



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021/2022 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Validering av GC-Orbitrap for FAME, FAEE og FAPE analyse

Validation of GC-Orbitrap for FAME, FAEE og
FAPE analysis

Vilde Bårdsen Hustoft

Kjemi

Forord

Alt arbeid på denne masteroppgaven er gjort ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Mastergraden har vært to spennende, lærerike og unike år i Ås til tross for at tiden har vært preget av covid-19. I den anledning vil jeg takke min gode venn Linda Hummervoll som har holdt ut å bo med meg i to år. I tillegg har du vært en god støttespiller for de mange timene med hjemmeskole, sosial isolasjon og for et godt samarbeid i masterskrivingen.

Videre vil jeg takke veileder Professor Dag Ekeberg for hans ekspertise og veiledning på instrumentet og utføring av analyser. Takk for alle gangene du har tatt deg tid til å sitte å diskutere resultater og se på problemstillinger som har oppstått. Vil også takke senior ingeniør Hanne M. Devle for hennes ekspertise på Excel, beregninger og utfordringer jeg har hatt.

Takk til min far for tiden han har brukt til å lese korrektur og ikke minst lest seg opp emner for å hjelpe meg. Vil også takke min mor for god støtte og oppmuntrende ord. Til slutt vil jeg takke venner og familie som også har vært støttende igjennom alle disse årene med skole.

Norges miljø og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2022

Vilde Bårdsen Hustoft

Sammendrag

Etter at det i mange år har vært forsket på lipider ved bruk av GC-FID, GC-MS med sektorinstrument og med kvadrupol har det nå på laboratoriet vårt blitt byttet inn en GC-MS med orbitrap. I sammenheng med dette er målet med denne oppgaven å bli kjent med instrumentet, parameterne og hvilken betydning de har ved analyse av fettsyre metylestere (FAME). I tillegg er det sett videre på fettsyre etylestere (FAEE) og fettsyre propylestere (FAPE) i forhold til FAME.

I denne oppgaven er det benyttet en Exactive GC med Orbitrap til å analysere FAME, FAEE og FAPE. For å lage FAME prøven ble det brukt en mix med 37 ulike FAME. Prøven ble analysert for å finne LOD, LOQ og RRF på de ulike FAME. For de andre alkylestere ble det benyttet en prøve med 15 fettsyrer, som ble omestret til FAEE og FAPE. Deretter ble de også fortynnet til tre ulike konsentrasjoner for å finne LOD, LOQ og RRF.

Det ble også justert på elektronenergien i fra 30-70 eV. Spenningen i C-fellen ble også justert fra 0-2,5 V. Det ble også justert på masseoppløsningen på 15 000, 30 000 og 60 000. Det ble også sett på SIM-analyse ettersom dette i teorien skal gi bedre sensitivitet, men under arbeidet ble det oppdaget at det ikke er en fordel for FAME analyse på GC-MS med orbitrap. Det er derfor ikke lagt mye tid i disse analysene og resultatene.

Det ble konkludert med at instrumentet burde analyseres på en masseoppløsning på 60 000 med en c-felle spenning på 1,5 V, men kan også analyseres på 2 V ved lange karbonkjeder. I tillegg ble det konkludert med at elektron spenningen burde være på 70 eV for FAME, men det kan også være bedre å kjøre 40 eV på lengre karbonkjeder.

Det ble funnet LOD for FAME til å være mellom 0,03 µg/mL og 0,87 µg/mL, og LOQ ble funnet til å være mellom 0,11 µg/mL og 1,93 µg/mL. Videre for FAEE ble det funnet LOD til å være mellom 0,06 µg/mL og 0,64 µg/mL og for LOQ mellom 0,21 µg/mL og 2,15 µg/mL. Til slutt ble LOD for FAPE funnet til å være mellom 0,05 µg/mL og 0,24 µg/mL og LOQ ble funnet til å være mellom 0,18 µg/mL og 1,49 µg/mL. Fettsyre alkylestere er ikke så sammenlignbare ettersom FAME ble kjøpt som ferdig standard, mens FAEE og FAPE ble estrifisert på laboratoriet og vil ikke ha like nøyaktig konsentrasjon. Ut ifra resultatene som ble sett på er alle alkylestere like i økning og minskning mellom alle de ulike fettsyrene for de korteste karbonkjedene. Beregningene av RRF viste at det er ikke like bra resultater for alle FAME på GC med orbitrap som det er på en GC-FID.

Abstract

After many years of research on lipids using GC-FID, GC-MS with sector instruments and with quadrupole, a GC-MS with orbitrap has now been replaced in our laboratory. Because of this, the aim of this thesis is to become familiar with the instrument, the parameters and what significance they have in the analysis of fatty acid methyl esters (FAME). In addition, fatty acid ethyl esters (FAEE) and fatty acid propyl esters (FAPE) have been considered in relation to FAME.

In this thesis, an Exactive GC with Orbitrap GC-MS has been used to analyze FAME, FAEE and FAPE. To make the FAME sample, a mix of 37 different FAMEs was used. The sample was analyzed to find LOD, LOQ and RRF on the various FAME. For the other alkyl esters, a sample of 15 fatty acids was used, which was esterified to FAEE and FAPE. Then they were also diluted to three different concentrations to find LOD, LOQ and RRF.

The electron energy was also adjusted from 30-70 eV. The voltage in the C-trap was also adjusted from 0-2.5 V. Mass resolution was adjusted on the mass resolution of 15 000, 30 000 and 60 000. SIM analysis was also considered as in theory it gives better sensitivity, but during the work it was discovered that there is no advantage for FAME analysis on GC-MS with orbitrap. Therefore, not much time has been put into these analyzes and results.

It was concluded that the instrument should be analyzed at a mass resolution of 60,000, a c-trap voltage of 1.5 V, but can also be analyzed at 2 V for long carbon chains. In addition, it was concluded that the electron voltage should be 70 eV for FAME, but it may also be better to run 40 eV on longer carbon chains.

The LOD for FAME was found to be between 0.03 $\mu\text{g/mL}$ and 0.87 $\mu\text{g/mL}$, and the LOQ was found to be between 0.11 $\mu\text{g/mL}$ and 1.93 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, for FAEE, LOD was found to be between 0.06 $\mu\text{g/mL}$ and 0.64 $\mu\text{g/mL}$ and for LOQ between 0.21 $\mu\text{g/mL}$ and 2.15 $\mu\text{g/mL}$. Finally, the LOD of FAPE was found to be between 0.05 $\mu\text{g/mL}$ and 0.24 $\mu\text{g/mL}$ and the LOQ was found to be between 0.18 $\mu\text{g/mL}$ and 1.49 $\mu\text{g/mL}$. The fatty acid alkyl esters are not so comparable as FAME was purchased as a finished standard, while FAEE and FAPE were esterified in the laboratory and will not have the same exact concentration. Based on the results, all the alkyl esters are equal in increase and decrease between all the different fatty acids for the shortest carbon chains. The calculations of RRF showed that there are not as good results for all FAME on GC with orbitrap as there are on a GC-FID.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
FORKORTELSER	VI
1 INNLEDNING	1
2 TEORI	2
2.1 LIPIDER	2
2.2 KROMATOGRAFI	2
2.2.1 <i>Injektorer til gasskromatograf</i>	2
2.3 DETEKTORER	3
2.3.1 <i>Massespektrometri</i>	3
2.3.1.1 Ionekilde	3
2.3.1.2 Massefilter	4
2.3.1.2.1 Orbitrap	4
2.3.1.2.2 C-Felle og Høy-energi C-felle dissosiasjon (HCD)	5
2.3.1.3 Masseoppløsning	5
2.3.1.4 «Selected ion monitoring» (SIM)	6
2.4 VARIABEL ELEKTRONENERGI (VEV)	6
2.5 DETEKSJONSGRENSE (LOD) OG KVANTITERINGSGRENSE (LOQ)	6
2.6 RELATIV RESPONSAKTOR (RRF)	6
2.7 NØYAKTIGHET OG PRESISJON	7
3 MATERIALER OG METODER	8
3.1 FAME	8
3.2 FETTSYRE ETYLESTER (FAEE)/ FETTSYRE PROPYLESTER (FAPE)	10
3.3 INSTRUMENTER	11
3.3.1 <i>LOD, LOQ og RRF</i>	12
3.3.2 <i>Ulike oppløsninger, C-felle og VeV</i>	12
3.3.3 <i>SIM</i>	13
4 RESULTATER OG DISKUSJON	14
4.1 LOD/LOQ	14
4.1.1 <i>LOD/LOQ for FAME</i>	14
4.1.2 <i>LOD/LOQ for FAEE</i>	16
4.1.3 <i>LOD/LOQ for FAPE</i>	16

4.1.4	Sammenligning av LOD/LOQ for FAME, FAEE og FAPE	17
4.2	AREAL OG S/N	18
4.2.1	Areal og S/N for FAME	18
4.2.2	Areal og S/N for FAEE.....	20
4.2.3	Areal og S/N for FAPE.....	21
4.2.1	Sammenligning av areal for FAME, FAEE og FAPE	23
4.3	RELATIV RESPONSAKTOR	23
4.3.1	RRF for FAME	23
4.3.2	RRF for FAEE.....	25
4.3.3	RRF for FAPE.....	25
4.4	MASSEOPPLØSNING	26
4.5	LOD OG LOQ VED BRUK AV SIM.....	26
4.6	ENDRING AV SPENNINGEN PÅ C-FELLEN	28
4.7	ENDRING AV ELEKTRONENERGIEN	29
4.8	FAME OVER TID.....	31
5	KONKLUSJON	33
6	LITTERATURLISTE	34

Forkortelser

CI: Kjemisk ionisering

EI: Elektronionisering

FA: Fettsyre

FAEE: Fettsyre etylester

FAME: Fettsyre metylester

FAPE: Fettsyre propylester

FID: Flamme ioniserings detektor

GC: Gasskromatografi

HCD: Høy-energi C-felle dissosiasjon

ICH: International Conference on Harmonisation

IS: Intern standard

LC: Væske kromatografi

LOD: Deteksjonsgrense

LOQ: Kvantitasjonsgrense

MS: Massespektrometri

Q: Kvadrupol

RRF: Relativ respons faktor

SIM: "Selected ion monitoring"

TIC: Total ione kromatografi

TOF: "Time of Flight"

VeV: Variabel elektronspenning

1 Innledning

Fettsyrer er en viktig ressurs og er en god energikilde. De er med å beskytte indre organer, inngår med i membraner og cellestrukturer og ikke minst tilfører viktige fettløselige vitaminer. (Anonym, 2016a) Ettersom det er en viktig del av kostholdet er det gjort mye forskning på dette tidligere, der den vanligste forskningen er gjort ved å benytte Gasskromatografi (GC) med flammeionisasjonsdetektor (FID) og Gasskromatografi med massespektrograf (MS). På dette laboratoriet er det i mange år utført lipidforskning på GC-FID og GC-MS, der det har vært både GC-kvadrupol (Q) og GC med EBE-geometri. I vårt laboratorium har nå en GC med sektorinstrument blitt byttet ut med en GC-MS med orbitrap. Årsaken til dette er at orbitrap er et høytoppløsende instrument, som gjør at det vil være enklere å separere ulike topper i kromatogrammet.

I denne oppgaven så er målet å bli kjent med instrumentet, de ulike parameterne og hvilken betydning de har for analysene. De parameterne som ble sett på er masseoppløsningen, c-felle spenning og elektronenergi i ionekilden. Vil også validere eksisterende analysemetode som er utført på GC-MS med sektorinstrument hvor jeg skal se på deteksjonsgrensen (LOD), kvantitasjonsgrensen (LOQ) og relativ responsfaktor (RRF) for fettsyre metylester (FAME). Det vil også bli sett på muligheten for å benytte fettsyre etylestere (FAEE) og fettsyre propylestere (FAPE).

2 Teori

2.1 Lipider

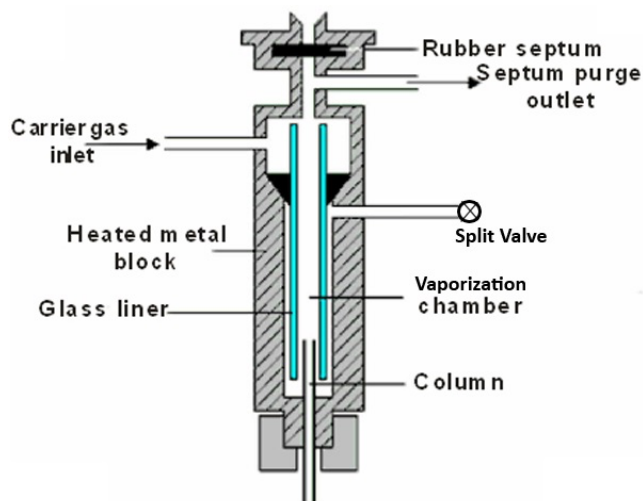
Lipider kan forekomme som mange ulike upolare organiske forbindelser som for eksempel olje, fett og hormoner. De tre hovedtypene lipider er glyserolipider, sfingolipider og steroider. Det som kjennetegner lipider er at de ikke kan løses i vann, men kan løses i upolare løsninger. Triacylglyserider består av ett molekyl glyserol og tre fettsyrer. Fettsyrene (FA) består av en karbonlenke, fra 4 til 36 karbonatomer, som er koblet til en syregruppe. Fettsyrer kan deles inn i mettet, umettet og flerumettede etter hvordan oppbygningen er. Umettete fettsyrer har dobbeltbindinger på fettsyregrener. (Anonym, 2022a; Coultate, 1996) Fettsyrer analyseres ofte med GC ved at de først omdannes til fettsyremetylestere (FAME) (Devle et al., 2009).

2.2 Kromatografi

Kromatografi er forskjellige metoder som brukes til å separere, isolere eller rense stoffer i komplekse blandinger. Kromatografi kan deles inn i flere teknikker, for eksempel gasskromatografi (GC) og væskkromatografi (LC). Felles for all form for kromatografi er at de benytter to faser, en stasjonær og en mobil fase. Den stasjonære fasen er belagt i kolonnen og har til hensikt å retardere analytt mens den mobile fase skal frakte analytt gjennom kolonnen og frem til detektoren. I gasskromatografi er den mobile fasen en gass. Nitrogen, helium, eller hydrogen benyttes som bæregass. Helium er den mest brukte etter som den er mest effektiv og gir høyere hastighet ved det optimale punktet. Siden nitrogen er vesentlig billigere benyttes også den ofte. Nitrogen har lavere optimal hastighet og effektivitet. Hydrogen er også en godt egnet bæregass, men da den er eksplosjonsfarlig må flere sikkerhetstiltak benyttes (Miller, 2009).

2.2.1 Injektorer til gasskromatograf

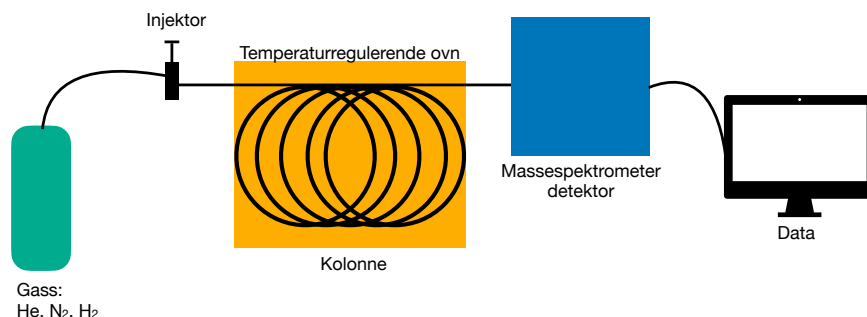
Det finnes en rekke forskjellige injektorer, men jeg har valgt å kun ta for meg splitt/splittless-injektor, (Figur 2-1) da det er denne typen som er benyttet i denne oppgaven. Prøven injiseres med en sprøyte gjennom et septum og inn i en glassliner. Det blir kontinuerlig tilført bæregass. Prøven fordampes i denne innerte glasslinereren på grunn av at temperaturen er vesentlig varmere enn makstempertur som benyttes i metoden. Forskjellen på splitt og splittless-injeksjon er når et stoff injiseres splittless er splitventilen lukket og hele prøven appliseres inn på kolonnen. Ved splitt-injeksjon er det kun en fraksjon av det som injiseres som går inn på kolonnen. Det blir brukt prøvestørrelser i størrelsesorden 0,1-10 μL og ved splittlessinjeksjon injiseres det 1-5 μL . Når det benyttes splittless injeksjon bør prøvene være mest mulig rene for å unngå kontaminering av kolonnen etter injeksjon. Splittless benyttes når man har ekstremt lav konsentrasjon av analytt og er avhengig av optimal følsomhet (Anonym, 2022e; Miller, 2009).



Figur 2-1: Oppbygging av en Splitt/Splittless injektor, (lab-training.com, 2014)

2.3 Detektorer

En kromatograf kan kobles sammen med en rekke ulike detektorer. Eksempler på GC-detektorer er massespektrometer (MS) og flamme-ionisasjonsdetektor (FID). Som viste på Figur 2-2 der kromatografen er koblet sammen med en MS. Uansett detektor bør man validere sin analytiske metode og resultater ut fra betingelser definert av Den internasjonale konferanse om harmonisering (ICH). Disse betingelsene består blant annet av robusthet, linearitet, deteksjon- og kvantiteringsgrense (Miller, 2009), og vil bli gjennomgått i et senere kapittel.



