, W.H. (2005). Use of Solid Phase Extraction in the Biochemistry Laboratory to Separate Different Lipids. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(5), s. 357-360.
- Giacometti, J., Milosevic, A., Milin, C. (2002). Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography*, 976, s. 47-54.
- Gunstone, F. (1996). *Fatty Acid and Lipid Chemistry*, Blackie Academic & Professional, United Kingdom.
- Hennion, M.C. & Pinchon, V. (1994). Solid-Phase Extraction of Polar Organic Pollutants from Water. *Environmental Science & Technology*, 28(13), s. 576-583.
- Henry, M. (2000). SPE-Technology-Principles and Practical Consequences. I: Simpson, N.J.K. (red.), *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, Marcel Dekker, Inc., USA.
- Hopia, A.I., Piironen, V.I., Koivistolinen, P.E., Hyvönen, L.E.T. (1992). Analysis of Lipid Classes by Solid-Phase Extraction and High-Performance Size-Exclusion Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 69(8), s. 772-776.
- Kaluzny, M.A., Duncan, L.A., Merrit, M.V., Epps, D.E. (1985). Rapid Separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, 26, s. 135-140.
- Koprivnjak, O., Conte, L., Boschelle, O., Morassi, S. (1997). Validation of diglyceride contents in cheeses using co-ordinated chromatographic techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 204, s. 429-432.
- MacGibbon, A.K.H. & Taylor, M.W. (2006). Composition and Structure of Bovine Milk Lipids. I: Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (red.), *Advanced Dairy Chemistry: Lipids*, Vol. 2, 3.utg. Springer Science + Business Media, Inc., USA.

- Marcato, B. & Cecchin, G. (1996). Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono-, di-, and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection. *Journal of Chromatography*, 730, s. 83-90.
- Masoro, E.J. (1968). *Physiological Chemistry of Lipids in Mammals*. Physiological Chemistry, Vol. 1, W. B. Saunders Company, U.S.A.
- McKee, T. & Mc.Kee, J.R. (2003). *Biochemistry: The Molecular Basis of Life*, 3<sup>rd</sup> edition, The McGraw-Hill Companies, USA, s. 331-353.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography – Concepts & Contrasts*. John Wiley & Sons, Inc., Publication. New Jersey, U.S.A.
- Morrison, W. R. (1970). Milk Lipids, I: Gunstone, F. D. (red.), *Topics in Lipid Chemistry*, Vol. 1, Logos Press Limited, Great Britain.
- Neff, W.E. (1992). Resolution of lipolysis mixtures from soybean oil by a solid-phase extraction procedure. *Journal of Chromatography*, 589, s. 353-357.
- Pacheco, Y.M., Pérez-Camino, M.C., Cert, A., Montero, E., Ruiz-Guitérrez, V. (1998). Determination of the molecular species composition of diacylglycerols in human adipose tissue by solid-phase extraction and gas chromatography on a polar phase. *Journal of Chromatography*, 714, s 127-132.
- Pérez-Camino, M.C., Moreda, W., Cert, A. (1996). Determination of diacylglycerol isomers in vegetable oils by solid-phase extraction followed by gas chromatography on a polar phase. *Journal of Chromatography*, 721, s. 305-314.
- Pernet, F., Pelletier, C.J., Milley, J. (2006). Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves. *Journal of Chromatography*, 1137, s. 127-137.
- Pinkart, H.C., Devereux, R., Chapman, J.C. (1998). Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *Journal of Microbiological Methods*, 34, s. 9-15.
- Plank, C. og Lorbeer, E. (1995). Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di-, and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 697, s. 461-468.
- Poole, C. F., Gunatilleka, A. D., Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography*, 885, s.17-39.
- Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *Trends in analytical Chemistry*, 22(6), s. 362-373.

- Rasmussen, K.E. (1994a). Gasskromatografi. I: *Kromatografi; Separasjon og deteksjon*. Universitetsforlaget, 3. utg., Oslo, Norge.
- Rasmussen, K.E. (1994b). Adsorpsjonskromatografi. I: *Kromatografi; Separasjon og deteksjon*. Universitetsforlaget, 3. utg., Oslo, Norge.
- Rossi, D.T. & Zhang, N. (2000). Automating Solid-Phase Extraction: Current Aspects and future Prospects. *Journal of Chromatography*, 885, s. 97-113.
- Ruiz-Gutiérrez, V. & Pérez-Camino, M.C. (2000). *Update on Solid-Phase Extraction for the Analysis of Lipid Classes and Related Compounds*. *Journal of Chromatography*, 885, s. 321-341.
- Rønning, P.O. (2011). *Innføring i Massespektrometri*. Institutt for industriell utvikling, Høgskolen i Oslo og Akershus, s. 1 -27.
- Simpson, N.J.K. & Van Horne, K.C. (1993). *Handbook of Sorbent Extraction Technology*, Varian Sample Preparation Products, USA.
- Simpson, N.J.K. & Wells, M.J.M. (2000). Introduction to Solid-Phase Extraction. I: Simpson, N.J.K. (red.) *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. USA: Marcel Dekker, Inc., s. 1- 15.
- Stanton, C., McMahon, D., Mills, S. (2013). Dairy components, products and human health. I: Muehlhoff, E., Bennett, A., McMahon, D. (red.), *Milk and dairy products in human nutrition*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Thurman, E.M. & Mills, M.S. (1998). *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. Wiley-Interscience. New York, U.S.A
- Weaver, C., Wijesinha-Bettoni, R., McMahon, D., Spence, L. (2013). Milk and dairy product as part of the diet. I: Muehlhoff, E., Bennett, A., McMahon, D. (red.), *Milk and dairy products in human nutrition*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Wells, M.J.M. & Michael, J.L. (1987). Reversed-phase extraction for aqueous sample preparation in herbicide residue analysis. *Journal of Chromatographic Science*, 25 (8), s. 345 – 350.
- Wijesinha-Bettoni, R. & Burlingame, B. (2013). Milk and dairy product composition. I: Muehlhoff, E., Bennett, A., McMahon, D. (red.), *Milk and dairy products in human nutrition*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.



## Litteraturliste

Ågren, J.J., Julkunen, A., Penttilä, I. (1992). Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *Journal of Lipid Research*, Vol 33, s. 1871-1876.

Vedlegg 1 – Semivalidering av SPE-roboten

Vekt av eppendorfrør før og etter pipettering av 150 µL heksan. Tettheten til heksan benyttet i beregningen av volum er 0,6548 g/mL.

**Tabell V.1:** Innveid pipettert heksan og beregnet volum og standardavvik for automatpipette og SPE-robot.

Nål	n	Før (g)	Etter (g)	Differanse (g)	Volum (µL)
<b>1</b>	1	0,9275	0,9964	0,0689	105,223
	2	0,9709	1,0362	0,0653	99,725
	3	0,9406	1,0030	0,0624	95,296
	Snitt Std.avvik			0,0655 0,003	<b>100,081</b> 4,973
<b>2</b>	1	0,9352	1,01	0,0748	114,233
	2	0,935	0,9963	0,0613	93,616
	3	0,9368	1,013	0,0762	116,371
	Snitt Std.avvik			0,0708 0,008	<b>108,074</b> 12,566
<b>3</b>	1	0,9355	0,992	0,0565	86,286
	2	0,9257	0,9923	0,0666	101,710
	3	0,9507	1,0238	0,0731	111,637
	Snitt Std.avvik			0,0654 0,008	<b>99,878</b> 12,775
<b>4</b>	1	0,9368	0,9987	0,0619	94,533
	2	0,9363	1,0075	0,0712	108,735
	3	0,9366	1,0041	0,0675	103,085
	Snitt Std.avvik			0,0669 0,0038	<b>102,118</b> 7,151
<b>Pipette</b>	1	0,9406	1,0389	0,0983	150,122
	2	0,9592	1,0573	0,0981	149,817
	3	0,9596	1,0581	0,0985	150,428
	Snitt Std.avvik			0,0983 0,000	<b>150,122</b> 0,305

**Tabell V.2:** Vekt av pipettert heksan, beregnet volum og avvik fra de teoretiske verdiene.

Nål	Vekt pipettert Heksan			Beregnet volum pipettert Heksan		
	Vekt (g)	Std.avvik	Avvik (%)	Volum (uL)	Std. Avvik	Avvik (%)
<b>Pipette</b>	0,0983	0,0002	0,1	150,1	0,3	0,1
<b>1</b>	0,066	0,003	-33,3	100	5	-33,3
<b>2</b>	0,071	0,008	-28,0	108	13	-28,0
<b>3</b>	0,065	0,008	-33,4	100	13	-33,4
<b>4</b>	0,067	0,004	-31,9	102	7	-31,9

## Vedlegg 2 - Eksisterende metoder

Tabell V.3: Separasjonoppsett for separasjon av de nøytrale lipidene ved SPE i tidligere publikasjoner

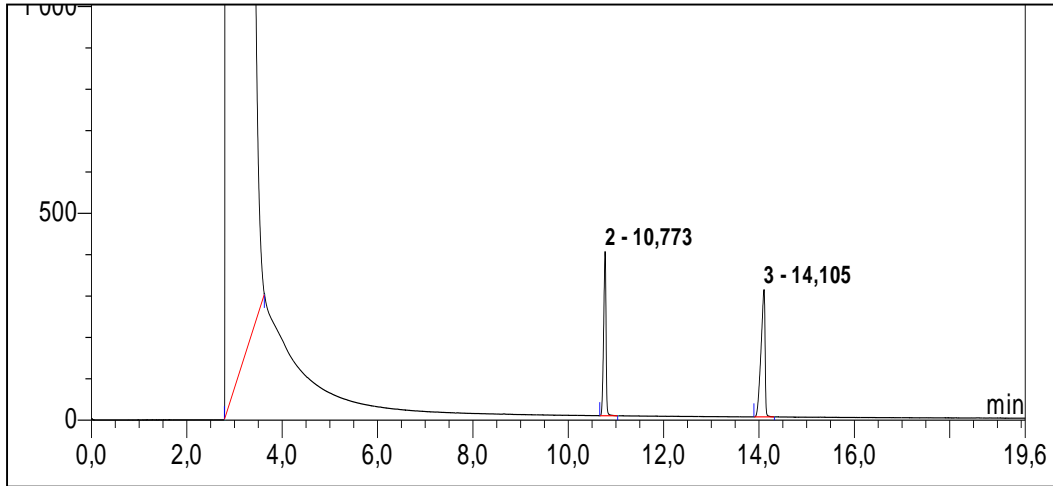
Matriks	Sorber	Løsemiddel i prøven	Elueringmiddel			Verifisering	Referanse	
			TAG	DAG	MAG			
A	Standarder og adipoosytter	NH <sub>2</sub>	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :dietyl eter (89:10:1)	Heksan:etylacetat (85:15)	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1)	TLC	Kaluzny et al., (1985)	
B	Soyaolje	Silika	Heksan	Heksan:dietyl eter (9:1)	Heksan:dietyl eter:eddiksyre (50:50:1)	MeOH	Neff, (1992)	
C	Mikrobiell lipid	NH <sub>2</sub>	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CHCl <sub>3</sub> (88:10:2)	Heksan:etylacetat (15:85)	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1)	GC-FID	Prinkart et al., (1998)	
D	Vev, olivenolje, maisolje	NH <sub>2</sub>	Heksan	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CHCl <sub>3</sub> (88:10:2)	Heksan:etylacetat (15:85)	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1)	TLC	Giacometti et al., (2002)
E	Adipoosytter, 20-100 mg/lipid	ZOH	-	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :dietyl eter (89:10:1)	Heksan:etylacetat (85:15)	-	TLC	Pacheco et al., (1998)
F	Melk, 4mg	ZOH**	Diklorometan	Diklorometan	Diklorometan:t-butylmetyl eter (1:1)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (2:1)	GC-FID	Fagan et al., (2004)
G	Ost, 50 mg lipid	NH <sub>2</sub>	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (9:1)	Heksan:dietyl eter (99:1)	Metanol:eddiksyre (98:2)	-	GC-FID	Koprivnjak et al., (1996)
H	Ost, 50 mg lipid	ZOH	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (9:1)	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (9:1)	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1)	-	GC-FID	Koprivnjak et al., (1996)
I	Vegetabiliske oljer	ZOH	Heksan	Heksan	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1)	-	TLC	Pérez-Carriño et al., (1996)
J	Standarder og serum	NH <sub>2</sub>	Heksan:MTBE:Etansyre (100:3:0:3)	Heksan:n:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :dietyl eter (89:10:1)	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1)	-	GC-FID	Ágren et al., (1992)
K	Standarder (C18:1)	NH <sub>2</sub>	Heksan:MTBE:Etansyre (100:3:0:3)	Heksan:CHCl <sub>3</sub> :Etylacetat (100:5:5)	CHCl <sub>3</sub> :propanol (2:1)	-	TLC	Flurkey, (2005)
L	Melkeprodukter	ZOH	Heksan:dietyl eter (9:1)	Heksan:dietyl eter (9:1)	Dietyl eter: MeOH (2:1)	-	GC-FID	Barth et al., (2003)
M	Standarder (C18:1), 20-80 mg	NH <sub>2</sub>	-	Heksan:dietyl eter (9:1)	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (2:1)	-	LSD	Hopia et al., (1992)

\* Alle kondisjonerte kolonnen med heksan

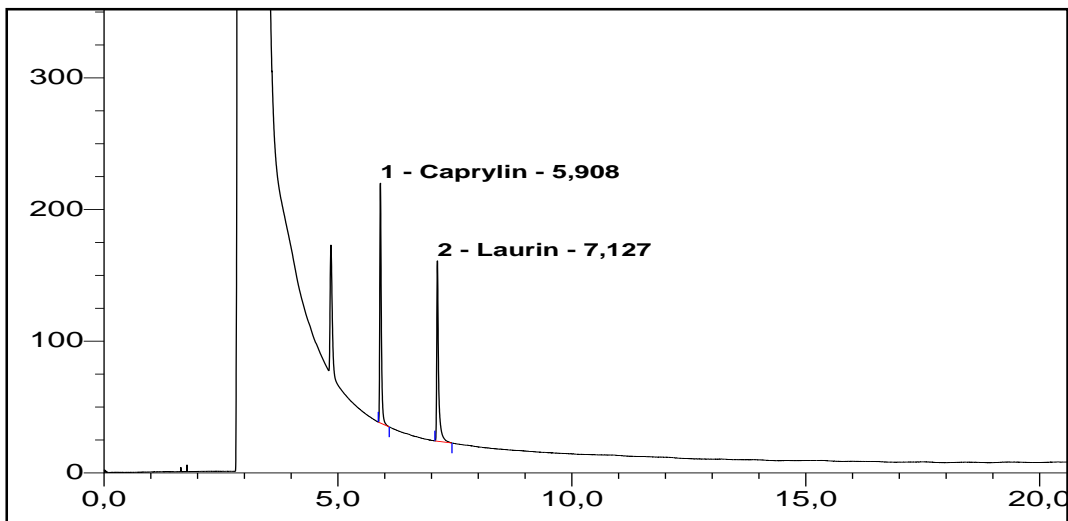
\*\* Kondisjonert med diklorometan

### Vedlegg 3 – Test av eksisterende metoder

Kromatogram av FAME omestret fra første fraksjonen etter separasjon av NL med oppsettene gitt i tabell V.3.

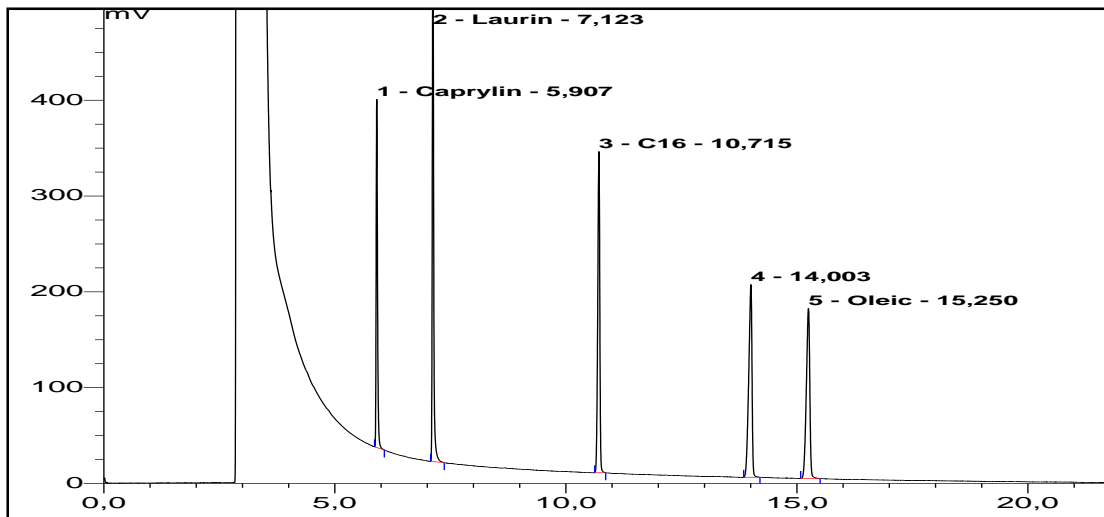


**Figur V.1:** Oppsett A. Tristearin og dipalmitin eluert ut med 5 mL Heksan:Diklormetan:Dietyleter (89:10:1).

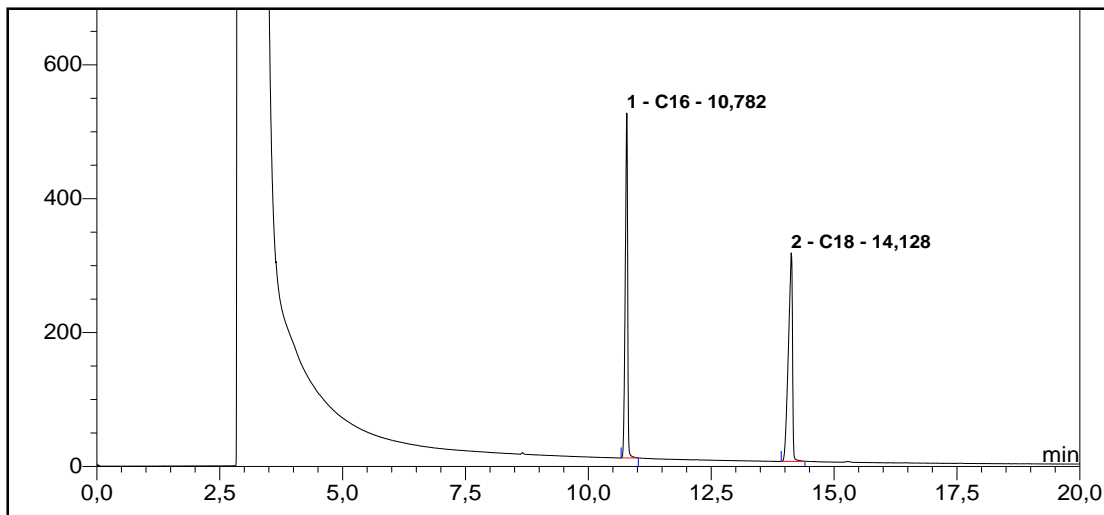


**Figur V.2:** Oppsett C/D. TAG og DAG eluert ut med 5 mL Heksan:Diklormetan:Kloroform (88:10:2). (Trilaurin, dicaprin og dicaprylin)