Figur 2-2: Oppsett av GC med MS

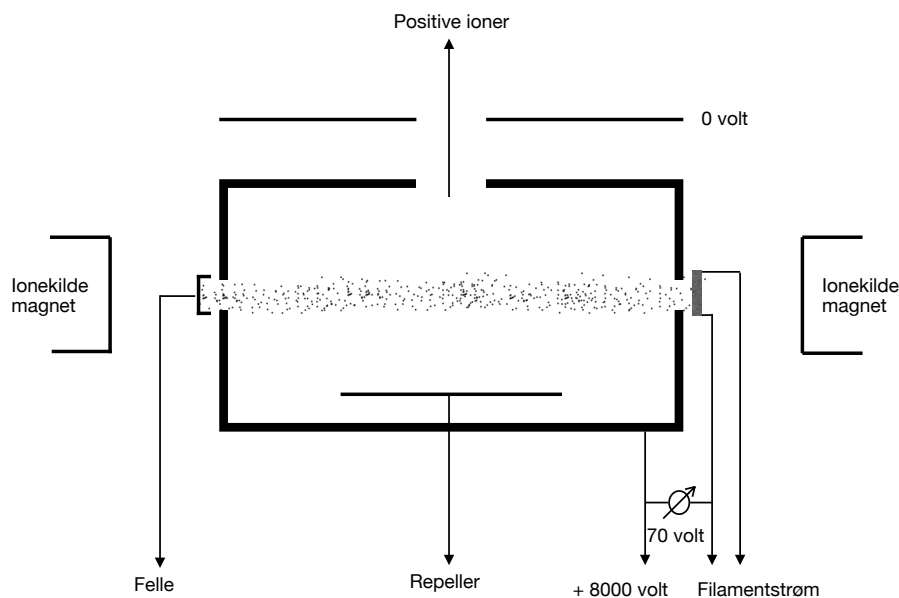
2.3.1 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er et instrument som blir benyttet til å separere ioner med forskjellige masse over ladning, m/z . Alle MS-instrumenter består av en ionekilde, massefilter og en detektor. Atomene/molekylene kan bli ionisert med ulike ioniseringsteknikker ved forskjellige typer ionekilder som f.eks. elektronionisering (EI) eller kjemisk ionisering (CI). Ionene separeres med et massefilter for til slutt å detekteres av en detektor. Også detektorer til massespektrometre finnes det flere forskjellige typer av, som for eksempel faradaycup, fotomultiplikator og elektromultiplikator. Massespektrometri benyttes både til kvantitativ og kvalitativ analyse (Anonym, 2022f).

2.3.1.1 Ionekilde

I et GCMS-instrument slippes bæregass og analytt sammen inn i ionekilden. Det finnes flere metoder for ionisering av analyttmolekylene, men to meget vanlige er kjemisk ionisering og elektronionisering. Kjemisk ionisasjon er en myk ioniseringsmetode som resulterer i lite fragmentering, mens ved bruk av EI (som er en hard ionisasjonsmetode) får man høy fragmenteringsgrad. Under EI-betingelser oppleves ofte at man ikke observerer molekylion, kun fragmentioner.

En ionekilde består av et filament som er vanligvis en wolframtråd som sender ut elektroner når det går strøm gjennom denne, ofte ca. 4 A, som illustrert på Figur 2-3. Spenning mellom filamentet og ionekilden resulterer i at elektronene tiltrekkes ionekilden og får en kinetisk energi som vanligvis er på 70 eV. Ionekildemagneter plassert på utsiden av ionekilden som resulterer i at elektronene får en spiralformet bevegelse gjennom ionekilden og derved øker lengden og oppholdstiden av elektronene inne i ionekilden som i sin tur er med på å øke følsomheten til instrumentet i form av at flere ioner produseres. Ionekilden er påsatt en spenning på f.eks. 8000 V (sektorinstrumenter) for at ionene inne i ionekilden skal ekstraheres ut av ionekilden og sendes inn i de tilhørende massefiltrene. I tillegg er det en repeller inne i ionekilden som har til hensikt å justere oppholdstiden til ionene i ionekilden. Dersom repelleren er negativ er oppholdstiden til ionene i ionehuset lengre enn dersom den er positiv. Når instrumentet tunes er det polaritet og spenning over repelleren som blant annet justeres (Hoffmond, 2007).



Figur 2-3: Skisse av EI-ionekilde som benyttes i sektorinstrumenter

2.3.1.2 Massefilter

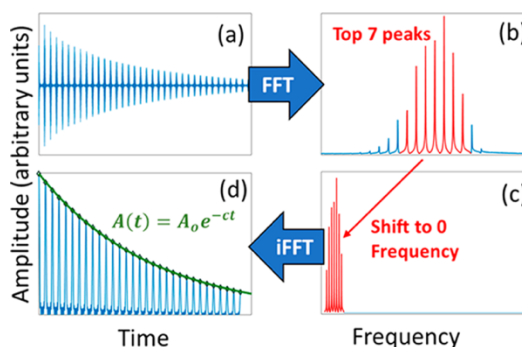
Massefilteret separere ulike ioner med forskjellig m/z fra hverandre. Orbitrap, Time of flight (TOF) og kvadrupol er ofte brukte massefilter. Massefilter kan også ofte bestå av flere sammenstilte massanalytatorer som kalles hybridinstrumenter. I kombinasjon med orbitrap blir ofte kvadrupol brukt. Kvadrupol har fire staver av metall hvor to og to motstående stenger er koblet til hverandre. På den måten vil ionene oscillere gjennom staven ut fra hvilken m/z de har (Dunn, 2011).

2.3.1.2.1 Orbitrap

GC-Orbitrap er som oftest bygd opp med en ionekilde hvor ionene produseres og som deretter sendes gjennom en bøyd «flatapol». Etter flatapolen er det ofte en kvadrupol for så å komme fram, til en c-felle, før de endelig slippes pulsvis inn i selve orbitrapen. Mange av instrumentene kan også ha en HCD kollisjons-celle koblet til c-fellen.

I en bøyd «flatapol» blir ionene sendt igjennom en 90° bue som består av flate metall elektroder. Etter som flatapolen er bøyd vil ikke de nøytrale partiklene bli med inn i massfilteret (Anonym, 2015, 2022f).

En orbitrap er en kombinert massefilter og detektor. Den består av et kammer med to ytre elektroder og en indre elektrode, senterelektrode. Når ionene føres inn i kammeret vil de oscillerer rundt den indre elektroden og mellom de to ytre elektrodene. Ioner med ulik m/z vil derfor bevege seg med ulik hastighet og dermed separeres (Anonym, 2022d). Det er de ytre elektrodene som registrer ionene. Ionene blir detektert med en bildespenning (image current) som er statisk elektrisitet som bygges opp ettersom de ionene er nærme platen. Dette danner forskjellige sinusbølger som blir transformert til ulike frekvenser. Hver ulik masse/ladnings-verdi har ulike frekvenser som deretter danner grunnlaget for massespekteret (Figur 2-4).

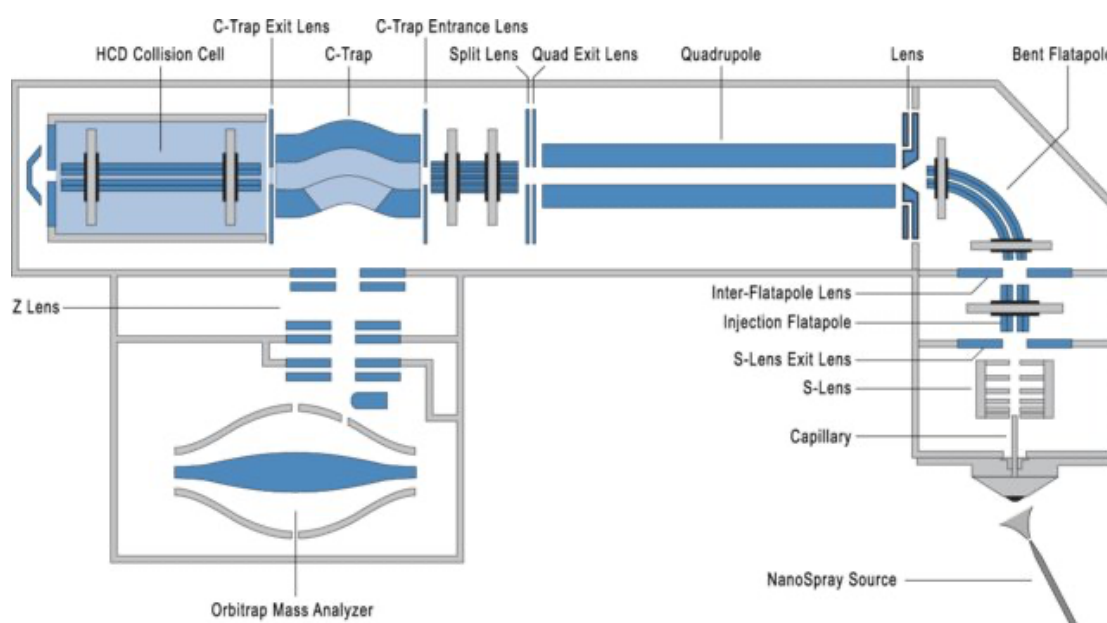


Figur 2-4: Hvordan sinusbølger blir omdannet til kromatogram, (Sanders J.A, 2018)

2.3.1.2.2 C-Felle og Høy-energi C-felle dissosiasjon (HCD)

Massespektrometri hvor man har en orbitrap har også en C-felle, samt mange instrumenter er videre koblet til Høy-energi C-felle dissosiasjon (HCD), som illustrert på Figur 2-5. C-fellen består av flate metallelektroder. Den leder ionene inn i orbitrapen til rett tid og med rett kinetisk energi. Dersom ionene har for høy kinetisk energi, vil de kollidere med en av de ytre elektrodene. Dersom energien er for lav vil de bli sugd inn i senterelektroden. Dersom ioner har samme vekt, vil de bevege seg med samme frekvens og blir vanskelig å skille fra hverandre. Derfor slippes de inn med ulikt mellomrom. I C-fellen samles ionene i felt med samme frekvens hvor de blir kjølt ned ved hjelp av nitrogen. Når frekvensen har minsket nok blir ionene ført videre inn i orbitrapen (Anonym, 2022c).

I C-felle hvor ionene blir stabilisert og kjølt ned kan de bli sendt videre og fragmentert i HCD før de videre blir injisert i selve orbitrapen. HCD gir muligheten for å løse ioner med lavere m/z -verdier som gir bedre muligheter til å detektere flere ulike molekyler (Anonym, 2022b).



Figur 2-5: Oppsett av MS med Orbitrap, (Michalski et al., 2011)

Orbitrapen er designet med det beste fra alle maskefiltrene sammen, hvilket gjør at den har meget høy oppløsning og god presisjon. Orbitrapen er derfor et av de mest nøyaktige instrumentene som er tilgjengelig i dag. Den kan brukes både med gass og væskeinjeksjoner. Hovedforskjellen mellom orbitrap og andre analysatorer er oppløsningen på instrumentene. Etersom orbitrap kan ha høyere oppløsning får man vesentlig bedre masseoppløsning

2.3.1.3 Masseoppløsning

Masseoppløsningen forteller noe om evnen instrumentet har til å skille topper i kromatogrammet fra hverandre. En av fordelene med å bruke et massespektrometer av typen orbitrap er muligheten for høy masseoppløsning. Orbitrap kan gi en oppløsning fra 10 000 til 450 000. Et høyt oppløsende massespektrometer har per definisjon en oppløsning på minst 10 000. En høyere oppløsning vil kunne skille topper som ligger nærmere fra hverandre i massespekteret (Anonym, 2016b; Strupat, 2016).

2.3.1.4 «Selected ion monitoring» (SIM)

Med teknikken «Selected ion monitoring» (SIM) blir det valgt ut et ion med en spesifikk m/z som bli detektert. Denne metoden vil generelt sett gi vesentlig høyere følsomhet enn ved bruk av total ionekromatografi (TIC) der alle ioner detekteres. Ved bruk av SIM kan man velge fragmentioner fra ulike molekyler i forskjellige tidsvinduer. Ettersom C-fellen kan holde på et maksantall av ioner, 3 millioner ladninger, og ikke sender for mange ioner inn i orbitrapen om gangen så vil ikke SIM gi bedre resultater enn TIC (Kaufmann, 2018).

2.4 Variabel elektronenergi (VeV)

Den mest brukt energien på elektroner ved EI er 70 eV, men av og til vil man kunne oppnå bedre følsomhet ved andre elektronenergier. En lavere ioniseringsenergi vil også redusere fragmenteringen, noe som kan gjøre identifisering mer komplisert. Ved behov for molekylion eller høyere intensitet av molekylionet i massespekteret, er lavere energi en mulig vei å gå. Da trengs det ikke å bytte ionekilden slik som ofte må gjøres ved å gå over til for eksempel CI, men kun redusere filamentspenningen. Spenningen på det instrumentet som er benyttet i denne oppgaven kan settes fra 12 eV til 150 eV (Zheng, 2017).

2.5 Deteksjonsgrense (LOD) og Kvantiteringsgrense (LOQ)

Deteksjonsgrense (LOD) er den laveste konsentrasjon av analytt som kan være til stede for at den skal kunne rapporteres. Kvantiteringsgrensen (LOQ) er den minste mengde analytt en prøve kan inneholde for å kvantifiseres (Anonym, 1995). Disse grensene settes ut fra forholdet mellom signalet av toppen og støyen. For hvert molekyl kan man finne et nivå for signal/støy (S/N) ved hjelp av instrumentspesifikke algoritmer. Disse verdiene benyttes til å beregne LOD og LOQ. For å finne LOD benyttes en konsentrasjon der $S/N=3$ og tilsvarende for LOQ, det benyttes en konsentrasjon som gir et $S/N=10$. Det er benyttet formel 1 til å beregne LOD og formel 2 til å beregne LOQ.

$$1. \frac{[FAME/FAEE/FAPE]}{(S/N)} * 3 = LOD$$

$$2. \frac{[FAME/FAEE/FAPE]}{(S/N)} * 10 = LOQ$$

2.6 Relativ responsfaktor (RRF)

Ulike analytter har ulik respons på detektoren. Med respons av analytt menes det arealet som benyttes for å beregne konsentrasjonen til analytten. Disse er konsentrasjonsavhengige. For å beregne RRF for hver FAME benyttes arealet til toppene ved ulike konsentrasjoner, disse blir plottet mot konsentrasjonen. Stigningstallet fra disse kurvene deles på stigningstallet til internstandard. RRF ligger vanligvis på en verdi rundt 1 ved bruk av en enkel detektor som FID.

RRF benyttes med ligningen for å finne konsentrasjon:

$$3. [FAAE] = \frac{Areal_{FAAE} * [IS]}{(Areal_{IS} * RRF_{FAAE})}$$

2.7 Nøyaktighet og presisjon

For å oppnå mest mulig riktige resultater som også skal være repeterbare og reproducerbare, er det viktig med høy grad av nøyaktighet og presisjon. Ved å analysere flere like prøver er det mulig å se ulikhetene mellom prøvene. Dersom det er liten forskjell mellom analysene betyr dette at presisjonen har vært høy. Dersom prøvene er nøyaktig vil dette si at resultatet stemmer godt overens med virkeligheten.

3 Materialer og Metoder

Standardene som er benyttet i analysene for FAME, FAEE og FAPE er listet opp i Tabell 3-1.

Tabell 3-1: Liste over alle standarder som er benyttet og forhandler.

Standarder	Forhandler
Miks FA 61	Larodan AB, Sverige
Supelco 37 Component FAME Mix	Sigma-Aldrich, nå Merck KPGaA, Darmstadt, Tyskland
C19:0 Metyl nonadekanoate	Larodan AB, Sverige

Andre kjemikalier som er benyttet til å lage prøvene med FAME, FAEE og FAPE er listet opp i Tabell 3-2.

Tabell 3-2: Liste over alle kjemikalier og kvalitet som er benyttet samt forhandlere.

Kjemikalier	Kvalitet	Forhandler
n-Heptan	AnalaR NORMAPUR	VWR Chemicals, del av Avantor, Radnor, PA, USA
BF ₃ i etanol, 10 %		Sigma-Aldrich, nå Merck KPGaA, Darmstadt, Tyskland
BF ₃ i propanol, 14%		Sigma-Aldrich, nå Merck KPGaA, Darmstadt, Tyskland
Kloroform	HiPerSolv CHROMANORM	VWR Chemicals, del av Avantor, Radnor, PA, USA

3.1 FAME

Det lages først en løsning med FAME mix (R37) fortynnet med heptan. Dette gjøres med 10 µL prøve R37 (10mg/mL) sammen med 990 µL heptan. Totalkonsentrasjonen til det nye produktet R37 blir da 100 µg/mL. Videre blir det fortynnet et prøverør et til 50 µg/mL, formel 4 og et til 10 µg/mL, formel 5.

Fortynne totalen:

50µg/mL:

$$4. \quad \frac{100 \mu\text{g/mL} \cdot 500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 50 \mu\text{g/mL}$$

10 µg/mL:

$$5. \quad \frac{100 \mu\text{g/mL} \cdot 100 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 10 \mu\text{g/mL}$$

Det ble beregnet ny konsentrasjonen for de ulike FAME i totalkonsentrasjon 100µg/mL:

$$6. \quad \frac{200 \mu\text{g/mL} \cdot 10 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 2 \mu\text{g/mL}$$

$$7. \quad \frac{400 \mu\text{g/mL} \cdot 10 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 4 \mu\text{g/mL}$$

$$8. \quad \frac{600 \mu\text{g/mL} \cdot 10 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 6 \mu\text{g/mL}$$

Til forsøkene hvor det er benyttet FAME ble det kjøpt inn en FAME-standard med 37 ulike FAME, Tabell 3-3, med en konsentrasjon fra 200-600 µg/mL.

Tabell 3-3: Oversikt over innholdet i FAME R37.