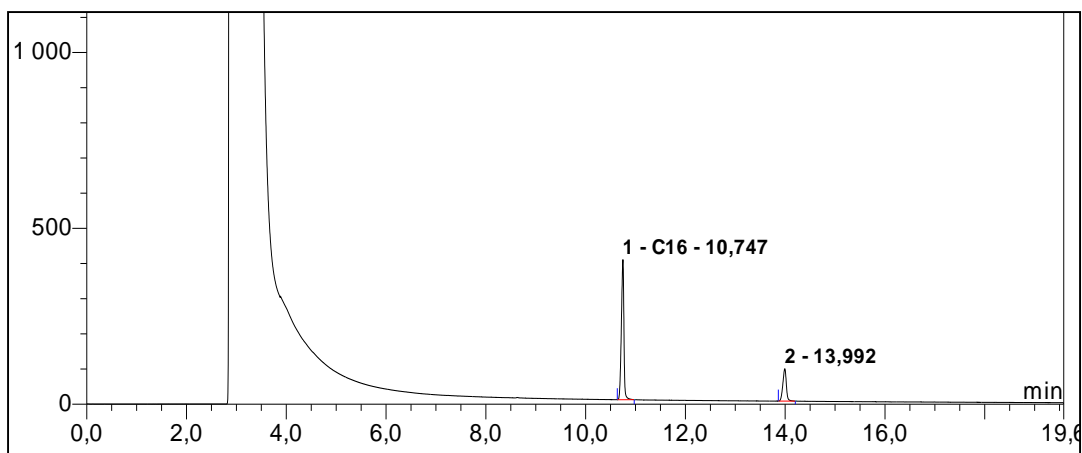
Vedlegg 3 – Test av eksisterende metoder



**Figur V.3:** Oppsett F. Diolein, monostearin, dipalmitin, trilaurin og dicaprin eluert ut med 5 mL diklormetan på diolkolonne.



**Figur V.4:** Oppsett H. Tristearin og dipalmitin løst i heksan:diklormetan 9:1, eluert ut med 3 mL heksan:diklormetan 9:1 på diol-kolonne.



**Figur V.5:** Oppsett M. Tristearin og dipalmitin eluert ut med 0,5 + 1 mL Heksan:Dietyleter (9:1)

**Vedlegg 4 – Elueringsmiddel**

Det ble utført fraksjonering av TAG og DAG ved bruk av forskjellige elueringsmidler. Tabell V.4 – V.10 viser kromatografiske areal etter analyse på GC-FID av omestrede DAG og TAG i fraksjonene. Gjennomblødning av TAG er andel eluert etter 1,0 mL. Breakthrough av DAG er andel eluert ut *etter* 1,0 mL.

**Tabell V.4:** Kromatografisk areal av 2,0 mg TAG og 1,8 mg DAG etter fraksjonering med heptan, omesteret til FAME og analysert på GC-FID, og kalkulert gjennomblødning

	Heptan				Gjennomblødning (%)
	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	2 mL	
Trilaurin	n.d.	24,75	2,37	n.d.	8,7
Triolein	n.d.	61,00	5,17	n.d.	7,8
<b>Snitt TAG</b>					<b>8,3</b>
Dicaprin	n.d.	10,74	14,10	10,18	30,7
Dipalmitin	n.d.	3,94	2,17	n.d.	64,5
Diolein	n.d.	21,97	10,69	1,72	63,9
<b>Snitt DAG</b>					<b>53,0</b>

**Tabell V.5:** Kromatografisk areal av 1,0 mg TAG og 0,91 mg DAG etter fraksjonering med heptan:dietyleter (96:4), omesteret til FAME og analysert på GC-FID, og kalkulert gjennomblødning

	Heptan:dietyleter 96:4				Gjennomblødning (%)
	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	2 mL	
Trilaurin	n.d.	16,43	Spor	n.d.	-
Triolein	n.d.	41,16	Spor	n.d.	-
<b>Snitt TAG</b>					<b>-</b>
Dicaprin	n.d.	n.d.	11,54	5,39	-
Dipalmitin	n.d.	0,87	2,46	n.d.	26,0
Diolein	n.d.	5,47	12,39	0,67	29,5
<b>Snitt DAG</b>					<b>18,5</b>

**Tabell V.6:** Kromatografisk areal av 2,0 mg TAG og 1,8 mg DAG etter fraksjonering med heptan:dietyleter 93:7, omesteret til FAME og analysert på GC-FID, og kalkulert gjennomblodning

Heptan:dietyleter 93:7					
	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	2 mL	Gjennomblodning (%)
Trilaurin	n.d.	29,913	n.d.	n.d.	-
Triolein	n.d.	70,981	n.d.	n.d.	-
Snitt TAG					-
Dicaprin	n.d.	n.d.	15,466	12,845	-
Dipalmitin	n.d.	n.d.	4,881	n.d.	-
Diolein	n.d.	n.d.	26,449	1,502	-
Snitt DAG					-

**Tabell V.7:** Kromatografisk areal av 2,0 mg TAG og 1,8 mg DAG etter fraksjonering med heptan:dietyleter (9:1), omesteret til FAME og analysert på GC-FID, og kalkulert gjennomblodning.

Heptan:dietyleter 9:1					
	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	2 mL	Gjennomblodning (%)
Trilaurin	n.d.	29,31	n.d.	n.d.	-
Triolein	n.d.	70,20	n.d.	n.d.	-
Snitt TAG					-
Dicaprin	n.d.	n.d.	15,36	13,44	-
Dipalmitin	n.d.	n.d.	4,63	n.d.	-
Diolein	n.d.	1,27	24,90	1,79	4,5
Snitt DAG					1,5

**Tabell V.8:** Kromatografisk areal av 3,3 mg TAG og 3,0 mg DAG etter fraksjonering med heptan:dietyleter (85:15), omesteret til FAME og analysert på GC-FID, og kalkulert gjennomblodning.

Heptan:dietyleter 85:15					
	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	2 mL	Gjennomblodning (%)
Trilaurin	n.d.	41,68	n.d.	n.d.	-
Triolein	1,16	69,76	n.d.	n.d.	-
Snitt TAG					-
Dicaprin	n.d.	n.d.	44,13	10,32	-
Dipalmitin	n.d.	0,68	2,81	n.d.	19,5
Diolein	n.d.	9,60	29,76	n.d.	24,4
Snitt DAG					14,6



**Tabell V.9:** Kromatografisk areal av 2 mg TAG og DAG etter fraksjonering med heksan:dietyleter 93:7, omesteret til FAME og analysert på GC-FID, og kalkulert gjennomblødning.

	Heksan:dietyleter 93:7		
	1,0 mL	2,0 mL	Gjennomblødning (%)
Trilaurin	19,44	n.d.	-
Triolein	4,40	n.d.	-
Snitt TAG			-
Dicaprin	1,69	18,89	4,5
Diolein	n.d.	16,95	-
Snitt DAG			2,3

**Tabell V.10:** Kromatografisk areal av 1,5 mg DAG etter fraksjonering med heksan:dietyleter 9:1, omesteret til FAME og analysert på GC-FID, og kalkulert gjennomblødning.

	Heksan:dietyleter 9:1				
	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	2 mL	Gjennomblødning (%)
Dicaprin	n.d.	spor	23,36	7,76	-
Dipalmitin	n.d.	spror	1,79	n.d.	-
Diolein	n.d.	2,53	19,33	1,00	11,1
Snitt DAG					3,7

## Vedlegg 5 - Lipidmasse

Det ble testet hvor stor masse acylglyserider som ga gjennomblødning. Forsøket ble utført i 2 paralleller. Tabell V.11 – V.14 viser de kromatografiske arealene i fraksjon 1 og fraksjon 2 og kalkulert gjennomblødning. Gjennomblødning av TAG er andel funnet i 2. fraksjon. Gjennomblødning av DAG er andel funnet i 1. fraksjon.

**Tabell V.11:** Areal av FAME etter GC-analyse av omesteret TAG eluert med 1 mL + 2 mL heptan:dietyleter (93:7) i 2 paralleller og beregnet gjennomblødning.

		1			2		
		A1. fraksjon	A2. fraksjon	Gj.blødning (%)	A1. fraksjon	A2. fraksjon	Gj.blødning (%)
1 mg	Trilaurin	15,447	n.d.	-	-	-	-
	Triolein	38,428	n.d.	-	-	-	-
2 mg	Trilaurin	29,913	n.d.	-	-	-	-
	Triolein	70,981	n.d.	-	-	-	-
3 mg	Trilaurin	10314	428	3,98436045	11140	463	3,99034732
	Triolein	122564	2636	2,10543131	135388	3119	2,25187175
5 mg	Trilaurin	18702	337	1,77005095	16597	285	1,6881886
	Triolein	226264	1721	0,75487422	198625	1526	0,76242437

**Tabell V.12:** Gjennomsnittlig areal med standardavvik av FAME etter GC-analyse av omesteret TAG eluert med 1 mL + 2 mL heptan:dietyleter. (93:7) og beregnet gjennomsnittlig gjennomblødning med standardavvik.