Antall karboner	IUPAC navn	Konsentrasjon [µg/mL]
C4:0	Butanoic acid, methyl ester	400
C6:0	Hexanoic acid, methyl ester	400
C8:0	Octanoic acid, methyl ester	400
C10:0	Decanoic acid, methyl ester	400
C11:0	Undecanoic acid, methyl ester	200
C12:0	Dodecanoic acid, methyl ester	400
C13:0	Tridecanoic acid, methyl ester	200
C14:0	Tetradecanoic acid, methyl ester	400
C14:1cis9	9(Z)-Tetradecenoic acid, methyl ester	200
C15:0	Pentadecanoic acid, methyl ester	200
C15:1cis10	10(Z)-Pentadecenoic acid, methyl ester	200
C16:0	Hexadecanoic acid, methyl ester	600
C16:1cis9	9(Z)-Hexadecanoic acid, methyl ester	200
C17:0	Heptadecanoic acid, methyl ester	200
C17:1cis10	10(Z)-Heptadecenoic acid	200
C18:0	Octadecanoic acid, methyl ester	400
C18:1trans9	9(E)-Octadecenoic acid, methyl ester	200
C18:1cis9	9(Z)-Octadecenoic acid, methyl ester	400
C18:2trans9,12	9,12(E,E)-Octadecadienoic acid, methyl ester	200
C18:2cis9,12	9,12(Z,Z)-Octadecadienoic acid, methyl ester	200
C18:3cis6,9,12	6,9,12(Z,Z,Z)-Octadecadienoic acid, methyl ester	200
C20:0	Eicosanoic acid, methyl ester	400
C18:3cis9,12,15	9,12,15(all Z)-Octadecatrienoic acid, methyl ester	200
C20:1cis11	11(Z)-Eicosenoic acid, methyl ester	≤200
C21:0	heneicosanoic acid, methyl ester	200
C20:2cis11,14	11,14(Z,Z)-Eicosadienoic acid, methyl ester	200
C20:3cis8,11,14	8,11,14(all Z)-Eicosatrienoic acid, methyl ester	200
C22:0	Docosanoic acid, methyl ester	400
C20:4cis5,8,11,14	5,8,11,14(all Z)-Eicosatetraenoic acid, methyl ester	200
C20:3cis11,14,17	11,14,17(all Z)-Eicosatrienoic acid, methyl ester	200
C22:1	13(Z)-Docosenoic acid, methyl ester	200
C23:0	Tricosanoic acid, methyl ester	200
C20:5cis5,8,11,14,17	5,8,11,14,17(all Z)-Eicosapentaenoic acid, methyl ester	200
C22:2cis13,16	13,16(Z,Z)-Docosenoic acid, methyl ester	200
C24:0	Tetracosanoic acid, methyl ester	400
C24:1cis15	15(Z)-Tetracosenoic acid, methyl ester	200

3.2 Fettsyre etylester (FAEE)/ Fettsyre propylester (FAPE)

Det ble benyttet 1,0 mL med løst Frie fettsyre mix (10,0 mg/mL) og 1,0 mL løst C19:0 (1,0mg/mL) prøve i kloroform som ble overført til en plastikk tube med skrukork ved hjelp av en Hamilton sprøyte. Ved å tilføre N₂-gass ble kloroform fordampet før prøven ble løst i 1,0 mL bor trifluorid 10-14% i alkohol løsning (etanol og propanol). Prøven ble deretter plassert på vannbad i 10/15 min. Etter nedkjøling under kaldtvann ble det tilsatt 2,0 mL n-heptan og prøven ble ristet på vortex mikser i 2 minutter. Videre ble 1mL med mettet NaCl i vann tilsatt før til slutt ble det øverste laget overført til en GC-vial og oppbevart i fryseren før analyse. Selve prøvene ble laget av Linda Hummervoll (Hummervoll, 2022).

Det ble benyttet prøver som har en totalkonsentrasjon på 5,5 mg/mL. Det ble laget tre ulike konsentrasjoner på hver av de tre FAEE prøvene og FAPE prøvene. Innholdet i miksen med FAEE og FAPE samt konsentrasjon av de ulike fettsyre alkylesterene er listet i Tabell 3-4.

Tabell 3-4: Oversikt over innholdet i FA61, hvor konsentrasjonen til FAEE og FAPE er fortynnet til en total på 110 µg/mL.

Antall karboner	IUPAC navn	Konsentrasjon (µg/ml)
C4:0	Butanoic acid	4
C6:0	Hexanoic acid	2
C8:0	Octanoic acid	1
C10:0	Decanoic acid	3
C12:0	Dodecanoic acid	4
C14:0	Tetradecanoic acid	10
C14:1	9(Z)-Tetradecenoic acid	2
C16:0	Hexadecanoic acid	25,1
C16:1	9(Z)-Hexadecanoic acid	5
C18:0	Octadecanoic acid	10
C18:1	9(Z)-Octadecenoic acid	25
C19:0	Nonadecanoic acid	10
C18:2	9,12(Z,Z)-Octadecadienoic acid	2,9
C18:3	6,9,12(Z,Z,Z)-Octadecadienoic acid	4
C20:0	15(Z)-Tetracosenoic acid	2

Det ble benyttet en prøven med konsentrasjon 5,5 mg/mL som ble fortynne til konsentrasjonen 110 µg/mL (formel 9). Denne prøven ble brukt videre til å fortynne ned til konsentrasjonen 55 µg/mL (formel 10), og 27,5 µg/mL (formel 11).

Beregningene for fortynningen:

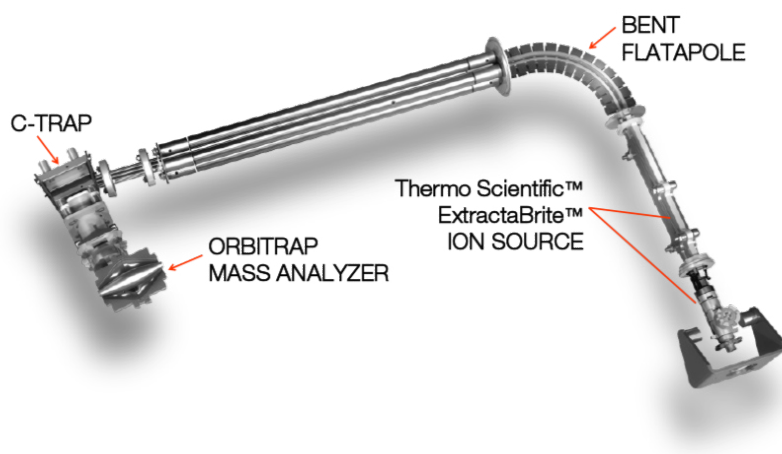
$$9. \quad \frac{5,5\text{mg/ml} \cdot 20\mu\text{l}}{1000\mu\text{l}} = \frac{0,11\text{mg}}{\text{ml}} = 110\mu\text{g/ml}$$

$$10. \quad \frac{110\mu\text{g/ml} \cdot 500\mu\text{l}}{1000\mu\text{l}} = 55\mu\text{g/ml}$$

$$11. \quad \frac{110\mu\text{g/ml} \cdot 200\mu\text{l}}{800\mu\text{l}} = 27,5\mu\text{g/ml}$$

3.3 Instrumenter

En gasskromatograf koblet til en Orbitrap ble benyttet til identifisering og kvantifisering av FAME. Instrumentet var av typen Exactive™ GC Orbitrap GCMS, Thermo Scientific™, Waltham, MA (Figur 3-1) der det er helium som ble benyttet til bæregass. Programmet som ble brukt for kontroll av instrumentet var Excalibur™, versjon 4.5. Det ble benyttet Tracefinder 5.1, Thermo Scientific™, Waltham, MA til å injisere prøvene. Instrumenter har en væske autoasamplere, Thermo Scientific™ TriPlus™ 100LS, Thermo Scientific™, Waltham, MA. Prøvene ble injisert med 1:10 splitt inn i en EI-ionekilde, gjennom en bøyd flatapole, i en c-felle og til slutt inn i orbitrapen, som vist på Figur 3-1 (Anonym, 2018).



Figur 3-1: Instrumentoppsettet til Exactive GC, (scientific, 2017).

For å identifisere de ulike fettsyre alkylesterene ble det benyttet NIST17 (Nasjonalt institutt av standarder og teknologi, Gaithersburg, MS, USA) massespektralbibliotek.

Gasskromatografen som ble brukt var Thermo Scientific™ Trace™ 1310 instrument utstyrt med en 60m Restek kolonne (Rtx® 2330) med 0.25 µm filmtykkelse, 60 m lang og ID på 0,25mm. Stasjonærfasen er svært polar og inneholder 90 % biscyanopropyl og 10 % cyanopropylfenyl polysiloksane, Restek Corporation, Bellefonte, PA USA. Det ble benytte helium (99.99990% fra Yara, Rjukan, Norge) som mobilfase med konstant flyt på 1.5 mL/min.

Skanneområdet var m/z 50 – 500. Instrumentet blir som standard analysert på 70 eV, og med en masseoppløsning på 60 000 og 1.5 V på C-fellen. Ionekilde temperaturen var satt til 250 °C. Instrumentet ble kalibrert og tunet med jevne mellomrom. Temperatur programmet starter på 50 °C i 5 min før temperaturen øker til 140 °C (100 °C/min) over 15 min. Deretter øker temperaturen til 145 °C (10 °C/min) i 15 min, 155 °C (1 °C/min) i 15 min, 190 °C (3 °C/min) i 15 min og til slutt 260 °C (50 °C/min) i 5 min.

3.3.1 LOD, LOQ og RRF

Det ble laget 3x3 konsentrasjoner som analyseres med GC-orbitrap. Deretter loggføres de ulike arealene og S/N verdiene til alle 37 FAME. Dette gjennomføres 3 ganger totalt. Fant deretter LOD og LOQ på hver av de enkelte FAME. Alle prøvene ble analysert på nytt med tuning og kalibrering før et nytt sett. Det ble laget 2 nye 3x3 sett med prøver som ble analysert. Det blir også beregnet RRF for disse verdiene.

For å få best RRF-verdier ble metylesterene C6:0, C18:0 og C22:0 brukt som interne standarder (IS). C6:0 ble brukt til å IS de korteste FAME fra C4:0 til C8:0. C18:0 ble brukt som IS for prøvene C10:0 til og med C22:1. C22:0 ble benyttet som IS for C21:0 og de resterende FAME.

Det ble også funnet LOD/ LOQ og beregnet RRF for FAEE og FAPE på samme måte. For FAEE ble det beregne RRF ved å benytte C8:0 som IS for FAEE C4:0 og C8:0, C14:1 ble benyttet som IS for FAEE C10:0 til C18:1 og C18:2 ble benyttet som IS for C19:0 og de resterende FAEE.

For FAPE ble det beregnet RRF ved å benytte prøvene C8:0 som IS for FAPE C4:0 til C8:0, C14:1 ble benyttet som IS for C10:0 til C18:1 og C18:3 ble benyttet som IS for C19:0 og resterende FAPE. Det er beregnet RRF både med stigningstallet tvunget igjennom origo ($y=a$) og ikke ($y=ax+b$).

3.3.2 Ulike oppløsninger, C-felle og VeV

Orbitrapen har identifisert R37 på 3 ulike konsentrasjoner, 100 µg/mL, 50 µg/mL og 10 µg/mL. Prøvene ble testet med å variere oppløsningen til instrumentet mellom 60 000, 30 000 og 15 000. Spenningen i ionekilden ble variert fra 70 eV og ned til 30 eV og spenningen i c-fella ble også justert mellom 0V til 2,5V med intervall på 0,5V. I tillegg ble disse justeringene sammenlignet med en standardverdi.

3.3.3 SIM

FAME-prøvene ble analysert med SIM. Det ble utført 3 replikater med fokus på hver av de 37 FAME som finnes i prøvene. Under analysene for FAME ble molekylionet og hovedtoppen (basepeak) valgt ut som ioner. Noen av FAME har samme molekylion og hovedtopp så det ble lagt til noen tilleggsgioner på noen av prøvene. Dette vist i Tabell 3-5

Tabell 3-5: Liste over ioner benyttet ved analyse i SIM.

FAME	Retensjonstid fra	Retensjonstid til	Molekylformel	Hovedtopp	Molekylvekt	Tilleggsgioner
C4:0	5,5	6	C ₅ H ₁₀ O ₂	74,04	102	-
C6:0	7,5	8	C ₇ H ₁₄ O ₂	74,04	130	-
C8:0	8,8	9,5	C ₉ H ₁₈ O ₂	74,04	158	-
C10:0	10,3	10,8	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	74,04	186	-
C11:0	11,1	11,7	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	74,04	200	-
C12:0	12,5	13	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	87,04	214	-
C13:0	14,3	15	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	87,04	228	-
C14:0	17	17,5	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	87,04	242	-
C14:1cis9	19,4	20	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	81,07	240	-
C15:0	20,5	21,5	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	87,04	256	-
C15:1cis10	23,5	24,1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	81,07	254	-
C16:0	25	25,7	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	87,04	270	-
C16:1cis9	28	28,7	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	81,07	268	-
C17:0	31	31,8	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	87,04	284	-
C17:1cis10	35	35,9	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	81,07	282	-
C18:0	39,4	40,3	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	87,04	294	-
C18:1trans9	42,8	43,6	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	81,07	294	149,02
C18:1cis9	43,9	44,8	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	81,07	294	133
C18:2trans9,12	50,5	51,1	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	81,07	292	95,09
C19:0	51,4	52	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	87,04	310	-
C18:2cis9,12	53,3	54	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	81,07	292	87,04
C18:3cis6,9,12	57,7	58,4	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	79,05	290	105,07
C20:0	59,5	60,3	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	87,04	324	-
C18:3cis9,12,15	60	60,7	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	79,05	290	107,09
C20:1cis11	61,7	62,4	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	81,07	322	-
C21:0	64,4	65	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	87,04	338	-
C20:2cis11,14	65	65,8	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	81,07	320	-
C20:3cis8,11,14	67	67,6	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	79,05	318	-
C22:0	68	68,7	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	87,04	352	-
C20:3cis11,14,17 + C20:4cis5,8,11,14	68,3	69,2	C ₄₂ H ₆₆ O ₄	79,05	634	-
C22:1	69,6	70,3	C ₂₃ H ₄₂ O ₂	69,07	350	-
C23:0	72	72,6	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	87,04	366	-
C20:5cis5,8,11,14,17	72,7	73,2	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	91,05	314	-
C22:2cis13,16	73,2	73,6	C ₂₃ H ₄₀ O ₂	81,07	348	-
C24:0	76,7	77	C ₂₅ H ₄₈ O ₂	87,04	380	-
C24:1cis15	77,4	77,8	C ₂₅ H ₄₆ O ₂	69,07	378	-
C22:6cis4,7,10,13,16,19	78,6	79,1	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	91,05	340	-

4 Resultater og diskusjon

4.1 LOD/LOQ

4.1.1 LOD/LOQ for FAME

Deteksjonsgrensen og kvantitasjonsgrensen ble funnet for R37 FAME mix, Tabell 4-1. Utfra gjennomsnittet som ble beregnet fra de tre konsentrasjonene (100, 50 og 10 µg/mL) ble LOD funnet til å være mellom 0,04 µg/mL og 0,23 µg/mL. Unntak fra dette var C4:0, C18:2*trans*9,12 og C24:0, der LOD var henholdsvis 0,87 µg/mL, 0,38 µg/mL og 0,41 µg/mL. LOQ ble beregnet utfra det samme tallmaterialet og har derfor samme standardavvik og variasjon i resultatene. LOQ ble funnet å være fra 0,08 µg/mL og opp til 2,89 µg/mL for C4:0.

C24:0 har standardavvik på 0,18 µg/mL og C18:2 *trans*-9,12 har standardavvik på 0,08 µg/mL. Ettersom standardavviket er høyere enn for de fleste andre FAME vil dette bety at C24:0 og C18:2 *trans*-9,12 ikke nødvendigvis har høyere LOD/LOQ, men hatt flere variasjoner i analysene. C4:0 er vanskelig å separere fra andre topper i kromatogrammet, som er forbindelser fra blant annet løsningsmiddel, hvilket kan være en årsak til at denne fettsyren har en høyere LOD enn de andre.

Ved å se på mønsteret til LOD/LOQ for FAME når de er sortert etter retensjonstid slik det står nedover i Tabell 4-1 kan man se at LOD/LOQ reduseres fra C4:0 til C10:0. Deretter blir det en svak økning i LOD/LOQ opp til C18:2*cis*9,12 før LOD/LOQ minker igjen. Fra C23:0 og utover er det en varierende verdier i LOD/LOQ.

Ved å sammenligne resultatet for LOD/LOQ fra tidligere analyser på GC-MS, sektorinstrument med EBE-geometri, er LOD/LOQ forholdsvis like. Den største forskjellen er på C24:0 hvor LOD er funnet til å være 0,203 µg/mL og LOQ er 0,6778 µg/mL på sektorinstrumentet (Devle et al., 2009). På GC-MS med orbitrap ble LOD for C24:0 funnet til å være 0,41 µg/mL, mens LOQ ble funnet til å være 1,36 µg/mL. Dette var forventet ved å se på standardavviket og resultatet for FAME i Tabell 4-1, hvor C24:0 hadde høyt standardavvik. Ved å se på resultatet på C24:0 med en totalkonsentrasjon på 100 µg/mL er LOD 0,54 µg/mL og LOQ 1,81 µg/mL. For 50 µg/mL er LOD for C24:0 funnet til å være 1,44 µg/mL og for LOQ 1,61 µg/mL. Ved disse konsentrasjonene er LOD og LOQ mye høyere enn resultatet for analysen på GC-MS med sektorinstrument. Derimot er resultatene for prøvene med en totalkonsentrasjon på 10 µg/mL LOD på 0,12 µg/mL og LOQ 0,20 µg/mL, hvilket er en mye lavere konsentrasjon enn analysene på GC-MS med sektorinstrument.