		A1. fraksjon	Std.	A2. fraksjon	Std	Gj.blødning (%)	Std.
		1 mg	Trilaurin	15	-	n.d.	-
Triolein	38		-	n.d.	-	-	-
2 mg	Trilaurin	30	-	n.d.	-	-	-
	Triolein	71	-	n.d.	-	-	-
3 mg	Trilaurin	10727	584	446	25	3,987	0,004
	Triolein	128976	9068	2878	342	2,2	0,1
5 mg	Trilaurin	17650	1488	311	37	1,73	0,06
	Triolein	212445	19544	1624	138	0,759	0,005

**Tabell V.13:** Areal av FAME etter GC-analyse av omesteret DAG eluert med 1 mL + 2 mL heptan:dietyleter (93:7) i 2 paralleller og beregnet gjennombødning.

		1			2		
		A1	A2	Gj.blødning (%)	A1	A2	Gj.blødning (%)
1 mg	Dicaprin	n.d.	13061	-	n.d.	13381	-
	Diolein	trace	17190	-	trace	17368	-
2 mg	Dicaprin	n.d.	19094	-	n.d.	23450	-
	Diolein	n.d.	30144	-	376	39740	0,94
3 mg	Dicaprin	n.d.	31083	-	n.d.	28963	-
	Diolein	604	60843	0,98	806	53445	1,49

**Tabell V.14:** Gjennomsnittlig areal med standardavvik av FAME etter GC-analyse av omesteret TAG eluert med 1 mL + 2 mL hepotan:dietyleter. (93:7) og beregnet gjennomsnittlig gjennombødning med standardavvik.

		A1. fraksjon	Std.	A2. fraksjon	Std	Gj.blødning (%)	Std.
1 mg	Dicaprin	n.d.	-	13221	226	-	-
	Diolein	n.d.	-	17279	126	-	-
2 mg	Dicaprin	n.d.	-	21272	3080	-	-
	Diolein	188	266	34942	6785	0,5	0,7
3 mg	Dicaprin	n.d.	-	30023	1499	-	-
	Diolein	705	143	57144	5231	1,2	0,4

Vedlegg 6 – Validering av metode

Det ble utført SPE av to standardprøver i tre paralleller som inneholdt (1) trilaurin, tristearin, diolein, dicaprin og monocaprylin (2) triolein, dipalmitin, dicaprylin, monostearin og monomyristin. Fraksjonene ble omestret og analysert på GC-MS. Tabell V.15 – V.19 viser de kromatografiske arealene, beregnet utbytte og gjennomblodning. En kontrollprøve ble omestret og analysert på GC-MS og brukt til å beregne utbytte.

**Tabell V.15:** Kromatografiske areal av FAME i første parallell etter separasjon av nøytrale lipider i tre fraksjoner, analysert på GC-MS.

	1					
	FA	A1.fraksjon	A2.fraksjon	A3.fraksjon	Utbytte (%)	Gj.blødning (%)
<b>Trilaurin</b>	C12:0	2018	65	n.d.	97,3	3,12
<b>Tristearin</b>	C18:0	1092	11	n.d.	108,1	1,0
<b>Triolein</b>	C18:1	2397	45	n.d.	87,1	1,84
<b>Dicaprylin</b>	C8:0	n.d.	1527	n.d.	93,3	-
<b>Dicaprin</b>	C10:0	Spor	4877	n.d.	101,8	-
<b>Dipalmitin</b>	C16:0	n.d.	317	n.d.	89,5	-
<b>Diolein</b>	C18:1	21	5879	n.d.	102,6	0,4
<b>Monocaprylin</b>	C8:0	n.d.	n.d.	2836	100,1	-
<b>Monomyristin</b>	C14:0	n.d.	n.d.	307	90,3	-
<b>Monostearin</b>	C18:0	n.d.	n.d.	283	75,9	-

**Tabell V.16:** Kromatografiske areal av FAME i andre parallell etter separasjon av nøytrale lipider i tre fraksjoner, analysert på GC-MS.

	2					
	FA	A1.fraksjon	A2.fraksjon	A3.fraksjon	Utbytte (%)	Gj.blødning (%)
<b>Trilaurin</b>	C12:0	1812,0	64,0	n.d.	87,6	3,4
<b>Tristearin</b>	C18:0	881	13	n.d.	88,5	1,5
<b>Triolein</b>	C18:1	2773	39	n.d.	100,2	1,4
<b>Dicaprylin</b>	C8:0	n.d.	1652	n.d.	100,9	-
<b>Dicaprin</b>	C10:0	n.d.	4453	n.d.	92,9	-
<b>Dipalmitin</b>	C16:0	n.d.	312	n.d.	88,1	-
<b>Diolein</b>	C18:1	36	5437,00	n.d.	94,9	0,7
<b>Monocaprylin</b>	C8:0	n.d.	n.d.	2631	92,8	-
<b>Monomyristin</b>	C14:0	n.d.	n.d.	347	102,1	-
<b>Monostearin</b>	C18:0	n.d.	n.d.	289	77,5	-

**Tabell V.17:** Kromatografiske areal av FAME i tredje parallell etter separasjon av nøytrale lipider i tre fraksjoner, analysert på GC-MS.

	FA	3			Utbytte (%)	Gj.blødning (%)
		A1.fraksjon	A2.fraksjon	A3.fraksjon		
<b>Trilaurin</b>	C12:0	-	-	-	-	-
<b>Tristearin</b>	C18:0	-	-	-	-	-
<b>Triolein</b>	C18:1	2797,0	31,0	n.d.	100,8	1,1
<b>Dicaprylin</b>	C8:0	n.d.	1668,0	n.d.	101,9	-
<b>Dicaprin</b>	C10:0	-	-	-	-	-
<b>Dipalmitin</b>	C16:0	n.d.	379,0	n.d.	107,1	-
<b>Diolein</b>	C18:1	-	-	-	-	-
<b>Monocaprylin</b>	C8:0	-	-	-	-	-
<b>Monomyristin</b>	C14:0	n.d.	n.d.	354,0	104,1	-
<b>Monostearin</b>	C18:0	-	-	-	-	-

**Tabell V.18:** Gjennomsnittlig kromatografisk areal med standardavvik av omestret TAG, DAG og MAG i tre fraksjoner etter separasjon ved SPE, analysert på GC-MS.

	FA	A1.fraksjon	Std	A2.fraksjon	Std	A3.fraksjon	Std
<b>Trilaurin</b>	C12:0	1915	146	64,5	0,7	n.d.	-
<b>Tristearin</b>	C18:0	987	149	12	1	n.d.	-
<b>Triolein</b>	C18:1	2656	224	38	7	n.d.	-
<b>Dicaprylin</b>	C8:0	n.d.	-	1616	77	n.d.	-
<b>Dicaprin</b>	C10:0	n.d.	-	4665	300	n.d.	-
<b>Dipalmitin</b>	C16:0	n.d.	-	336	37	n.d.	-
<b>Diolein</b>	C18:1	29	11	5658	313	n.d.	-
<b>Monocaprylin</b>	C8:0	n.d.	-	n.d.	-	2734	145
<b>Monomyristin</b>	C14:0	n.d.	-	n.d.	-	336	25
<b>Monostearin</b>	C18:0	n.d.	-	n.d.	-	286	4

**Tabell V.19:** Areal av FAME i omestret kontrollprøve etter GC-analyse, beregnet utbytte av TAG, DAG og MAG med standardavvik og beregnet gjennomsnittlig gjennomblødning med standardavvik.

	FA	A <sub>kontroll</sub>	Utbytte (%)	Std	Gj.blødning (%)	Std
<b>Trilaurin</b>	C12:0	2142	92	7	3,3	0,2
<b>Tristearin</b>	C18:0	1010	98	14	1,2	0,3
<b>Triolein</b>	C18:1	2805	96	8	1,4	0,4
<b>Dicaprylin</b>	C8:0	1637	99	5	-	-
<b>Dicaprin</b>	C10:0	4792	97	6	-	-
<b>Dipalmitin</b>	C16:0	354	95	11	-	-
<b>Diolein</b>	C18:1	5729	99	5	0,5	0,2
<b>Monocaprylin</b>	C8:0	2835	96	5	-	-
<b>Monomyristin</b>	C14:0	340	99	7	-	-
<b>Monostearin</b>	C18:0	373	77	1	-	-

Vedlegg 7 – FAME og IS

Fettsyremetylesternes molekylvekt og inverse relative responsfaktor er gitt i tabell V.19.

Mengde IS tilsatt 1,0 mL melk er gitt i tabell V.20.