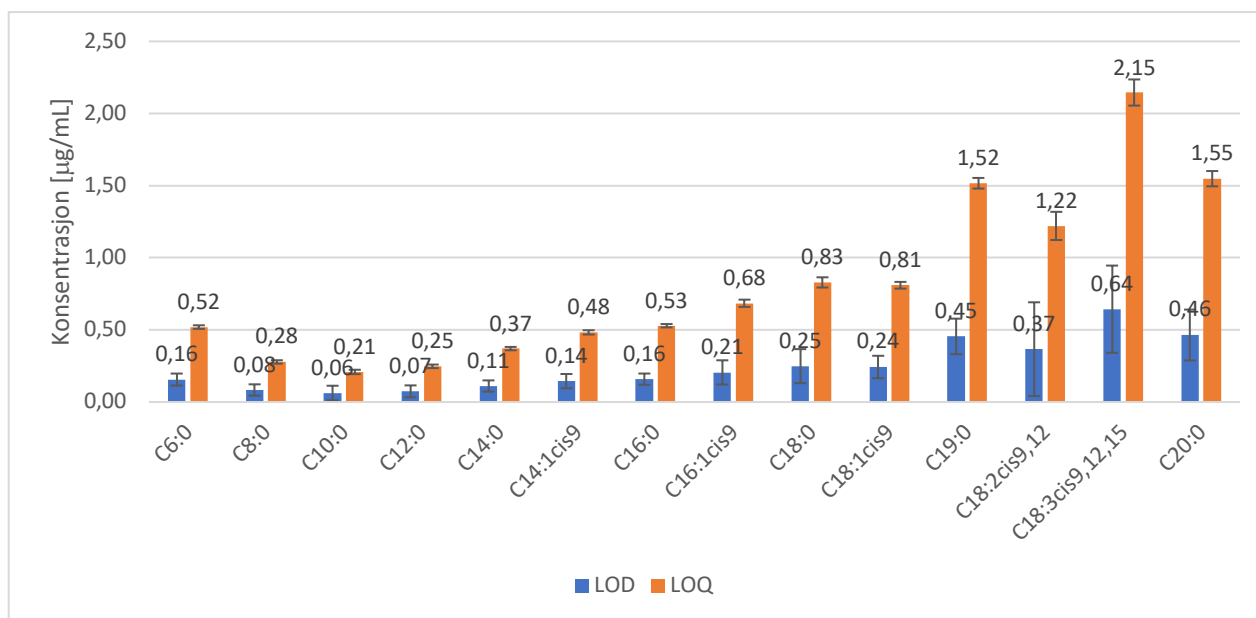
Tabell 4-1: Liste over LOD og LOQ for de ulike konsentrasjonene med gjennomsnitt og standardavvik, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver av konsentrasjonene har 9 forskjellige replikater.

Fettsyre	LOD				LOQ			
	100 (µg/mL)	50 (µg/mL)	10 (µg/mL)	Gjennomsnitt (µg/mL)	100 (µg/mL)	50 (µg/mL)	10 (µg/mL)	Gjennomsnitt (µg/mL)
C4:0	0,89	0,84	-	0,87 ± 0,04	2,98	2,81	-	1,93 ± 0,12
C6:0	0,11	0,13	0,14	0,12 ± 0,02	0,35	0,44	0,46	0,42 ± 0,05
C8:0	0,04	0,05	0,05	0,05 ± 0,00	0,13	0,16	0,16	0,15 ± 0,02
C10:0	0,03	0,03	0,04	0,03 ± 0,01	0,09	0,11	0,12	0,11 ± 0,02
C11:0	0,03	0,04	0,04	0,04 ± 0,01	0,10	0,13	0,14	0,12 ± 0,02
C12:0	0,03	0,04	0,05	0,04 ± 0,01	0,10	0,13	0,15	0,13 ± 0,02
C13:0	0,04	0,05	0,06	0,05 ± 0,01	0,13	0,17	0,20	0,17 ± 0,03
C14:0	0,05	0,07	0,08	0,06 ± 0,01	0,17	0,23	0,26	0,22 ± 0,05
C14:1cis9	0,06	0,09	0,09	0,08 ± 0,01	0,21	0,29	0,31	0,27 ± 0,05
C15:0	0,07	0,09	0,11	0,09 ± 0,02	0,23	0,31	0,36	0,30 ± 0,07
C15:1cis10	0,07	0,10	0,11	0,09 ± 0,02	0,24	0,32	0,38	0,31 ± 0,07
C16:0	0,08	0,10	0,11	0,10 ± 0,02	0,25	0,33	0,38	0,32 ± 0,06
C16:1cis9	0,09	0,12	0,15	0,12 ± 0,03	0,30	0,39	0,49	0,39 ± 0,09
C17:0	0,13	0,15	0,17	0,15 ± 0,02	0,44	0,50	0,56	0,50 ± 0,06
C17:1cis10	0,19	0,18	0,19	0,19 ± 0,01	0,64	0,60	0,64	0,63 ± 0,03
C18:0	0,15	0,21	0,26	0,21 ± 0,06	0,50	0,70	0,88	0,69 ± 0,19
C18:1trans9	0,23	0,26	0,26	0,25 ± 0,02	0,77	0,87	0,86	0,83 ± 0,05
C18:1cis9	0,18	0,23	0,28	0,23 ± 0,05	0,60	0,77	0,92	0,76 ± 0,16
C18:2trans9,12	0,43	0,42	0,28	0,38 ± 0,08	1,44	1,41	0,94	1,26 ± 0,28
C18:2cis9,12	0,22	0,24	0,25	0,23 ± 0,01	0,73	0,80	0,82	0,78 ± 0,04
C18:3cis6,9,12	0,11	0,14	0,15	0,14 ± 0,02	0,37	0,48	0,51	0,45 ± 0,08
C20:0	0,12	0,16	0,19	0,16 ± 0,03	0,42	0,53	0,62	0,52 ± 0,10
C18:3cis9,12,15	0,13	0,15	0,15	0,14 ± 0,01	0,43	0,49	0,49	0,47 ± 0,03
C20:1cis11	0,10	0,14	0,16	0,14 ± 0,03	0,34	0,46	0,55	0,45 ± 0,10
C21:0	0,11	0,12	0,15	0,13 ± 0,02	0,36	0,41	0,51	0,43 ± 0,08
C20:2cis11,14	0,09	0,11	0,14	0,11 ± 0,03	0,29	0,38	0,47	0,38 ± 0,09
C20:3cis8,11,14	0,10	0,13	0,13	0,12 ± 0,02	0,33	0,45	0,44	0,41 ± 0,07
C22:0	0,09	0,14	0,16	0,13 ± 0,03	0,31	0,47	0,52	0,43 ± 0,11
C20:3cis11,14,17 + C20:4cis5,8,11,14 ¹	0,14	0,19	0,19	0,17 ± 0,03	0,45	0,64	0,64	0,58 ± 0,11
C22:1	0,13	0,17	0,20	0,17 ± 0,03	0,45	0,57	0,67	0,56 ± 0,11
C23:0	0,20	0,23	0,22	0,22 ± 0,01	0,67	0,76	0,73	0,72 ± 0,05
C20:5cis5,8,11,14,17	0,15	0,15	0,15	0,15 ± 0,00	0,49	0,49	0,50	0,49 ± 0,01
C22:2cis13,16	0,24	0,23	0,22	0,23 ± 0,01	0,81	0,77	0,73	0,77 ± 0,04
C24:0	0,54	0,48	0,20	0,41 ± 0,18	1,81	1,61	0,67	1,36 ± 0,61
C24:1cis15	0,20	0,24	0,12	0,19 ± 0,06	0,67	0,81	0,40	0,63 ± 0,21
C22:6cis4,7,10,13,16,19	0,14	0,19	0,17	0,17 ± 0,03	0,46	0,64	0,56	0,55 ± 0,09

¹ FAME C20:3cis11,14,17 og C20:4cis5,8,11,14 koeluerer og har en sammenlagt LOD og LOQ

4.1.2 LOD/LOQ for FAEE

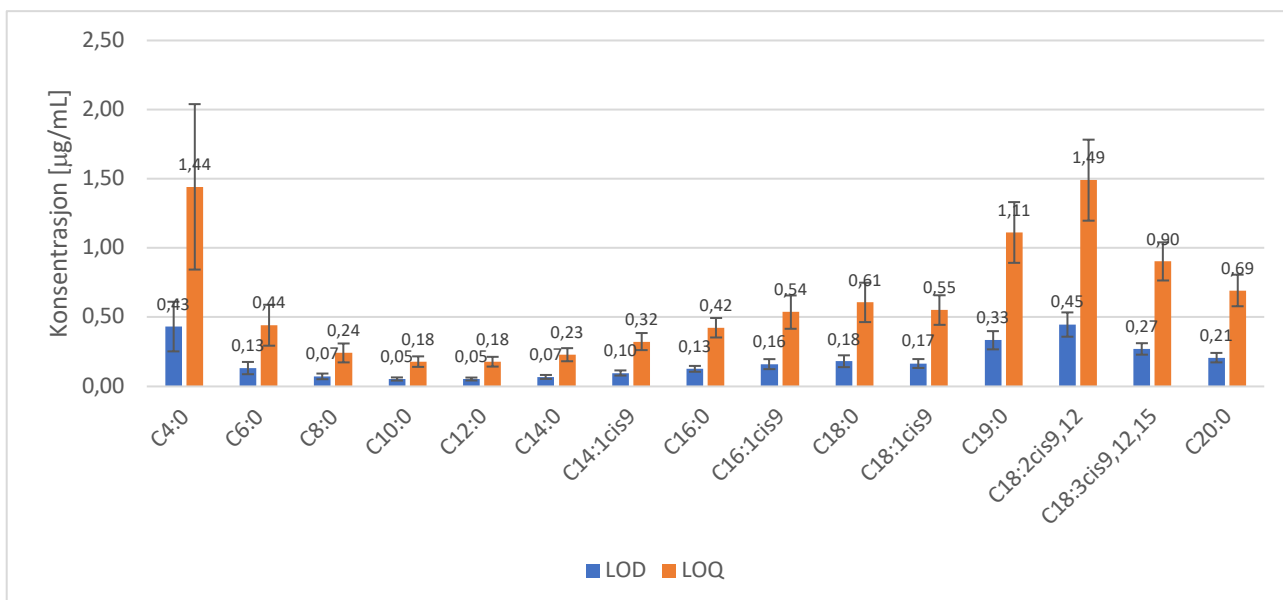
LOD for FAEE ligger mellom 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og 0,59 $\mu\text{g}/\text{mL}$. LOQ for FAEE ligger mellom 0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og 1,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Figur 4-1) Mønsteret viser at FAEE er lik som FAME hvor de korteste karbonkjedene fra C6:0 til C10:0 synker og etter som karbonkjeden blir lengre øker LOD/LOQ. Det er noe avvik i de lengste FAEE hvor C18:1 har lavere LOD/LOQ enn C18:0 og der C18:2 har lavere LOD/LOQ enn C19:0. I analysene for FAEE er det ikke med resultater for C4:0 ettersom denne var vanskelig å separere fra støyen.



Figur 4-1: LOD og LOQ for FAEE, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver av de ulike konsentrasjonene har 3 forskjellige replikater.

4.1.3 LOD/LOQ for FAPE

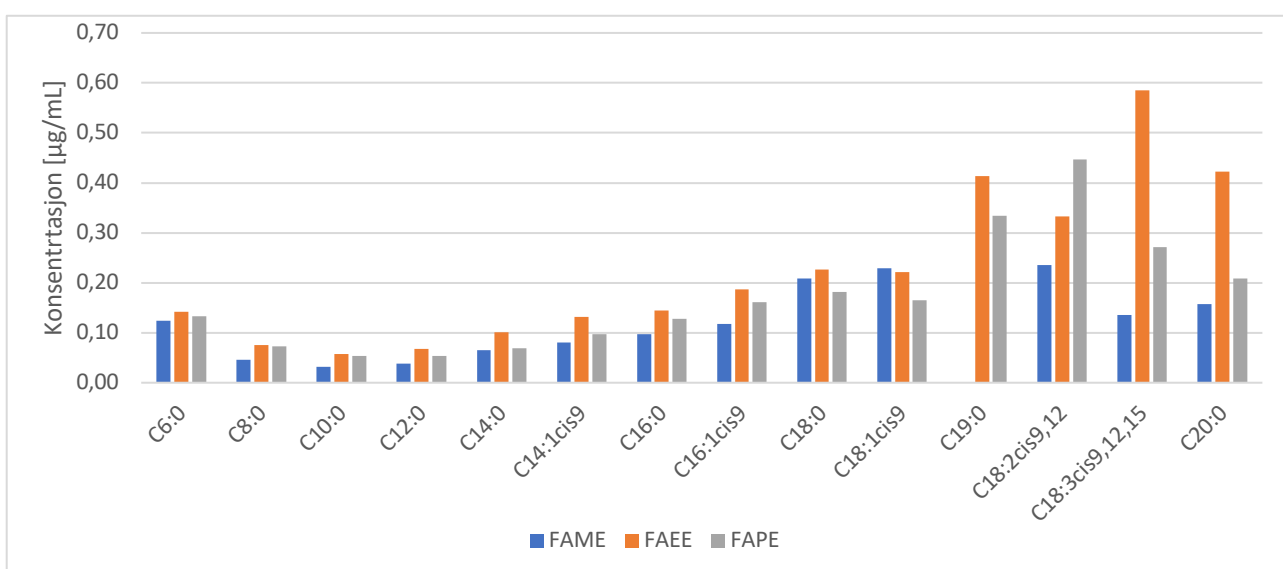
LOD for FAPE ligger mellom 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og 0,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. LOQ for FAPE ligger fra 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ til 1,49 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Figur 4-2) LOD og LOQ for FAPE har et forventet mønster der de lignende FAME og FAEE. LOD/LOQ-verdiene er høye (0,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for LOD og 1,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for LOQ) for C4:0 og minker fram til LOD på 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og LOQ på 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for C10:0. Etter det øker konsentrasjonen mer til den når C18:2 og deretter reduseres igjen. C18:1 avviker fra normalen ved at den har et lavere signal enn forventet med LOD på 0,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og LOQ på 0,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Denne konsentrasjonen er lavere enn C18:0 som har LOD på 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og LOQ på 0,61 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Figur 4-2: LOD og LOQ for FAPE, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver av de ulike konsentrasjonene har 3 forskjellige replikater.

4.1.4 Sammenligning av LOD/LOQ for FAME, FAEE og FAPE

For alle alkylesterene er det en reduksjon i LOD for de korteste alkylesterene (C6:0-C10:0), deretter økning av LOD med økende karbonkjedelengde fram til et «toppunkt» før de minker igjen (Figur 4-3). For C18:1cis9 er mønsteret likt for alle typer alkylestere, med veldig lik LOD som for C18:0. For FAME og FAPE vil 18:2cis9,12 ha den høyeste LOD av de lengste FAME, vist i figur 4-3. For FAEE vil det være C18:2cis9,12 som har høyest konsentrasjon. Etter som at LOQ er basert på samme tall som LOD vil mønsteret se likt ut som for LOD.

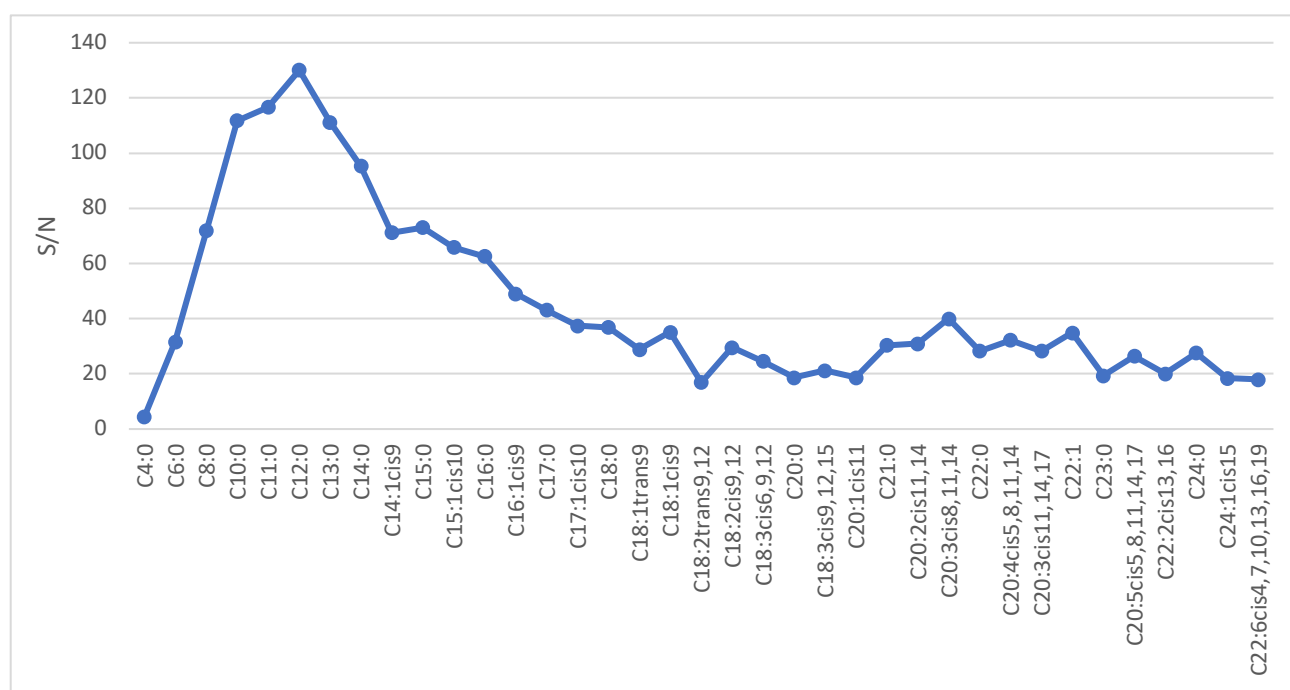


Figur 4-3: Sammenligning av LOD for 14 FAME, FAEE og FAPE. Resultatene er basert på for FAEE og FAPE der det er 3 ulike konsentrasjoner med 3 replikater av hver konsentrasjon. For FAME er det benyttet 3 ulike konsentrasjoner med 9 replikater av hver konsentrasjon.

4.2 Areal og S/N

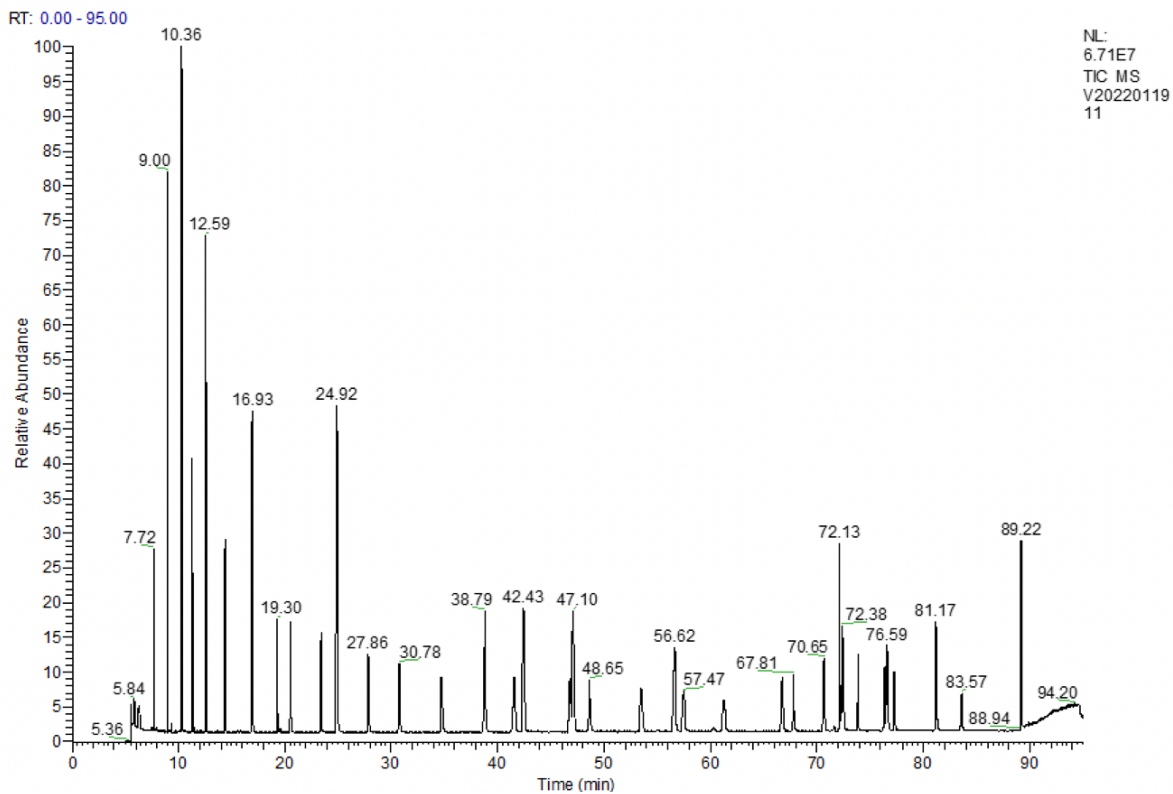
4.2.1 Areal og S/N for FAME

Siden arealet øker dersom konsentrasjonen øker vil man kunne tro at dersom alle fettsyrene har samme konsentrasjon vil alle ha samme areal. Signal er derimot ikke en parameter som forteller noe om konsentrasjonen. Vi har derfor sett på S/N og areal der alle de ulike FAME har konsentrasjon på 1 µg/mL. Som forventet er S/N størst på de korte FAME, med unntak for C4:0, C6:0 og C8:0. (Figur 4-4) Resterende av FAME er jevne med S/N mellom 20 og 40 på de lengre FAME. Dette er speilvendt av mønsteret til LOD/LOQ etter som det benyttes hovedsakelig S/N til å beregne LOD/LOQ.



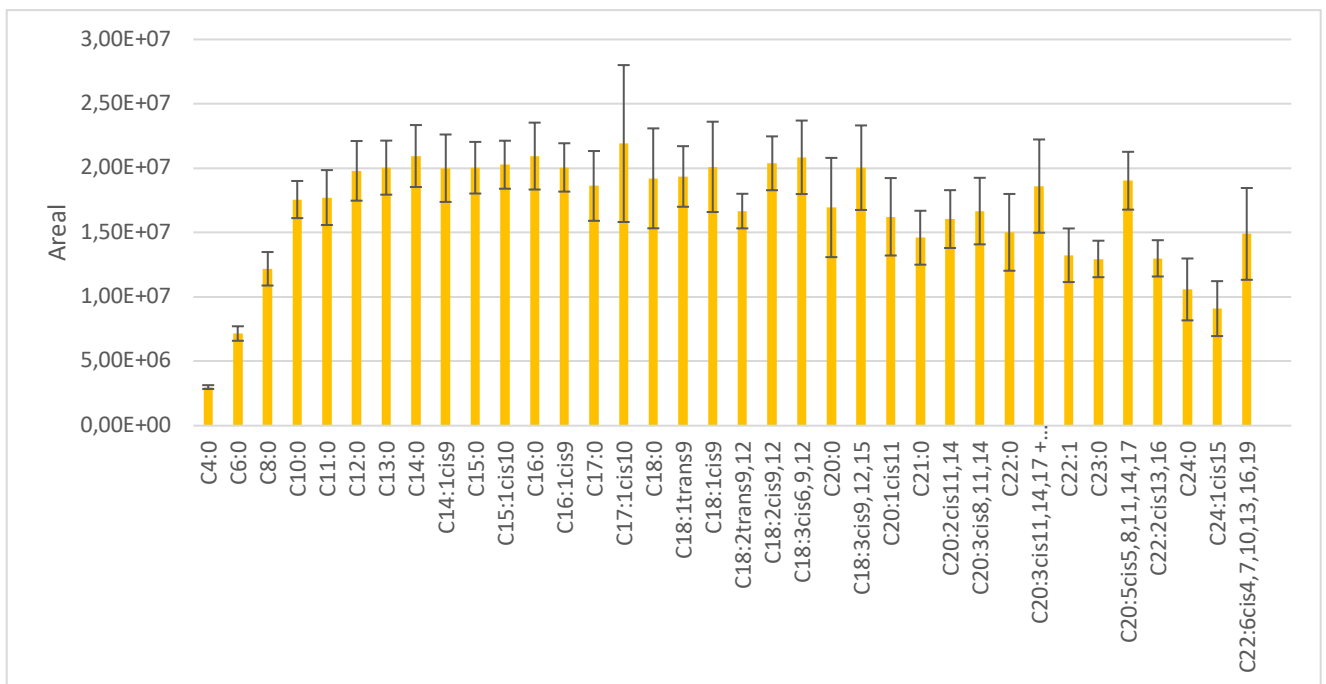
Figur 4-4: S/N der de enkelte 37 FAME har en konsentrasjon på 1 µg/mL, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 9 replikater.

Ved å se på kromatogrammet under (Figur 4-5) viser dette som forventet at de korteste FAME har høyest utslag, mens de lengre FAME har kortere og bredere profil, mens arealet til de ulike FAME er relativt like. Signal til støy forholdet påvirkes av høyden til FAME, derfor har de korteste FAME høyere S/N.



Figur 4-5: Kromatogram for FAME, R37, analysen er fra en prøve med konsentrasjon 100 µg/mL.

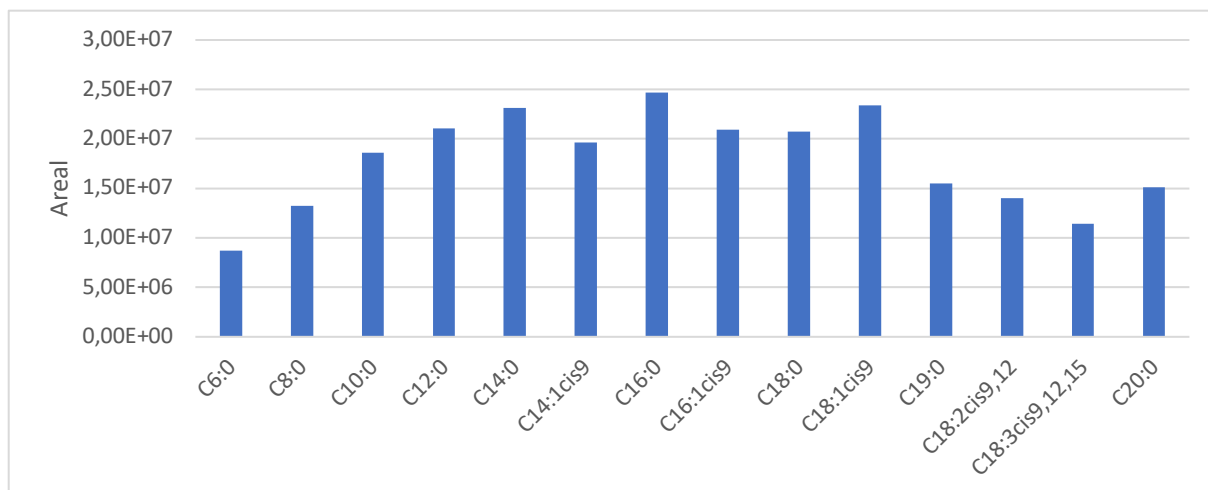
Arealet er forholdsvis jevn mellom de forskjellige FAME, Figur 4-6. Vi ser en økning i areal fra C4:0 som er den korteste FAME til C10:0. Selv om arealet er ganske jevnt blir også arealet noe mindre ettersom molekyllengden blir lengre. De toppene som skiller seg ut med noe større areal enn gjennomsnittet har noe større standardavvik.



Figur 4-6: Areal for 37 FAME der alle har en beregnet konsentrasjon på 1 µg/mL, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 9 forskjellige replikater.

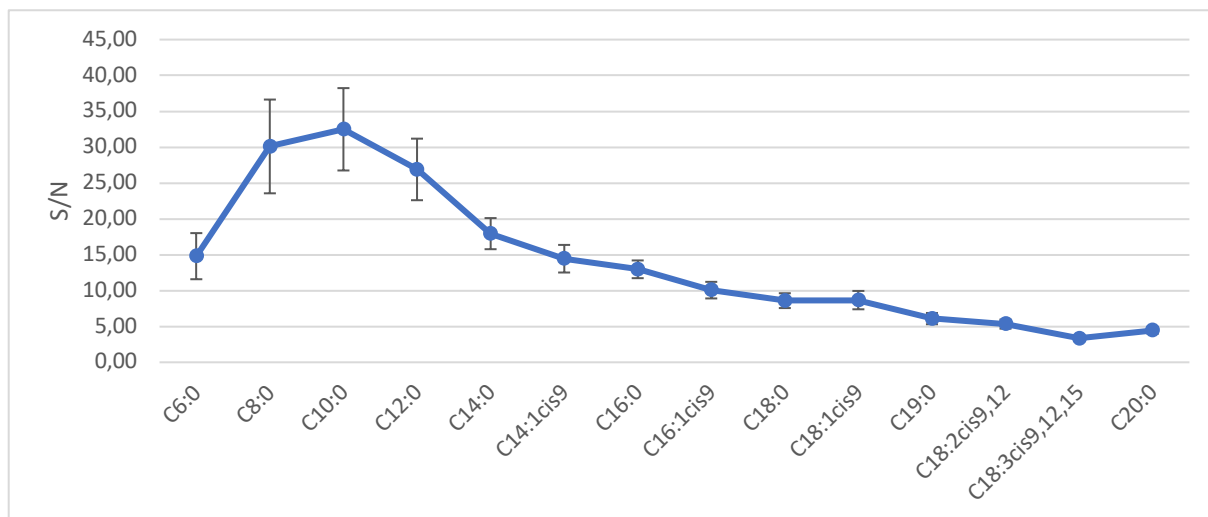
4.2.2 Areal og S/N for FAEE

Ved å se på arealet til FAEE med konsentrasjon 1 µg/mL er det som man kan se på mønsteret til LOD, en økning i areal opp til C10:0 deretter et jevnt areal til C19:0 hvor det kommer et skille der de lengre FAEE har lavere areal (Figur 4-7).



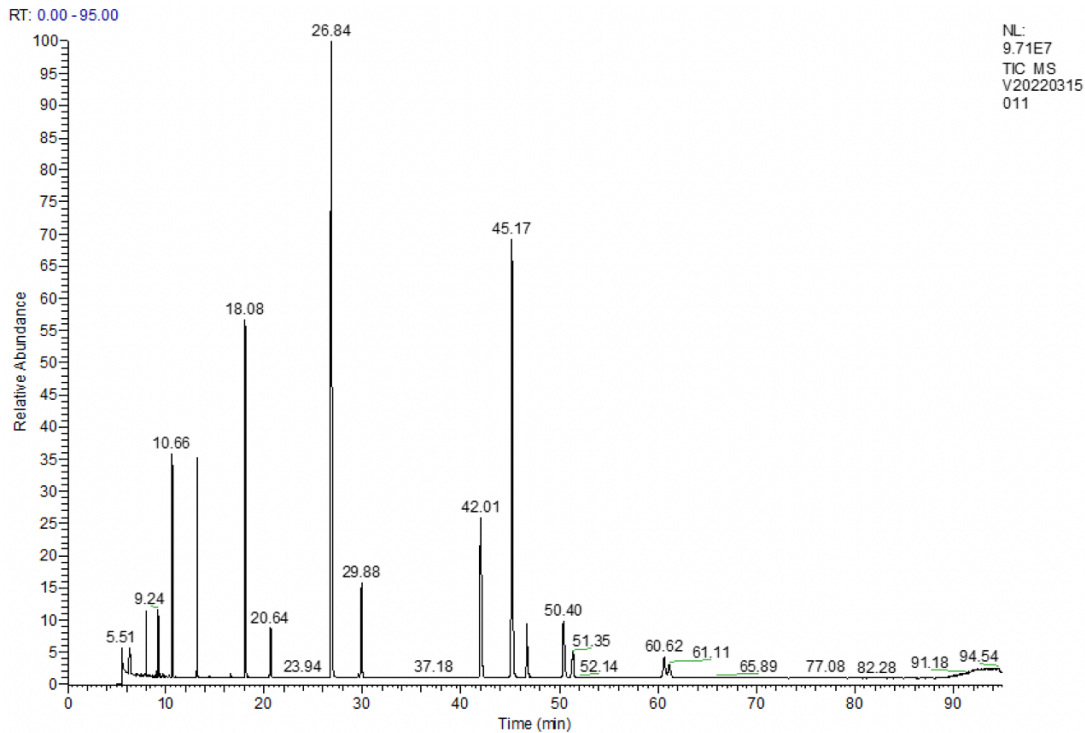
Figur 4-7: Areal for 14 FAEE der alle FAEE har en konsentrasjon på 1 µg/mL, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 3 forskjellige replikater.

For FAEE vil S/N være høyest for de korteste FAEE, og ettersom størrelsen på molekylet øker vil S/N blir lavere. Som for areal er det en økning i S/N fra C6:0 til C10:0 (Figur 4-8).



Figur 4-8: S/N der alle 14 FAEE har konsentrasjon 1 µg/mL, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 3 forskjellige replikater.

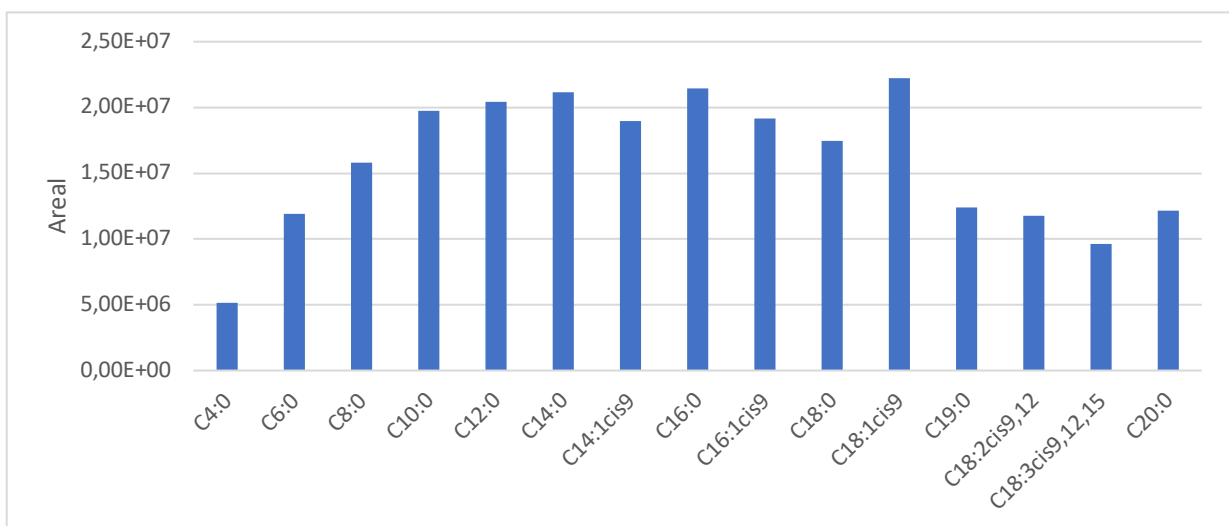
For å se på S/N mot kromatogrammet (Figur 4-9) er det flere høye signaler i kromatogrammet en topper i figur 4-8. Blandingen med FAEE i forhold til blandingen med ulike FAME har mye større forskjell i konsentrasjon, hvor de varierer fra 1-25,5 mg som gjør at det ikke tydelig går an å se mønsteret som vist i Figur 4-8 i Figur 4-9.



Figur 4-9: Kromatogram for FAEE, Prøven har en konsentrasjon på 110 µg/mL.