**Tabell V.20:** Fettsyremetylesternes molekylvekt og inverse relative responsfaktor

<b>FAME</b>	<b>RRF<sup>-1</sup></b>	<b>MW (g/mol)</b>
C4:0	0,75	88,11
C6:0	0,75	116,16
C8:0	0,90	144,22
C10:0	0,95	172,27
C11:0	1,00	186,3
C12:0	1,05	200,33
C13:0	1,23	214,35
C14:0	1,12	228,38
C15:0 <i>iso</i>	1,22	242,41
C15:0 <i>anteiso</i>	1,22	242,41
C14:1	1,24	226,38
C15:0	1,22	242,41
C16:0 <i>iso</i>	1,22	256,43
C16:0	1,22	256,43
C17:0 <i>iso</i>	1,22	270,46
C16:1	1,18	254,43
C17:0	1,22	270,46
C18:0	1,19	284,48
C18:1	1,16	282,48
C18:1	1,16	282,48
C19:0	1,00	298,52
C18:2	1,04	280,48
C20:0	1,17	312,54
C18:3	0,98	278,48
C18:2	1,04	280,48

**Tabell V.21:** Internstandard tilsatt i 1,0 mL fordøyd og ufordøyd helmelk

	<b>Ufordøyd IS (mol)</b>	<b>Fordøyd IS (mol)</b>
C11:0 TAG	7,53895E-06	7,53895E-06
C19:0 TAG	8,03342E-06	8,03342E-06
C11:0 FFA	2,68384E-07	5,36769E-06
C19:0 FFA	3,34986E-07	8,37465E-06

Vedlegg 8 – Beregninger ufordøyd melk

Lipider fra ufordøyd melk ble separert i fraksjonene TAG, DAG, MAG, og FFA ved SPE-SPE. Fraksjonene ble derivatisert til FAME og analysert på GC-MS. De kromatografiske arealene og beregnet konsentrasjon av fettsyrene er gitt i tabell V.22 – V.25. Gjennomsnitt og standardavvik er gitt i tabell V.26.

**Tabell V.22:** Kromatografiske areal av de omestrede fettsyrene i TAG-fraksjonen etter separasjon av lipider i ufordøyd melk ved SPE. Beregnet fettsyrekonsentrasjon og sum SFA og UFA.

FA	TAG			TAG			TAG		
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)
C6:0	3798	2,4E-06	280,7	3052	2,5E-06	295,0	2809	2,5E-06	285,2
C8:0	3280	1,7E-06	250,8	2553	1,8E-06	255,3	2387	1,7E-06	250,7
C10:0	9186	4,6E-06	795,0	7316	4,8E-06	827,9	6800	4,7E-06	808,2
C12:0	12714	5,8E-06	1157,6	9901	5,9E-06	1178,9	9059	5,7E-06	1132,9
C13:0	353	1,4E-07	29,4	249	1,3E-07	27,1	223	1,2E-07	25,5
C14:0	47719	2,0E-05	4643,7	37065	2,1E-05	4716,8	34184	2,0E-05	4568,8
C15:0 iso	1036	1,4E-07	33,4	748	1,5E-07	36,1	677	1,5E-07	36,0
C15:0 anteiso	1884	2,5E-07	60,7	1409	2,8E-07	68,0	1299	2,8E-07	69,0
C15:0	4603	6,1E-07	148,4	3374	6,7E-07	162,8	3035	6,7E-07	161,3
C16:0 iso	1192	4,7E-07	119,6	830	4,2E-07	108,9	702	3,8E-07	96,7
C16:0	143768	5,6E-05	14421,4	109132	5,6E-05	14315,5	99000	5,3E-05	13639,0
C17:0 iso	2253	3,0E-07	81,0	1665	3,3E-07	89,6	1483	3,3E-07	87,9
17:0 anteiso	1979	2,6E-07	71,2	1348	2,7E-07	72,6	1195	2,6E-07	70,9
C17:0	2321	3,1E-07	83,5	1586	3,2E-07	85,4	1420	3,1E-07	84,2
C18:0	67538	9,2E-06	2619,7	51104	1,0E-05	2966,5	44499	1,0E-05	2845,3
C20:0	921	1,3E-07	39,9	589	1,2E-07	38,2	511	1,2E-07	36,5
<b>Sum SFA</b>			<b>24836,1</b>			<b>25244,5</b>			<b>24198,0</b>
C14:1	3263	4,3E-07	96,7	2525	4,9E-07	111,9	2256	4,9E-07	110,2
C16:1	5246	7,2E-07	183,5	3826	7,9E-07	200,3	3429	7,8E-07	197,8
C18:1	11268	1,6E-06	445,2	8452	1,8E-06	499,8	7470	1,7E-06	486,5
C18:1cis9	119595	1,7E-05	4725,4	87590	1,8E-05	5179,2	78842	1,8E-05	5135,2
C18:2cis9,12	6516	1,0E-06	285,1	4611	1,1E-06	302,0	4136	1,1E-06	298,3
C18:3cis9,12,15	1400	2,3E-07	64,5	971	2,4E-07	67,0	866	2,4E-07	65,8
C18:2cis9,t11	2815	4,4E-07	123,2	1935	4,5E-07	126,7	1750	4,5E-07	126,2
<b>Sum UFA</b>			<b>5923,7</b>			<b>6486,9</b>			<b>6420,1</b>



**Tabell V.23:** Kromatografiske areal av de omestrede fettysere i TAG-fraksjonen etter separasjon av lipider i ufordøyd melk ved SPE. Beregnet fettsyrekonsentrasjon og sum SFA og UFA.

FA	DAG			DAG			DAG		
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)
C6:0	335	2,1E-07	24,8	162	1,3E-07	15,7	217	1,9E-07	22,0
C8:0	272	1,4E-07	20,8	136	9,4E-08	13,6	173	1,3E-07	18,2
C10:0	791	4,0E-07	68,5	391	2,6E-07	44,2	506	3,5E-07	60,1
C12:0	1162	5,3E-07	105,8	598	3,6E-07	71,2	752	4,7E-07	94,0
C13:0	97	3,8E-08	8,1	62	3,1E-08	6,7	78	4,2E-08	8,9
C14:0	4996	2,1E-06	486,2	2468	1,4E-06	314,1	3090	1,8E-06	413,0
C15:0 iso	87	1,2E-08	2,8	43	8,6E-09	2,1	52	1,1E-08	2,8
C15:0 anteiso	174	2,3E-08	5,6	73	1,5E-08	3,5	96	2,1E-08	5,1
C15:0	441	5,9E-08	14,2	412	8,2E-08	19,9	244	5,3E-08	13,0
C16:0 iso	134	1,8E-08	4,6	106	5,4E-08	13,9	82	4,4E-08	11,3
C16:0	15490	2,1E-06	528,3	7472	3,8E-06	980,1	9211	4,9E-06	1269,0
C17:0 iso	194	2,6E-08	7,0	126	2,5E-08	6,8	140	3,1E-08	8,3
C17:0 anteiso	152	2,0E-08	5,5	62	1,2E-08	3,3	83	1,8E-08	4,9
C17:0	182	2,4E-08	6,5	87	1,7E-08	4,7	127	2,8E-08	7,5
C18:0	5269	7,2E-07	204,4	2484	5,1E-07	144,2	3075	6,9E-07	196,6
C20:0	42	5,8E-09	1,8	18	3,7E-09	1,2		0,0E+00	0,0
<b>Sum SFA</b>			<b>1494,7</b>			<b>1645,2</b>			<b>2134,8</b>
C14:1	267	3,5E-08	7,9	121	2,4E-08	5,4	158	3,4E-08	7,7
C16:1	422	5,8E-08	14,8	190	3,9E-08	9,9	254	5,8E-08	14,6
C18:1	583	8,2E-08	23,0	323	6,8E-08	19,1	329	7,6E-08	21,4
C18:1cis9	8697	1,2E-06	343,6	4022	8,4E-07	237,8	5101	1,2E-06	332,2
C18:2cis9,12	460	7,2E-08	20,1	178	4,2E-08	11,7	237	6,1E-08	17,1
C18:3cis9,12,15	106	1,8E-08	4,9	60	1,5E-08	4,1		0,0E+00	0,0
C18:2cis9,t11	159	2,5E-08	7,0	73	1,7E-08	4,8		0,0E+00	0,0
<b>Sum UFA</b>			<b>421,3</b>			<b>292,8</b>			<b>393,1</b>

**Tabell V.24:** Kromatografiske areal av de omestrede fettysere i MAG-fraksjonen etter separasjon av lipider i ufordøyd melk ved SPE. Beregnet fettysyrekonentrasjon og sum SFA og UFA.

FAME	MAG			MAG			MAG		
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)
C6:0	n.d.			n.d.			n.d.		
C8:0	78	4,1E-08	6,0	n.d.			16	1,2E-08	1,7
C10:0	28	1,4E-08	2,4	18	1,2E-08	2,0	36	2,5E-08	4,3
C12:0	79	3,6E-08	7,2	48	2,9E-08	5,7	76	4,7E-08	9,5
C13:0	n.d.			n.d.			n.d.		
C14:0	190	8,1E-08	18,5	74	4,1E-08	9,4	145	8,5E-08	19,4
C15:0 iso	n.d.			n.d.			n.d.		
C15:0 anteiso	n.d.			n.d.			n.d.		
C15:0	n.d.			n.d.			n.d.		
C16:0 iso	n.d.			n.d.			n.d.		
C16:0	368	1,4E-07	36,9	252	1,3E-07	33,1	461	2,5E-07	63,5
C17:0 iso	n.d.			n.d.			n.d.		
C17:0 anteiso	n.d.			n.d.			n.d.		
C17:0	n.d.			n.d.			n.d.		
C18:0	182	2,5E-08	7,1	134	2,7E-08	7,8	198	4,5E-08	12,7
C20:0	n.d.			n.d.			n.d.		
<b>Sum SFA</b>			<b>78,0</b>			<b>58,0</b>			<b>111,0</b>
C14:1	n.d.			n.d.			n.d.		
C16:1	n.d.			n.d.			n.d.		
C18:1	n.d.			n.d.			n.d.		
C18:1 cis9	136	1,9E-08	5,4	n.d.			n.d.		
C18:2 cis9,12	n.d.			n.d.			n.d.		
C18:3 cis9,12,15	n.d.			n.d.			n.d.		
C18:2 cis9,t11	n.d.			n.d.			n.d.		
<b>Sum UFA</b>			<b>5,4</b>			<b>0,0</b>			<b>0,0</b>

**Tabell V.25:** Kromatografiske areal av de omestrede fettysere i FFA-fraksjonen etter separasjon av lipider i ufordøyd melk ved SPE. Beregnet fettysyrekonentrasjon og sum SFA og UFA.

FA	FFA			FFA			FFA		
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)
C6:0	34	2,1E-08	2,4	23	1,7E-08	2,0	33	2,5E-08	2,9
C8:0	38	2,0E-08	2,8	28	1,7E-08	2,5	30	1,9E-08	2,7
C10:0	102	5,0E-08	8,6	61	3,5E-08	6,1	100	6,0E-08	10,3
C12:0	245	1,1E-07	21,7	177	9,3E-08	18,5	190	1,0E-07	20,6
C13:0	n.d.			39	1,7E-08	3,7	n.d.		
C14:0	613	2,5E-07	58,0	391	1,9E-07	43,8	485	2,5E-07	56,2
C15:0 iso	63	1,1E-08	2,8	49	1,1E-08	2,8	27	6,4E-09	1,6
C15:0 anteiso	n.d.			n.d.	0,0E+00		n.d.		

Vedlegg 8 – Beregninger ufordøyd melk

C15:0	79	1,4E-08	3,5	46	1,1E-08	2,6	59	1,4E-08	3,4
C16:0 iso	n.d.			n.d.	0,0E+00		n.d.		
C16:0	3320	1,3E-06	324,0	2468	1,1E-06	284,7	2832	1,3E-06	338,5
C17:0 iso	n.d.			n.d.	0,0E+00		n.d.		
C17:0 anteiso	n.d.			n.d.	0,0E+00		n.d.		
C17:0	n.d.			n.d.	0,0E+00		n.d.		
C18:0	2184	4,0E-07	114,9	1683	4,0E-07	114,7	1793	4,4E-07	124,0
C20:0	44	8,3E-09	2,6	279	6,8E-08	21,2	284	7,0E-08	21,9
<b>Sum SFA</b>			<b>541,3</b>			<b>502,6</b>			<b>582,1</b>
C14:1	28	5,0E-09	1,1	24	5,5E-09	1,2	33	7,7E-09	1,7
C16:1	n.d.			n.d.			n.d.		
C18:1	362	6,9E-08	19,4	295	7,3E-08	20,5	286	7,1E-08	20,1
C18:1cis9	1214	2,3E-07	65,1	763	1,9E-07	53,0	869	2,2E-07	61,2
C18:2cis9,12	63	1,3E-08	3,7	n.d.			n.d.		
C18:3cis9,12,15	78	1,8E-08	4,9	16	4,7E-09	1,3	n.d.		
C18:2cis9,t11	18	3,8E-09	1,1	n.d.			n.d.		
<b>Sum UFA</b>			<b>95,3</b>			<b>76,0</b>			<b>83,1</b>

**Tabell V.26:** Gjennomsnittlig fettsyrekonsentrasjon i TAG-, DAG-, MAG- og FFA-fraksjonene med standardavvik etter SPE av lipider fra ufordøyd helmelk.

FA	TAG <sub>Gjennomsnitt</sub>		DAG <sub>Gjennomsnitt</sub>		MAG <sub>Gjennomsnitt</sub>		FFA <sub>Gjennomsnitt</sub>	
	C (µg/mL)	STD	C (µg/mL)	STD	C (µg/mL)	STD	C (µg/mL)	STD
C6:0	287	7	18,8	4,5	0	0	2,4	0,5
C8:0	252,3	2,6	15,9	3,6	2,5	3,1	2,7	0,2
C10:0	810,4	16,6	52,2	12,3	2,9	1,2	8,3	2,1
C12:0	1156,5	23	82,6	17,6	7,5	1,9	20,3	1,6
C13:0	27,3	2	7,8	1,1	0	0	1,2	2,2
C14:0	4643,1	74	363,5	86,4	15,8	5,5	52,7	7,8
C15:0 iso	35,2	1,5	2,4	0,4	0	0	2,4	0,7
C15:0 anteiso	65,9	4,5	4,3	1,1	0	0	0	0
C15:0	157,5	7,9	16,4	3,7	0	0	3,2	0,5
C16:0 iso	108,4	11,4	12,6	4,8	0	0	0	0
C16:0	14125,3	424,5	1124,6	373,3	44,5	16,6	315,7	27,8
C17:0 iso	86,2	4,5	7,5	0,8	0	0	0	0
C17:0 anteiso	71,5	0,9	4,1	1,1	0	0	0	0
C17:0	84,4	1	6,1	1,4	0	0	0	0
C18:0	2810,5	176	170,4	32,7	9,2	3	117,9	5,3
C20:0	38,2	1,7	0,6	0,9	0	0	15,3	11
<b>ΣSFA</b>	<b>24759,5</b>	<b>527,4</b>	<b>1758,2</b>	<b>334,6</b>	<b>82,4</b>	<b>26,8</b>	<b>542</b>	<b>39,8</b>
C14:1	106,3	8,4	6,5	1,4	0	0	1,4	0,3
C16:1	193,9	9	12,3	2,7	0	0	0	0
C18:1	477,2	28,5	20,3	2	0	0	20	0,6

Vedlegg 8 – Beregninger ufordøyd melk

C18:1cis9	5013,3	250,3	285	58,1	1,8	3,1	59,8	6,2
C18:2cis9,12	295,1	8,9	14,4	3,8	0	0	1,2	2,2
C18:3cis9,12,15	65,8	1,2	2,1	2,6	0	0	2,1	2,5
C18:2cis9,t11	125,4	1,9	2,4	1,5	0	0	0,4	0,6
<b>ΣUFA</b>	<b>6276,9</b>	<b>307,7</b>	<b>369,1</b>	<b>67,5</b>	<b>1,8</b>	<b>3,1</b>	<b>84,8</b>	<b>9,8</b>

Vedlegg 9 – Beregninger fordøyd melk

Lipider fra fordøyd melk ble separert i fraksjonene TAG, DAG, MAG, og FFA ved SPE.

Fraksjonene ble derivatisert til FAME og analysert på GC-MS. De kromatografiske arealene og beregnet konsentrasjon av fettsyrene er gitt i tabell V.27 – V.30. Gjennomsnitt og standardavvik er gitt i tabell V.31.

**Tabell V.27:** Kromatografiske areal av de omestrede fettsyrer i TAG-fraksjonen etter separasjon av lipider i fordøyd melk ved SPE. Beregnet fettsyrekonsentrasjon og sum SFA og UFA.

FAME	TAG			TAG			TAG		
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)
C6:0	94	6,8E-08	8,0	129	7,2E-08	8,4	1665	1,3E-06	146,5
C8:0	328	2,0E-07	28,7	406	1,9E-07	27,4	242	1,5E-07	22,0
C10:0	1039	6,0E-07	102,9	1389	6,2E-07	106,1	986	5,9E-07	101,6
C12:0	1386	7,2E-07	144,4	1931	7,7E-07	155,1	1349	7,3E-07	146,2
C13:0	70	3,1E-08	6,7	76	2,6E-08	5,6		0,0E+00	0,0
C14:0	5323	2,6E-06	592,8	7429	2,8E-06	637,9	5064	2,6E-06	586,6
C15:0 iso	102	1,8E-08	4,3	144	1,8E-08	4,4	94	1,8E-08	4,3
C15:0 anteiso	184	3,2E-08	7,7	252	3,2E-08	7,7	171	3,2E-08	7,8
C15:0	376	6,5E-08	15,7	481	6,1E-08	14,7	365	6,9E-08	16,7
C16:0 iso	107	4,8E-08	12,3	154	5,3E-08	13,6	102	4,7E-08	12,2
C16:0	13451	6,0E-06	1544,2	18742	6,5E-06	1658,9	13088	6,1E-06	1562,6
C17:0 iso	204	3,5E-08	9,5	293	3,7E-08	10,0	206	3,9E-08	10,5
17:0 anteiso	146	2,5E-08	6,8	235	3,0E-08	8,0	156	2,9E-08	8,0
C17:0	136	2,3E-08	6,3	206	2,6E-08	7,0	127	2,4E-08	6,5
C18:0	4349	7,7E-07	218,0	6042	7,8E-07	222,3	4298	8,3E-07	236,7
C20:0	55	9,9E-09	3,1	84	1,1E-08	3,5	54	1,1E-08	3,3
<b>Sum SFA</b>			<b>2711,2</b>			<b>2890,6</b>			<b>2871,5</b>
C14:1	370	6,3E-08	14,2	531	6,6E-08	14,9	369	6,9E-08	15,5
C16:1	497	8,8E-08	22,5	765	1,0E-07	25,4	510	1,0E-07	25,3
C18:1	678	1,2E-07	34,6	1135	1,5E-07	42,5	665	1,3E-07	37,3
C18:1cis9	12881	2,3E-06	657,8	18063	2,4E-06	677,0	12446	2,5E-06	698,2
C18:2cis9,12	666	1,3E-07	37,7	975	1,4E-07	40,5	662	1,5E-07	41,1
C18:3cis9,12,15	115	2,5E-08	6,9	177	2,8E-08	7,7	128	3,0E-08	8,4
C18:2cis9,t11	229	4,6E-08	13,0	333	4,9E-08	13,8	228	5,1E-08	14,2
<b>Sum UFA</b>			<b>786,5</b>			<b>821,9</b>			<b>840,1</b>

**Tabell V.28:** Kromatografiske areal av de omestrede fettysere i TAG-fraksjonen etter separasjon av lipider i fordøyd melk ved SPE. Beregnet fettsyrekonsentrasjon og sum SFA og UFA.