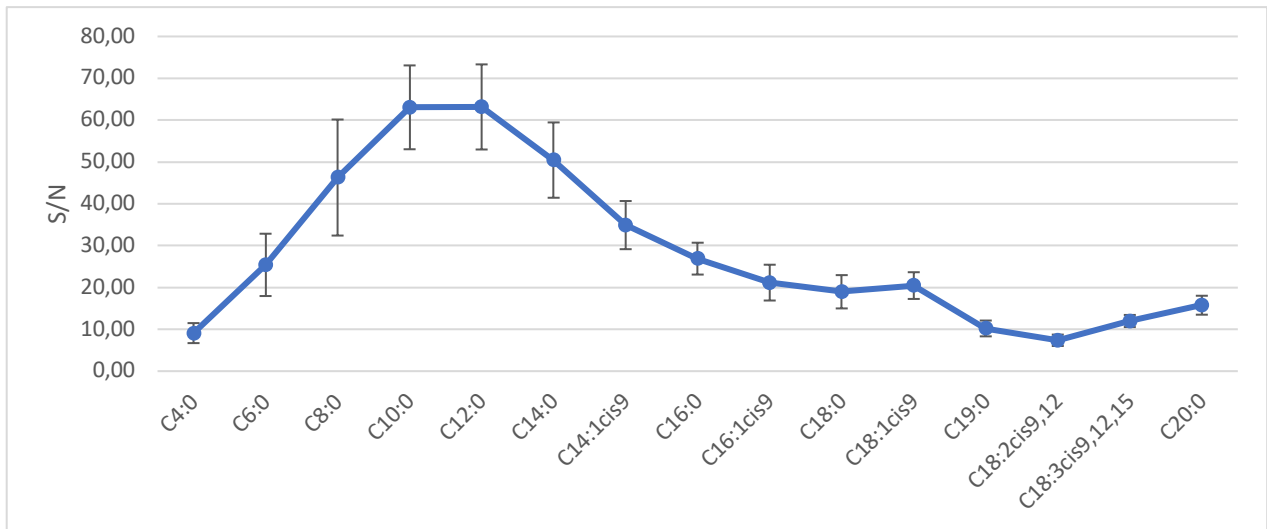
4.2.3 Areal og S/N for FAPE

Ved å se på arealet til hver av FAPE med samme konsentrasjon er den veldig lik som FAEE sitt mønster når det gjelder areal, hvor det er en økning av areal frem til C10:0 (Figur 4-10). Det samme skille mellom prøve C18:1 og prøve C19:0 hvor arealet er mye mindre for de lengre FAPE er likt som for FAEE.



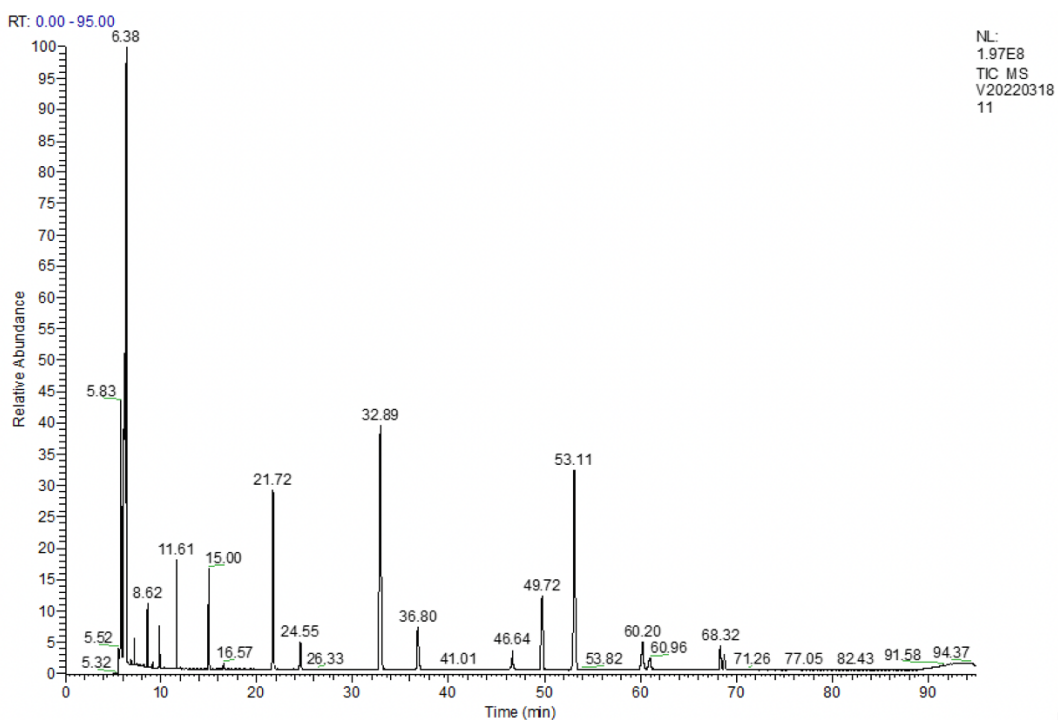
Figur 4-10: Areal for 15 FAPE der alle FAEE har konsentrasjon 1 µg/mL, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 3 forskjellige prøver.

Ved å se på S/N for FAPE er det veldig likt mønster som FAEE og FAME, Figur 4-11, med økning i S/N for de korteste FAPE opp til C10:0 hvor den synker deretter. Forskjellen fra FAEE er at kurven er mye brattere ettersom at C10:0 for FAPE har mye høyere S/N enn det FAEE har.



Figur 4-11: S/N for 15 FAPE der konsentrasjonen er 11 µg/mL, resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 3 forskjellige replikater.

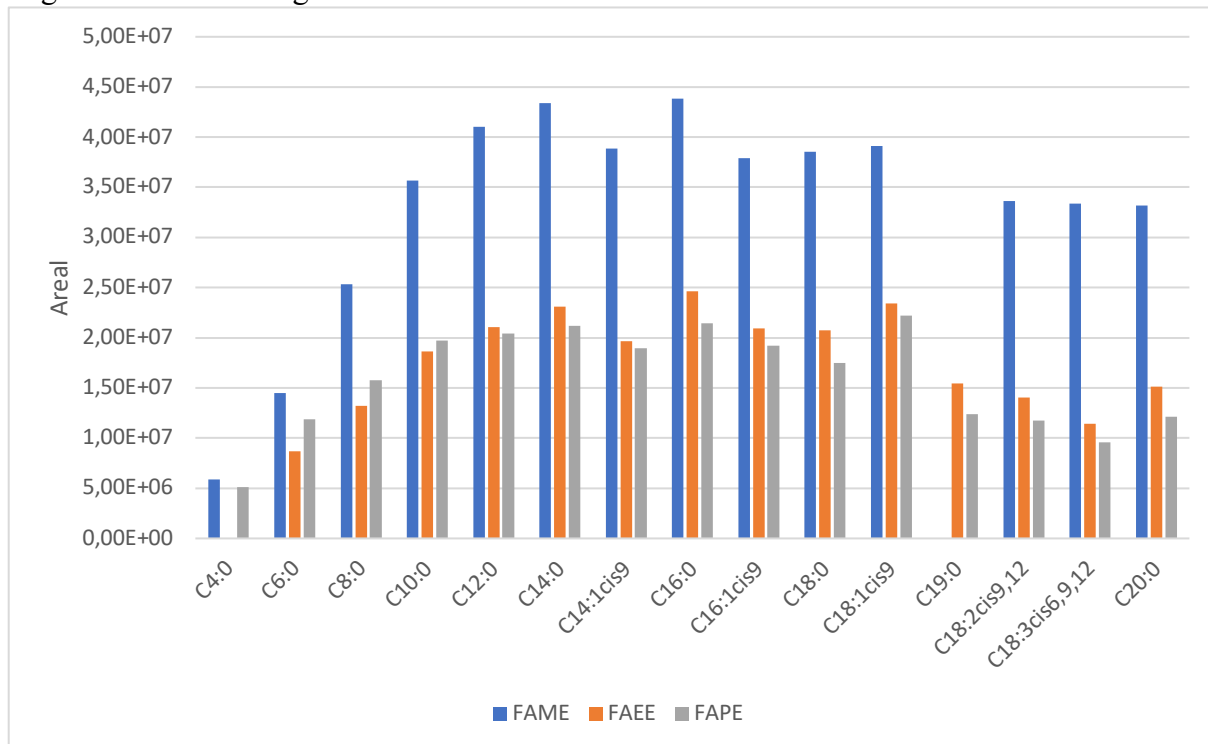
Kromatogrammet til FAPE, Figur 4-12 viser at det er tilsvarende som for kromatogrammet for FAEE (Figur 4-9) der den høyeste toppen er C16:0. For FAEE er retensjonstiden 26,84 min og for FAPE 32,89 min. FAPE har ett ekstra karbonatom sammenlignet med FAEE og har derfor en forskjøvet retensjonstid. Som det er på FAEE er også konsentrasjonene veldig varierende for de ulike FAPE, vil derfor ikke kunne se mønsteret i Figur 4-11 gjenspeilet i kromatogrammet. Toppen som kommer ut på 6,38 min er ikke en av FAPE så denne blir sett bort fra.



Figur 4-12: Kromatogram for FAPE, Prøven har en konsentrasjon på 110 µg/mL.

4.2.1 Sammenligning av areal for FAME, FAEE og FAPE

Ved å sammenligne arealene for FAME, FAEE og FAPE der alle har en konsentrasjon på 1 µg/mL (Figur 4-13) ser man at FAME har høyere areal enn de andre alkylesterene. Årsaken til dette kan være at FAME var kjøpt som et ferdig estrifisert produkt. Derimot var FAEE og FAPE estrifisert på lab og utbyttet kan være lavere. Trenden for både FAME, FAEE og FAPE er ganske lik som tidligere nevnt.



Figur 4-13: Sammenligning av areal der alle FA har en konsentrasjon på 1 µg/mL. Resultatene er basert på for FAEE og FAPE der det er 3 ulike konsentrasjoner med 3 replikater av hver konsentrasjon. For FAME er det benyttet 3 ulike konsentrasjoner med 9 replikater av hver konsentrasjon.

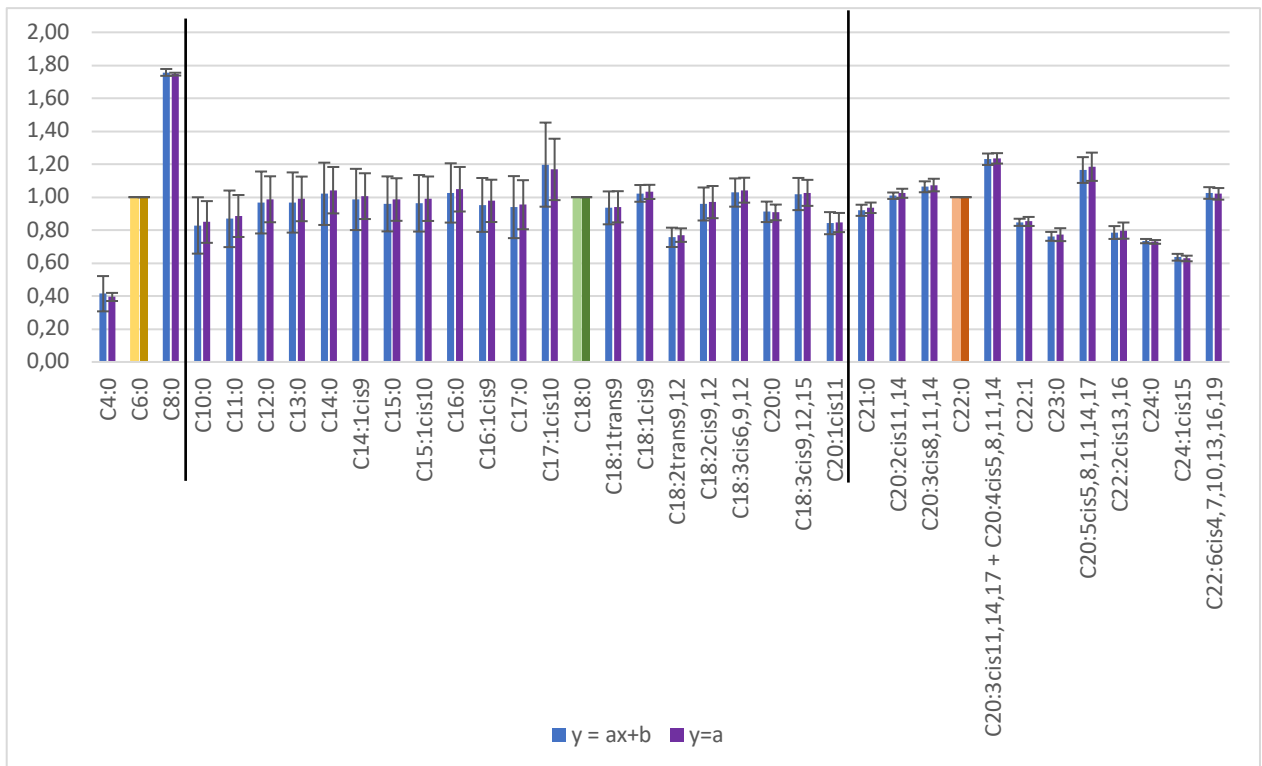
4.3 Relativ responsfaktor

Det er ikke gitt at alle FAME gir samme respons. Det er større forskjell i respons ved bruk av et massespektrometer enn ved for eksempel FID. Dette henger selvsagt sammen med detektorenes egenskaper og i denne oppgaven er det ønskelig å finne responsfaktoren for den nye Orbitrapen og sammenligne denne med et tidligere instrument som var et tre-sektorinstrument.

4.3.1 RRF for FAME

Ved å se på arealene for alle alkylesterene kunne man se tydelig skille mellom de tre korteste alkylesterene og de som er lengre. Det ble derfor valgt å beregne RRF for både FAME, FAEE og FAPE der C4:0, C6:0 og C8:0 ble beregnet med C6:0 som internstandard. Videre ble FAME delt i to seksjoner til mellom C20:1cis11 og C21:0. Det kunne ha blitt delt opp i mindre seksjoner for å få det enda mer nøyaktig, slik det ble gjort for FAEE, Tabell 4-2 og FAPE, Tabell 4-3. Disse prøvene inneholdt ikke like mange alkylestere i analysene og beregningen ble delt opp mellom C18:1 og C19:0. Ut ifra at RRF måtte deles opp i så mange seksjoner for å få mer nøyaktige RRF-verdi kan dette indikere at GC-FID har jevnere RRF over alle FAME ved benytte færre internstandarder. Relativ responsfaktor ble beregnet både med en lineær regresjonslinje som er tvunget igjennom origo ($y=a$) og uten origo ($y=ax+b$).

Relativ respons faktor for FAME, Figur 4-14, ligger rundt 1, med unntak for C4:0 og C8:0. Årsaken til dette er at det allerede var stor differanse mellom arealene mellom C4:0, C6:0 og C8:0 i forhold til de resterende FAME. Differansen mellom tvunget og ikke tvunget gjennom origo er ikke stor med en differanse på 0,9 % forskjell i absoluttverdien. Når alle FAME over de ulike konsentrasjonene ble tilbakeregnet til den ordinære konsentrasjonen ved å benytte RRF-verdiene gir dette en liten variasjon fra ordinær konsentrasjon hvor differansene er mellom 0,00 µg/mL til 0,12 µg/mL, med unntak for C16:0 og C13:0 som fikk en differanse med konsentrasjon mellom 0,21 µg/mL og 0,34 µg/mL.



Figur 4-14: RRF-verdier for FAME, hvor den gule, grønne og røde stolpe er FAME som er benyttet som Intern standard. resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 9 forskjellige replikater.

4.3.2 RRF for FAEE

Relativ responsfaktor verdiene beregnet for FAEE (tabell 4-2) ligger mellom 0,63 og 1,24. Ved å beregne RRF med de C8:0, C14:1cis9 og C18:2cis9,12 som internstandarder gir dette en liten totaldifferanse i konsentrasjon når de bergenes tilbake for alle 3 konsentrasjonene.

Tabell 4-2: RRF-verdier for FAEE, Standardene av FAME som er markert gul, grønn og blå er benyttet som internstandard. resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon her 3 forskjellige replikater.

Standard av FAEE	$y = ax+b$	$y=a$
C6:0	0,63	0,65
C8:0	1,00	1,00
C10:0	0,91	0,93
C12:0	1,05	1,06
C14:0	1,17	1,17
C14:1cis9	1,00	1,00
C16:0	1,24	1,25
C16:1cis9	1,12	1,09
C18:0	1,10	1,08
C18:1cis9	1,22	1,20
C19:0	1,11	1,11
C18:2cis9,12	1,00	1,00
C18:3cis9,12,15	0,83	0,82
C20:0	1,07	1,08

4.3.3 RRF for FAPE

Relativ responsfaktor verdiene til FAPE er beregnet til å være mellom 0,42 til 1,27 (Tabell 4-3). Ved å beregne tilbake til den opprinnelige konsentrasjonen vil det også her som for FAME og FAEE være liten differanse fra den opprinnelige konsentrasjonen.