FAME	DAG			DAG			DAG		
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)
C6:0	127	9,2E-08	10,74	152	8,5E-08	9,91	130	9,8E-08	11,44
C8:0	472	2,9E-07	41,31	611	2,9E-07	41,23	463	2,9E-07	42,14
C10:0	2452	1,4E-06	242,85	3180	1,4E-06	242,83	2424	1,4E-06	249,69
C12:0	3549	1,8E-06	369,83	4631	1,9E-06	372,06	3577	1,9E-06	387,66
C13:0	133	5,9E-08	12,66	159	5,4E-08	11,67	146	6,7E-08	14,45
C14:0	14713	7,2E-06	1638,62	18717	7,0E-06	1607,17	14905	7,6E-06	1726,42
C15:0 iso	266	4,6E-08	11,08	343	4,3E-08	10,49	268	5,1E-08	12,27
C15:0 anteiso	536	9,2E-08	22,33	703	8,9E-08	21,50	534	1,0E-07	24,44
C15:0	843	1,4E-07	35,13	1355	1,7E-07	41,44	1111	2,1E-07	50,86
C16:0 iso	273	1,2E-07	31,34	353	1,2E-07	31,24	295	1,4E-07	35,22
C16:0	34104	1,5E-05	3915,18	44116	1,5E-05	3904,72	34165	1,6E-05	4079,11
C17:0 iso	480	8,3E-08	22,31	639	8,1E-08	21,80	494	9,3E-08	25,23
C17:0 anteiso	410	7,0E-08	19,06	534	6,7E-08	18,22	403	7,6E-08	20,58
C17:0	325	5,6E-08	15,11	457	5,8E-08	15,59	340	6,4E-08	17,36
C18:0	8576	1,5E-06	429,92	11295	1,5E-06	415,59	8590	1,7E-06	473,08
C20:0		0,0E+00	0,00	111	1,5E-08	4,56	71	1,4E-08	4,37
<b>Sum SFA</b>			<b>6817,48</b>			<b>6770,03</b>			<b>7174,32</b>
C14:1	857	1,4E-07	32,81	1121	1,4E-07	31,50	881	1,6E-07	37,05
C16:1	1293	2,3E-07	58,46	1752	2,3E-07	58,14	1315	2,6E-07	65,32
C18:1	1716	3,1E-07	87,63	2301	3,1E-07	86,24	1675	3,3E-07	93,97
C18:1cis9	26793	4,8E-06	1368,20	34949	4,6E-06	1309,89	26708	5,3E-06	1498,33
C18:2cis9,12	1501	3,0E-07	84,89	2037	3,0E-07	84,55	1546	3,4E-07	96,05
C18:3cis9,12,15	266	5,7E-08	15,85	365	5,7E-08	15,96	275	6,5E-08	18,00
C18:2cis9,t11	500	1,0E-07	28,28	682	1,0E-07	28,31	507	1,1E-07	31,50
<b>Sum UFA</b>			<b>1676,12</b>			<b>1614,60</b>			<b>1840,23</b>

**Tabell V.29:** Kromatografiske areal av de omestrede fettysere i MAG-fraksjonen etter separasjon av lipider i fordøyd melk ved SPE. Beregnet fettsyrekonsentrasjon og sum SFA og UFA.

FA	MAG		MAG		MAG		MAG	
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)
C6:0	81	5,9E-08	6,85	106	6,0E-08	6,91		
C8:0	68	4,1E-08	5,95	42	2,0E-08	2,83		
C10:0	677	3,9E-07	67,05	1150	5,1E-07	87,82		
C12:0	1535	8,0E-07	159,96	2516	1,0E-06	202,14		
C13:0	80	3,6E-08	7,61	137	4,7E-08	10,05		
C14:0	8931	4,4E-06	994,67	14530	5,5E-06	1247,64		
C15:0 iso	159	2,7E-08	6,63	239	3,0E-08	7,31		
C15:0 anteiso	337	5,8E-08	14,04	536	6,8E-08	16,39		
C15:0	564	9,7E-08	23,50	968	1,2E-07	29,60		
C16:0 iso	172	7,7E-08	19,75	388	1,3E-07	34,34		
C16:0	21873	9,8E-06	2511,05	35014	1,2E-05	3099,10		
C17:0 iso	269	4,6E-08	12,51	423	5,3E-08	14,43		
C17:0 anteiso	172	3,0E-08	8,00	305	3,8E-08	10,41		
C17:0	197	3,4E-08	9,16	325	4,1E-08	11,09		
C18:0	3674	6,5E-07	184,18	5947	7,7E-07	218,81		
C20:0		0,0E+00	0,00	72	9,5E-09	2,96		
<b>Sum SFA</b>			<b>4030,89</b>			<b>5001,85</b>		
C14:1	325	5,5E-08	12,44	533	6,6E-08	14,98		
C16:1	623	1,1E-07	28,17	1055	1,4E-07	35,01		
C18:1	321	5,8E-08	16,39	679	9,0E-08	25,45		
C18:1cis9	7837	1,4E-06	400,20	12944	1,7E-06	485,14		
C18:2cis9,12	528	1,1E-07	29,86	919	1,4E-07	38,15		
C18:3cis9,12,15	84	1,8E-08	5,01	150	2,4E-08	6,56		
C18:2cis9,t11	103	2,1E-08	5,83	180	2,7E-08	7,47		
<b>Sum UFA</b>			<b>497,90</b>			<b>612,76</b>		

**Tabell V.30:** Kromatografiske areal av de omestrede fettysere i FFA-fraksjonen etter separasjon av lipider i fordøyd melk ved SPE. Beregnet fettsyrekonsentrasjon og sum SFA og UFA.

FA	FFA		FFA		FFA		FFA		FFA	
	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal	(mol/mL)	(µg/mL)	Areal
C6:0	970	5,4E-07	63,02	1054	6,2E-07	72,47	844	5,3E-07	61,53	
C8:0	1618	7,5E-07	108,75	1607	7,9E-07	114,32	1413	7,4E-07	106,57	
C10:0	5229	2,3E-06	397,73	4931	2,3E-06	396,96	5036	2,5E-06	429,83	
C12:0	6716	2,7E-06	537,46	6178	2,6E-06	523,27	6622	3,0E-06	594,67	
C13:0	164	5,6E-08	11,99	148	5,3E-08	11,45	159	6,1E-08	13,04	
C14:0	22398	8,4E-06	1915,70	20493	8,1E-06	1855,11	22701	9,5E-06	2178,79	
C15:0 iso	387	3,6E-08	8,70	353	5,7E-08	13,76	384	7,0E-08	16,94	
C15:0 anteiso	631	5,9E-08	14,19	556	8,9E-08	21,68	654	1,2E-07	28,85	
C15:0	2282	2,1E-07	51,31	2069	3,3E-07	80,67	2172	4,0E-07	95,82	

Vedlegg 9 – Beregninger fordøyd melk

C16:0 iso	430	1,5E-07	37,91	386	1,4E-07	36,02	414	1,6E-07	40,96
C16:0	85367	2,9E-05	7526,24	78712	2,9E-05	7344,71	80023	3,1E-05	7916,87
C17:0 iso	1026	1,5E-07	40,16	956	1,5E-07	41,59	967	1,8E-07	47,59
C17:0 anteiso	800	1,2E-07	31,31	751	1,2E-07	32,67	756	1,4E-07	37,21
C17:0	1264	1,8E-07	49,48	1122	1,8E-07	48,81	1175	2,1E-07	57,83
C18:0	53294	7,9E-06	2249,55	47833	7,9E-06	2243,96	46027	8,6E-06	2442,87
C20:0	567	8,6E-08	26,74	509	8,5E-08	26,68	500	9,5E-08	29,65
<b>Sum SFA</b>			<b>13070,25</b>			<b>12864,15</b>			<b>14099,04</b>
C14:1	1598	1,5E-07	33,02	1488	2,4E-07	53,31	1508	2,7E-07	61,12
C16:1	2113	3,2E-07	80,45	1965	3,3E-07	83,14	2053	3,9E-07	98,28
C18:1	5600	8,5E-07	240,79	5218	8,8E-07	249,35	5078	9,7E-07	274,54
C18:1cis9	58159	8,9E-06	2500,69	55026	9,3E-06	2629,54	53708	1,0E-05	2903,70
C18:2cis9,12	3400	5,8E-07	161,91	3078	5,8E-07	162,90	3084	6,6E-07	184,66
C18:3cis9,12,15	636	1,1E-07	31,91	590	1,2E-07	32,90	583	1,3E-07	36,78
C18:2cis9,t11	1357	2,3E-07	64,62	1211	2,3E-07	64,09	1171	2,5E-07	70,11
<b>Sum UFA</b>			<b>3113,37</b>			<b>3275,24</b>			<b>3629,20</b>

**Tabell V.31:** Gjennomsnittlig fettsyrekonsentrasjon i TAG-, DAG-, MAG- og FFA-fraksjonene med standardavvik etter SPE av lipider i fordøyd helmelk.

FA	TAG <sub>Gjennomsnitt</sub>		DAG <sub>Gjennomsnitt</sub>		MAG <sub>Gjennomsnitt</sub>		FFA <sub>Gjennomsnitt</sub>	
	C (µg/mL)	STD	C (µg/mL)	STD	C (µg/mL)	STD	C (µg/mL)	STD
C6:0	8,2	0,3	10,7	1,1	6,9	0	65,7	5,9
C8:0	24,7	3,5	41,7	0,5	4,4	2,2	109,9	4
C10:0	103,8	2,3	246,3	4	77,4	14,7	408,2	18,8
C12:0	150,7	5,7	379,9	9,7	181	29,8	551,8	37,8
C13:0	6,1	0,8	13,1	1,4	8,8	1,7	12,2	0,8
C14:0	612,2	28	1666,8	61,8	1121,2	178,9	1983,2	172,1
C15:0 iso	4,4	0,1	11,4	0,9	7	0,5	13,1	4,2
C15:0 anteiso	7,8	0,1	23	1,5	15,2	1,7	21,6	7,3
C15:0	15,7	1	46,1	7,9	26,6	4,3	75,9	22,6
C16:0 iso	12,9	0,8	33,2	2,3	27	10,3	38,3	2,5
C16:0	1610,7	61,6	3991,9	97,8	2805,1	415,8	7595,9	292,4
C17:0 iso	10,3	0,5	23,5	1,8	13,5	1,4	43,1	3,9
C17:0 anteiso	8	0,7	19,4	1,2	9,2	1,7	33,7	3,1
C17:0	6,8	0,4	16,5	1,2	10,1	1,4	52	5
C18:0	229,5	9,8	444,3	29,9	201,5	24,5	2312,1	113,3
C20:0	3,4	0,2	4,5	2,6	1,5	2,1	27,7	1,7
<b>ΣSFA</b>	<b>2824,4</b>	<b>98,5</b>	<b>6920,6</b>	<b>221</b>	<b>4516,4</b>	<b>686,6</b>	<b>13344,5</b>	<b>661,5</b>
C14:1	15,2	0,7	34,3	2,9	13,7	1,8	49,1	14,5
C16:1	25,4	1,7	61,7	4,1	31,6	4,8	87,3	9,6
C18:1	39,9	4	90,1	4,1	20,9	6,4	254,9	17,5
C18:1cis9	687,6	20,2	1404,1	96,5	442,7	60,1	2678	205,8



Vedlegg 10 – Areal av internstandard

C18:2cis9,12	40,8	1,8	90,3	8,1	34	5,9	169,8	12,9
C18:3cis9,12,15	8,1	0,8	17	1,2	5,8	1,1	33,9	2,6
C18:2cis9,t11	14	0,6	29,9	22,3	6,6	1,2	66,3	3,3
<b>ΣUFA</b>	<b>816,2</b>	<b>27,2</b>	<b>1710,3</b>	<b>116,6</b>	<b>555,3</b>	<b>81,2</b>	<b>3339,3</b>	<b>263,8</b>

Vedlegg 10 – Areal av internstandard

Kromatografiske areal av internstandardene ved analyse på GC-MS etter separasjon av TAG, DAG, MAG og FFA i ufordøyde- og fordøyde melkelipider ved SPE.

**Tabell V.32:** Kromatografiske areal av TAG internstandardene C11:0 og C19:0 i første og andre fraksjon etter SPE og beregnet gjennomblødning.

		C11:0		C19:0	
		Fordøyd	Ufordøyd	Fordøyd	Ufordøyd
1	A <sub>1</sub> .fraksjon	12747	14559	37321	48098
	A <sub>2</sub> .fraksjon	1056	1238	988	1413
	<b>GB (%)</b>	<b>7,65</b>	<b>7,84</b>	<b>2,58</b>	<b>2,85</b>
2	A <sub>1</sub> .fraksjon	17102	11566	51548	32588
	A <sub>2</sub> .fraksjon	801	514	647	496
	<b>GB (%)</b>	<b>4,47</b>	<b>4,25</b>	<b>1,24</b>	<b>1,50</b>
3	A <sub>1</sub> .fraksjon	12392	10757	34084	29310
	A <sub>2</sub> .fraksjon	880	745	784	725
	<b>GB (%)</b>	<b>6,63</b>	<b>6,48</b>	<b>2,25</b>	<b>2,41</b>

**Tabell V.33:** Kromatografiske areal av FFA internstandardene C11:0 og C19:0 i FFA-fraksjonen etter SPE.

	C11:0		C19:0	
	Ufordøyd	Fordøyd	Ufordøyd	Fordøyd
1	578	12797	1522	47430
2	489	12091	1175	42676
3	472	11404	1158	37721

**Vedlegg 11 – Total fettsyrekonsentrasjon i helmelk**

Konsentrasjon,  $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$ , av fettsyrer i TAG-, DAG-, MAG- og FFA-fraksjonene i hver parallell ble summert. Konsentrasjonen til NL er også summert for hver parallell. Beregnet gjennomsnitt og standardavvik av de tre parallellene i hver fraksjon for ufordøyde og fordøyde lipider.

**Tabell V.34:** Fettsyrekonsentrasjonen i ufordøyd helmelk.

	Ufordøyd				
	TAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	DAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	MAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	NL $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	FFA $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$
1	30760	1916	83	32759	637
2	31731	1938	58	33727	579
3	30618	2528	111	33257	665
Snitt	31036	2127	84	33248	627
STD	606	347	27	484	44

**Tabell V.35:** Fettsyrekonsentrasjonen i fordøyd helmelk.

	Fordøyd				
	TAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	DAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	MAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	NL $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	FFA $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$
1	3498	8494	4529	16520	16184
2	3713	8385	5615	17712	16139
3	3712	9015			17728
Snitt	3641	8631	5072	17116	16684
STD	124	337	768	843	905

**Tabell V.36:** Differansen i fettsyrekonsentrasjonen mellom fordøyd og ufordøyd helmelk.

	Differanse				
	TAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	DAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	MAG $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	NL $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$	FFA $\left(\frac{\mu g}{mL}\right)$
1	-27262	6578	4445	-16239	15547
2	-28019	6447	5557	-16016	15561
3	-26907	6487			17063
Snitt	-27396	6504	5001	-16127	16057
STD	568	67	786	158	871

## Vedlegg 12 – Total molar fettsyrekonsentrasjon i helmelk

Sum konsentrasjon, (mM), av fettsyrer i TAG-, DAG-, MAG- og FFA-fraksjonene i hver parallell. Konsentrasjonen til NL er også summert for hver parallell. Gjennomsnitt og standardavvik av de tre parallellene i hver fraksjon er beregnet.

**Tabell V.37:** Fettsyrekonsentrasjonen i ufordøyd helmelk.

	Ufordøyd				
	TAG (mM)	DAG (mM)	MAG (mM)	NL (mM)	FFA (mM)
1	124,1	7,9	0,4	132,4	2,5
2	127,8	7,8	0,2	135,8	2,2
3	123,3	10,2	0,5	134,0	2,6
Snitt	125	9	0,4	134	2,4
STD	2	1	0,1	2	0,2

**Tabell V.38:** Fettsyrekonsentrasjonen i fordøyd helmelk.

	Fordøyd				
	TAG (mM)	DAG (mM)	MAG (mM)	NL (mM)	FFA (mM)
1	14,1	34,3	18,3	66,6	64,1
2	14,9	33,8	22,7	71,4	63,9
3	15,5	36,3			70,1
Snitt	14,8	35	20	69	66
STD	0,7	1	3	3	4

**Tabell V.39:** Differansen i fettsyrekonsentrasjon mellom fordøyd og ufordøyd helmelk.

	Differanse				
	TAG (mM)	DAG (mM)	MAG (mM)	NL (mM)	FFA (mM)
1	-110,0	26,3	17,9	-65,8	61,6
2	-112,8	26,0	22,4	-64,4	61,6
3	-107,8	26,1			67,5
Snitt	-110	26,1	20	-65	64
STD	3	0,2	3	1	3

### Vedlegg 13 – Molar lipidkonsentrasjon i helmelk

Sum konsentrasjon, (mM), av TAG, DAG, MAG og FFA i hver parallell av ufordøyde og fordøyde lipider, kalkulert fra tabell V.36 – V.38. Konsentrasjonen til NL er også summert for hver parallell. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet av de tre parallellene i hver fraksjon.

**Tabell V.40:** Konsentrasjon av TAG, DAG, MAG, FFA, og NL i ufordøyd helmelk.

	Ufordøyd				
	TAG (mM)	DAG (mM)	MAG (mM)	NL (mM)	FFA (mM)
1	41,4	4,0	0,4	45,7	2,5
2	42,6	3,9	0,2	46,7	2,2
3	41,1	5,1	0,5	46,7	2,6
Snitt	41,7	4,3	0,4	46,4	2,4
STD	0,8	0,7	0,1	0,6	0,2

**Tabell V.41:** Konsentrasjon av TAG, DAG, MAG, FFA, og NL i fordøyd helmelk.

	Fordøyd				
	TAG (mM)	DAG (mM)	MAG (mM)	NL (mM)	FFA (mM)
1	4,7	17,1	18,3	40,1	64,1
2	5,0	16,9	22,7	44,5	63,9
3	5,2	18,1	-	-	70,1
Snitt	4,9	17,4	20	42	66,0
STD	0,2	0,7	3	3	4

**Tabell V.42:** Differansen i konsentrasjon av TAG, DAG, MAG, FFA, og NL mellom fordøyd og ufordøyd helmelk.

	Differanse				
	TAG (mM)	DAG (mM)	MAG (mM)	NL (mM)	FFA (mM)
1	-36,7	13,2	17,9	-5,6	61,6
2	-37,6	13,0	22,4	-2,2	61,6
3	-35,9	13,0	-	-	67,5
Snitt	-36,7	13,1	20,2	-3,9	63,6
STD	0,8	0,1	3,2	2,4	3,4



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)