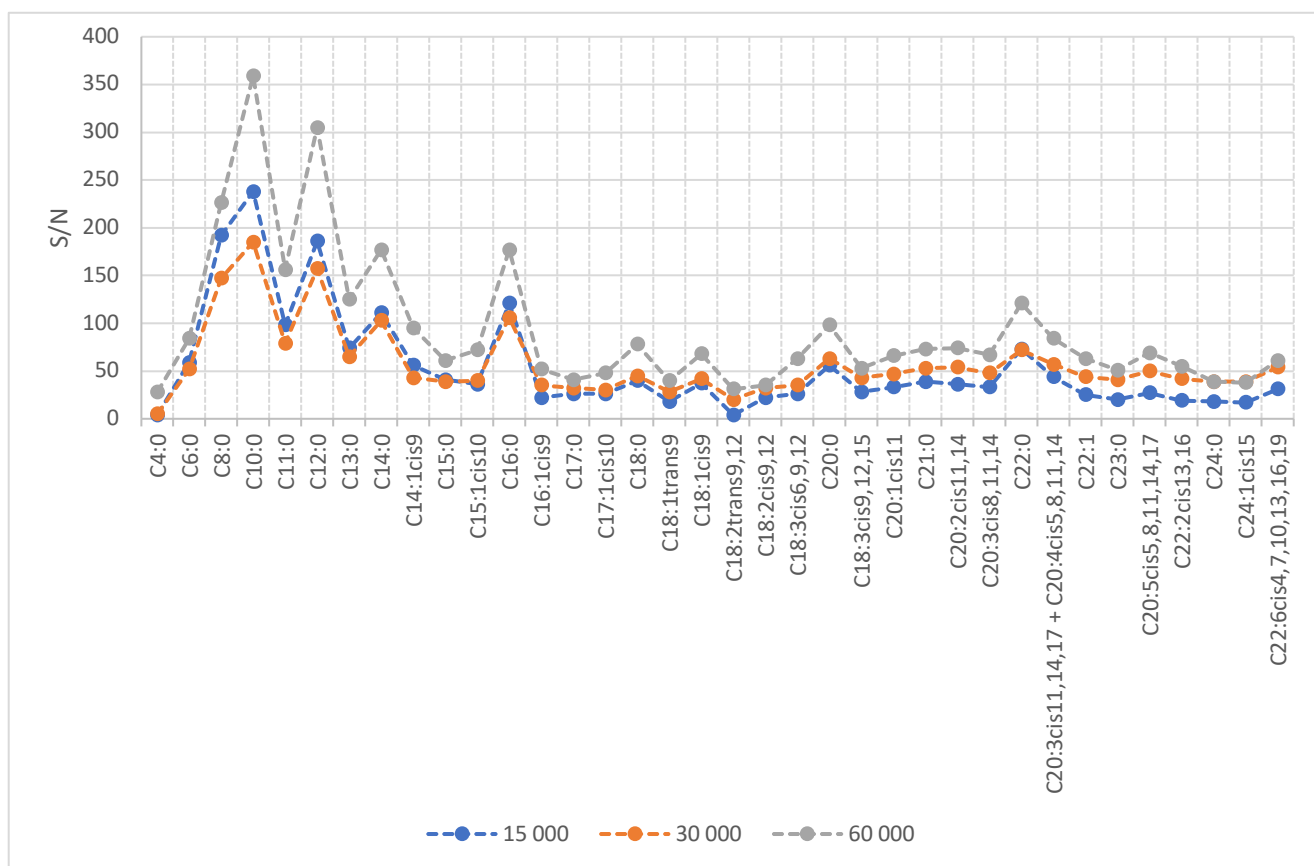
Tabell 4-3: RRF-verdier for FAPE, Standardene av FAME som er markert gul, grønn og blå er benyttet som internstandard. resultatene er basert på 3 forskjellige konsentrasjoner der hver konsentrasjon her 3 forskjellige replikater.

Standard av FAPE	$y = ax+b$	$y=a$
C4:0	0,43	0,43
C6:0	1,00	1,00
C8:0	1,42	1,37
C10:0	0,92	0,93
C12:0	0,96	0,96
C14:0	1,00	1,00
C14:1cis9	0,93	0,91
C16:0	1,01	1,01
C16:1cis9	0,98	0,94
C18:0	0,90	0,86
C18:1cis9	1,12	1,08
C19:0	1,29	1,29
C18:2cis9,12	1,23	1,23
C18:3cis9,12,15	1,00	1,00
C20:0	1,27	1,27

4.4 Masseoppløsning

Tre prøver med R37 FAME mix ble analysert med tre ulike masseoppløsninger på massespektrometeret. Resultatene viser en betydelig forskjell i S/N på toppene i kromatogrammet med oppløsning 60 000 og 30 000, Figur 4-15. Det viser en vesentlig mindre S/N forskjellen mellom toppene med masseoppløsning på 30 000 og 15 000. Denne trenden er som forventet på grunn av det er mindre forskjell i masseoppløsning mellom 15 000 og 30 000 enn mellom 30 000 og 60 000.

Det man bør være klar over når man velger oppløsning på massespektrometeret er at det produseres filer hvor størrelsen på hver fil er betydelig forskjellig. Filstørrelsen fra analyser med de ulike oppløsningene varierte mellom 1,2 GB for 60 000 i oppløsning, til 0,5 GB for 15 000. En slik økning i oppløsning på analysene med 4x øker filstørrelsen ca. 2,4x.



Figur 4-15: S/N med ulik oppløsning, resultatene er basert på 3 replikater for hver av oppløsningene.

4.5 LOD og LOQ ved bruk av SIM

En av styrkene med orbitrap er at følsomheten er den samme på skann og SIM, men for å dokumentere dette og lære instrumentet mer å kjenne ble det valgt å gjøre et studium på om dette stemmer. Som vist i Tabell 4-4 er det en lavere LOD/LOQ for SIM enn skann på samtlige FAME opp til og med C14:0 med en konsentrasjon mellom 0,01 µg/mL og 0,03 µg/mL. Når det gjelder den store forskjellen for C4:0 kan dette muligens forklares med avdampnings problemer siden dette er den desidert flyktigste FAME i prøven.

Det viste seg at økende grad av umettethet av FAME ga en vesentlig høyere LOD og LOQ i SIM enn ved skann, noe vi har vanskelig for å forklare. I tillegg ser vi at prøve C21:0 også har relativt høy konsentrasjon på LOD.

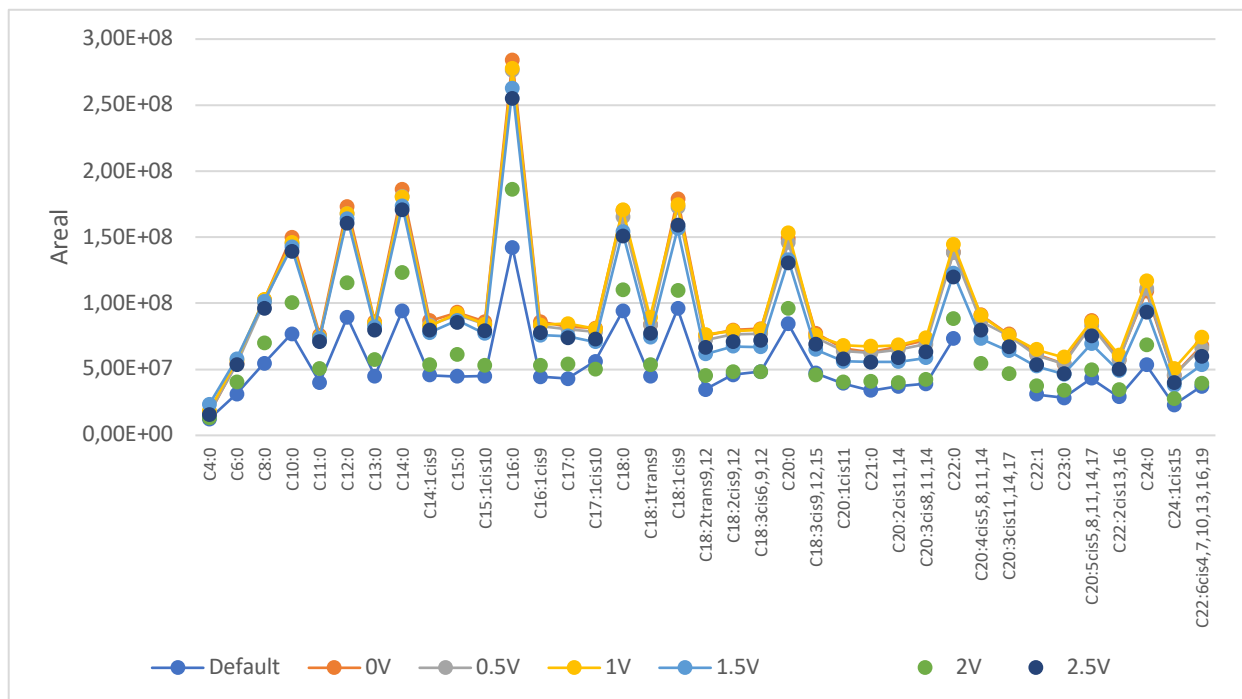
Tabell 4-4: Sammenligning av LOD/LOQ for SIM og skann. Resultatene for skann og SIM er basert på 3 ulike konsentrasjoner der hver konsentrasjon har 9 replikater.

Fettsyreester	LOD		LOQ	
	SIM	SKANN	SIM	SKANN
C4:0	0,16	0,87	0,54	2,89
C6:0	0,03	0,12	0,09	0,42
C8:0	0,01	0,05	0,03	0,15
C10:0	0,01	0,03	0,04	0,11
C11:0	0,01	0,04	0,04	0,12
C12:0	0,02	0,04	0,05	0,13
C13:0	0,02	0,05	0,07	0,17
C14:0	0,03	0,06	0,09	0,22
C14:1cis9	0,16	0,08	0,53	0,27
C15:0	0,04	0,09	0,13	0,30
C15:1cis10	0,18	0,09	0,61	0,31
C16:0	0,04	0,10	0,15	0,32
C16:1cis9	0,24	0,12	0,81	0,39
C17:0	0,06	0,15	0,20	0,50
C17:1cis10	0,35	0,19	1,18	0,63
C18:0	0,09	0,21	0,31	0,69
C18:1cis9	0,84	0,23	2,78	0,76
C18:3cis9,12,15	0,08	0,14	0,26	0,47
C20:1cis11	0,31	0,14	1,03	0,45
C21:0	0,57	0,13	1,91	0,43
C20:2cis11,14	0,20	0,11	0,67	0,38
C22:0	0,21	0,13	0,70	0,43
C23:0	0,05	0,22	0,16	0,72
C22:2cis13,16	0,10	0,23	0,34	0,77

4.6 Endring av spenningen på C-fellen

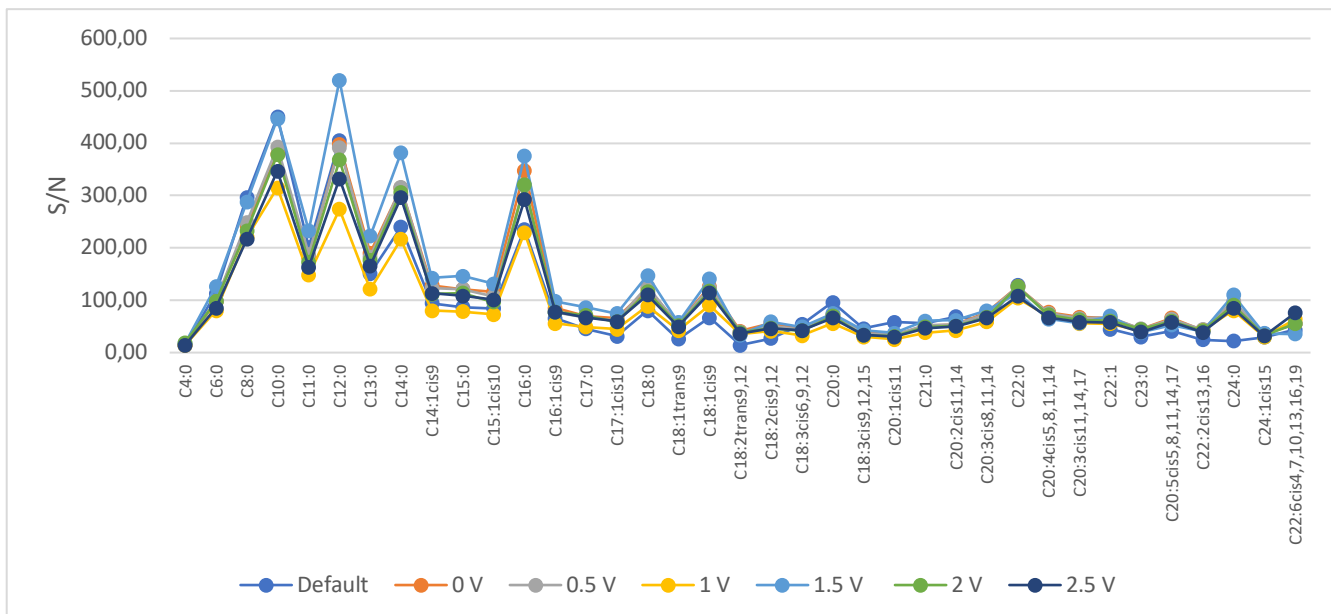
Siden en av hensiktene med oppgaven er å gjøre seg kjent med massespektrometerets muligheter og begrensinger så var det å se effekten av å endre spenningen på C-fellen en viktig del. Instrumentet er innstilt på en standard-verdi som vi ikke kjenner størrelsen på, derfor det testet ut forskjellige spenninger i området 0 – 2,5 V med intervall på 0,5 V.

For å vurdere resultatene valgte vi å se på både arealet av toppene og S/N. Ved å justere C-felle-spenningen ned fra 1,5 V til 1,0 V økte arealene på nesten alle toppene (Figur 4-16). Ved å ha C-felle spenning på 0 V, 0,5 V og 1 V gir det et ganske jevnt areal for alle FAME. Det samme gjør det for 1,5 V og 2,5 V. Ved bruk av standard-verdien gir det lavest areal for de korteste FAME, men ettersom FAME blir lengre jevner arealene seg ut og kan sammenlignes med arealene for 2 V analysene.



Figur 4-16: Sammenligning av areal med ulike spenning i c-fellen, resultatet er basert på 9 replikater for hver spenning.

Det er ikke bare stort areal som er viktig, men man ønsker også lav støy. Der ser vi at prøvene analysert med spenning på 1,5 V har høyest S/N for de fleste FAME (Figur 4-17). Resultatene antyder at ved rundt 1,5 V vil C-fellen slippe inn størst ionesty uten støy. Dersom spenningen er lavere vil C-fellen slippe inn mer enn bare ionene som er ønsket i prøven, dette vil derfor gi lavere S/N. På de korteste FAME der signalet er størst gir det best resultat for prøvene analysert på 1,5 V som forventet. For de litt lengre FAME er det 2 V som gir større S/N enn det 1,5 V gjør. Dette gjør at man kan vurdere om en skal analysere de litt lengre FAME på 2 V.

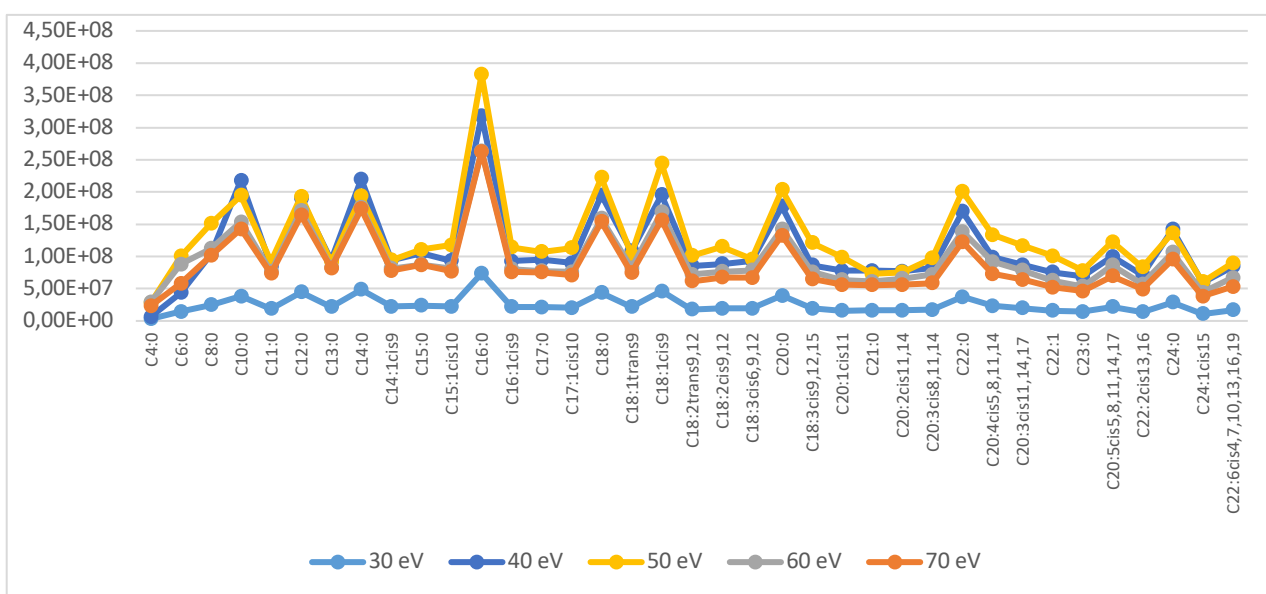


Figur 4-17: Sammenligning av total S/N for alle FAME med ulik spenning i c-fellen, resultatet er basert på 9 replikater for hver spenning.

4.7 Endring av elektronenergien

Selv om standardbetingelser ved EI benytter seg av en elektronenergi på 70 eV så vil det ved noen analyser kunne være fordeler med en annen ioniseringsenergi. Det ble derfor valgt å se om det er noen effekt av å benytte seg av en annen energi i håp om at følsomheten til analysemetoden skulle bli forbedret. Elektronenergiene som ble valgt varierte fra 30 – 70 eV med intervall på 10 eV.

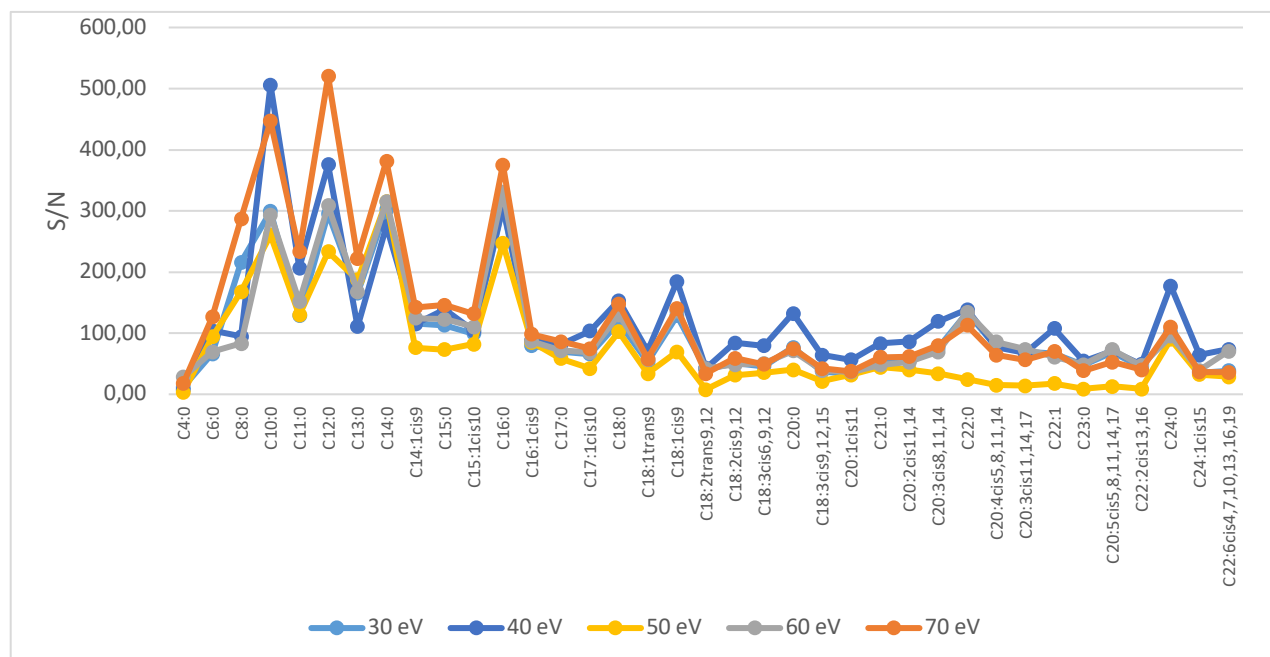
Arealet for de ulike elektronspenningene, Figur 4-18, viser at det er 50 eV som har høyest areal over alle FAME med unntak av noen hvor 40 eV er større. Ved analyser på 60eV og 70eV gir det lavere areal enn ved 40 eV og 50 eV. Det er et stort skille mellom elektronspenningen 30 eV og resterende elektronspenninger som er analysert hvor 30 eV hadde mye lavere areal.



Figur 4-18: Sammenligning med ulik elektronspenning, resultatet er basert på 9 replikater for hver spenning.

Som forventet ga 70 eV høyt S/N (Figur 4-19). I tillegg gav også analyser på 40 eV et høyt S/N. Analysene på 40 eV hadde større S/N for de fleste lengre FAME fra C17:1cis10 og utover. Det var også høyere S/N for C10:0 der for 40 eV var S/N 506, mens for 70 eV er S/N 446. For de lengre FAME ligger S/N for 70 eV mellom 30 og 140, men for analysene på 40 eV er S/N mellom 60 og 190.

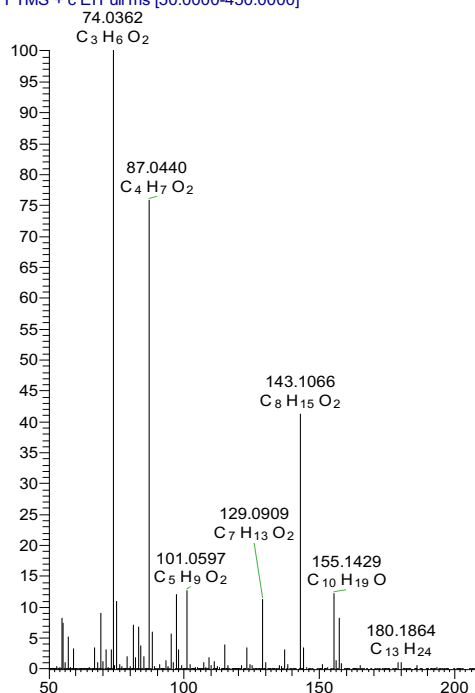
Analysene på spenningene på 50 eV og 60 eV viser at det kan kjøres med lavere elektronspenning enn 70 eV med gode resultater med henhold til S/N. Kjøringer på 60 eV er ganske like resultater som ved 70 eV. Analyser på 50 eV kommer ut med et stort areal på toppene, (figur 4-20) og med et ganske lavt S/N forhold. Det kan se ut som 50 eV kjøringene med har hatt en del støy eller forurensning. Etter som spenningen ble lavere blir det vanskeligere å skille støy fra signal og vi kan se at arealet for 30 eV er ganske mye lavere enn resterende, er derfor ikke analysert på lavere enn 30 eV. 70 eV gir høyest S/N for de korteste FAME, men 40 eV gir høyest S/N for de lengre FAME. Det kan indikere at det bør benyttes ulike spenning ut ifra hvilke FAME som skal analyseres.



Figur 4-19: Sammenligning av S/N med ulik elektronspenning, resultatet er basert på 9 replikater for hver spenning.

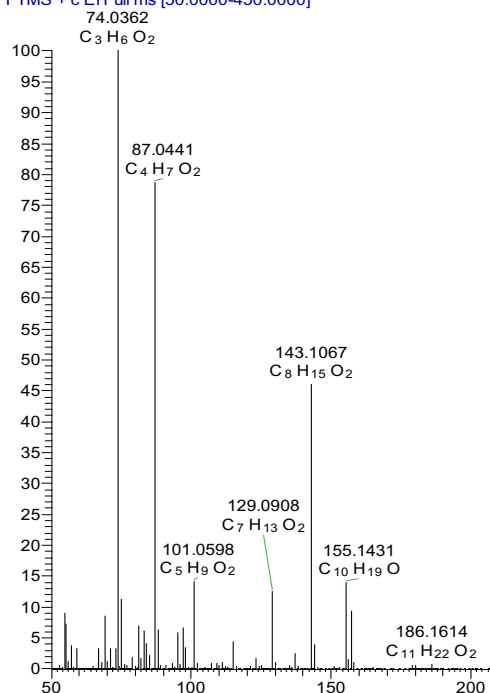
Ved å sammenligne MS-spektrene for FAME der spenningen er mellom 40 eV og 70eV er det ikke stor forskjell, Figur 4-20 og Figur 4-21. Det er heller ikke så stor forandring på molekylionet som er 186 m/z . Noe som ville vært antatt etter som at 40 eV gir en mykere ionisering og ville da muligens i teorien gi høyere molekylion.

V2022040111 #2061-2088 RT: 10.24-10.30 AV: 28 SB: 159
T: FTMS + c EI Full ms [50.0000-450.0000]



Figur 4-20: MS-spekter over C:10 ved 40eV

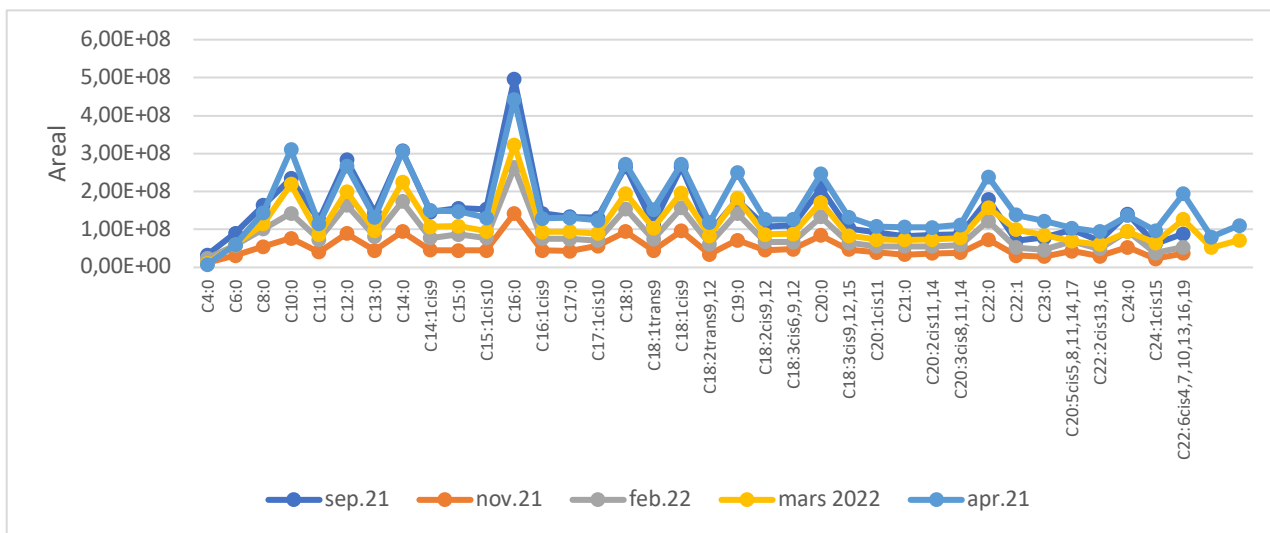
V2022011911 #2096-2119 RT: 10.33-10.38 AV: 24 SB: 170
T: FTMS + c EI Full ms [50.0000-450.0000]



Figur 4-21: MS-spekter over C10:0 ved 70eV

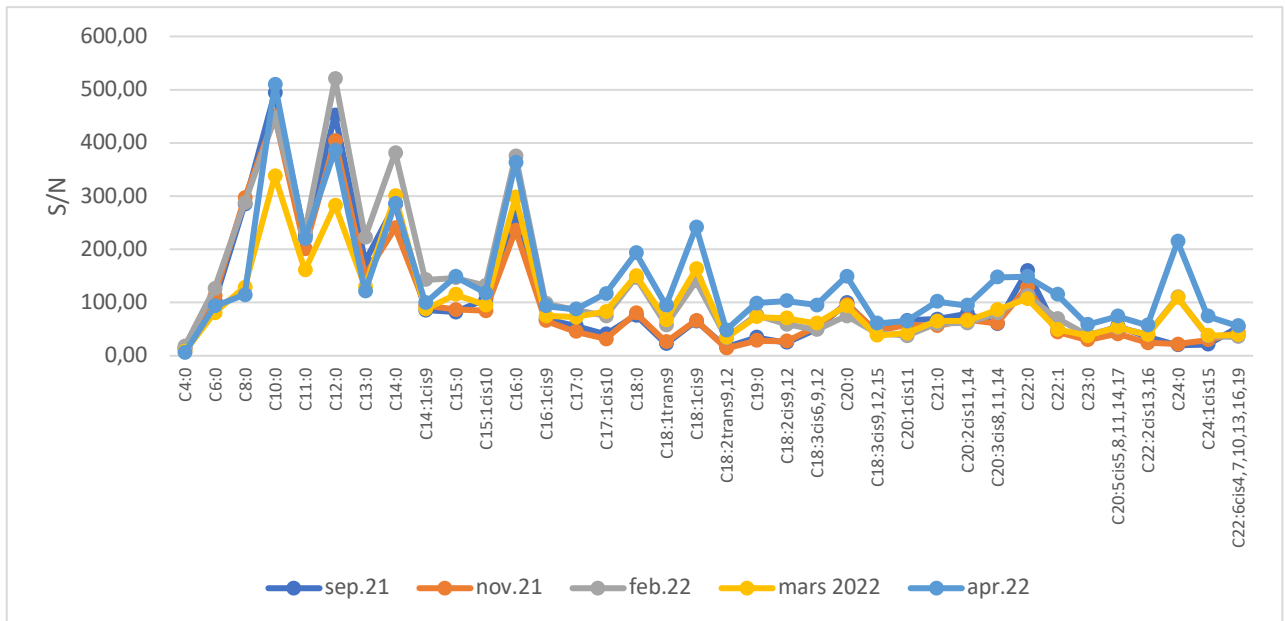
4.8 FAME over tid

Arealet til FAME på prøvene som ble analysert sist er høyere enn prøvene som ble analysert først, ved unntak av prøven som ble analysert i september 2021, Figur 4-22. Prøvene som ble analysert i september hadde standardspenning på C-fellen og på spenningen i EI-kilden. Dette kan være årsaken til at den har et høyere areal. De senere prøvene ble analysert med en fast spenningsenergi som ga en bedre S/N forhold. Analysen som er analysert i april har høyere areal en analyse i mars og videre tilbake i tid til november. En årsak til dette er at løsemiddelet i prøvene fordamper over tid og gir en høyere konsentrasjon for analyttene.



Figur 4-22: Sammenligning av areal for FAME. Resultatene er basert på for FAEF og FAPE der det er 3 ulike konsentrasjoner med 3 replikater av hver konsentrasjon. For FAME er det benyttet 3 ulike konsentrasjoner med 9 replikater av hver konsentrasjon.

Over tid har også S/N til FAME blitt større fra analysene som ble analysert i november og framover i tid til analysen som er analysert i april (Figur 4-23). Dette kan være av samme årsak som at arealet har økt, løsemiddelet har fordampet og konsentrasjonen har økt i prøven. Derfor vil usikkerhet på konsentrasjon øke.



Figur 4-23: Sammenligning av S/N for FAME. Resultatene er basert på for FAEE og FAPE der det er 3 ulike konsentrasjoner med 3 replikater av hver konsentrasjon. For FAME er det benyttet 3 ulike konsentrasjoner med 9 replikater av hver konsentrasjon.

5 Konklusjon

For å konkludere vil det være ønskelig å ha instrument på en masseoppløsning på 60 000. I tillegg vil det være ønskelig å analysere på en c-felle spenning på 1,5 V. Det kan også være mulighet å benytte en c-felle spenning på 2 V for lengre karbonkjeder. Ut ifra resultatene for variabel elektron energi vil det være som forventet å benytte 70 eV, resultatene viste også at 40 eV kan være bedre å benytte for de lengre karbonkjedene over 18 karboner. Det ble også ikke sett at lavere elektron energi påvirket molekylionet i massespektrene til de ulike FAME.

For FAME ble det funnet LOD til å være mellom 0,03 µg/mL og 0,87 µg/mL, og LOQ ble funnet til å være mellom 0,11 µg/mL og 1,93 µg/mL. Videre for FAEE ble det funnet LOD til å være mellom 0,06 µg/mL og 0,64 µg/mL og for LOQ mellom 0,21 µg/mL og 2,15 µg/mL. Til slutt ble LOD for FAPE funnet til å være mellom 0,05 µg/mL og 0,24 µg/mL og LOQ ble funnet til å være mellom 0,18 µg/mL og 1,49 µg/mL. Alle alkylesterene hadde likt mønster for de korteste karbonkjedene for LOD/LOQ, det var mer variasjon mellom de ulike for lengre FAME. Det er en liten forskjell rundt FAME, FAEE og FAPE som gjør at det ikke har en stor betydning hvilken alkylester det brukes, men det vil være lettest å fortsette å benytte FAME som tidligere. Vil også trekke fram at FAME er ikke helt sammenlignbar med FAEE og FAPE ettersom de ikke laget på samme måte.

Etter å ha sett på sammenhengen mellom areal og S/N mot konsentrasjonen kan det konkluderes med arealet er påvirket av konsentrasjonen, men signalet har mange andre faktorer som gjør dette ikke sammenlignbart. For beregningene på RRF kan det konkluderes med at GC-FID vil gi bedre og mer nøyaktige resultater for RRF enn det orbitrap vil gi. Til slutt vil det også konkluderes med at analysene vil bli mer unøyaktige over tid. Dette vil gjøre det er vanskeligere å anta en konsentrasjon og benytte resultatene i beregninger for LOD/LOQ og RRF.

6 Litteraturliste

- Anonym. (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- Anonym. (2015). *Q Exactive GC Mass spectrometer operating manual*.
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-1R120706-0002-GC-MS-Q-Exactive-Man1R1207060002-EN.pdf>
- Anonym. (2016a). *Inntak av næringsstoffer, 2.3 Fett*. Helsedirektoratet. Retrieved 10.05 from <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/inntak-av-naeringsstoffer/fett>
- Anonym. (2016b). *Mass Resolution and Resolving Power*. Fiehn Lab.
<https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/seven-golden-rules/mass-resolution>
- Anonym. (2018). The frontier of routine GC-MS.
- Anonym. (2022a). *Lipids*.
<https://www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/lipids/a/lipids>
- Anonym. (2022b). *Molecular Dissociation Technology Overview*. ThermoFisher Scientific. Retrieved 09.02 from <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/dissociation-technique-technology-overview.html>
- Anonym. (2022c). *Orbitrap*. Mass spc pro. <http://www.massspecpro.com/mass-analyzers/orbitrap>
- Anonym. (2022d). *Orbitrap LC-MS*. Thermo Fisher.
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms.html>
- Anonym. (2022e). *Split vs. Splitless injection*. <https://www.restek.com/row/video-library/split-vs-splitless-injection/>
- Anonym. (2022f). *What is Mass spectrometry*. <https://www.broadinstitute.org/technology-areas/what-mass-spectrometry>
- Coulter, T. P. (1996). *Food The Chemistry of Its Components*. The Royal Society of Chemistry.
- 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. *J Sep Sci*, 32(21), 3738-3745.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200900455>
- Dunn, W. B. (2011). Methods in System Biology. In *Methods in Enzymology*.
<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/quadrupole-mass-analyzer>
- Hoffmond, E. S., V. (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hummervoll, L. (2022). *Optimization of synthesis of FAME, FAEE, FAPE and FBE for analysis with GC-FID and GC-Orbitrap*
- Kaufmann, A. B., M. (2018). Selecting the best Q Exactive Orbitrap Mass spectrometer scan mode for your application. 11.
- lab-training.com. (2014). *Benefits of split/splitless injection in capillary gas chromatography* [Figur]. <https://lab-training.com/benefits-of-split-splitless-injection-in-capillary-gas-chromatography/>
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J. P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., & Horning, S. (2011). *Mass spectrometry-based proteomics using Q*

- Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer* [Figur]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642640>
- Miller, J. M. (2009). *Chromatography concepts & Contrasts*. John Wiley & Sons.
- Sanders J.A, G. D., Aizikov, K, Makarov A., Holden D.D, Brodbelt J.S. (2018). *Determination of collision cross sections of protein ions in an orbitrap mass analyzer* [Figur]. https://www.researchgate.net/publication/324172536_Determination_of_Collision_Cross_Sections_of_Protein_Ions_in_an_Orbitrap_Mass_Analyzer
- scientific, T. (2017). *The frontier of routine GC-MS* [Figur].
- Strupat, S. S., O.; Bromirski, M. (2016). High-Resolution, Accurate-Mass Orbitrap mass Spectrometry - Definitions, Opportunities and Advantages. 5.
- Zheng, X. C., C.; Cole, J.; Silcock, P. (2017). Variable electron voltage (VeV) on Q Exactive GC and Exactive GC Orbitrap GC-MS systems. 4.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway