Mastergradsoppg. 2011

Mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer, analysert med GC-MS

Microwave-assisted methylation of free fatty acids, analyzed by GC-MS

UMB. UNIVERSITETSBIBLIOTEKET

Siri Rafdal

Universitetet for miljø- og biovitenskap
Institutt for
Masteroppgave 30/60 stp. 2008

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap. Oppgaven utgjør 30 studiepoeng av sivilingeniørprogrammet på 300 studiepoeng. Oppgaven er en metodeutviklingsoppgave innen organisk-analytisk kjemi, og alt praktisk arbeid er utført på IKBM fra august 2010 til mars 2011.

Takk til veileder, Dag Ekeberg for konstruktive tilbakemeldinger og gode råd i forbindelse med praktisk arbeid og resultatbehandling. Vil også takke Hanne Devle for hjelp og veiledning på laboratoriet i startfasen. Til slutt en spesiell takk til mine foreldre, for at de alltid har tro på meg, og at de til en hver tid klarer å berolige meg når presset er størst.

Ås, 15.03.2011

_____

Siri Rafdal

Sammendrag

En metode for syrekatalysert metylering av frie fettsyrer (FFA) assistert av mikrobølger ble utviklet, og sammenlignet med tradisjonelle oppvarmingsmetoder i vannbad. GC-MS ble benyttet for kvalitativ og kvantitativ analyse av fettsyre metylestere (FAMEs) i tre forskjellige standarder. Prosent utbytte av hver FAME ble beregnet fra deres respektive arealer mot arealet til en internstandard. Optimaliseringskurver ble laget for hver metode for å få en grafisk oversikt over utbyttene til de ulike FAMEs over tid.

I del I av metodeutviklingen var presisjonen i analysene gode for FAMEs fra C14:0. C10:0 og C12:0 hadde store sprik i resultatene, og enkelte hadde RSD opp mot 100%, så disse ble ikke tatt med i videre beregninger. De øvrige FAMEs hadde relative standardavvik (RSD) under 10%, men med noen unntak. Best presisjon ble oppnådd ved 70W, med total RSD i metoden på 1,71%.

I andre del ble en referansestandard med 20 ulike FFA av ulik lengdre og grad av umettethet derivatisert. Det ble tidlig oppdaget større avvik i resultatene i forhold til forventningene. Spesielt C22:0, C24:0, C22:1cΔ13 og C24:1cΔ15 fikk utbytter betydelig lavere enn forventet. Avvik ble også oppdaget i enkelte prøver, og da det kun ble preparert 3 paralleller per metode, kunne ikke presisjonen gjøres rede for. Jevnt over var det lave RSD, de fleste under 10%, men noen unntak. Ved sammenligning av totalt derivatisert mettet, enumettet, flerumettet samt totalt FAME i referansestandarder, var presisjonen dårlig med RSD større enn 10%. Det ble konkludert med at den innkjøpte referansestandarden hadde et annet mengdeforhold enn det som var oppgitt, og at beregnet vekt var høyere enn reell vekt, så en endelig konklusjon på metoden kunne ikke bestemmes.

Ved mikrobølgemetode på korte og middels korte FFA, gikk det som forventet. FFA og FAMEs opp til C14:0 er mer flyktige enn de over, det er sannsynlig at det skjedde mye tap enten før, under og/eller etter metylering. Presisjonen var kun god før C16:0-C18:0, og på grunn av mye tap av kortere FAMEs ligger utbyttene over 100%. For en mer nøyaktig derivatisering må andre metoder benyttes.

Abstract

A method for acid catalyzed methylation of free fatty acids (FFA), assisted by microwaves was developed and compared with conventional heating methods by water baths. GC-MS was used for the qualitative and quantitative analysis of fatty acid methyl esters (FAMEs) in three different standards. Percentage yield of each FAME was calculated from their respective chromatogram areas against the area of an internal standard. Optimization curves were made to get a graphic view of the FAME's yields over time.

In part I of the method development, the precision of the analysis of FAMEs from C14:0 – C18:0 were good. C10:0 and C12:0 had a large discrepancy in the results, and some had RSD near 100%. These were not included in further calculations. FAMEs from C14:0 – C18:0 had RSD below 10%, with some exceptions. The best precision was obtained at 70W, with a total RSD of the method of 1,71%, and stable yield at 80 – 95% after 20 seconds with microwave irradiation.

In the second part of the method development, a reference standard of 20 different FFA with different lengths and degrees of unsaturation was tested. Four different methods were used. It was observed rather early significant differences in yields relative to the expectations. In particular, C22:0, C24:0, C22:1cΔ13 and C24:1cΔ15 percentage yields were significantly lower compared to the other FAMEs, and relative to the expectations. Differences were also detected in some samples, and since it was only prepared three parallels per method, and only one injection of each sample, the precision could not be accounted for. Most FAMEs had RSD below 10%, but some exceptions were discovered. When comparing the average yields of saturated, monounsaturated and polyunsaturated FAMEs and total average yield of the reference standard, RSD's greater than 10% was observed. It was concluded that the purchased reference standard had a different wt% of the FFA than firstly thought, and that the calculated weight was higher than the actual weight, so a final conclusion could not be determined.

As expected, the acid catalyzed methylation of short and medium chain FA is not recommended. FFA and FAMEs up to C14:0 are more volatile than FFA and FAMEs with longer hydrocarbon chains, so loss before, during and/or after methylation is likely. The precision was good only for C16:0-C18:0, and average yields were greater than 100% due to loss of short and medium chain FA.

Contents

Forord 1
Sammendrag 2
Abstract 3
1. Innledning 6
1.1. Hensikt 6
1.2. Teori 6
1.2.1. Lipider 6
1.2.2. Fettsyrer 7
1.2.2.1. Grupperinger 9
1.2.2.2. Uvanlige fettsyrer 13
1.2.2.3. Acylglyseroler 15
1.2.2.4. Fosfoglyserider 15
1.2.3 Fettsyreanalyser og GC-MS 16
1.2.3.1 Basekatalysert metylering 16
1.2.3.2 Syrekatalysert esterifisering av fettsyrer 17
1.2.3.3 Mikrobølger 20
1.2.3.4 Injeksjon av prøve på GC 22
1.2.3.5 Separasjon 23
1.2.3.6 Kolonner 23
1.2.3.7 Massespektrometer som detektor 24
1.3 Forventede resultater 28
2 Materialer og Metoder 29
2.1 Laging av stamløsninger 29
2.2 Metylering av fettsyrestandarder 31
2.2.1 Metodeutvikling del I 31
2.2.2 Metodeutvikling del II og III 32
2.2.2.1 Mikrobølgemetode, del II og III 32
2.2.2.2 Alternativ mikrobølgemetode, del II 32
2.2.2.3 Vannbad 70 ˚C, del II 32
2.2.2.4 Vannbad 100 ˚C del II 33
2.3 Kvantitativ analyse med GC-MS 33
2.3.1 Temperaturprogrammer på gasskromatograf (GC) 33

2.3.1.1 Temperaturprogram I 33
2.3.1.2 Temperaturprogram II 34
2.3.2 Massespektrometer (MS) 35
3 Resultater og Diskusjon 36
3.1 Metodeutvikling del I 36
3.2 Metodeutvikling del II 40
3.2.1 Mikrobølger, 70W 41
3.2.2 Mikrobølger, 70˚C 46
3.2.3 70 ˚C vannbad 52
3.2.4 100 ˚C vannbad 57
3.2.5 Sammenligning av metoder for metylering av GLC 502 62
3.3 Metodeutvikling del III 63
4 Konklusjon 67
5 Videre arbeid 69
6. Referanser 70
Vedlegg 73
Verdier, stolpediagram 89

1. Innledning

1.1. Hensikt

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en metode for mikrobølgeassistert metylering av frie fettsyrer med 10% BF_3 – metanol. Kvalitativ og kvantitativ analyse ble utført på GC-MS (Autospec Ultima) med metode utviklet av Devle et. al (2009) på institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB).

I 1986 ble det publisert et arbeid av Gedye et al. som brukte mikrobølger i kjemiske transformasjoner. Mikrobølgeassistert syntese er siden den gang blitt et ekspanderende område, der det i de fleste tilfelle ga raskere reaksjoner, bedre utbytte og lavere andel uønskede sidereaksjoner og biprodukter sammenlignet med konvensjonelle oppvarmingsmetoder. Teknologien er også i nyere tid brukt mye i multistep-syntese, medisinsk kjemi, polymersyntese, materialvitenskap, nanoteknologi og biokjemiske prosesser (Kappe et al. 2009)

1.2. Teori

1.2.1. Lipider

Utrykket lipid er fra tidlig 1900-tallet og kommer fra det franske ordet *lipide* som igjen stammer fra greske *lipos*, oversatt "fett" (Oxford Dictionarys Online 2011). Siden lipidkjemien oppstod er flere andre naturstoffer oppdaget som også går under lipider, og definisjonene er da blitt mange. Oxford Dictionary definerer lipider som:

"Alle grupper eller substanser som generelt er godt løselige i eter, kloroform og andre løsningsmidler for fett men lite løselige i vann, som med karbohydrater og proteiner strukturelt er hovedkomponentene i celler, og inkluderer fett, voks, fosfotider, cerebrosider og slektede deriverte stoffer og av og til steroider og karotenoider"

Dette er en forholdsvis innskrenket versjon i forhold til de tidligste definisjonene som i hovedsak definerte lipider som naturstoffer som var løselige i upolare løsningsmidler, og uløselige i polare løsningsmidler. William W. Christie's (1989) verson sier:

"Lipider er fettsyrer og deres derivater, og stoffer relatert biosyntetisk eller funksjonelt til disse stoffene"

Her vil kolesterol, gallesyrer og tocoferoler kunne tolkes som lipider, mens naturstoffer som fettløselige vitaminer, hormonsteroler, karotenoider og enkle terpener ekskluderes. Fahy et al. (2005) har publisert en artikkel om klassifisering av lipider, der deres definisjon var:

"Lipider er hydrofobe amfipatiske små molekyler som stammer helt eller delvis fra karbanion-baserte kondensasjoner (polyketider, fettsyrer, etc.), og/eller fra kabokation-baserte kondensasjoner av isoprenenheter (terpener, steroler, etc.)"

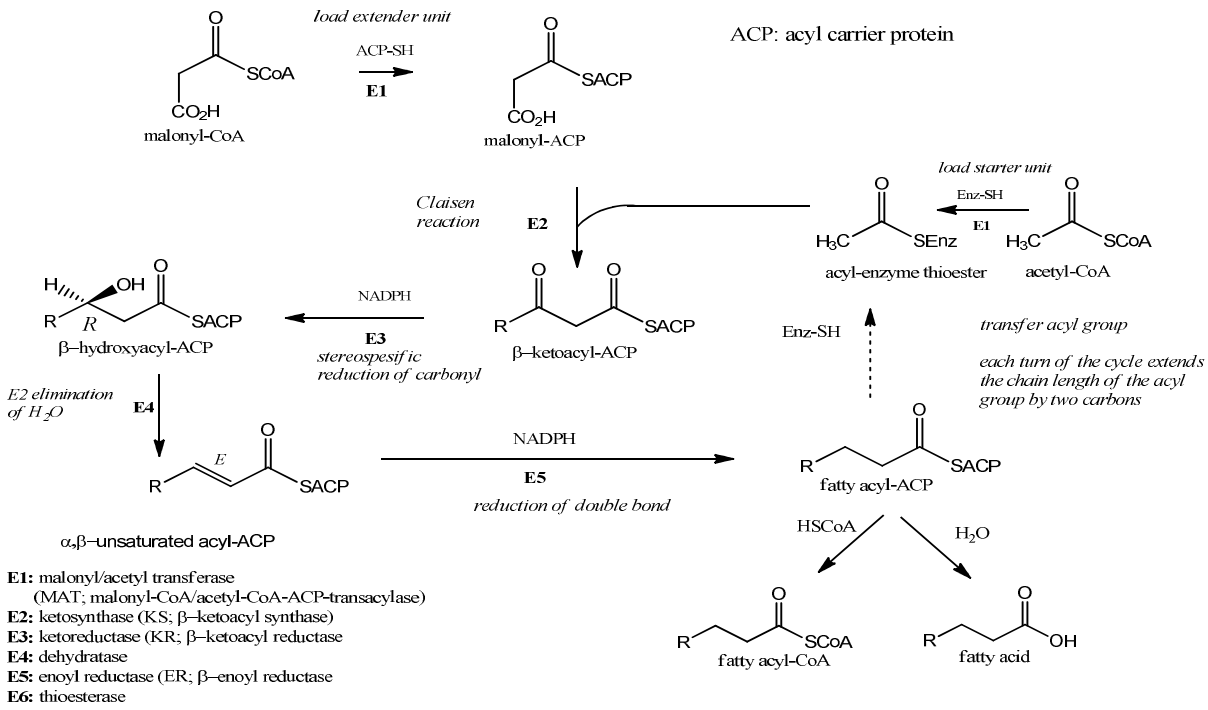
Selv om analytikere flest har en klar forståelse om hva et lipid er, eksisterer det noen uenigheter om hvilke stoffer man skal anse som et lipid, og derav finnes i dag ingen klare definisjoner. Felles for alle er oprinnelsen til lipidkjemien, fettsyrer og fettsyrederivater, og er et mye diskutert tema i dagens samfunn i forhold til kosthold og sykdommer.

Lipider kan klassifiseres etter flere kriterier; Polaritet, fysiske egenskaper ved romtemperatur (fast, flytende), livsnødvendighet (essensiell, ikke essensiell), og struktur (enkel, kompleks). Fettsyrer, alkoholer, acylglyseroler og steroler regnes som nøytrale lipider, mens de polare inkluderer glyserofosfolipider og glyseroglykolipider. Klassifisering etter polaritet er noe diffus, så strukturell klassifisering er mer foretrukket. Strukturelt kan lipidene deles inn i enkle og komplekse, der de enkle lipidene ofte er byggesteiner til de mer komplekse. Acylglyseroler, eter acylglyseroler og steroler er eksempler på enkle lipider, da disse gir maksimalt to produkter ved hydrolyse. Om et lipid gir tre eller flere produkter ved hydrolyse ansees det som en komplekst lipid, e.g. fosfolipider, glykolipider og sphingolipider (Akoh & Min 2002).

1.2.2. Fettsyrer

Opprinnelsen til lipidkjemien er fett, og er et område det blir lagt mye vekt på, spesielt i henhold til kosthold. Biosyntesen av fettsyrer er grundig studert, og katalyseres av et fettsyre syntase enzym (FAS). FAS kan deles inn i to typer, FAS I (dyr og sopp) og FAS II (planter og bakterier). FAS I i dyr er et stort multifunksjonelt protein der alle domener er plassert på et og samme polyketid, altså alle domener koder fra et spesifikt gen. I sopp er de funksjonelle domenene fordelt på to ulike polypeptider, α og β, men dette er også et stort multifunksjonelt protein. FAS II skiller seg fra FAS I ved at det er en samling av syv ulike enzymer kodet fra syv forskjellige gener. Selv om FAS i ulike grupper av naturen skilles i struktur, utfører de tilnærmet de samme reaksjonene (Dewick 2009).

Fettsyrer er et produkt fra acetat-biosynteseveien via acetyl-CoA som startenhet og det mer reaktive malonyl-CoA som forlenger (Figur 1.1).



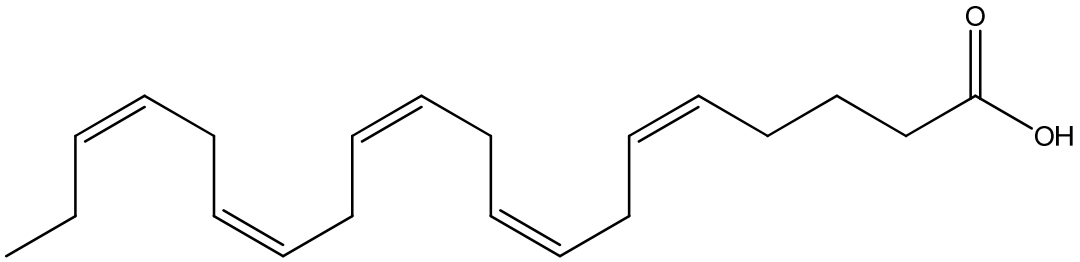
FIGUR 1.1: BIOSYNTESE AV FETTSYRER I PATTEDYR (DEWICK 2009)

Aktivering skjer ved konvertering av acetyl-CoA og malonyl-CoA til enzymbundede thioestere. Hydrokarbonkjeden forlenges med to karboner fra malonyl-ACP ved Claisen kondensasjoner, deretter følger stereospesifik reduksjon av karbonyl, eliminasjon av vann og reduksjon av dobbeltbinding. For hver gang syklusen går, forlenges den alifatiske kjeden med to karbonatomer, derav har flertallet av fettsyrene et partalls antall karboner. Det finnes også fettsyrer med oddetalls antall karbonatomer, disse forekommer mest i marine organismer og bakterier (Dewick 2009).

NOMENKLATUR

For en mest mulig entydig navnsetting har The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) og International Union of Biochemistry (IUB) utviklet et navnsettingssystem for lipider (IUPAC-IUB 1977). Fettsyrene navnsettes i henhold til lengden på den alifatiske kjeden, og får endelsen –syre. E.g en mettet fettsyre med 14 karboner vil ha navnet tetradekansyre, fra tilhørende alkan tetradekan, 16 karboner gir heksadekansyre, fra alkanet heksadekan osv. Umettede fettsyrer navngis på samme måte, men da men hensyn på fettsyrens respektive alken, og endelse –ensyre, diensyre osv. avhengig av graden av umettethet.

De fleste fettsyrene er veldig lange, så forkortelser er mye brukt. F.eks Eicosapentaensyre (EPA) kan skrives C20:5, molekylet har 20 karbonatomer og 5 dobbeltbindinger. Da det ofte finnes flere isomere av flerumettede fettsyrer bør posisjonen til dobbeltbindingene også være med og plasseringen angis med Δ, som er avstanden fra karboksylkarbonet til dobbeltbindingen(e). Eks. EPA refererer som oftest til *c*-5, *c*-8, *c*-11, *c*-14, *c*-17-eicosapentaensyre, men isomeren *c*-2, *c*-5, *c*-8, *c*-11, *c*-14-eicosapentaensyre som også finnes i naturen, er i henhold til standard nomenklatur også en eicosapentaensyre. Ved å bruke forkortelser som også angir posisjonen til dobbeltbindingene, henholdsvis C20:5Δ5c,8c,11c,14c,17c (Figur 1.2) og C20:5Δ2c,5c,8c,11c,14c, kan de enkelt skilles.



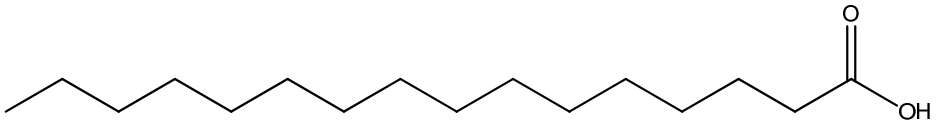
FIGUR 1.2: EICOSAPENTAENSYRE, C20:5Δ5C,8C,11C,14C,17C

Selv om IUPAC og IUB utviklet dette navnsettingssystemet, er fortsatt noen trivialnavnsettinger anerkjent. n-familien, mer kjent som ω-familien gir informasjon om plassering av første dobbeltbinding, talt fra metylenden (ω er siste bokstav i det greske alfabetet, teller fra enden, "halen") (Dewick 2009). På denne måten kan EPA også skrives C20:5ω-3, siden første dobbeltbinding er mellom C3 og C4 talt fra metylenden. I tillegg finnes trivialnavn som gjerne stammer fra kilden fettsyren først ble isolert fra, e.g palmitinsyre (C16:0) fra palmeoljer.

1.2.2.1. Grupperinger

METTEDE FETTSYRER

De mettede fettsyrenes alifatiske kjede har kun enkeltbindinger, da maksimalt antall hydrogenatomer og er derav mettet. Bundet til glyseroler, er disse ved romtemperatur faste, da de rette kjedene kan pakkes tett sammen. Siden det er mulig med rotasjon rundt enkeltbindingene kan andre konformasjoner også eksistere (Mathews et. *al*.). Den mest forekommende fettsyren er C16:0 (Figur 1.3), tett etterfulgt av C14:0 og C18:0, men lange fettsyrer opp til 56 karbonatomer er funnet i celleveggen til mycobakterier (Dewick 2009).



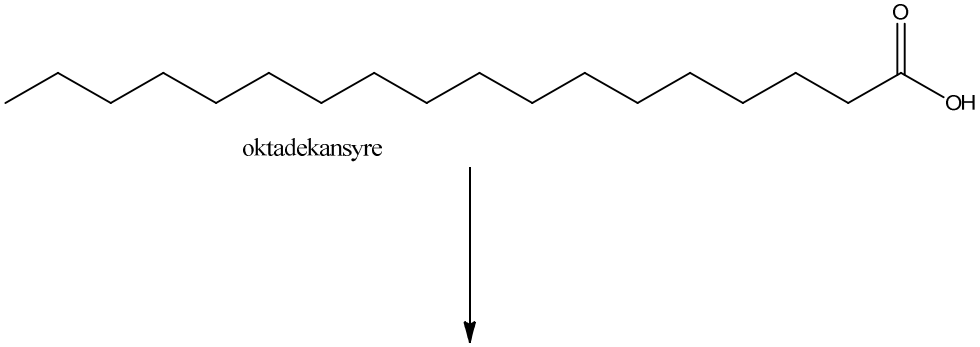
FIGUR 3: HEKSADECANSYRE, C16:0

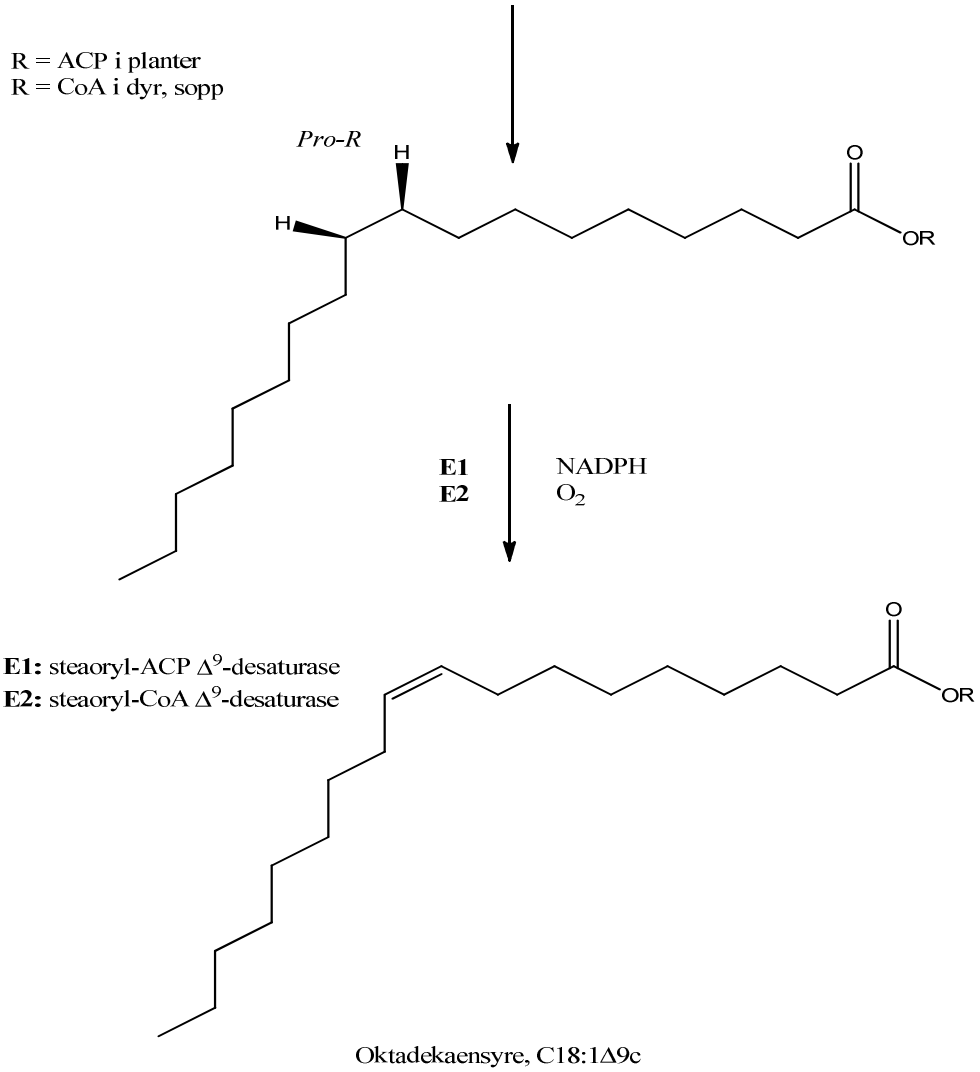
Fett som inneholder mye mettede fettsyrer har høyere smelte- og kokepunkt sammenlignet med fett som har et større innhold av umettede fettsyrer, og vil være faste ved romtemperatur. Årsaken til dette er at den utstrakte strukturen til de mettede fettsyrene gir tettpakking av fettsyrekjedene, omtrent tilsvarende som i en krystall (Hart et al. 2007)

ENUMETTEDE FETTSYRER

Oktadekaensyre, C18:1Δ9c er den mest forekommende enumettede fettsyren i naturen, og betydelig mange flere er blitt isolert fra naturen (Akoh & Min 2002). De fleste enumettede fettsyrer er Δ9 fettsyrer, men det er identifisert mer uvanlige monoener som Δ5 og Δ7 i enkelte planter, marine organismer og bakterier (Christie 2010).

Den viktigste prosessen for introduksjon av en dobbeltbinding kalles oksidativ demetting, der dobbeltbindingen introduseres til hydrokarbonkjeden ved syn-eliminasjon av et vicinalt par av *Pro-R* hydrogener, som gir dobbeltbindingen *cis*-konfigurasjon (Figur 1.4) (Dewick 2009). *Trans*-konfigurasjon på fettsyrer er også funnet i naturen, men disse er mer sjeldne.





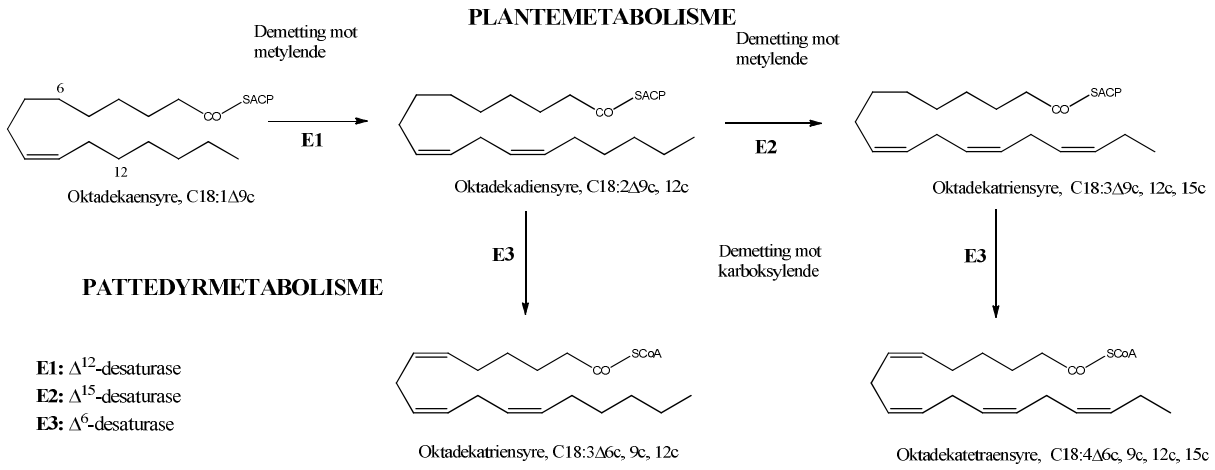
FIGUR 1.4: OKSIDATIV DEMETTING AV OKTADEKANSYRE, C18:0, TIL OKTADEKAENSYRE, C18:1Δ9C

Fett med høyere andel enumettede fettsyrer vil ha lavere smelte- og kokepunkt sammenlignet med mettede fettsyrer. Når en *cis*-dobbeltbinding introduseres på hydrokarbonkjeden vil den få en knekk, og derav ikke kunne pakkes like tett sammen. Resultatet er da at fettet blir flytende ved romtemperatur.

FLERUMETTEDE FETTSYRER

Flerumettede fettsyrer (PUFAs, fra engelsk; PolyUnsaturated Fatty Acids) har to eller flere dobbeltbindinger på hydrokarbonkjeden. Videre intruduksjon av dobbeltbindinger skjer på tilsvarende måte som beskrevet over (Figur 1.4), men retningen avhenger av organismen. Pattedyr har Δ5 og Δ3 i tillegg til Δ9 desaturaser, og gir dermed nye dobbeltbindinger mellom eksisterende og karboksylhodet. I motsetning har planter og sopp Δ12 og Δ15 desaturaser,

slik at nye dobbeltbindinger blir introdusert mellom eksisterende og metylende (Figur 1.5) (Akoh & Min 2002).



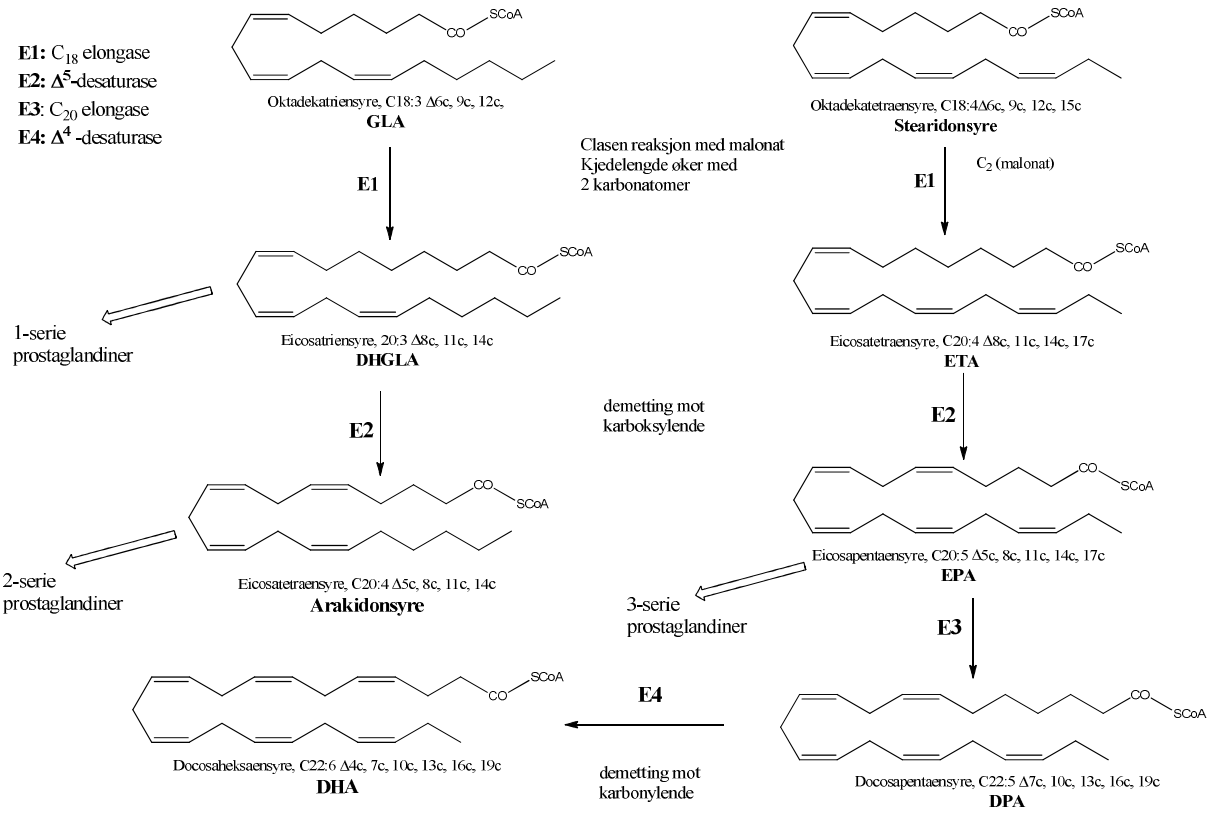
FIGUR 1.5: INTRUDUKSJON AV DOBBELTBINDINGER PÅ ENUMETTEDE FETTSYRER (DEWICK 2009)

PUFAs omtales ofte i familier (ω- eller n-familie), fremfor standard navnsetting, da for å illustrere posisjonen av første dobbeltbinding. Siden dyr ikke kan syntetisere de essensielle ω-3 eller ω-6 fettsyrer, må disse tas opp gjennom dietten.

Som med enumettede fettsyrer vil fett med høy andel flerumettede fettsyrer ha lavere smelte- og kokepunkt enn mettede. Jo flere *cis*-dobbeltbindinger som introduseres på hydrokarbonkjeden, jo mer uorden i strukturen og mer utfordrende pakking av fettsyrene.

ESSENSIELLE FETTSYRER

Essensielle fettsyrer er de dyr ikke klarer å syntetisere selv og har en biologisk livsnødvendighet for organismen. Livsnødvendigheten til ω-6 fettsyrer har lenge vært kjent, mens bevis for livsnødvendighet til ω-3 fettsyrer ikke ble kjent før fra 1970 og utover (Akoh & Min 2002). Forløperen til alle esensielle fettsyrer er C18:2ω-6, også kalt linolsyre, og C18:3ω-3, også kalt α-linolensyre. Selv om dyr ikke kan syntetisere ω-3 og ω-6 fettsyrer selv, vil forlenging og videre demetting mot kaboksylgruppe kunne skje, da hovedsaklig i leveren (Figur 6). Dannelse av eicosafettsyrer og docosafettsyrer (Figur 1.6) med ulik grad av umettethet gir opphav til blant annet prostaglandiner, leukotriener, tromboxaner og resolviner/protektiner (Dewick 2009).



FIGUR 1.6: FORLENGING OG DEMETTING AV FETTSYRER I PATTEDYR (IUPAC-UIB NAVN OG TRIVIALNAVN)

1.2.2.2. Uvanlige fettsyrer

C10-C20 fettsyrer er de mest forekommende i naturen, men både lengre og kortere er isolert fra naturen. Dannelse av fettsyrer lengere enn C20 skjer ofte ved semisyntese, der utgangspunktet er en kortere fettsyre som gjennomgår flere Claisenkondensasjoner for ytterligere forlenging av hydrokarbonkjeden, katalysert av elongaser. I dyr skjer dette hovedsaklig i leveren. Fettsyrer med oddetalls antall karbonatomer er også isolert, da mest fra marine organismer og bakterier. Fettsyresammensetningen til enkelte bakteriemembraner kan i dag brukes til diagnostisering ved sykdom (Dewick 2009).

TRANSFETTSYRER

Transfettsyrer inkluderer alle fettsyrer med en eller flere dobbeltbindinger med *trans* eller *E* konfigurasjon. I enkelte organismer kan man også finne konjugerte systemer, men disse mer mer sjeldne. Mennesker og dyr får transfettsyrer fra dietten gjennom blant annet bakterier og delvis hydrogenerte oljer. Bakterier danner transfettsyrer under anaerobiske forhold, og er mest forekommende i gram-negative bakterier. Årsaken til dannelsen av transfettsyre kan være for å regulere fastheten til cellemembranen for bedre resistens mot løsningsmidler eller plutselige temperaturforandringer (Akoh & Min 2002). Delvis hydrogenering av olje gjøres

mye i industri for å øke fastheten av enkelte typer fett, e.g margarin. Siden det i senere tider er bevist at store mengder transfett kan ha en negativ helseeffekt, er mengde transfett i matvarer nøye overvåket (Dewick 2009).

ACETYLENFETTSYRER

Acetylenfettsyrer er fettsyrer med en eller flere trippelbindinger, og de dannes ved videre demetting av en eksisterende dobbeltbinding. De er funnet i mange organismer i naturen, men spesielt vanlig i et fåtall planter og sopp. Acetylenfettsyrene er veldig ustabile, og kan ved høye konsentrasjoner være eksplosive, men da mengdene som regel er veldig lave er dette sjeldent et problem (Dewick 2009)

HYDROKSYFETTSYRER

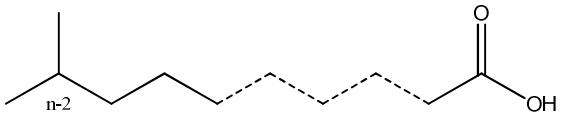
Hydroksyfettsyrer har en eller flere hydroksygrupper på hydrokarbonkjeden (Mathews et al. 2005), og finnes i små mengder i de fleste organismer, der de ofte er viktige komponenter i sphingolipider. De er som oftest mettet, men både enumettede og flerumettede er isolert. I dyr og planter er 2-hydroksy de mest vanlige, altså hydroksygruppen sitter på α-karbonet. OH-gruppen blir introdusert ved α-oksidasjon. 3-hydroksyfettsyrer dannes ved β-oksidasjon av fettsyrer. Dersom konsentrasjonen av 3-hydroksyfettsyrer i dyrs blod eller urin er høy, kan det indikere en fettsyreoksidasjonslidelse .

EPOKSYFETTSYRER

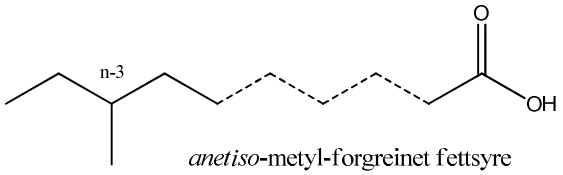
Epoksyfettsyrer finnes i forholdsvis høye konsentrasjoner i enkelte planter og frøoljer, og dannes ofte ved lengere tids lagring av frø (Akoh & Min 2002). Epoksyfettsyrene dannes ved direkte innføring av en epoksyring på fettsyren (som en forfolipidester), avhengig av organismen varierer enzymet som katalyserer reaksjonen (Dewick 2009).

FORGREINEDE FETTSYRER

Forgreinede fettsyrer er vanligste i bakterier og dyr, men mer sjeldent i planter. De vanligste forgreinede fettsyrene har en metylgruppe i n-2 eller n-3 posisjon, og kalles henholdsvis *iso*- og *anteiso*-metyl-forgreinede fettsyrer (Figur 1.7).



iso-metyl-forgreinet fettsyre



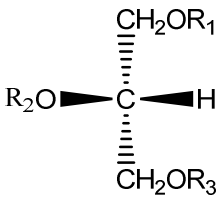
anetiso-metyl-forgreinet fettsyre

FIGUR 1.7: GENERELL STRUKTUR AV ISO- OG ANETISO-METYL-FORGREINEDE FETTSYRER

Metylgruppene kan introduseres på hydrokarbonkjeden ved C-alkyleringsmekanismen med *S*-adenosylmetionin (SAM), men andre mekanismer er foreslått for polyforgreinede fettsyrer. Enkelte forgreinede fettsyrer er spesifike for patogene bakterier, e.g tuberkolostearinsyre (10-metyl-oktadekansyre) fra bakterien *Mycobacterium tubercolosis*, og kan brukes som en markør i diagnistisering av tuberkolose (Dewick 2009).

1.2.2.3. Acylglyseroler

I stort sett alle typer fett og oljer, er fettsyrene esterbundet til en glyserolenhet. Dette gir opphav til mono-, di- og triacylglyserolene som har henholdsvis en, to og tre fettsyrer bundet til glyserolenheten (Figur 1.8).



R_1 = FA, R_2 og R_3 = H → Monoacylglyserol

R_1 og R_2 = FA, R_3 = H → Diacylglyserol

R_1, R_2 og R_3 =FA → Triacylglyserol

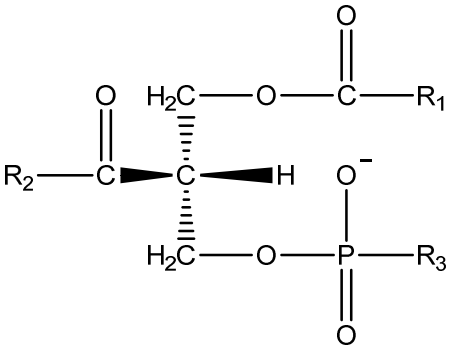
FA: Fettsyre

FIGUR 1.8: STEREOSPESIFIK STRUKTUR OG BESKRIVELSE AV MONO- DI- OG TRIACYLGLYSEROL

De mest forekommende acylglyserolene er triacylglyserol, som er hovedkomponentene i stort sett alt av fett og oljer. Mono- og diacylglyserolene finner stort sett bare i spormengder i planter og dyr, der de hovedsaklig er intermediater i syntese av triacylglyseroler (Christie 1989)

1.2.2.4. Fosfoglyserider

Fosfolipidene består av en glyserolenhet, fettsyrer, fosfat og en organisk base eller polyhydroksy forbindelse. Disse er veldig like diacylglyserolene, der klasse fosfolipid avhenger av gruppen bundet til fosfatenheten (Figur 1.9).



R_1 og R_2 er like eller ulike fettsyrer
R_3 angir klasse fosfolipid

FIGUR 1.9: GENERELL STRUKTUR AV ET FOSFOLIPID

Fosfolipidene er en hovedkomponenten i cellemembranen, og utgjør ca. 40%. De resterende 60% er stort sett proteiner. Fosfolipidene bygger opp cellemembranen ved å danne et "dobbeltlag", der de polare hodene (fosfatdelen) vender ut som de vanndige miljøene (det intracellulære og ekstracellulære), mens de fettsyrene danner et hydrofobt rom i midten. Med denne mekanismen og proteinene kontrolleres diffusjonen av molekyler og ioner inn og ut av cellen.

1.2.3 Fettsyreanalyser og GC-MS

Siden James og Martin i 1952 publiserte den første artikkelen på analyse av uderivatiserte fettsyrer, og i 1956 på tilsvarende med metylestere, er dannelse av fettsyremetylestere er en av de mest vanlige derivatiseringsmetodene av analytikere for lipidanalyse med GC. Metodene er veldig følsomme og selektive, spesielt i kombinasjon med høykvalitets kapillærkolonner og en spektroskopisk detektor. Før fettsyrene kan analyseres med GC-MS, må den polare syregruppen konverteres til et mer upolart derivat, e.g metylestere. Det kan deles inn i to hovedmekanismer; Syrekatalysert og basekatalysert metylering. Deretter følger injeksjon av prøve, separasjon av analytter, identifisering og eventuell kvantifisering (Eder 1995).

1.2.3.1 Basekatalysert metylering

Ved basekatalysert metylering er det kun O-acyl fettsyrer som metyleres, så metoden fungerer dårlig på frie fettsyrer og sphingolipider. Fordelen med basekatalysert metylering er at omestringen foregår ved romtemperatur, og den går relativt hurtig (Eder 1995). Omestringen

av O-acyl fettsyrene skjer i ved overskudd av vannfri metanol og en basisk katalysator (Figur 1.10) (Christie & Han 2010).

$$RCOOR_1 + CH_3OH \xrightleftharpoons{OH^-} RCOOCH_3 + R_1OH$$

FIGUR 10: GENRELL REAKSJONSLIGNING FOR TRANSESTERIFISERING AV O-ACYL FETTSYRER

Vanlige basekatalysatorer er natrium metoksid og kalium metoksid, og her er et vannfritt miljø veldig viktig for å unngå hydrolyse og frigjøring av frie fettsyrer. Da lange go veldig upolare lipider generelt er lite løselig i metanol, kan løsningsmidler som toulen eller tetrahydrofuran øke løseligheten (Christie & Han 2010).

1.2.3.2 Syrekatalysert esterifisering av fettsyrer

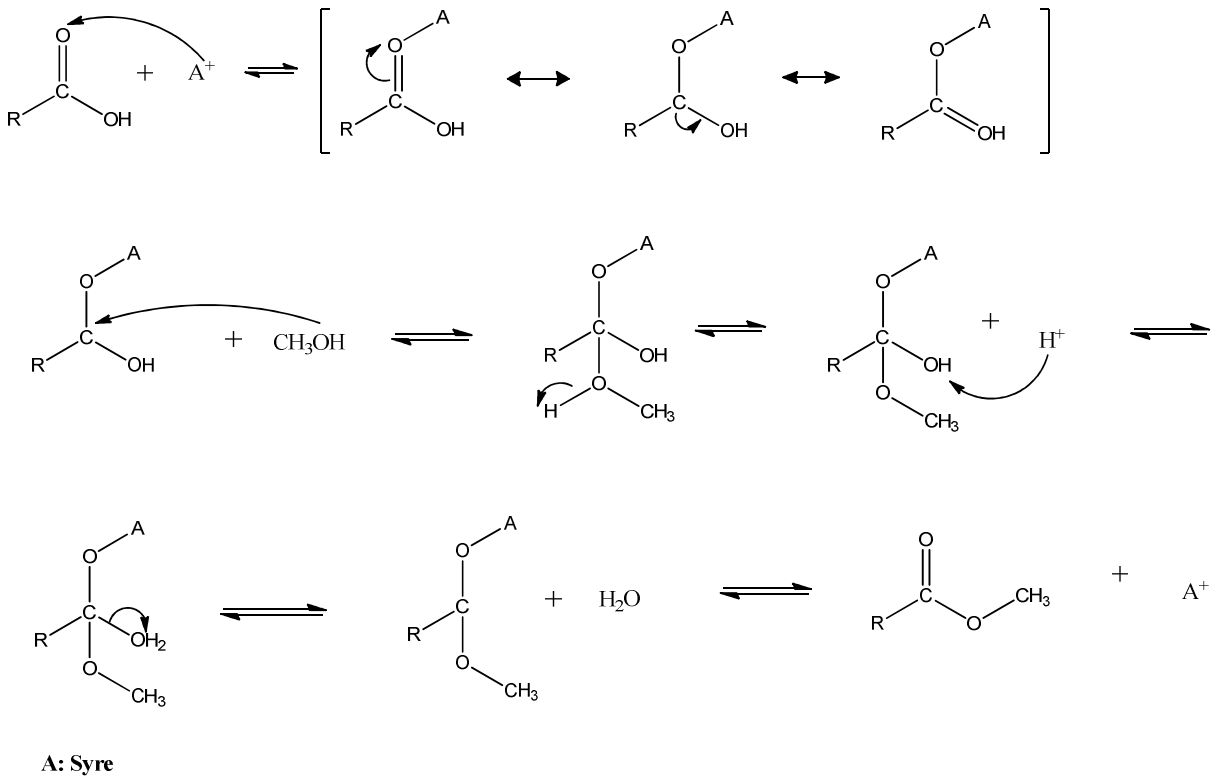
Ved denne metoden metyleres fettsyrene ved et stort overskudd av vannfri metanol med en syrekatalysator tilstede (Figur 1.11).

$$RCOOH + CH_3OH \xrightleftharpoons{H^+ \text{ eller LA}} RCOOCH_3$$

LA: Lewis syre

FIGUR 1.11: GENERELL REAKSJONSLIGNING FOR METYLERING AV FRIE FETTSYRER

Vannfri metanol er viktig da tilstedeværelsen av vann kan føre til at reaksjonen ikke går fullstendig (Christie & Han 2010). Metyleringen må helst skje under oppvarming, der syrekatalysatoren angriper karbonyloksygenet og eliminerer dobbeltbindingen slik at karbonylkarbonet blir en mer egnet nukleofil (Figur 1.12).



FIGUR 1.12: MEKANISME FOR SYREKATALYSERT METYLERING AV FRIE FETTSYRER

De vanligste syrekatalysatorene ved omestring er HCl-, H_2SO_4- og BF_3-metanol. Om fettsyrene er veldig lange og upolare, bør en andel av reagensen bestå av løsningsmidler som toulen eller tertahydrofuran for økt løselighet. HCl- og H_2SO_4-metanol er de rimeligste men ikke nødvendigvis de mest brukte reagensene. Metylering av frie fettsyrer går veldig raskt når en syrekatalysator er tilstede, men det er også mulig i kun metanol (Christie & Han 2010).

Det bør merkes at alder på reagensen kan ha innvirkning på derivatiseringen, da det er rapportert dannelse av biprodukter ved metylering av syklopropyl-, syklopentyl- og hydroksyfettsyrer, og noe dekomponering av PUFAs ved bruk av gammel BF_3-metanol. Epoksyfettsyrer er generelt også veldig ustabil i sure miljø, så det anbefales å ikke bruke en syrekatalysator ved derivatisering av disse (Hamilton & Hamilton 1993).

HCL-METANOL

HCl i metanol er en rimelig og veldig mild reagens for omestring av fettsyrer. Den prepareres ved å tilføre HCl-gass til vannfri metanol, der mengden bestemmes av operatøren. Det vanlligste er 5% (w/v), og en andel toulen eller tertrahydrofuran om nødvendig.. Fettsyrene metyleres ved oppvarming under refluks i 1-2 timer (Hamilton & Hamilton 1993), men lukkede systemer på vannbad ved 80 ˚C i ca. 1 time (Kramer et al. 1997).

H_2SO_4-METANOL

1-2% H_2SO_4 i metanol er veldig effektiv i både omestring av triacylglyseroler og frie fettsyrer. Den er enkel og rimelig å lage, og holder seg i 2-4 uker oppbevart i romtemperatur (Christie & Han 2010). Ved metylering kan metode tilsvarende HCl-metanol over brukes, da de oppfører seg ganske likt. Dette er en metode som egner seg godt for direkte omestring av triglyserider, så en andel toulen eller tetrahydrofuran er en fordel (Hamilton & Hamilton 1993). Om en prøve inneholder en høy andel mettede frie fettsyrer kan mengden H_2SO_4 økes til 10% for raskere metylering, men siden reagensen er en sterk oksidant anbefales det ikke for PUFAs, da høye konsentrasjoner, gjerne kombinert med høye temperaturer over lang tid kan føre til dekomponering av PUFAs. Jie og Yankit (1988) viste at mikrobølger som oppvarmingskilde til denne reagensen var veldig effektiv sammenlignet med tidligere brukte refluksmetoder for omestring av frie fettsyrer (5 minutter i mikrobølgeovn sammenlignet med 30 min refluks), og utbyttet ble like godt.

BF_3-METANOL

10-15% BF_3-metanol er en reagens som er veldig mye brukt ved derivatisering i dag, og den er spesielt hurtig på metylering av frie fettsyrer. Det er rapportert en del biprodukter ved bruk av BF_3 som katalysator, men da mest ved høye konsentrasjone av BF_3 (over 50%) (Lough 1964), men dette er ikke et problem når 10-15% benyttes (Morrison & Smith 1964). Det er også registrert problemer med biprodukter om reagensen er gammel (Fulk & Shorb 1970). Alternativ til BF_3-metanol kan BCl_3-metanol (12-15%) benyttes. Med denne er det registrert færre problemer med dannelse av biprodukter, men reaksjonstiden er noe lengre. Den er også en mer egnet katalysator ved analyse av sykloprpanfettsyrer, sammenlignet med andre syrekatalysatorer (Christie 2011)

OPPVARMINGSMETODER VED SYREKATALYSERT METYLDERING

Konvensjonelle metoder brukt på laboratorier i dag bruker mest vannbad (evt. sandbad) og refluks. Det er fortsatt gode og pålitelige metoder, men kravet til hurtighet av analyser blir stadig større. Den første publikasjonen på mikrobølger som oppvarmingskilde ved lipidtransformasjoner ble skrevet av Jie og Yankit i 1988, der deres sammenligninger av sine resultater mot andres i litteraturen viste betydelig redusert tid for å oppnå samme eller bedre utbytte. Siden den gang er bruk av mikrobølger i kjemiske synteser og transformasjoner blitt et ekspanderende område, og det har i mange tilfeller vist seg å svare til forventningene om raskere reaksjoner (Kappe et al. 2009).

1.2.3.3 Mikrobølger

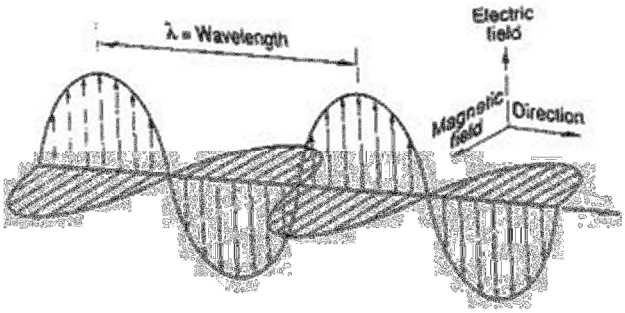
Mikrobølger er ekeltromagentisk stråling med frekvenser fra 0,3 – 300 GHz, tilsvarende bølgelengder fra 1mm – 1m, og ligger mellom den infrarøde strålingen og radiofrekvenser på det elektromagnetiske spektrum. Kommersielt brukes mikrobølger i dag til informasjonsoverføring (telekommunikasjon) og energioverføring (e.g kjøkken-mikrobølgeovner). Fotonenergien til mikrobølger (1,3 x 10^{-3} eV) er for lav til å bryte bindinger i molekyler (Tabell 1.1), så kjemiske reaksjoner skjer ikke ved absorpsjon av den elektromagnetiske strålingen. Reaksjoner i mikrobølgekjemi anhenger av dielektrisk oppvarming (Kappe et al. 2009).

TABELL 1.1: BINDINGSENERGIER FOR ULIKE BINDINGSTYPER (KAPPE ET AL. 2009)

Bindingstype	Bindingsenergi (eV)
C – C	3,61
C = C	6,35
C – O	3,74
C = O	7,71
C – H	4,28
O – H	4,80
Hydrogenbinding	0,04 – 0,44

DIELEKTRISK OPPVARMING

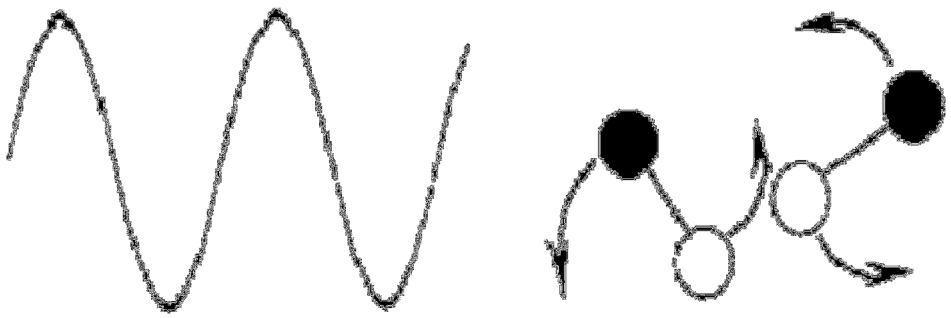
Dielektrisk oppvarming avhenger av evnen til et løsningsmiddel eller reagens til å konvertere absorberte mikrobølger til varme. Det elektromagnetiske feltet består av et elektrisk og et magnetisk felt (Figur 1.13). Interaksjoner mellom bølger og reaksjonsmidder påvirkes hovedsaklig av det elektriske feltet.



FIGUR 1.13: ELEKTRISKE OG MAGNETISKE FELTKOMPONENTER I MIKROBØLGER

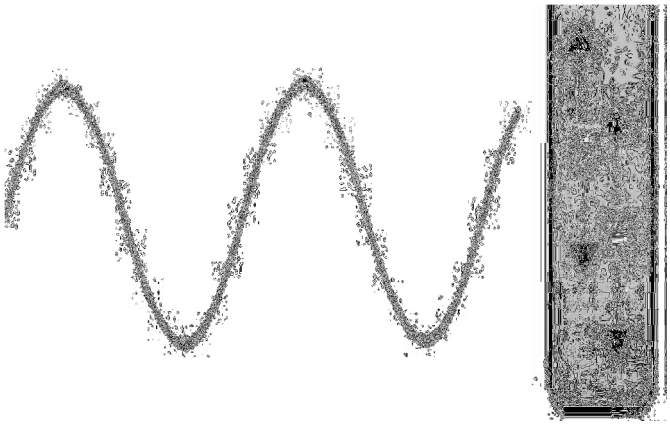
Oppvarming av en reaksjonsblanding fra det elektriske feltet skjer ved to hovedmekanismer; Dipolar polarisering og ionisk konduksjon.

DIPOLAR POLARISERING er interaksjonen mellom det elektriske feltet og matrikset. Dette fører til oppvarming ved at molekylene med dipolmoment prøver å justere seg etter det svingene elektriske feltet (Figur 1.14). Molekylenes kinetiske energi overførest til varme gjennom friksjon og dielektrisk tap (Loupy 2006).



FIGUR 1.14: DIPOLARE MOLEKYLER SOM PRØVER Å RETTE SEG ETTER ET STADIG SVINGENE ELEKTRISK FELT (LIDSTROM ET AL. 2001)

IONISK KONDUKSJON er teorien bak hvordan ioner oppfører seg når de blir påvirket av et elektrisk felt. Ettersom det elektriske feltet svinger, vil også ionene settes i bevegelse (Figur 1.15). Dette fører til en serie av kollisjoner som skaper bevegelse i prøven, og dermed gir ytterligere oppvarming (Kappe et al. 2009).



FIGUR 1.15: IONISK KONDUKSJON, IONENE FØLGER DET ELEKTRISKE FELTET OG SKAPER BEVEGELSE I LØSNINGEN (LIDSTROM ET AL. 2001)

Av disse mekanismene får man at en løsning må inneholde dipolare molekyler og/eller ioner for oppvarming med mikrobølger.

MIKROBØLGER VS. TRADISJONELL OPPVARMING

Tradisjonelle oppvarmingsmetoder som bruker en ekstern oppvamingskilde, e.g vannbad, er mindre effektive enn mikrobølger til oppvaming. Hvor effektiv oppvarmingen er avhenger av reaksjonsblandingens konveksjonsstrøm og materialenes termiske konduksjon. Ved bruk av eksterne oppvarmingskilder blir og reaksjonsbeholderen ofte varmere enn selve reaksjonsblandingen. Med dette blir det og ujevn oppvarming av reaksjonsblandingen, så temperaturgradienter kan oppstå, som igjen kan gi uønskede reaksjoner eller dekomponering av prøver og/eller reagenser. Ved oppvarming med mikrobølger blir energien direkte overført til komponentene i reaksjonsblandingen, så temperaturgradinenter minimaliseres og temperaturen blir tilnærmet den samme i hele blandingen.

Det skal merkes at dette ikke nødvendigvis gjelder storskala oppvarming med mikrobølger. Alle materialer har en penetreringsdybde, som er definert som den dybden (i cm) inn i et materiale der 37% av den initielle mikrobølgeenergien er igjen. Så dersom den diameteren av en reaksjonsblanding er mye større enn penetreringsdybden, vil konduksjonsstrømmer og temperaturgradienter kunne oppstå. Dette er også viktig å ta hensyn til i forhold til hvilken type beholder som skal brukes i reaksjonene. Om det brukes en beholder som effektivt kan absorbere mikrobølger, vil de samme problemene som med eksterne oppvarmingskilder oppstå. Derav er det viktig å velge en beholder som er tilnærmet transparent for mikrobølger, e.g glass eller teflon (Kappe et al. 2009).

1.2.3.4 Injeksjon av prøve på GC

Prøveinjeksjonen på GC-kolonnen er ofte det mest kritiske punktet, da med hensyn på nøyaktighet og presisjon i analysen. Ved manuell injeksjon kan flere variabler oppstå som vil påvirke analysen, e.g ulike injeksjonsvolum. Det er derfor en fordel med autosamplere for å eliminere slike feil (Eder 1995).

I kapillærkolonner kan prøven injiseres på 3 ulike moduser; split, uten split og direkte på kolonnen. Split er ofte foretrukket for å unngå overbelastning på kapillærkolonnen, og minimaliserer også båndbredden (Ahuja 2003).

1.2.3.5 Separasjon

Analyttene i prøven strømmer gjennom kolonnen ved hjelp av bæregassen (helium), og fordeles mellom bæregassen og stasjonærfasen. Stasjonærfasen holder selektivt igjen analytter i større eller mindre grad i henhold til deres distrubisjonskoeffisient, slik at de danner separate bånd i bæregassen (Ahuja 2003).

En best mulig kvalitativ og kvantitativ analyse av FAMEs er avhengig av flere faktorer; God oppløsning så toppene blir smale og symmetriske, reproduserbarhet og repeterbarhet av retensjonstider (i samme temperaturprogram), god nøyaktighet og presisjon ved kvantifisering basert på arealer (ingen diskriminering) og minimal temisk og katalytisk dekomponering (Schomburg et al. 1977).

1.2.3.6 Kolonner

Tidligere var pakkede kolonner mest brukt i lipidanalyser (brukes fortsatt noe analyser av enkle FAME matriks som oljer). Fordelen med de er at de har høy kapasitet, men lav oppløsningsevne, så de egner seg ikke for analyse av komplekse matriks. For de mer komplekse prøvene anbefales høyoppløselige kapillærkolonner, det kan også kjøpes kolonner spesiallaget for analyse av FAMEs. Ulempen med disse kapilærkolonnene er at de lett kan overbelastes, og dette vil påvirke kolonnens oppløsning. Men flere faktorer påvirker kolonnens oppløsningsevne, e.g stasjonærfasens polaritet og kolonnelengde (Eder 1995).

STASJONÆRFASER

Det finnes 3 ulike stasjonærfaser for kapillærkolonner til analyse av FAMEs; upolar -, polar -, og veldig polar stasjonærfase. Polariteten til stasjonærfasen påvirker retensjonstiden til FAMEs, i størst grad til PUFAs. Ved analyse av prøver med høyt innhold av PUFAs, blir oppløsningen bedre med økende polaritet i stasjonærfasen, men ulempen er at veldig polare kolonner har kort levetid sammenlignet med mindre polare og upolare kolonner, og alternativene kan gi brukbar separasjon (Eder 1995).

Veldig polare kolonner har gjerne en stasjonærfase av 100% cyanoetylsilikon-olje, 100% cyanopropylsikikon eller 68% biscyanopropyl-32% dimetylsiloksan. Disse egner seg best for god separasjon av umettede fettsyrer, der økende antall dobbeltbindinger øker retensjonstide. Om to fettsyrer har likt antall dobbeltbindinger, men ulike posisjoner, vil fettsyren med første dobbeltbinding lengst unna ω-enden (metyl-enden) elueres ut først. Kolonnene kan også skille mellom *cis* og *trans*-isomere, der *trans*-isomeren vil elueres ut før *cis*-isomeren (Eder 1995).

Middels polare kolonner består gjerne av polyetylen-glykol. Disse er mer temisk stabile enn veldig polare kolonner, og oppløsningen er fortsatt god. Dette gir akseptabel separasjon av en rekke forskjellige FAMEs fra ulike kilder.

Upolare kolonner er ofte basert på metylsilikoner. Disse har som fordel at de er veldig termisk stabile, og kjemisk inerte slik at de kan brukes over store temperaturområder. Dette er blant annet en fordel når lipider med høy molekylvekt skal analyseres. Ulempen er at coeluering av spesielt umettede FAMEs kan forekomme, som vil bli et problem ved analyse av komplekse blandinger (Eder 1995).

KOLONNELENGDE

Lengden på kolonnen er en viktig parameter når det kommer til oppløsningsevne. Generelt gir økende kolonnelengde økende oppløsning, men igjen økte retensjonstider. De fleste kolonnene i dag er mellom 25 – 50 meter, men både lengre og kortere kan brukes (Eder 1995).

FILMTYKKELSE OG INDRE DIAMETER

Filmtykkelsen og den indre diameteren vil påvirke kapillærkolonnens kapasitet, oppløsning og retensjonstider. Økende filmtykkelse vil gi økende oppløsning og kapasitet, men også øke retensjonstiden. Vanligvis vil en filmtykkelse på 0,25µm gi god nok oppløsning, men dette kan variere. Videre vil reduksjon av indre diameter øke oppløsningen, men gi lengre retensjonstider og redusere kapasiteten til kolonnen. En indre diameter på 0,25 eller 0,32 mm vil være god for de fleste analyser (Eder 1995).

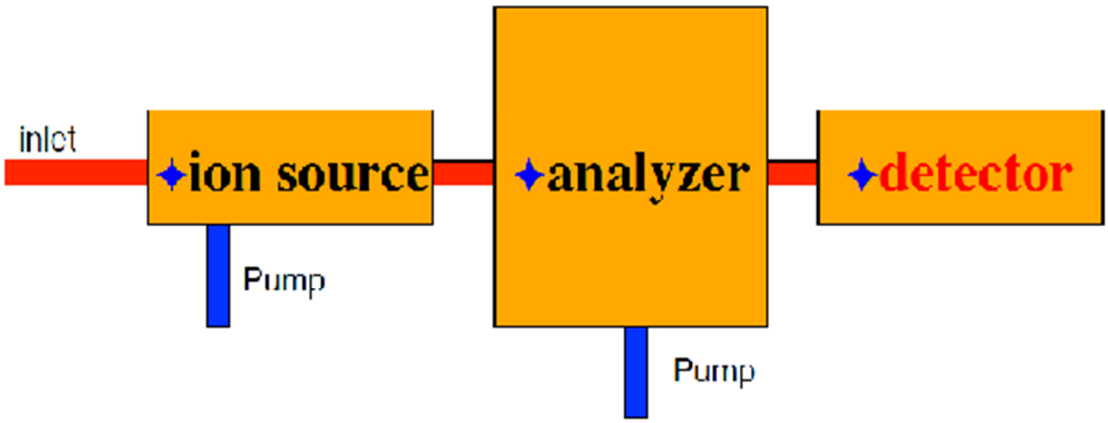
1.2.3.7 Massespektrometer som detektor

I dag bruker flere en flammeionisasjonsdetektor (FID) for kvalitativ og kvantitativ analyse av FAMEs fra GC. Dette er en pålitelig metode med god linearitet over store konsentrasjonsområder (Eder 1995), men da den kun identifiserer basert på sammenligning med standarder og retensjonstid og instrumentrespons, er den lite selektiv. Dette vil øke sjansen for feilidentifisering av FAMEs på grunn av kontaminanter eller coeluering for å nevne noen (Dodds et al. 2005).

Ved å bruke et massespektrometer som detektor kombineres de spektroskopiske data man får med kvantifisering. Det vil være en fordel ved analyse av komplekse biologiske prøver der man ikke nødvendigvis vet hele sammensetningen, slik at de eluerte forbindelsene lettere kan identifiseres (Dodds et al. 2005). Sensitiviteten kan også forbedres ytterligere ved å bruke RIC

(reconstructed ion chromatogram), og anbefales ved analyse av veldig små mengder analytt (Devle et al. 2009).

Alle massespektrometer består av 3 hovedkomponenter; ionekilde, masseanalysator og ionedetektor (Figur 1.16).



FIGUR 1.16: ENKEL SKISSE AV ET MASSESPEKTROMETER (EKEBERG 2010)

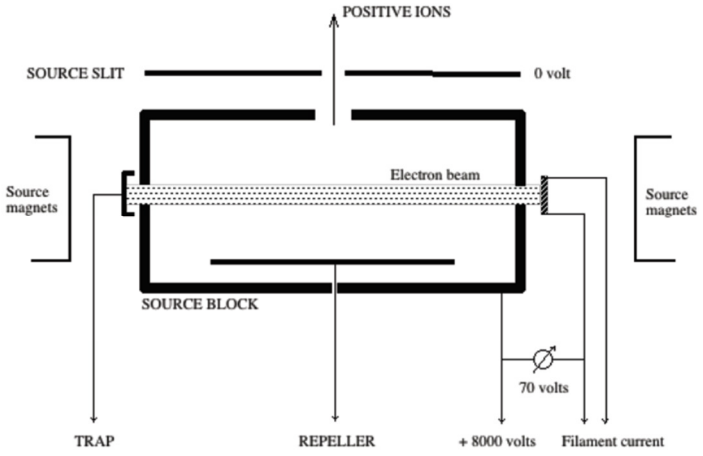
I ionekilden blir molekylene ionisert, og om tilstrekkelig energi blir tilført vil molekylene fragmentere. Molekylionene og fragmentionene vil så skytes ut av ionekilder og inn i masseanalysatoren. Her vil ionene bli separert med hensyn på deres masse/ladnings-forhold (*m/z*) under påvirkning av et elektrisk og/eller magnetisk felt og de sendes til detektoren. Her vil signalene fra de ulike ionene forsterkes og detekteres. En datamaskin vil konvertere signalene fra detektoren og plotte ionenes *m/z* forhold mot intensiteten (Downard 2004).

Det finnes flere forskjellige ionekilder og masseanalysatorer, under omtales kun de som ble benyttet i denne oppgaven.

ELEKTRONIONISASJON (EI)

EI er en veldig vanlig metode for ionisering av små biologiske molekyler. Her bombarderes molekylene med elektroner med veldig høy energi. Elektronene kommer fra et filament (katode) påført en høy spenning slik at elektronene sitter løst. Elektronene skytes gjennom ionekilden ved tiltrekning til en anode i andre enden av ionekilden. Magnetene på hver sin side av ionekilden gir elektronene en svingende bane, slik at den totale reiselengden og reisearealet øker. Spenningsforskjellene mellom katoden og anoden avgjør energien på elektronene som går gjennom ionisasjonskammeret. Det mest vanlige er en spenningsforskjell

på 70V, og dette gir elektronene en energi på 70eV, og dette mer mer enn nok energi til å ionisere små organiske molekyler som normalt ioniseres ved 8-15 eV (Figur 1.17) (Downard 2004).



FIGUR 1.17: SKISSE AV EN EI IONEKILDE (EKEBERG 2010)

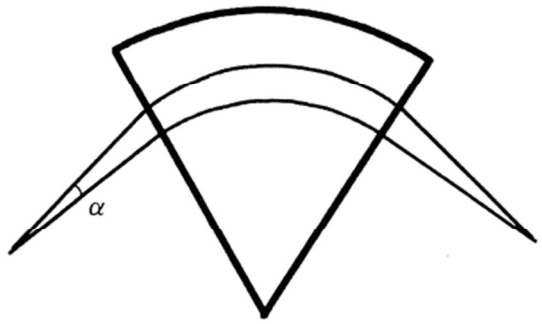
Når molekylene er ionisert og/eller fragmentert skytes de ut av ionekilden og mot masseanalysatoren ved hjelp av et akselerasjonspotensiale, *V*.

MAGNETISK SEKTOR MASSESPEKTROMETER

Magnetisk sektor instrumenter er den eldste typen massespektrometer. Et ion med ladning *z* og masse *m* har en hastivhet *v*, som krysser et magnetfelt *B* vinkelrett på retningen til magnetfeltet, vil bli utsatt for en sentrifugalkraft tilsvarende *zevB*. Hvis denne kraften tilsvarer sentripetalkraften, vil ionet få en avbøyd bane med radius *r*.

$$\boldsymbol{zevB} = \frac{(\boldsymbol{mv^2})}{\boldsymbol{r}} \; [1] \quad => \quad \boldsymbol{r} = \frac{\boldsymbol{mv}}{\boldsymbol{zeB}} \; [2]$$

Ligning [2] gir at et ion med en ladning *z* går gjennom et magnetfelt *B*, vil radiusen av avbøyningen til ionet kun avhenget av dets moment, *mv* (Figur 1.18)



FIGUR 1.18: ENKEL SKISSE AV IONENES VEI GJENNOM EN MAGNETSEKTOR (DEVLE 2010)

Den initielle energien til ionene, $1/2mv^2$ er lik zeV, der V er akselerasjonspotensialet, og initiell hastighet er avhengig av dette. Ligning for *m/z* er da

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2r^2}{2V} \quad [3]$$

Derav sees det at spesifike verdier for B og V (ligning [3]) gir unike veier gjennom magnetfeltet basert på deres *m/z* forhold.Variasjoner i B og V gjør at et spesifikt ion vil passere gjennom, men resten vil kollidere med veggene

Men det skal merkes at ioner forlater ionekilden med en rekke ulike kinetiske energier på grunn av romfordeling. Dette vil føre til at ioner har ulik hastighet, og forskjellige *m/z* vil nå detektoren samtidig ved satte verdier og *B* og *V*, og dette påvirker instrumentets oppløsning.

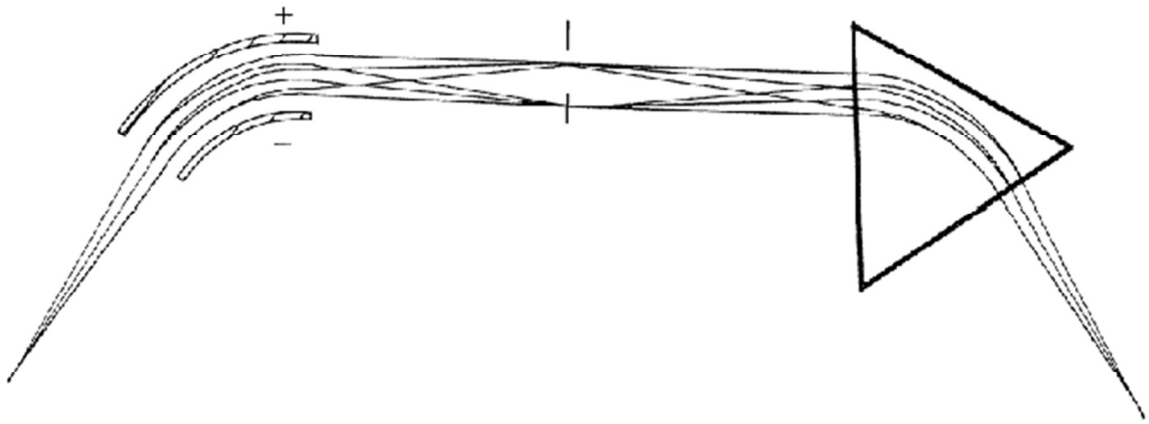
Et elektrostatisk felt *E* dannes av to bøyde plater med motsatte potensialer (+*E*/-*E*), og et ion med ladning *z* og masse *m* vil krysse feltet når den elektrostatiske kraften er lik sentripetalkraften.

$$zeE = \frac{(mv^2)}{r} \quad [4] \quad => \quad r = \frac{2V}{E} \quad [5]$$

Sett fra ligning [5] er ionets vei gjennom analysatoren uavhengig av *m/z* forholdet, kun avhengig av styrken på det elektriske feltet ved en gitt akselerasjonsspenning (Figur 1.19).

FIGUR 1.19: ENKEL SKISSE AV IONENES VEI GJENNOM EN ELEKTROSTATISK ANALYSATOR (DEVLE 2010)

Moderne sektorinstrumenter i dag er oftest utstyrt med en elektrostatisk analysator som er energifokuserende, og disse kalles dobbeltfokuserende sektorinstrumenter. Den elektrostatiske analysatoren kan sitte både før (fremoverrettet geometri, EB) og etter (reversert geometri, BE) magneten, men oftest før. Det er også mulig å ha en elektrostatisk analysator både før og etter (EBE geometri), det ble benyttet i denne oppgaven (Figur 1.20) (Downard 2004).



FIGUR 1.20: ENKEL SKISSE AV IONENES VEI GJENNOM ET DOBBELTFOKUSERENDE SEKTORINSTRUMENT MED EB GEOMETRI (DEVLE 2010)

1.3 Forventede resultater

Konvensjonelle oppvarmingsmetoder i dag bruker 2-5 minutter på syrekatalysert derivatisering av frie fettsyrer, eller 0,5-2 timer ved refluks. Det ble forventet at tiden skulle reduseres ned til sekunder, med tilsvarende eller bedre utbytte uten dekomponering eller dannelse av biprodukter. Det er også nevnt i litteraturen at metylering av korte og middels korte FFA er problematisk på grunn av flyktigheten, så større avvik forventes på disse.

2 Materialer og Metoder

2.1 Laging av stamløsninger

STAMLØSNING DEL I

Det ble valgt å fokusere på mettede fettsyrer i del I av metodeutviklingen (Tabell 2), da det var god tilgang på dem og de er mest stabile. Ca. 40mg av hver fettsyre (97-99%, Sigma Aldrich, Tyskland) og internstandard (C19:0me) ble veid ut, og de ble løst i heksan (99% n-heksan, Sigma Aldrich, Tyskland) til en konsentrasjon på ca. 2mg/mL.

TABELL 2.1: IUPAC NAVN, TRIVIALNAVN OG FORKORTELSER AV STAMLØSNING TIL METODEUTVIKLING DEL I

IUPAC navn	Trivialnavn	Forkortelse
Dekansyre	Caprinsyre	C10:0
Dodekansyre	Laurinsyre	C12:0
Tetradekansyre	Myristinsyre	C14:0
Pentadekansyre	-	C15:0
Heksadekansyre	Palmitinsyre	C16:0
Oktadekansyre	Stearinsyre	C18:0
Nonadekansyre metylester	-	C19:0me

STAMLØSNING DEL II

En GLC referansestandard med 20 forskjellige fettsyrer (Tabell 3) med både mettede, enumettede og flerumettede ble kjøpt via Chiron AS fra NuCheck Prep Inc. Fettsyrene ble tatt ut av ampullen ved å løse i heksan med hjelp fra ultralyd, og over i et mikrobølgerør-rør, og ble dampet til tørrhet under nitrogen ved romtemperatur. Samlet vekt av alle fettsyrer ble beregnet til ca. 144 mg ved å veie MW-rør før og etter fettsyrene var tilsatt, og mengde internstandard (C19:0me) ble satt til ca. 7,7 mg, som var en middelverdi i forhold til mengde av fettsyrene i referansestandarden. Fettsyrene og internstandard ble løst i 2mL heksan, og oppbevart ved -18 ˚C.

TABELL 2.2: IUPAC NAVN, TRIVIALNAVN, FORKORTELSER, FAMILIER OG VEKT % AV FETTSYRER I GLC REFERANSESTANDARD 502

GLC referansestandard 502

IUPAC navn	Trivialnavn	Forkortelse	Familie	wt %
Tetradekansyre	Myristinsyre	C14:0	-	2,5
cis-9-tetradekaensyre	Myristolensyre	C14:1cΔ9	ω-5	2,5
Heksadekansyre	Palmitinsyre	C16:0	-	2,5
cis-9-heksadekaensyre	Palmitolensyre	C16:1cΔ9	ω-7	2,5
Oktadekansyre	Stearinsyre	C18:0	-	5,0
cis-9-oktadekaensyre	Oljesyre	C18:1cΔ9	ω-9	5,0
alle cis-9,12-oktadekadiensyre	Linolensyre	C18:2cΔ9,12	ω-6	5,0
alle cis-9,12,15-oktadekatriensyre	α-linolensyre (ALA)	C18:3cΔ9,12,15	ω-3	5,0
Eicosansyre	arakidinsyre	C20:0	-	5,0
cis-11-eicosaensyre	EEA	C20:1cΔ11	ω-9	5,0
alle cis-11,14-eicosadiensyre	EDA	C20:2cΔ11,14	ω-6	5,0
alle cis-11,14,17-eicosatriensyre	ETE	C20:3cΔ11,14,17	ω-3	5,0
alle cis-5,8,11,14-eicosatetraensyre	ETA	C20:4cΔ5,8,11,14	ω-6	5,0
alle cis-5,8,11,14,17-eicosapentaensyre	arakidonsyre/EPA	C20:5cΔ5,8,11,14,17	ω-3	7,5
Docosansyre	Beheninsyre	C22:0	-	5,0
cis-13-docosaensyre	Erusinsyre	C22:1cΔ13	ω-9	5,0
alle cis-7,10,13,16,19-docosapentaensyre	DPA	C22:5cΔ7,10,13,16,19	ω-3	7,5
alle cis-4,7,10,13,16,19-docosaheksaensyre	DHA	C22:6cΔ4,7,10,13,16,19	ω-3	10,0
Tetracosansyre	Lignoseronsyre	C24:0	-	5,0
cis-15-tetracosaensyre	Nervonsyre	C24:1cΔ15	ω-9	5,0

STAMLØSNING DEL III

En referansestandard med korte mettede fettsyrer (Tabell 4) ble også testet. Denne ble kjøpt via Chiron fra NuCheck Prep Inc, og ble overført fra ampullen og veid på tilsvarende måte som ved stamløsningen til del II. Samlet vekt av alle fettsyrene ble beregnet til ca. 93mg og mengde interstandard (C19:0me) ble satt til 7,7mg. Fettsyrene og internstandard ble løst i 2mL heksan (n-heksan, Sigma Aldrich, Tyskland) og oppbevart ved -18 ˚C.

TABELL 2.3: IUPAC NAVN, TRIVIALNAVN, FORKORTELSER OG VEKT % AV FETTSYRER I GLC REFERANSESTANDARD 412

GLC referansestandard 412			
IUPAC navn	**Trivialnavn**	**Forkortelse**	**wt %**
Butansyre	Butyrinsyre	C4:0	10,53
Pentansyre	Valerinsyre	C5:0	10,53
Heksansyre	Kapronsyre	C6:0	10,53
Heptansyre	-	C7:0	10,53
Oktansyre	Kaprylsyre	C8:0	5,26
Nonansyre	Pelargonsyre	C9:0	5,26
Dekansyre	Kaprinsyre	C10:0	5,26
Hendekansyre	-	C11:0	5,26
Dodekansyre	Laurinsyre	C12:0	5,26
Tridekansyre	-	C13:0	5,26
Tetradekansyre	Myristinsyre	C14:0	5,26
Pentadekansyre	-	C15:0	5,26
Heksadekansyre	Palmitinsyre	C16:0	5,26
Heptadekansyre	Margarinsyre	C17:0	5,26
Oktadekansyre	Stearinsyre	C18:0	5,26

2.2 Metylering av fettsyrestandarder

Alle metyleringer assistert av mikrobølger ble utført på en en single-mode (fokuserte mikrobølger) Biotage Initiator (Uppsala, Sverige). Det ble i alle metoder brukt 0,5-2,0 mL reaksjonsbeholdere av borosilikatglass (mikrobølgerør) med caps av aluminium med teflon septum slik at systemene alltid var lukkede. Ekstraksjon av FAMEs ble utført på samme måte ved alle metodene, så beskrives kun i avsnitt **2.2.1**.

2.2.1 Metodeutvikling del I

200µL stamløsning ble overført til MW-rør, og løsnindmiddelet dampet forsiktig av under nitrogen ved romtemperatur. 2 mL kald (ca. 4 ˚C) 10% BF_3-metanol (Sigma Aldrich, Tyskland) ble tilsatt de tørre fettsyrene, en magnet ble lagt i røret, og MW-røret ble cappet slik at systemet var helt lukket. Instillingene på mikrobølgeoven (MW-ovnen): Time: se nedenfor, power: 65, 70 eller 75W, fixed holding time (FHT): off, pressure: off, temperature:

off, cooling: on, pre-stirring: 15 sec., absorption level: high, vial type: 0,5-2,0 mL. Prøven ble avkjølt til 45 ˚C før prøveuttak.

For representative tidspunkt mellom 10 sekunder – 20, ble det valgt 3 kjøringer med 3 prøveuttak per effekt, og 5 paralleller. Uttak skjedde etter 10, 20 og 30 sekunder, 1, 3, og 5 minutter og 10, 15 og 20 minutter.

Ved prøveuttak ble 250µL av reaksjonsblandingen overført til et reagensglass, og reaksjonsbeholderen recappet for videre metylering. FAMEs ble ekstrahert ut med 2x750µL 99% n-heksan over i 1,5 mL GC-vials. Prøven ble forsiktig dampet til tørrhet under nitrogen ved romtemperatur og reløst i 500µL i heksan. Prøvene ble capet og oppbevart ved -18 ˚C frem til analyse på GC-MS.

2.2.2 Metodeutvikling del II og III

2.2.2.1 Mikrobølgemetode, del II og III

Fra resultatene i del I ble det valgt å kun bruke en effekt på 70W, da den så ut til å være den optimale. Øvrige innstillinger på mikbrobølgeovn var tilsvarende beskrevet i avsnitt **2.2.1**.

Før metylering i mikrobølgeovn ble 40µL av stamløsningen overført til mikrobølgerør, og forsiktig dampet inn til tørrhet. 2 mL kald BF_3-metanol ble tilsatt og en magnet lagt i blandingen før den ble cappet for kjøring i mikrobølgeovovn. Det ble valgt å ta uttak etter 10, 20 og 30 sekunder x 3 paralleller, og 1, 3 og 5 minutter x 3 paralleller. Ekstraksjon er tilsvarene beskrevet over.

2.2.2.2 Alternativ mikrobølgemetode, del II

Metode brukt på laboratoriekurs i kromatografi (KJM310) på IKBM for metylering av fettsyrestandarder, brukes 70˚C vannbad i ca. 5 minutter (eller til alt er løst) for metylering. Det ble da bestemt å prøve å stille inn temperaturen til 70 ˚C og varierende effekt. Det ble valgt å kjøre 3 parallelle metyleringer, med uttak etter 1, 3 og 5 minutter. Prøveopparbeiding og ekstraksjon er tilsvarende beskrevet over.

2.2.2.3 Vannbad 70 ˚C, del II

Metoden er brukt ved metylering av fettsyrestandarder i laboratoriekurset i kromatografi (KJM310) høsten 2009. Det ble valgt å kjøre 3 parallelle metyleringer og 4 prøveuttak per kjøring, da etter 3, 5, 7 og 10 minutter. I motsetning til metoden brukt i laboratoriekurset var systemene her lukket (tilsvarende mikrobølgemetodene) når de stod i vannbad, så tørketrinn

med $MgSO_4$ fra orginal metode ble eliminert. Prøveopparbeiding og ekstraksjon er tilsvarende beskrevet over.

2.2.2.4 Vannbad 100 ˚C del II

Metoden er utviklet av Metcalfe og Schmitz (1961). Det ble valgt å kjøre 3 parallelle metyleringer og 4 prøveuttak per kjøring, da etter 1, 2, 3 og 5 minutter. Også i denne metoden var systemene lukkede, så ingen tørking var nødvendig. Prøveopparbeiding og ekstraksjon er tilsvarende beskrevet over.

2.3 Kvantitativ analyse med GC-MS

2.3.1 Temperaturprogrammer på gasskromatograf (GC)

Alle kvantitative analyser ble utført på samme instrument. Gasskromatografenen som ble brukt var en Agilent 6890 (Agilent Technology, Wilmington, DE, USA), utstyr med en CTC PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Kolonnen var en 50m CP-SIL 88 med en indre diameter på 0,25mm og filmtykkelse på 0,20µm (Varian, Middelburgh, Nederland). Bæregassen som ble brukt var helium (6.0, AGA AS, München, Tyskland) ved et konstant trykk på 90 kPa. Injeksjonene ble gjort med i splitmodus, med en splitrate på 10:1. Injeksjonstemperaturen var 250 ˚C, injeksjonstrykket var 1,0 kPa injeksjonsvolumet var 1,0 µL. Hver vial ble injisert en gang.

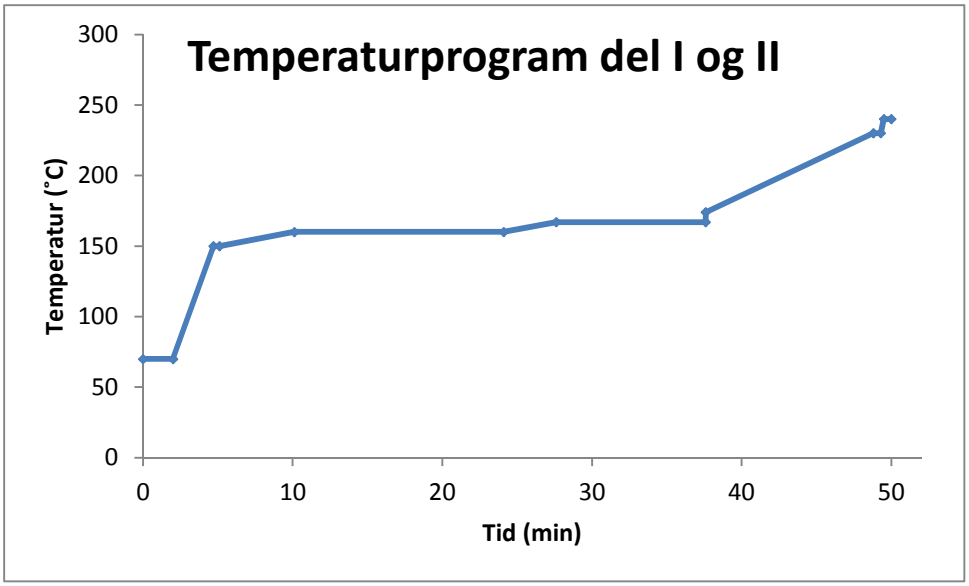
Det ble brukt to forskjellige temperaturprogram, og beskrives i egne avsnitt under.

2.3.1.1 Temperaturprogram I

Temperaturprogrammet ble brukt i metodeutvikling del I og II. Den initielle temperaturen var 70 ˚C, og ble holdt der i 2 minutter. Øvrig temperatur program sees i Tabell 2.4 og Figur 2.1.

TABELL 2.4: TEMPERATURPROGRAM BRUKT I DEL I OG II

Tid	Rate (˚C/min)	Temperatur (˚C)
0,5	30,0	150,0
14,0	2,0	160,0
10,0	2,0	167,0
0,0	2,0	174,0
0,5	5,0	230,0
0,5	10,0	240,0



FIGUR 2.1: TEMPERATURPROGRAM VIST GRAFISK FOR DEL I OG II

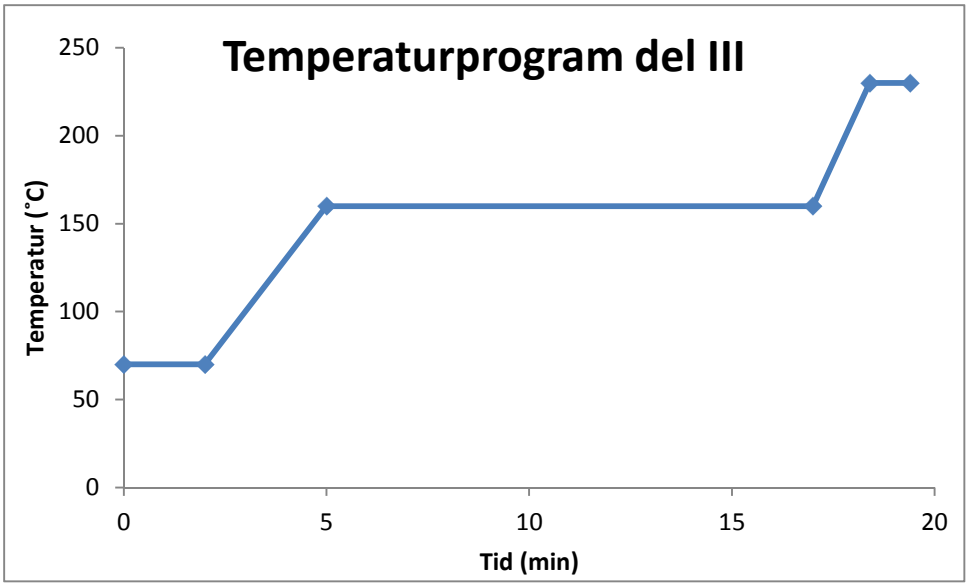
Det hadde en total kjøretid på ca. 50 minutter.

2.3.1.2 Temperaturprogram II

Kun korte fettsyrer var tilstede i standarden for metodeutvikling del III, så et forkortet temperaturprogram ble brukt. Initiell temperatur var satt til 70 ˚C og ble holdt der i 2 minutter. Øvrik temperaturprogram er vist i Tabell x og Figur x

TABELL 2.5: TEMPERATURPROGRAM FOR DEL III

Tid	Rate (˚C/min)	Temperatur (˚C)
12	30,0	160,0
1,0	50,0	230,0



FIGUR 21: TEMPERATURPROGRAM VIST GRAFISK FOR DEL I

Programmet hadde en total kjøretid på ca. 20 minutter.

2.3.2 Massespektrometer (MS)

Samme innstillinger ble brukt for alle prøver.

Massespektrometeret som ble brukt for identifisering av FAMEs var en Autospec Ultima (Micromass Ltd. Manchester, England). For ionisering ble det brukt en elektronionekile (EI) som produserte 70 eV elektroner, og holdt en temperatur på 200 ˚C. Akselerasjonsspenningen var satt til 8000V. Massespektrometeret scannet over 40-600 *m/z*, en scantid på 0,1 sekund, og en forsinkelse mellom hver scan på 0,2 sekunder.

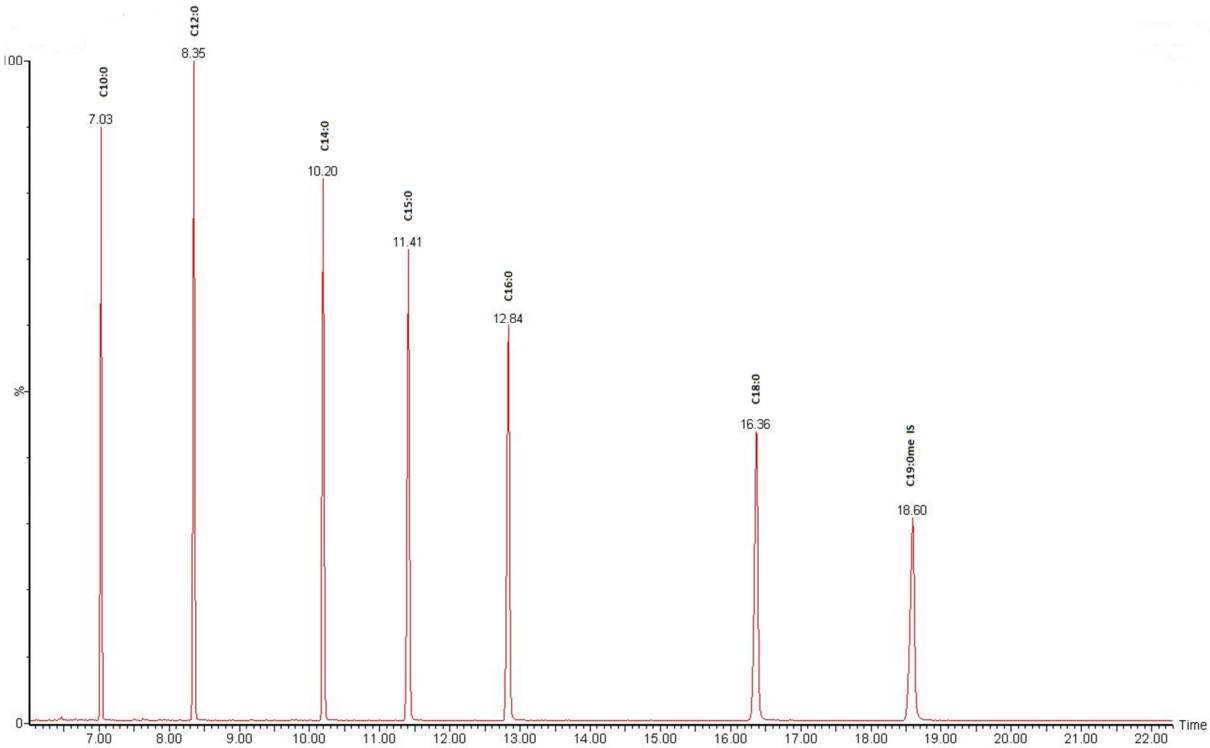
Programvaren brukt for innhentig av kromatogrammer og massespekter var MassLynx versjon 4.0 (Waters, Milford, MA, USA).

For identifisering av toppene i kromatogrammene ble spekterbiblioteket NIST 08 (Gaithersburg, MD, USA) benyttet. Totalt ionestrøm-kromatogrammet ble gjennomgått, og spekter til hver enkelt FAME i blandingene sjekket opp mot spekterbiblioteket. Søket kom opp med forslag til mulige forbindelser, listet etter en match faktor. Match faktoren er et mål på ditt spekters match til referansespekteret.

3 Resultater og Diskusjon

3.1 Metodeutvikling del I

Kromatogram fra metylering vises nedenfor (Figur 3.1). Det er kun mettede fettsyrer tilstede, og separasjonen er veldig god. Her vises også hvilke FAMEs som tilhører hvilke topper.



FIGUR 3.1: KROMATOGRAM, METODEUTVIKLING DEL I

Siden kromatogrammene ser tilnærmet like ut uavhengig av effekt, vil ikke flere kromatogram fra del I av metoden vises.

Gjennomsnittlig beregenet utbytte (se vedlegg 1 for enkeltverdier) og standardavvik for for hver FAME ved 75W, 70W og 65W ved ulike tidspunkt oppgis i Tabell 3.1.

TABELL 3.1: GJENNOMSNITTLIG BEREGNET % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK AV TEORETISK UTBYTTE VED 75W, 70W OG 65W.

75W									
FAME\Tid	10s.	20s.	30s.	1min.	3min.	5min.	10min.	15min	20min
C10:0	39,49% ± 8,87	43,14% ± 27,30	32,35% ±20,21	43,14% ± 20,00	39,53% ± 26,55	75,74% ± 12,18	64,95% ± 38,40	52,89% ± 23,49	46,06% ± 45,19
C12:0	84,41%	90,43%	86,01%	102,30%	96,83%	103,69%	114,04%	105,47%	88,03%

	± 6,45	± 3,22	± 2,77	±1,65	± 7,15	±0,55	± 4,78	± 5,72	± 25,50
C14:0	97,41% ± 3,30	100,88% ± 2,31	98,52% ± 0,69	103,34% ± 3,96	102,43% ± 4,59	106,50% ± 2,55	113,73% ± 0,22	112,99% ± 2,34	109,21% ± 3,47
C15:0	89,35% ± 3,58	91,62% ± 3,53	91,35% ± 2,30	95,46% ± 2,32	94,34% ± 2,19	96,09% ± 2,49	100,50% ± 4,03	102,78% ± 4,22	103,86% ± 3,82
C16:0	90,22% ± 2,31	93,54% ± 2,16	92,82% ± 1,04	94,24% ± 1,13	94,58% ± 0,88	95,43% ± 1,80	99,37% ± 2,20	102,24% ± 1,53	102,43% ± 2,89
C18:0	88,91% ± 1,60	93,10% ± 1,04	92,70% ± 0,90	92,83% ± 0,99	92,90% ± 0,69	93,32% ± 0,79	95,41% ± 0,52	96,52% ± 0,80	96,57% ± 1,10

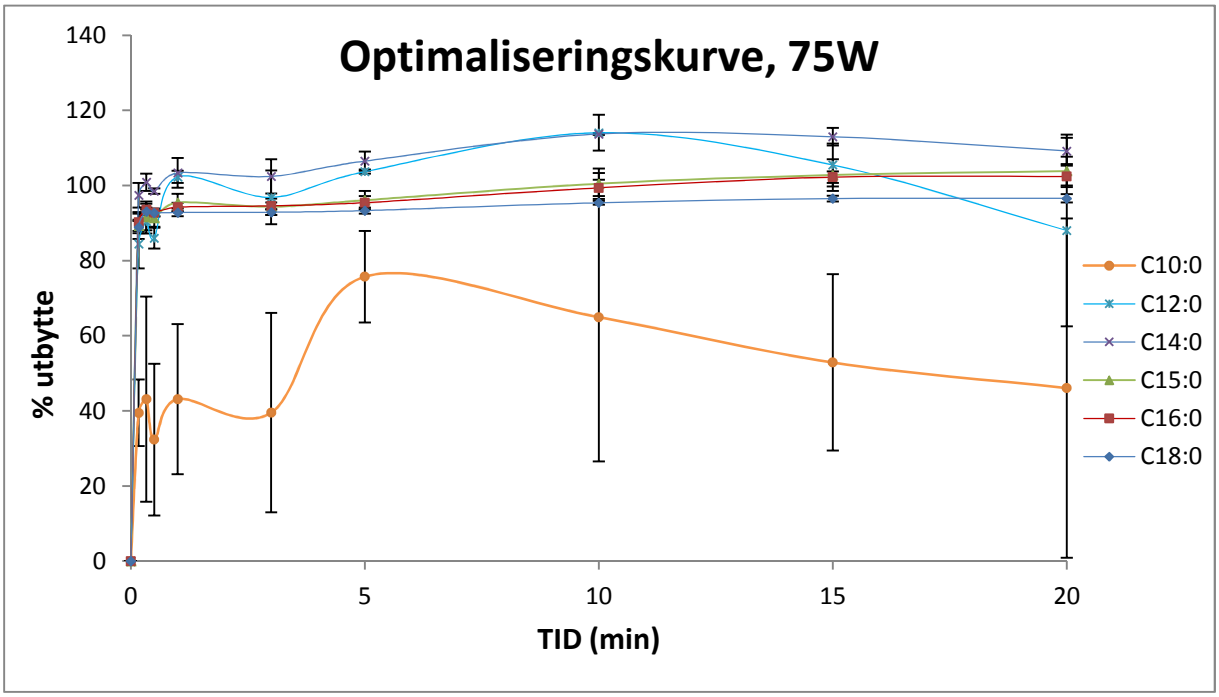
70W

FAME\Tid	10s.	20s.	30s.	1min.	3min.	5min.	10min.	15min	20min
C10:0	33,96% ± 32,19	50,34% ± 31,28	24,69% ± 32,01	52,67% ± 22,77	76,95% ± 3,53	51,58% ± 12,07	79,74% ± 12,65	45,06% ± 7,26	15,81% ± 7,38
C12:0	69,07% ± 19,49	94,35% ± 1,21	82,88% ± 12,87	85,39% ± 8,07	89,78% ± 6,15	89,33% ± 4,57	96,86% ± 3,17	88,18% ± 3,25	80,63% ± 1,57
C14:0	88,56% ± 2,78	95,92% ± 2,29	96,65% ± 3,01	96,04% ± 1,13	96,69% ± 1,28	96,72% ± 4,61	101,79% ± 0,68	99,48% ± 1,36	97,61% ± 4,14
C15:0	85,31% ±0,38	90,55% ± 1,20	92,23% ± 1,93	89,17% ± 2,72	90,67% ± 0,75	90,34% ± 2,05	95,12% ± 1,30	93,60% ± 1,50	93,11% ± 3,34
C16:0	85,57% ± 1,80	91,79% ± 1,25	92,13% ± 1,92	91,32% ± 1,46	91,96% ± 0,72	92,50% ± 1,37	96,20% ± 0,69	94,02% ± 0,97	93,05% ± 3,39
C18:0	84,71% ± 0,79	91,81% ± 1,08	90,99% ± 1,03	91,36% ± 0,95	90,79% ± 0,67	92,08% ± 0,23	92,68% ± 0,46	92,23% ± 0,93	91,70% ± 1,06

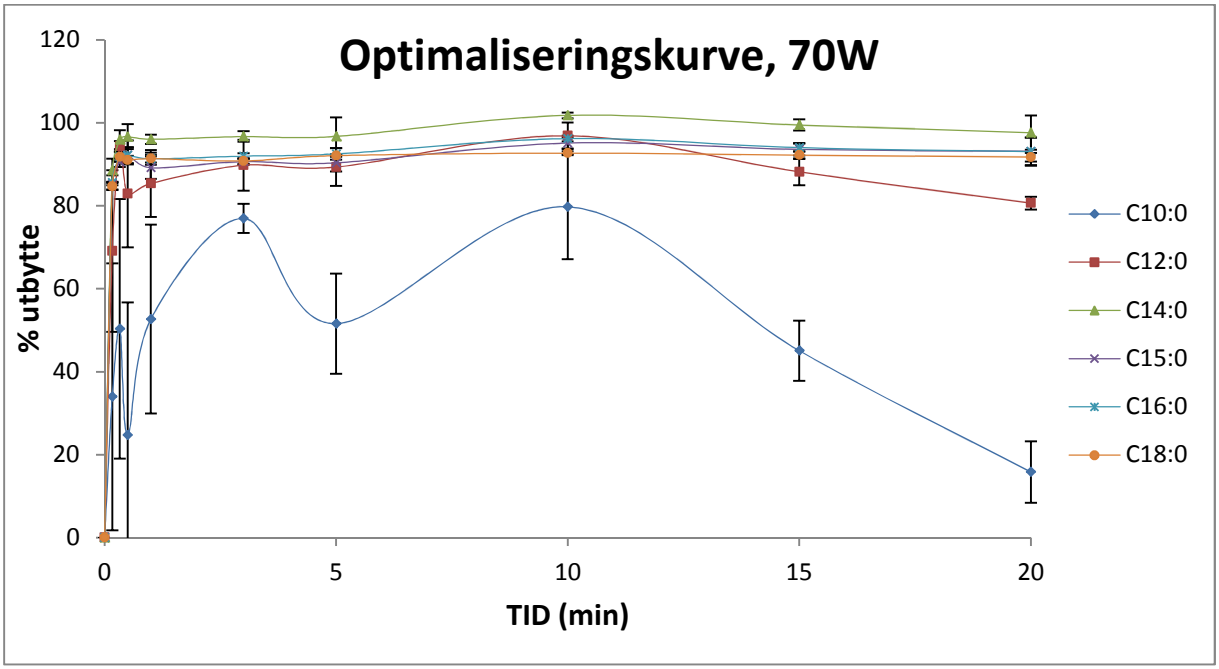
65W

FAME\Tid	10s.	20s.	30s.	1min.	3min.	5min.	10min.	15min	20min
C10:0	54,90% ± 1,02	80,22% ± 18,55	69,24% ± 37,68	37,53% ± 34,90	83,52% ± 10,98	87,04% ± 38,86	40,26% ± 37,24	102,40% ± 11,30	53,75% ± 41,35
C12:0	103,79% ± 3,83	100,99% ±18,23	118,68% ± 3,48	89,22% ± 4,79	109,07% ± 10,32	109,62% ± 10,58	113,66% ± 8,49	113,58% ± 10,06	94,81% ± 4,64
C14:0	107,23% ± 2,47	113,37% ± 3,89	113,68% ±3,79	110,66% ± 15.63	114,50% ± 1,04	110,19% ± 13,58	103,64% ± 8,42	115,19% ± 6,58	114,90% ± 4,90
C15:0	97,90% ± 2,09	104,69% 1,89	103,63% ± 0,51	102,32% ± 4,47	101,43% ± 0,61	100,59% ±5,97	100,03% ± 2,99	105,40% ± 4,01	105,97% ± 3,63
C16:0	95,34% ± 2,30	103,07% ± 1,49	102,74% ± 1,60	105,15% ± 3,56	102,85% ± 4,22	100,31% ± 3,35	100,07% ± 1,90	102,93% ± 3,65	104,72% ± 3,01
C18:0	87,76% ± 2,55	96,38% ± 1,10	95,84% ± 0,72	96,47% ± 0,65	95,80% ± 0,69	96,91% ± 2,36	98,44% ± 3,90	96,67% ± 0,71	96,68% ± 1,50

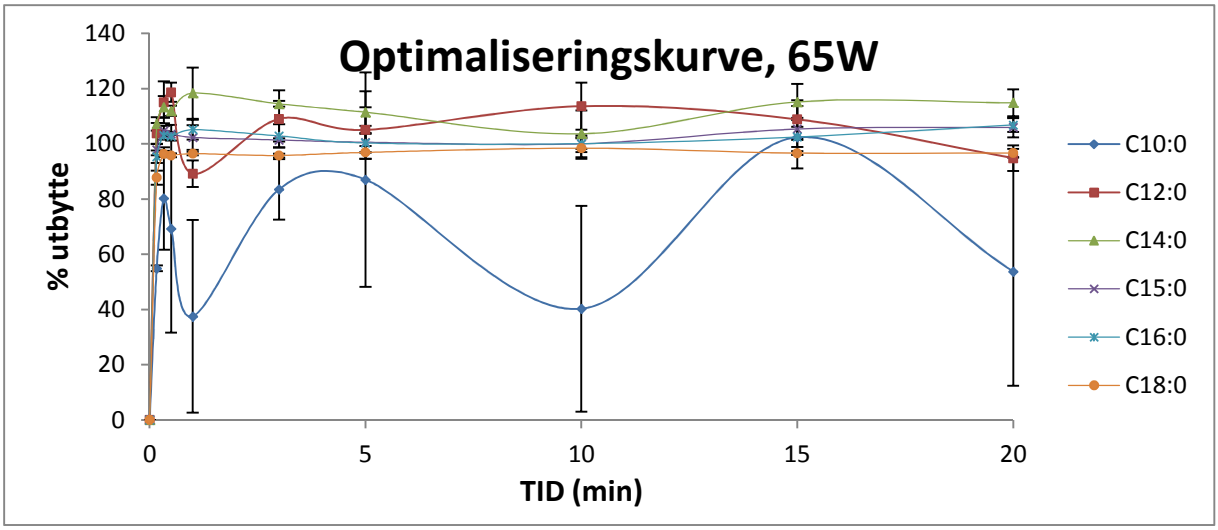
Figur 3.2 – 3.4 gir en grafisk oversikt over utbyttet av FAMEs over tid ved henholdsvis 75, 70 og 65W.



FIGUR 3.2: OPTIMALISERINGSURVE DEL I, 75W



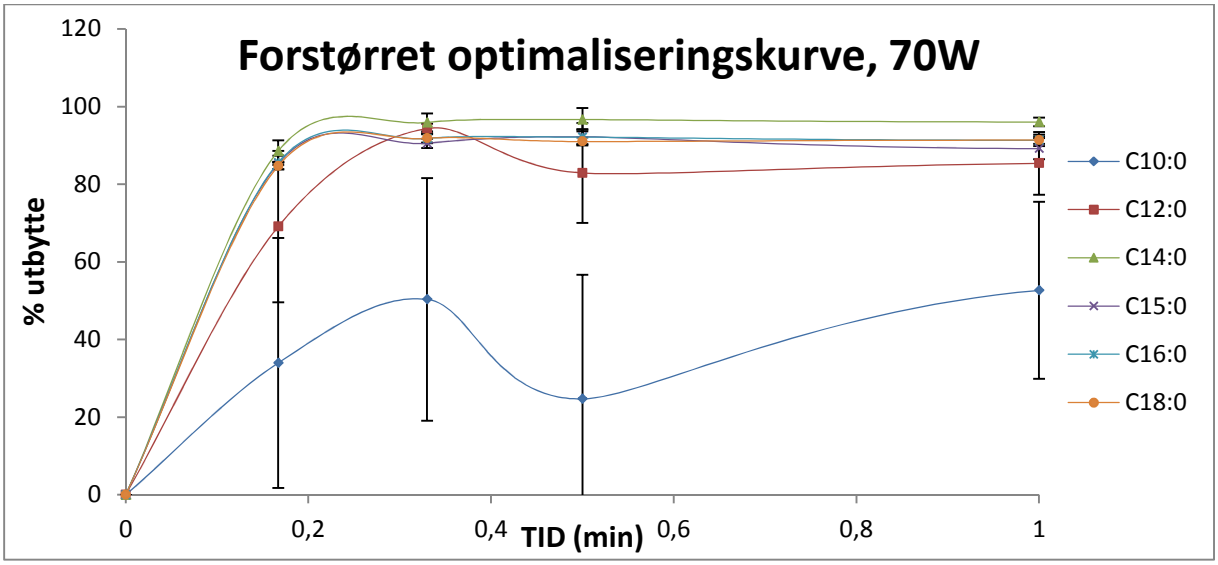
FIGUR 3.3: OPTIMALISERINGSKURVE DEL I 70W



FIGUR 3.4: OPTIMALISERINGSKURVE DEL I, 65W

Det sees fra tabell 3.2 og figurene 3.2-3.4 at utbyttene til C10:0 og C12:0 FAMEs svinger veldig. Disse kan grupperes under korte eller middels korte fettsyrer, og de er mer flyktige enn de lengre fra C14:0 og oppover. Christie og Han (2010) sier at syrekatalysert metylering av korte og middels korte fettsyrer (C2-C12/14) ikke er foretrukket da disse er mer flyktige enn de lengre fra C14 og oppover, og vil risikere å fordampe under oppvarming og/eller avdampning. Fra dette ble det allikevel besluttet å teste en referansestandard med flere korte fettsyrer (GLC 412), for å få bekreftet at andre metoder burde brukes på disse.

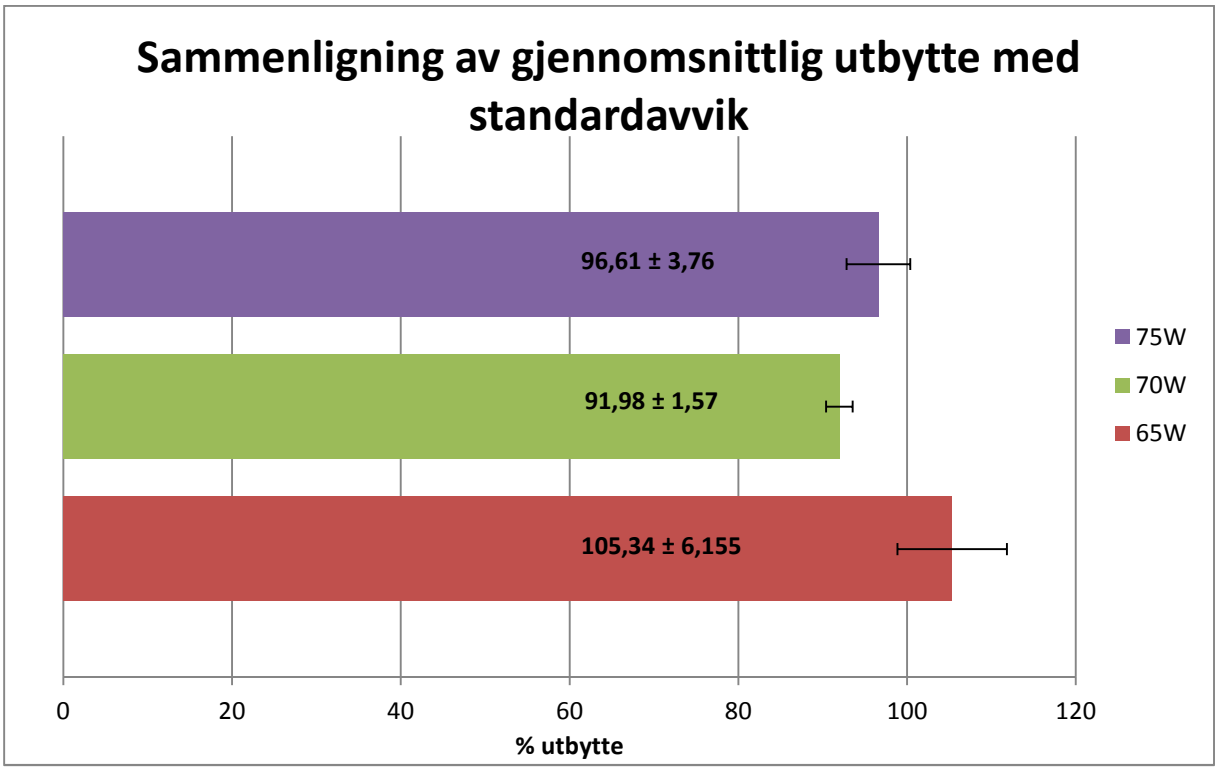
Utbyttene til FAMEs fra C14:0-C18:0 er mer stabile, og derivatiseringen skjer raskt. Figur 3.5 er en forstørret versjon av figur 3.2 for illustrering av den raske økningen av FAMEs etter veldig kort tid.



FIGUR 3.5: FORSTØRRET VERSJON AV OPTIMALISERINGSKURVE VED 70W.

Utbyttene til C14:0-C18:0 ligger stabilt rundt 90-100% etter 20 sekunder, dette gjelder ved alle effekter. Dette støtter forventingene om at bruk av mikrobølger som oppvarmingskilde vil redusere reaksjonstidene sammenlignet med konvensjonelle oppvarmingsmetoder.

Figur 3.6 viser gjennomsnittlig utbytte og standardavvik over alle paralleller og tidspunkt ved 65, 70, og 75W. C10:0 og C12:0 er ikke med i beregningene da de beregnede utbyttene svinger veldig (se Figur 3.3-3.5).

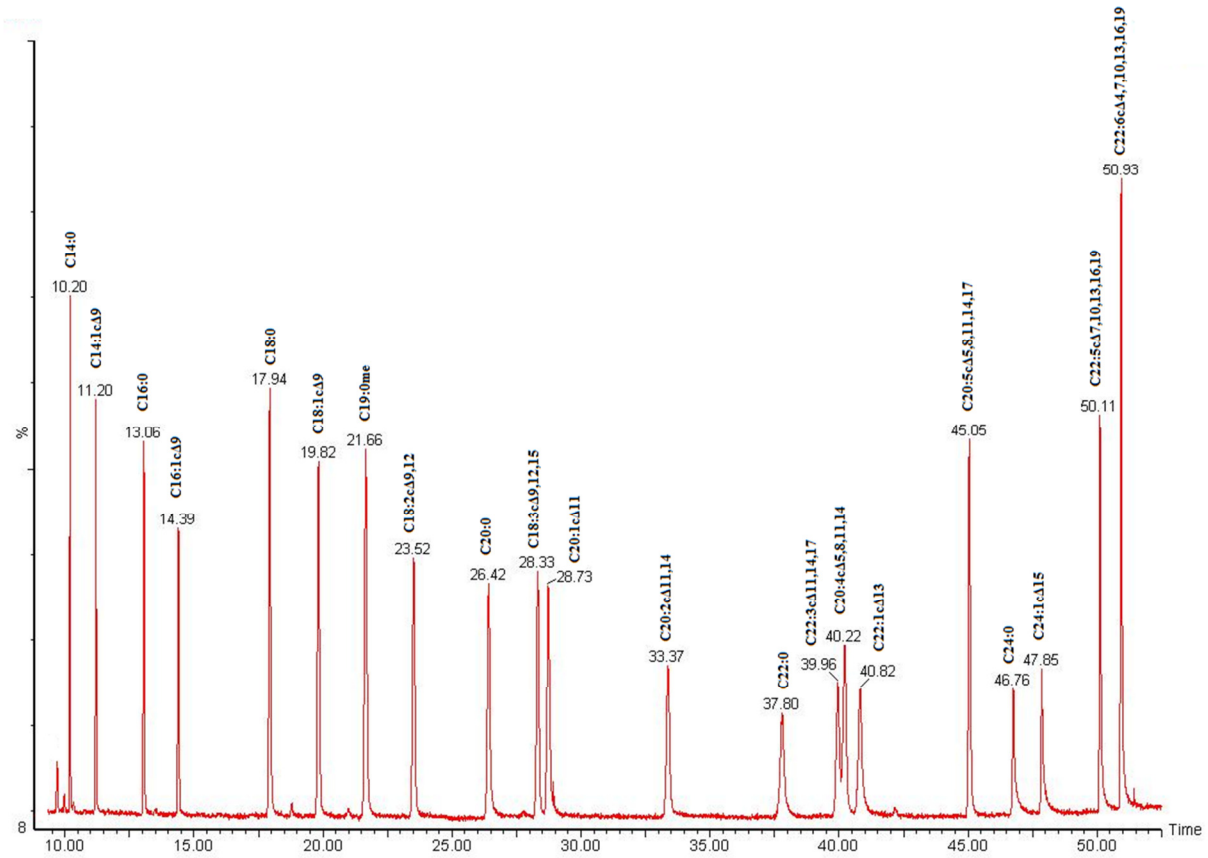


FIGUR 3.6: GJENNOMSNITTLIGE TOTALE UTBYTTER VED 65, 70 OG 75W

Selv om både 65W og 75W ser ut til å oppnå totalt høyere gjennomsnittlige utbytter, ser 70W ut til å være den optimale effekten. Det sees i figur 3.2 at utbyttene til de ulike FAMEs ved denne effekten ikke spriker stort, så det oppnås et høyt utbytte (91,98%) med lavt standardavvik (1,57) og RSD (1,71%). Det ble med dette besluttet å kun bruke 70W i videre derivatiseringer med mikrobølger.

3.2 Metodeutvikling del II

Ut fra resultatene ble det besluttet å kun bruke 70W ved derivatisering på mikrobølgeovnen, samt å undersøke en alternativ mikrobølgemetode der temperaturen stilles inn fremfor effekten, og to metoder med vannbad som oppvarmingskilde. Figur 3.7 viser TIC fra referansestandard GLC 502 (NuCheck prep. Inc.). Toppene er angitt med sine respektive FAMEs.



FIGUR 3.7: KROMATOGRAM TIL REFERANSESTANDARD GLC 502.

Da kromatogrammene for alle metoder brukt for derivatisering av denne referansestandarden, vil ikke flere bli vist videre i avsnitt 3.2.1-3.2.4.

Separasjonen av fettsyrene er stort sett god, men noe overlapp observeres mellom C20:3cΔ11,14,17 og C20:4cΔ5,8,11,14. Kvantifisering av disse blir ikke helt pålitelig på grunn av overlappet, men det gir et vist mål. Integralene av disse toppene ble noe modifisert. Fettsyrene lengst til høyre i spekteret (fra C24:0 og ut) har ikke helt den ønskede formen, da de til en viss grad har 'haler'.

3.2.1 Mikrobølger, 70W

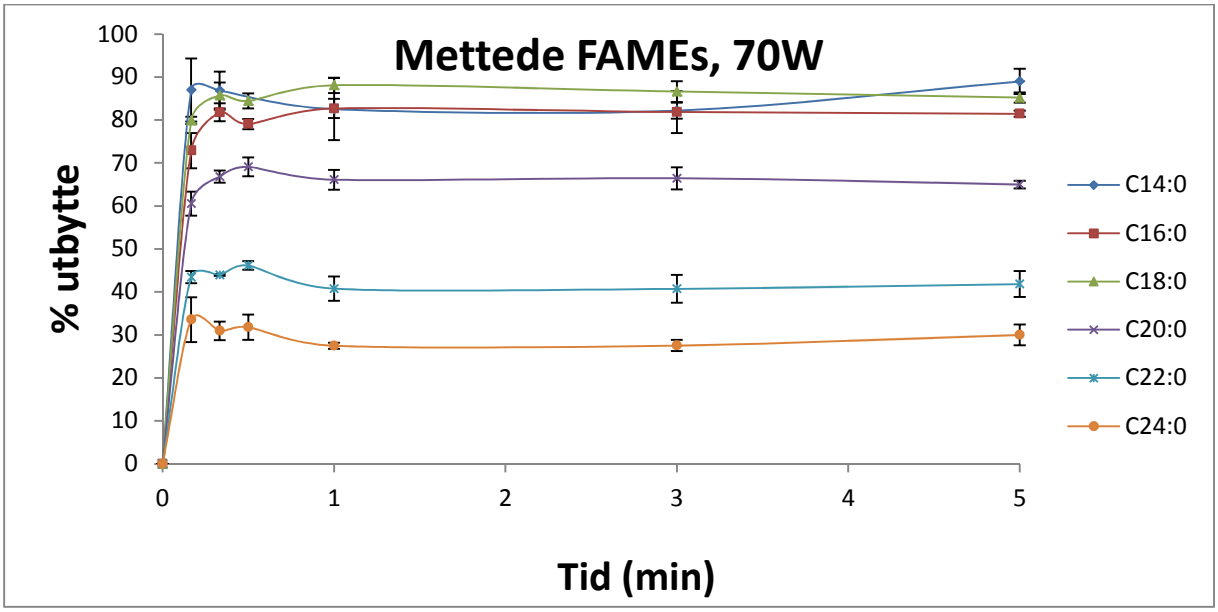
Fra del I ble det observert at utbyttene stort sett stabiliserte seg etter 20 sekunder, så det ble valgt å ikke kjøre standarden lenger enn 5 minutter på mikrobølgemetoden ved 70W. Tabell 3.2 viser gjennomsnittlig beregnet utbytte av mettede fettsyrer i referansestandard GLC 502 og dets standardavvik etter uttak ved ulike tidspunkt. Det ble observert noe avvik i kjøringene som ikke er tatt med i gjennomsnittlig beregning av utbytte og standardavvik (se vedlegg 2). Prøvene det gjelder mer merket i tabellene.

TABELL 3.2: BEREGNET % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK VED 70W AV REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I MIKROBØLGEOVN VED 70W

FAME\Tid	10s.	20s.	30s.	1min.	3min.	5min
Mettede FAMEs						
C14:0	86,99 % ± 7,32	86,81% ± 4,43	81,34% ± 7,26	82,54% ± 1,84	82,18% ±8,27[a)]	88,96% ± 4,64
C16:0	72,89% ± 4,10	81,78% ± 2,10	79,04% ± 1,19	82,68% ± 2,21	81,85% ± 4,89	81,44% ± 0,72
C18:0	79,91% ± 0,86	85,71% ± 3,00	84,41% ± 1,75	88,08% ± 1,78	86,61% ± 2,40	85,21% ± 1,17
C20:0	60,55% ± 2,79	66,83% ± 1,41	69,09% ± 2,18	66,12% ± 2,31	66,45% ± 2,57	64,99% ± 0,90
C22:0	43,45% ± 1,44	46,86% ± 4,11	46,14% ± 1,01	40,77% ± 2,85	40,72% ± 3,23	41,84% ± 3,02
C24:0	33,56% ± 5,20	30,94% ± 2,16	31,81% ± 2,95	27,48% ± 0,6 [a)]	27,54% ± 1,31[a)]	30,01% ± 2,41

a) *Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.*

Figur 3.8 viser optimaliseringskurven for de mettede fettsyrene i referansestandarden..



FIGUR 3.8: OPTIMALISERINGSKURVE FOR METTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

Utbyttene av det mettede FAMEs i referansestandarden viser seg å være noe lavere enn forventningene ut fra resultatene i avsnitt 3.1. Beregnede utbytter i forrige avsnitt ga 90-100% utbytte etter 20 sekunder ved 70W, og var tilnærmet stabil etter det. C14:0, C16:0 og C18:0 ligger samlet og stabilt rundt 80-90% utbytte etter 20 sekunder, så utbyttet ble ca. 10% lavere

for alle disse sammenlignet med resultatene fra avsnitt 3.1. Også FAMEs C20:0, C22:0 og C24:0 burde vært rundt dette nivået, men disse viser seg å ligge betydelig lavere. Årsaker til dette vil diskuteres i avsnitt 3.2.5.

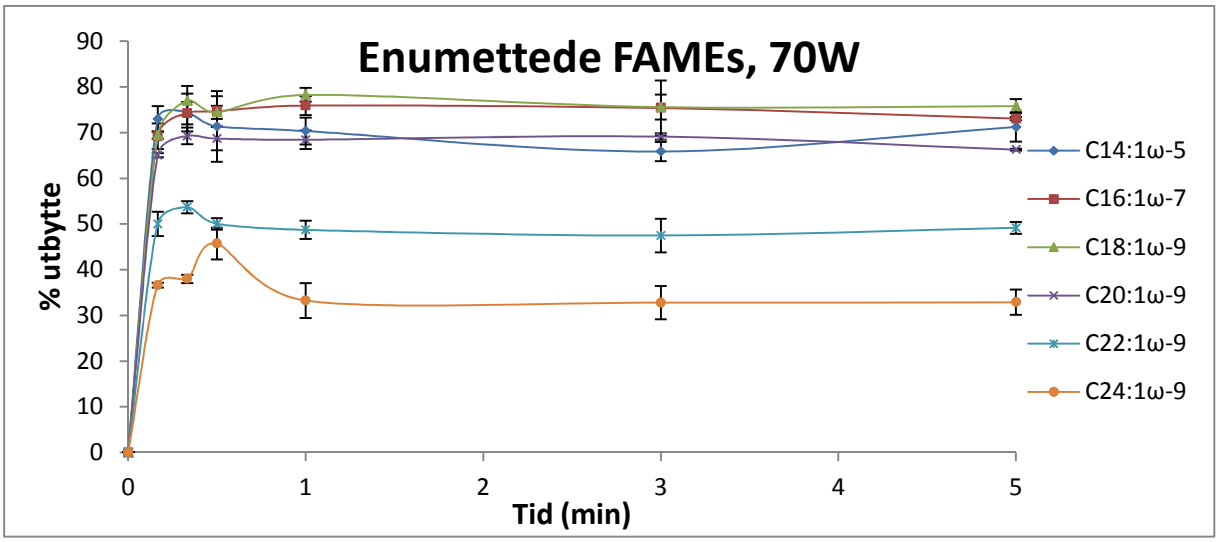
Tabell 3.3 viser % utbytte av enumettede FAMEs derivatisert med mikrobølger ved 70W.

TABELL 3.3: BEREGNET % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR ENUMETTEDE FETTSYRER I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I MIKROBØLGEOVN VED 70W

Enumettede FAMEs						
FAME\Tid	**10s**	**20s**	**30s**	**1min**	**3min**	**5min**
C14:1cΔ9 (ω-5)	72,99% ± 2,82 [a)]	74,39% ± 4,14	75,86% ± 5,38	70,34% ± 2,97	65,87% ± 2,12 [a)]	71,24% ± 3,22 [a)]
C16:1cΔ9 (ω-7)	69,22% ± 2,78	74,25% ± 2,45	74,68% ± 3,28	75,90% ± 2,05	75,38% ± 6,03	73,06% ± 0,34
C18:1cΔ9 (ω-9)	69,48% ± 0,82	76,98% ± 3,24	74,42% ± 1,44	78,26% ± 1,51	75,58% ± 2,72	75,81% ± 1,54
C20:1cΔ11 (ω-9)	65,08% ± 0,45	69,26% ± 1,83	68,69% ± 2,57	68,44% ± 2,05	69,13% ± 0,70	66,28% ± 0,23
C22:1cΔ13 (ω-9)	50,02% ± 2,68	53,68% ± 1,34	50,06% ± 1,26	48,72% ± 2,02	47,49% ± 3,69	49,17% ± 1,30
C24:1cΔ15 (ω-9)	36,62% ± 0,55	37,99% ± 0,93	45,72% ± 3,47	33,25% ± 3,83	32,77% ± 3,65	32,88% ± 2,77

a) Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.

Figur 3.9 viser optimaliseringskurven for enumettede FAMEs.



FIGUR 3.9: OPTIMALISERINGSKURVE FOR ENUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

Som for de mettede gir de enumettede FAMEs og lavere utbytter enn forventet. C14:1cΔ9, C16:1cΔ9, C18cΔ9 og C20:1cΔ11 ligger stabilt rundt 70-80% etter 20 sekunder, ca. 20% lavere enn forventet. C22:1cΔ13 og C24:1cΔ15 ligger betydelig lavere enn de øvrige. Til C24:1cΔ15 observeres det en kraftig økning fra 38 til 46% mellom 20 og 30 sekunder, før den brått går ned til 33% etter 1 minutt og stabiliserer seg der. Sammenlignet med formen til optimaliseringskurvene til de andre FAMEs, kan det antas at dette er et avvik, og at det virkelige utbyttet skulle vært noe lavere. C22:1cΔ13 har et maksimalt utbytte på 53% etter 20 sekunder, og stabiliserer seg rundt 49% etter 30 sekunder.

Tabell 3.4 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for mettede FAMEs.

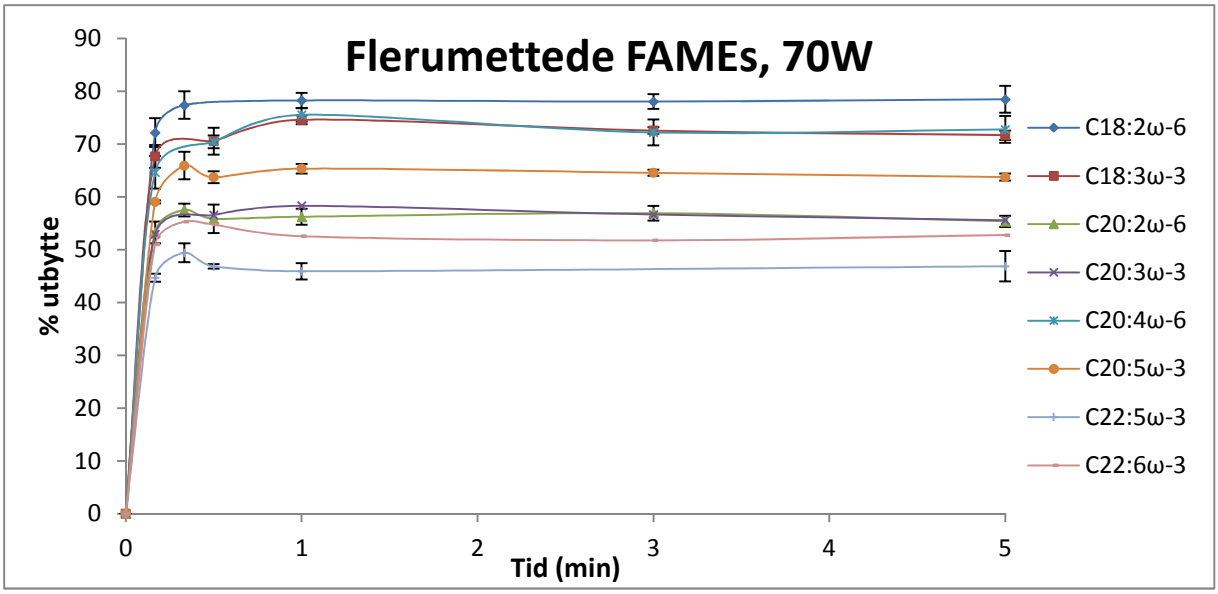
TABELL 3.4: BEREGNET % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I MIKROBØLGEOVN VED 70W

Flerumettede FAMEs						
FAME\Tid	**10s**	**20s**	**30s**	**1min**	**3min**	**5min**
C18:2cΔ9,12 (ω-6)	72,19% ± 2,75	77,40% ± 2,58	75,25% ± 1,46	78,27% ± 1,40	78,06% ± 2,56	78,49% ± 1,91
C18:3cΔ9,12,15(ω-3)	67,67% ± 2,17	72,19% ± 2,55	70,59% ± 0,87	74,62% ± 0,62	72,59% ± 0,88	71,69% ± 0,25
C20:2cΔ11,14 (ω-6)	53,28% ± 2,04	57,54% ± 1,22	55,87% ± 2,68	56,25% ± 1,52	56,92% ± 1,38	55,38% ± 1,06
C20:3cΔ11,13,17 (ω-3)	52,93% ±2,19	43,04% ± 0,65[b)]	56,59% ± 1,23	58,33% ± 1,31	56,67% ± 1,93[a)]	55,61% ± 0,15
C20:4cΔ5,6,11,14 (ω-6)	64,67% ± 3,07	57,48% ± 1,24	70,44% ± 1,29	75,54% ± 2,47	72,22% ± 2,53	72,79% ± 0,75
C20:5cΔ5,8,11,14,17 (ω-3)	59,05% ± 0,27	65,94% ± 2,62	63,71% ± 1,12	65,35% ± 0,91	64,58% ± 0,56	63,75% 0,67
C22:5cΔ7,10,13,16,19 (ω-3)	44,70% ± 0,74	49,43% ± 1,77	46,85% ± 0,40	45,92% ± 1,54	44,56% ± 2,88	46,86% ± 1,97
C22:6cΔ4,7,10,13,16,19 (ω-3)	51,01% ± 0,90	55,31% ± 2,31	54,76% ± 0,31	52,56% ± 0,46	51,79% ± 1,30	52,79% ± 3,45

a) *Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.*

b) *Avvik. Ikke med i optimaliseringskurver under.*

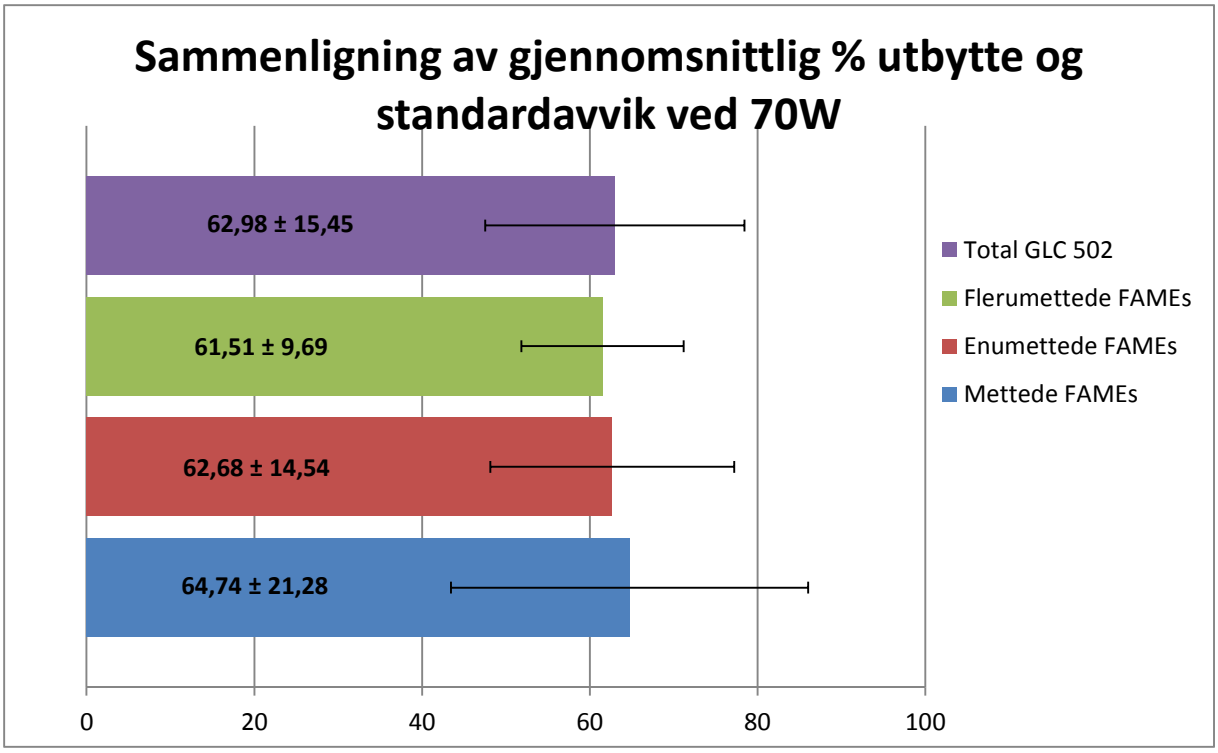
Figur 3.10 viser optimaliseringskurven for flerumettede FAMEs.



FIGUR 3.10: OPTIMALISERINGSKURVE FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

Også utbyttene til flerumettede FAMEs ser ut til å være en del lavere enn forventet. Her observeres det større spredning mellom de ulike FAMEs, og spredningen ser ut til å være uavhengig av kjedelengde, grad av umettethet og plassering av dobbetbindinger. Utbyttene strekker seg fra 47% (C22:5cΔ7,10,13,16,19) til 79% (C18:2cΔ9,12). Mulige årsaker til de lave utbyttene diskuteres i avsnitt 3.2.5.

Figur 3.11 viser gjennomsnittlig utbytte og standardavvik for henholdsvis mettede, enumettede og flerumettede FAMEs, samt totalgjennomsnitt med standardavvik av GLC 502.



FIGUR 3.11: SAMMENLIGNING AV TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE FOR METTEDE, ENUMETTEDE OG FLERUMETTEDE FAMES OG TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE AV REFERANSESTANDARD GLC 502

Gjennomsnittlig utbytte av alle mettede, enumettede og flerumettede FAMEs satt opp mot gjennomsnittlig totalt utbytte av hele standarden ser ut til å være ganske like. Standardavviket et størst til mettede FAMEs, dette fordi de lave utbyttene av C22:0 og C24:0 først og fremst drar ned snittet, men i og med at de er betydelig lavere enn de resterende øker også standardavviket betraktelig. Av de enumettede hadde C22:1cΔ13 og C24:1Δ15 de laveste utbyttene, og dette drar ned det totale snittet og øker det totale standardavviket. De flerumettede FAMEs hadde ikke de samme tydelige avstandene mellom utbyttene og har også det laveste standardavviket. Men på grunn av generelt høy spredning av mange FAMEs over et område på ca. 40%, øker det totale standardavvik. Sammenlagt er det totale gjennomsnittet av alle derivatiserte FAMEs i referansestandard GLC 502 62,98 ± 15,45 og med et RSD på 24,53%. Sammenlignet med resultatene i avsnitt 3.1 der gjennomsnittet var 91,98 ± 1,57 og et RSD på 1,71%, er presisjonen i denne derivatiseringen ikke god. Dette vil diskuteres videre i avsnitt 3.2.5.

3.2.2 Mikrobølger, 70˚C

I metode brukt på laboratoriekurs i kromatografi (KJM310) ved IKBM brukes vannbad ved 70 ˚C for derivatisering av frie fettsyrestandarder. Der er kjent at mikrobølger er en mer

effektiv oppvarmingskilde enn vannbad eller andre konvensjonelle oppvarmingskilder (Kappe et al. 2009), ble det besluttet å stille inn temperatur på mikrobølgeovnen til 70 ˚C og uttak etter 1, 3 og 5 minutter for å undersøke om oppvarming med mikrobølger gir bedre utbytter etter kortere tid.

Det ble også her observert variasjoner mellom parallellene, og enkelte er ikke med i beregningene av gjennomsnittlig utbytte og standardavvik (se vedlegg 3). Disse er merket i tabellen.

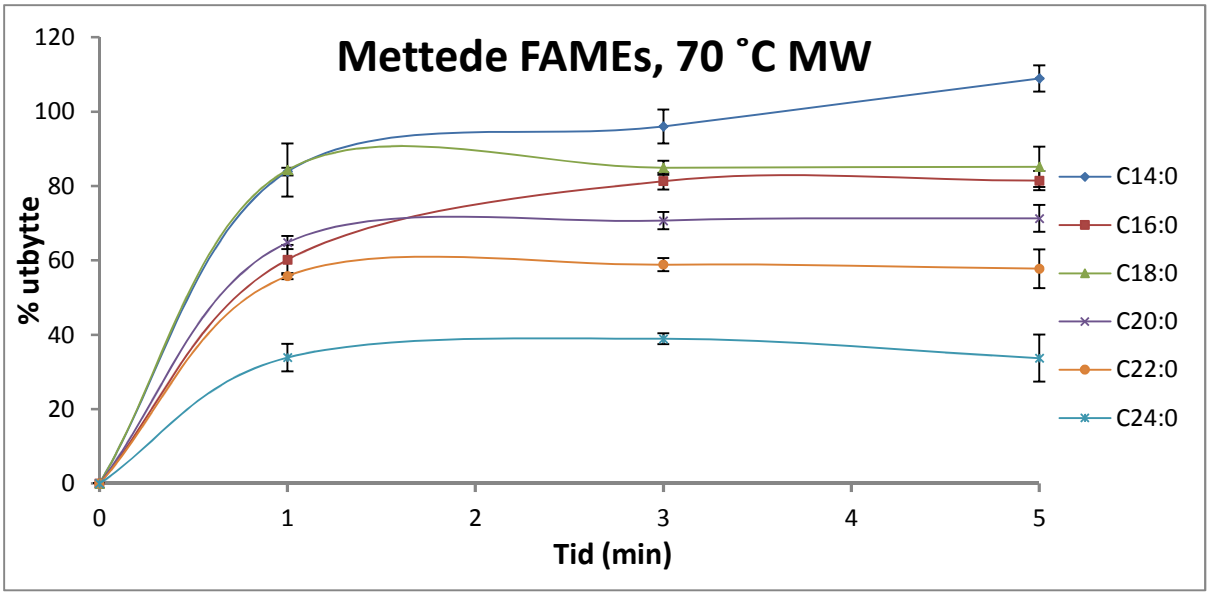
Tabell 3.5 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for mettede FAMEs.

TABELL 3.5: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR METTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I MIKROBØLGEOVN VED 70 ˚C

FAME\Tid	1min	3min	5min
Mettede FAMEs			
C14:0	83,91% ± 1,04[a)]	96,02% ±4,58	108,94% ± 3,54[a)]
C16:0	60,18% ± 7,15[a)]	81,31% ± 1,89	81,45% ± 5,39
C18:0	84,31% ± 4,00	84,93% ± 2,24	85,17% ± 2,58
C20:0	64,79% ± 1,77[a)]	70,70% ± 2,31	71,29% ± 3,62
C22:0	55,80% ± 0,81	58,86% ± 1,78	57,76% ± 5,23
C24:0	33,87% ± 3,70	38,91% ± 1,46	33,71% ± 6,32

a) *Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.*

Figur 3.12 viser optimaliseringskurven for mettede FAMEs.



FIGUR 3.12: OPTIMALISERINGSKURVE FOR METTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

De lave utbyttene av C22:0 og C24:0 fra metode i avsnitt 3.2.1 ser ut til å gjelde også i denne metoden, men C22:0 har økt fra 46% ved 70W og 20 sekunder til 59% ved 70 ˚C med mikrobølger. Det sees også en liten økning i utbyttet til C20:0. Større sprik mellom parallellene sees ved flere tilfeller, og noen paralleller er ikke tatt med i beregningene. Både standardavvikene og relative standardavvik (RSD%) er lave, så reproduserbarheten kan sies å være god.

Tabell 3.6 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for enumettede FAMEs.

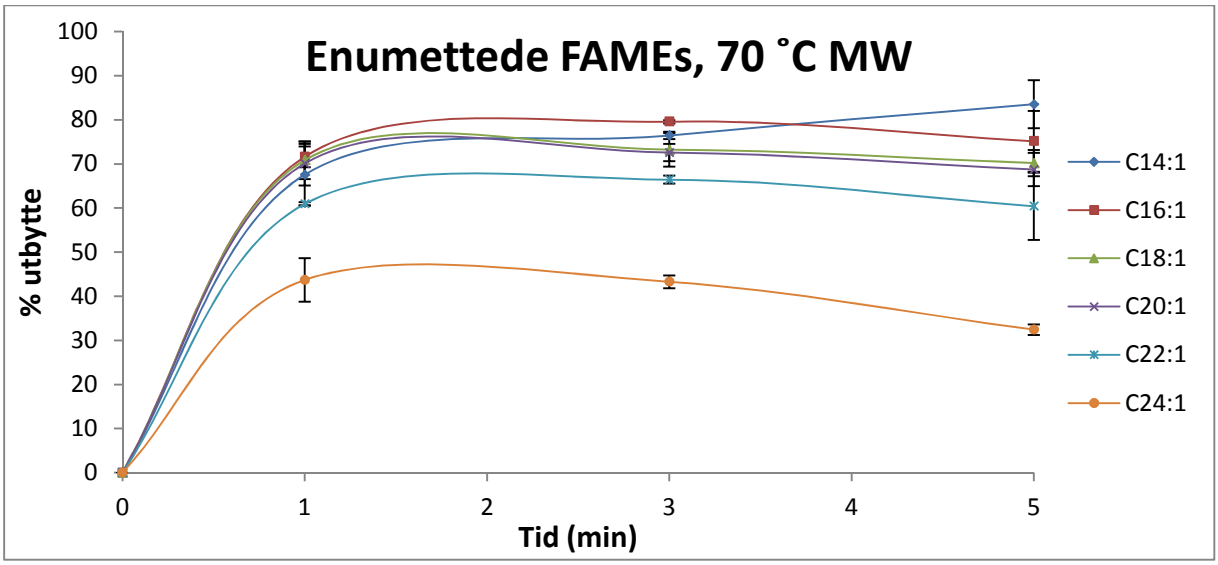
TABELL 3.6: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR ENUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I MIKROBØLGEOVN VED 70 ˚C

Enumettede FAMEs			
FAME\Tid	**1min**	**3min**	**5min**
C14:1cΔ9	67,56% ± 6,97	76,46% ± 0,85	83,54% ± 5,42
C16:1cΔ9	71,62% ± 2,34	79,59% ± 0,37[a)]	75,16% ± 6,91
C18:1cΔ9	70,85%	73,23%	70,19%

	± 4,27	± 3,82	± 2,98
C20:1cΔ11	70,09% ± 4,95	72,58% ± 1,97	68,74% ± 3,77
C22:1cΔ13	60,93% 0,42[a)]	66,44% ± 0,90	60,42% ± 7,63
C24:1cΔ15	43,70% ± 4,95	43,28% ± 1,46	32,44% ± 1,20

a) *Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.*

Figur 3.13 viser optimaliseringskurven for mettede FAMEs.



FIGUR 3.13: OPTIMALISERINGSKURVE FOR ENUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

Det sees ytterligere økning i utbytte av C22:1cΔ13 (66% mot 48%) og C24:1cΔ15 (43% mot 37%). FAMEs fra C14:1cΔ9 – C22:1cΔ13 er mer nærliggende. Utbyttet til C24:1cΔ15 er fortsatt betydelig lavere sammenlignet med de resterende enumettede FAMEs, og videre testing av metoder avgjør om dette er vedvarende. Det observeres også enkelte større sprik mellom parallellene, og noen er ikke tatt med i beregningene (merket i tabellen).

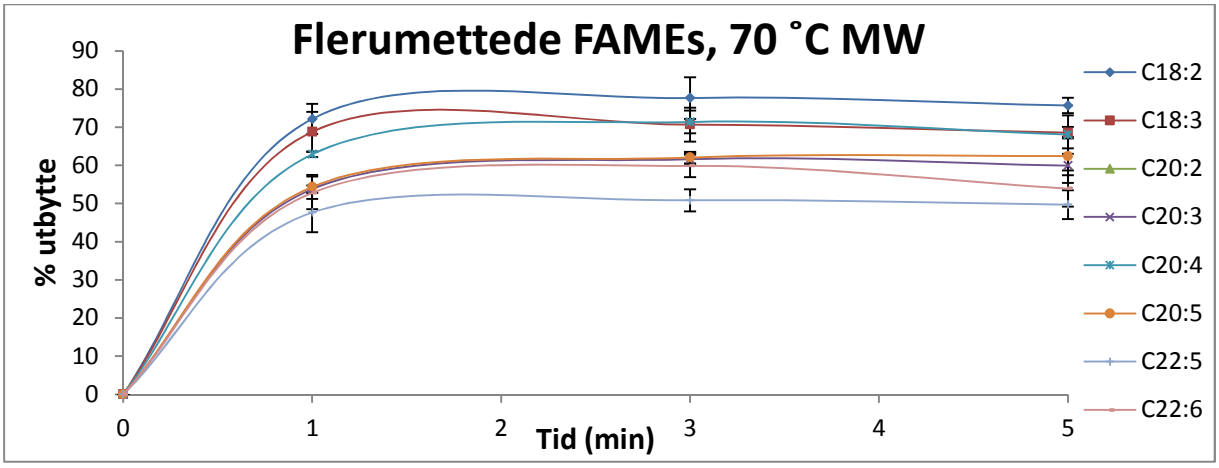
Tabell 3.7 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for flerumettede FAMEs.

TABELL 3.7: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I MIKROBØLGEOVN VED 70 ˚C

Flerumettede FAMEs			
FAME\Tid	**1min**	**3min**	**5min**
C18:2cΔ9,12	72,16% ± 3,93	77,66% ± 5,45	75,69% ± 1,99
C18:3cΔ9,12,15	68,78% ± 5,21	70,68% ± 4,45	68,56% ± 1,51
C20:2cΔ11,14	59,71% ± 5,61	61,80% ± 1,61	61,37% ± 3,68
C20:3cΔ11,14,17	53,79% ± 0,93	61,62% ± 1,57	59,94% ± 4,51
C20:4cΔ5,8,11,14	62,90% ± 0,72[a)]	71,38% ± 2,94	68,03% ± 5,03
C20:5cΔ5,8,11,14,17	54,35% ±3,12[a)]	62,03% ± 1,53	62,42% ± 5,02
C22:5cΔ7,10,13,16,19	47,64% ± 5,16	50,84% ± 2,92	49,72% ± 3,75
C22:6cΔ4,7,10,13,16,19	52,80% ± 4,27	59,85% ± 2,95	53,92% ± 4,73

a) *Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.*

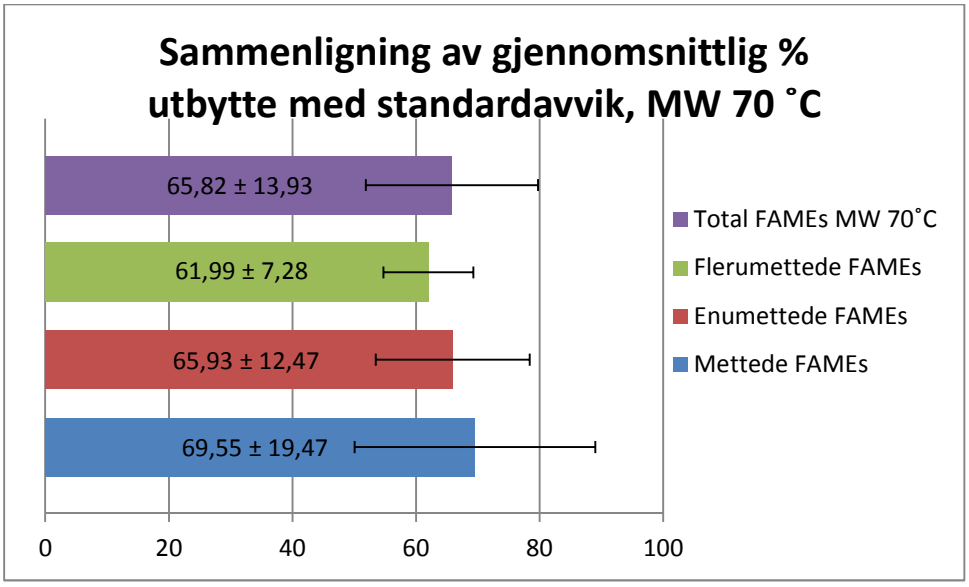
Figur 3.14 viser optimaliseringskurven for flerumettede FAMEs.



FIGUR 3.14: OPTIMALISERINGSKURVE FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

Utbyttet av flerumettede FAMEs er fortsatt noe spredt, fra 50% (C22:5cΔ7,10,13,16,19) til 76% (C18:2cΔ9,12), men noe mindre sammenlignet med resultatene til flerumettede FAMEs i avsnit 3.2.1. Større avvik i enkelte av parallellene ble funnet, og disse er ikke med i beregningene (se vedlegg; tabell 3.7). Presisjonen i metoden ser ellers ut til å være god, da flertallet av utbyttene har lave standardavvik og RSD% (se vedlegg for RSD%). Årsaker til lave utbytter diskuteres i avsnitt 3.2.5.

Figur 3.15 viser gjennomsnittlig utbytte av alle mettede, enumettede og flerumettede FAMEs, samt totalt gjennomsnitt av alle FAMEs i referansestandarden med standardavvik.



FIGUR 3.15: SAMMENLIGNING AV TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE FOR METTEDE, ENUMETTEDE OG FLERUMETTEDE FAMES OG TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE AV REFERANSESTANDARD GLC 502

Gjennomsnittlig utbytte av mettede, enumettede og flerumettede FAMEs er henholdsvis 69,55% ± 19,47, 65,93% ± 12,47 og 61,99% ± 7,28. Med hensyn på kun gjennomsnittet er de nærliggende, men høye standardavvik påvirker presisjonen. I likhet med 70W metode på mikrobølgeovn, ble det observert lave utbytter av C22:0, C22:1Δ13, C24:0 og C24:1cΔ15, og disse fører til en betraktelig økning i standardavvikene og reduserte gjennomsnittlige utbytter. De forskjellige flerumettede FAMEs var mer nærliggende i % utbytte sammenlignet med 70W mikrobølgemetode, og derav er standardavviket noe lavere. Totalt gjennomsnitt av alle FAMEs i referansestandarden ligger på 65,82% ± 13,93, med et RSD på 21,17%. Presisjonen

av denne metoden er noe bedre enn 70W mikrobølgemetode, men fortsatt dårlig sammenlignet med resultatene fra avsnitt 3.1. Dette vil diskuteres videre i avsnitt 3.2.5.

3.2.3 70 ˚C vannbad

Denne metoden benyttes på laboratoriekurs i kromatografi (KJM310) ved IKBM, og har vist seg å være en enkel for forholdsvis rask metode (5 minutter). Små endringer på metoden er gjort for å gjøre den mest mulig lik metoden på mikrobølgeovnen. Ved å varme de opp i lukkede systemer på vannbadet, eliminerer man muligheten for at vann kan påvirke derivatiseringen, og tørketrinn med $MgSO_4$ ble unngått. Som det ble sagt i teorien er det ikke ønskelig med vann i nærheten ved derivatisering, da det kan interferere med reaksjonen slik at den ikke går fullstendig.

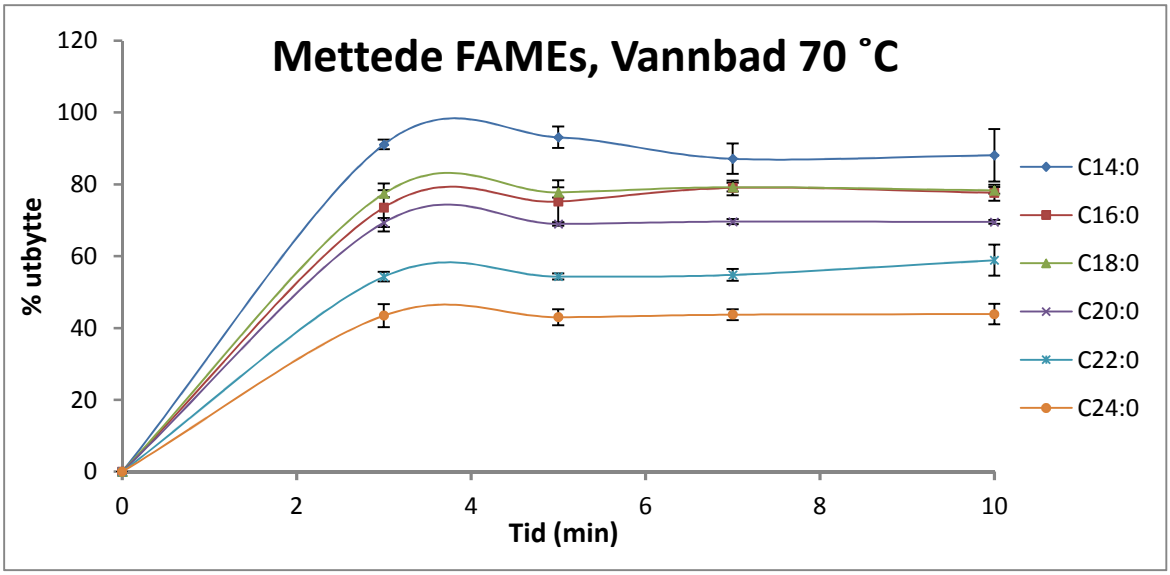
Tabell 3.8 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for mettede FAMEs.

TABELL 3.8: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR METTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I 70 ˚C VANNBAD

Mettede FAMEs				
FAME\Tid	**3min**	**5min**	**7min**	**10min**
C14:0	91,08% ± 1,32[a)]	93,09% ±2,97[a)]	87,13% ± 4,22	88,09% ± 7,27
C16:0	73,54% ± 6,67	75,19% ± 5,90	79,02% ± 2,05	77,66% ± 2,25
C18:0	77,40% ± 1,00	77,75% ± 1,45	79,20% ± 1,19	78,30% ± 0,94
C20:0	69,36% ± 1,26	68,99% ± 0,48	69,63% ± 0,69	69,51% ± 0,54
C22:0	54,27% ± 1,34	54,32% ± 0.84	54,80% ± 1,68	58,87% ± 4,32
C24:0	43,45% ± 3,19	43,02% ± 2,22	43,71% ± 1,53	43,86% ± 2,83

a) *Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.*

Figur 3.16 viser optimaliseringskurven for mettede FAMEs derivatisert på kokende vannbad.



FIGUR 3.16: OPTIMALISERINGSKURVE FOR METTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

De lave utbyttene av C22:0 og C24:0 er fortsatt vedvarende, men utbyttet av C24:0 er noe bedre sammenlignet med utbyttet fra mikrobølgemetodene (43% mot 27% og 39%), så spredningen av utbyttene til de ulike FAMEs er ikke like tydelig. Det tydelig beste utbyttet har C14:0, og det ligger på 93% ± 2,97 etter 3 minutter på 70 ˚C vannbad. Det skal merkes at dette er gjennomsnitt og beregnet standardavvik fra kun to paralleller grunnet et avvik i en parallell, så presisjonen kan ikke gjøres rede for (se tabell 3.8 og vedlegg 4). C16:0 og C18:0 ligger stabilt like under 80% etter 7 minutter, mens C20:0 ligger noe lavere, like under 70% etter 5 minutter. Standardavvikene og RSD for disse er stort sett lave, så presisjonen for hver enkelt FAME er god.

Tabell 3.9 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for enumettede FAMEs.

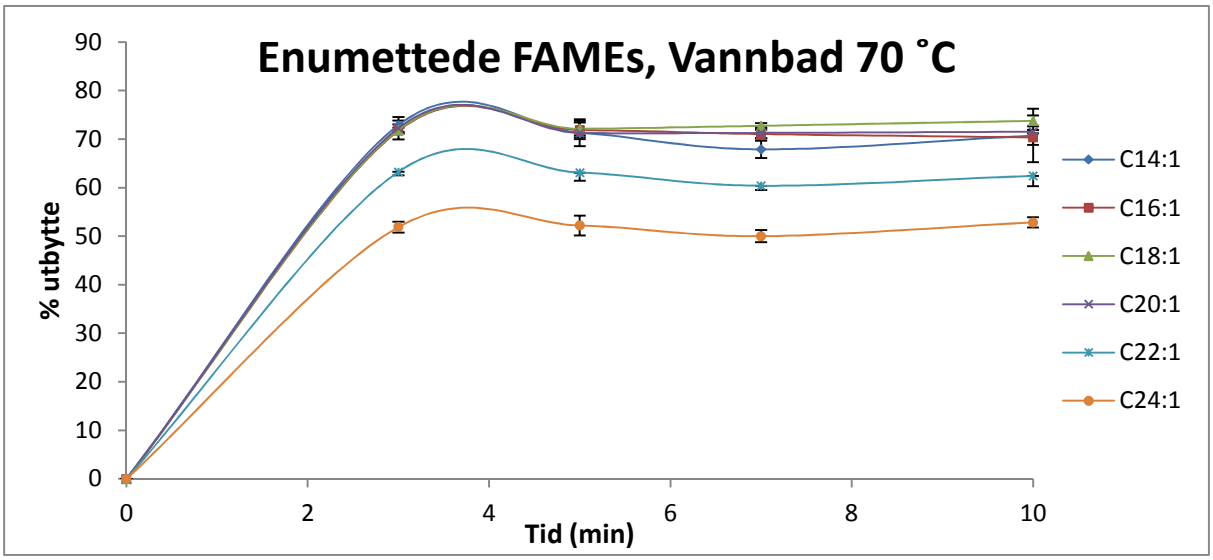
TABELL 3.9: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR ENUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I 70 ˚C VANNBAD

Enumettede FAMEs				
C14:1cΔ9	72,89% ± 1,65[a)]	71,31% ± 2,75[a)]	67,90% 1,79	70,74% ± 5,51
C16:1cΔ9	71,74% ± 0,60[a)]	71,86% ± 1,89[a)]	71,05% ± 0,86	70,35% ± 1,57
C18:1cΔ9	71,87% ± 1,92	72,12% ± 1,34	72,74% ± 0,56	73,77% ± 1,11

C20:1cΔ11	72,26% ± 0,75	71,27% ± 0,86	71,29% ± 1,17	71,52% ± 0,35
C22:1cΔ13	63,25% ± 0,70	63,10% ± 1,66	60,40% ± 0,91	62,44% ± 2,10
C24:1cΔ15	51,86% ± 1,13	52,20% ± 2,04	50,01% ± 1,28	52,84% ± 1.08

a) *Gjennomsnitt og standardavvik av kun to paralleller.*

Figur 3.17 viser optimaliseringskurven for enumettede FAMEs.



FIGUR 3.17: OPTIMALISERINGSKURVE FOR ENUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC502

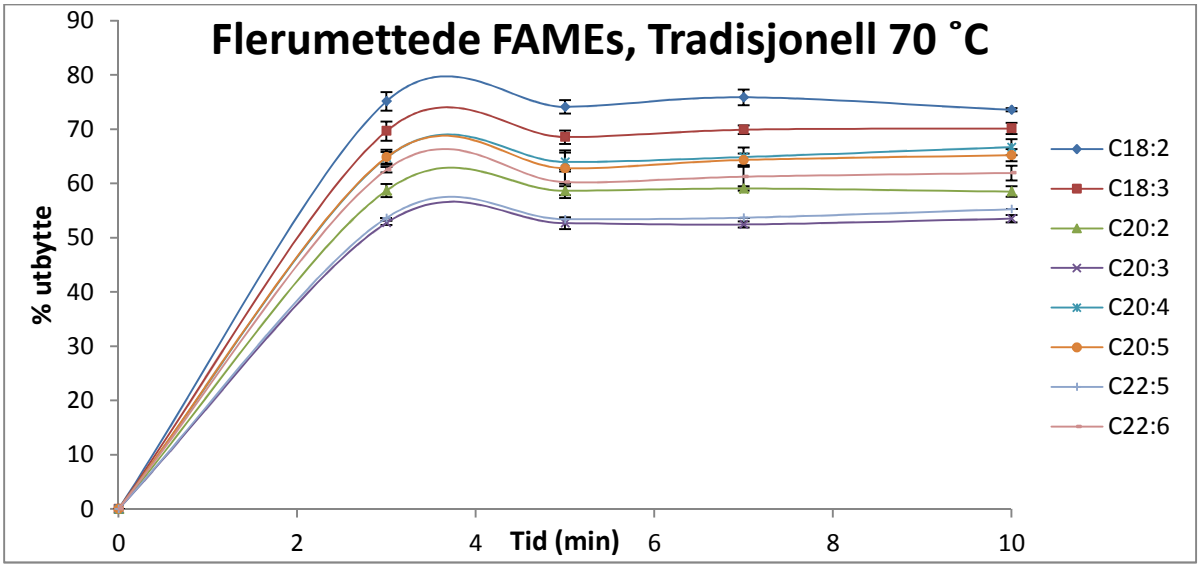
Som observert i andre metoder, er utbyttene generelt lavere enn det forventningene fra resultatene i avsnitt 3.1. Derivatiseringen av C14:1cΔ9, C16:1cΔ9, C18:1cΔ9 og C20:1cΔ11i denne metoden gir tilnærmet like utbytter over alle tidspunkt. I fire av prøvene ble det observert tydelige avvik, og disse ble ikke medregnet i gjennomsnittet og standardavviket (se tabell 3.9, vedlegg 4). C22:1cΔ13 og C24:1cΔ15 er fortsatt noe lavere enn de øvrige enumettede FAMEs, men spredninger er mye mindre sammenlignet med mikrobølgemetodene. Med jevnt over lave standardavvik (fra 0,60-5,51) og RSD (alle < 8%) (se vedlegg 4) vil presisjonen for hver enkelt FAME kunne ansees som god. Men da utbyttene er noe spredt, vil det totale standardavviket og RSD ikke være like godt.

Tabell 3.10 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for flerumettede FAMEs..

TABELL 3.10: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I 70 ˚C VANNBAD

Flerumettede FAMEs				
C18:2cΔ9,12	75,13% ± 1,69	74,11% ± 1,23	75,88% ± 1,45	73,58% ± 0,32
C18:3cΔ9,12,15	69,64% ± 1,76	68,53% ± 1,25	69,90% ± 0,78	70,12% ± 1,04
C20:2cΔ11,14	58,70% ± 1,23	58,63% ± 1,34	59,06% ± 0,42	58,49% ± 0,97
C20:3cΔ11,13,17	52,73% ± 0,41	52,68% ± 1,09	52,44% ± 0,57	53,50% ± 0,66
C20:4cΔ5,6,11,14	64,73% ± 1,06	63,94% ± 1,73	64,86% ± 1,76	66,68% ± 1,47
C20:5cΔ5,8,11,14,17	64,80% ± 1,39	62,79% ± 3,29	64,32% ± 1,17	65,20% ± 1,13
C22:5cΔ7,10,13,16,19	53,64% ±0,89	53,41% ± 1,09	53,69% ± 1,52	55,24% ± 0,54
C22:6cΔ4,7,10,13,16,19	62,52% 0,51	60,23% ± 2,41	61,24% ± 2,17	61,93% ± 1,36

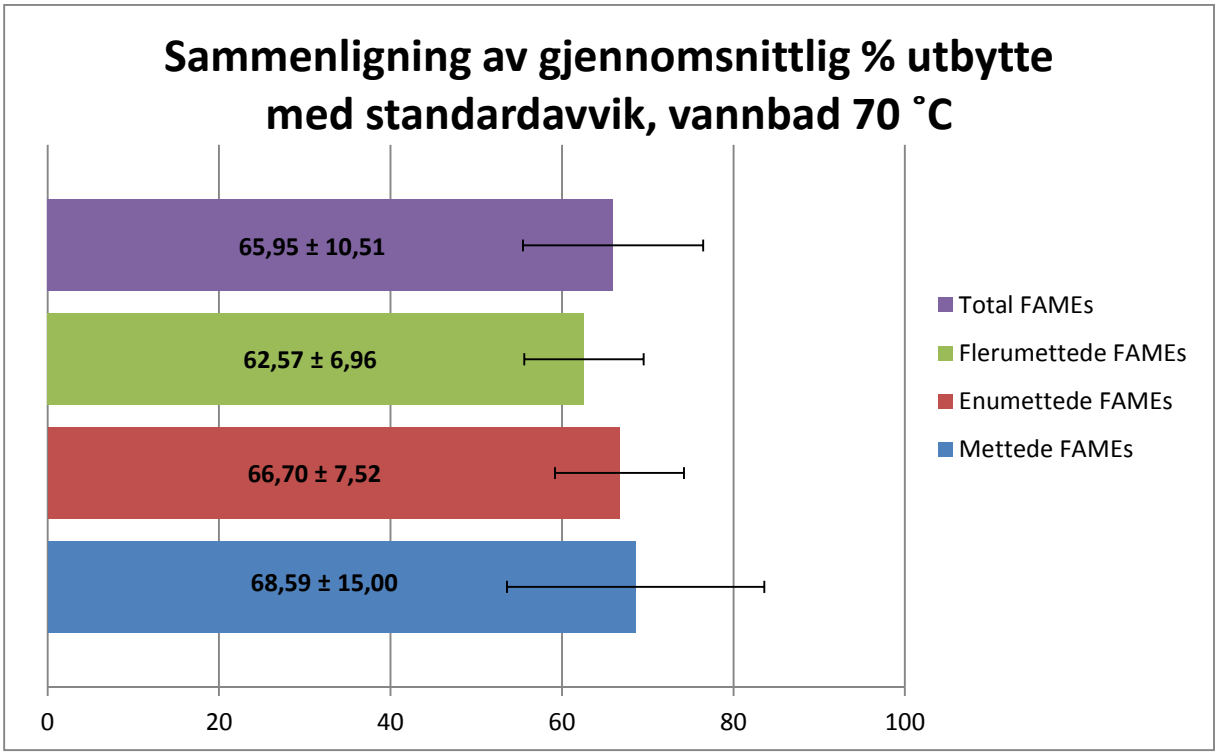
Figur 3.18 viser optimaliseringskurven for flerumettede FAMEs.



FIGUR 3.18: OPTIMALISERINGSKURVE FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

Utbyttene er fortsatt noe lavere enn forventningene. Utbyttene er fortsatt noe spredt, fra på C20:3cΔ11,14,17 (52,73% ± 0,41) til C18:2cΔ9,12 75,88% ± 1,45. Det ble ikke observert noen betydelige avvik i de ulike parallellene, og både standardavvikene og RSD (alle ≤ 4,00%) (se vedlegg 4) er lave. Med dette kan det konkluderes med at presisjonen for hver enkelt FAME i denne metoden er god, men også her på grunn av et vist sprik mellom de ulike FAMEs i referansestandarden, vil presisjonen av det totale innholdet enumettede FAMEs bli dårligere.

Figur 3.19 viser gjennomsnittlig totalutbytte for mettede, enumettede og flerumettede FAMEs og det totale gjennomsnittlige utbyttet av alle FAMEs i referansestandard GLC 502.



FIGUR 3.19: SAMMENLIGNING AV TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE FOR METTEDE, ENUMETTEDE OG FLERUMETTEDE FAMES OG TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE AV REFERANSESTANDARD GLC 502

Det totale gjennomsnittlige utbyttet av alle FAMEs ligger på 65,95% ± 10,51, og har et RSD på 15,94. Presisjonen totalt er ikke veldig god, men sammenlignet med mikrobølgemetodene er den noe lavere. Det sees fortsatt et høyt standardavvik og RSD (21,87%) for mettede FAMEs, og det er denne som påvirker presisjonen i størst grad. Selv om utbyttene av C22:0 og C24:0 er høyere sammenlignet med mikrobølgemetodene, er de merkbart lavere sammenlignet med de øvrige mettede FAMEs. Standardavvikene og RSD til enumettede og flerumettede FAMEs er sammenlignet med mettede FAMEs omtrent dobbelt så lave.

Flerumettede FAMEs har det laveste utbyttet (62,57% ±6,95), men igjen det laveste standardavviket og RSD (11,13%), så resultatene av disse vil være mer pålitelige på grunn av bedre presisjon.

3.2.4 100 ˚C vannbad

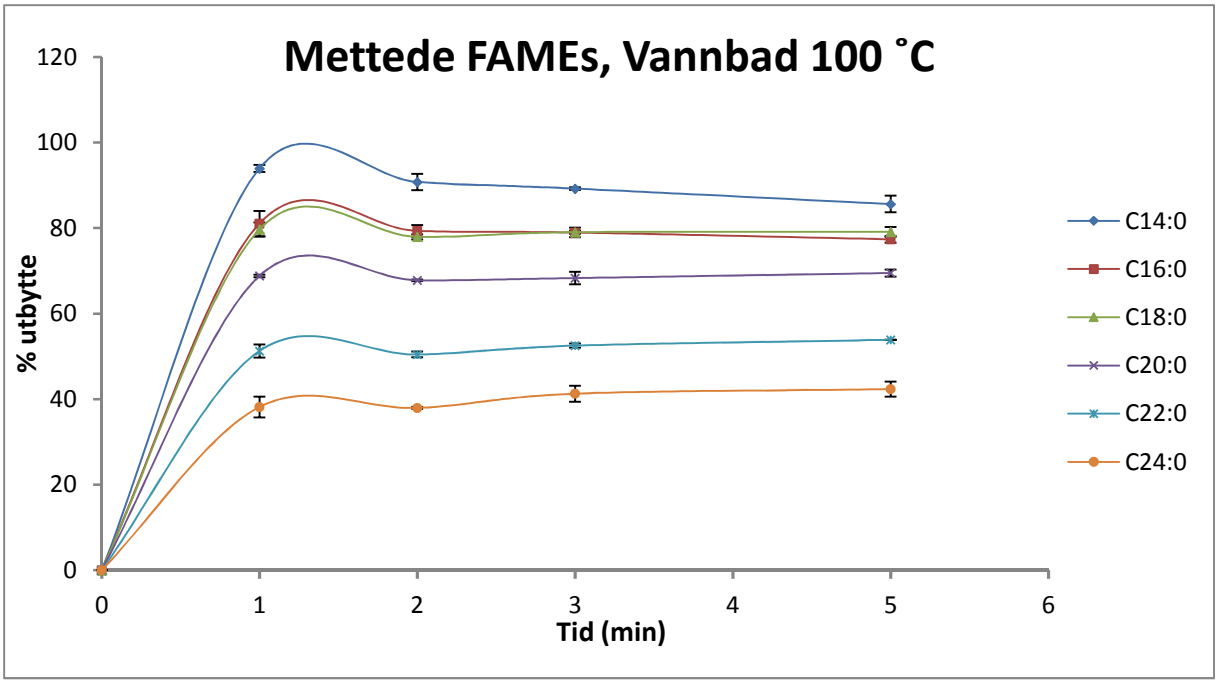
Metoden er tidligere brukt til derivatisering av frie fettsyrer, og har vist seg å være veldig hurtig. Morrison og Smith (1964) og Metcalfe og Schmitz (1961), og har vist seg å være en effektiv metode. Metcalfe og Schmitz rapporterer 80-96% utbytte etter 2 minutter ved derivatisering av frie fettsyrer i 14% BF_3-metanol på kokende vannbad. For å undersøke om ytterligere økning eller dekomponering forekommer er det tatt uttak ved flere tidspunkt.

Tabell 3.10 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for mettede FAMEs.

TABELL 3.10: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR METTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I 100 ˚C VANNBAD

FAME\Tid	1min	2min	3min	5min
Mettede FAMEs				
FAME\Tid	**1min**	**2min**	**3min**	**5min**
C14:0	93,94% ± 0,80	90,76% ± 1,91	89,21% ± 0,29	85,62% ± 1,94
C16:0	81,04% ± 2,94	79,32% ± 1,38	78,95% ± 1,11	77,36% ± 0,76
C18:0	79,67% ± 1,66	77,93% ± 0,60	79,04% ± 0,39	79,09% ± 1,13
C20:0	68,80% ± 0,28	67,79% ± 0,20	68,31% ± 1,49	69,48% ± 0,81
C22:0	51,26% ± 1,53	50,43% ± 0,67	52,51% ± 0,50	53,88% ± 0,06
C24:0	38,17% ± 2,42	37,96% ± 0,22	41,27% ± 1,86	42,36% ± 1,78

Figur 3.20 viser optimaliseringskurven for mettede FAMEs derivatisert på kokende vannbad.



FIGUR 3.20: OPTIMALISERINGSKURVE FOR METTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502.

Tilsvarende de øvrige metodene, er utbyttene også her lavere enn forventet. C22:0 og C24:0 ligger maksimalt på henholdsvis 51,26% ± 1,53 og 42,36% ± 1,78. C14:0 ser ut til å svare til forventningene i % utbytte (93,84% ± 0,80 etter 1 min, 90,76 ± 1,91 etter 2 minutter), da Metcalfe og Schmitz (1961) rapporterte 95% utbytte med tilsvarende metode etter 2 minutter. C16:0 og C18:0 ligger stabilt like under 80%, mens C20:0 ligger stabilt like under 70% etter 2 minutter.

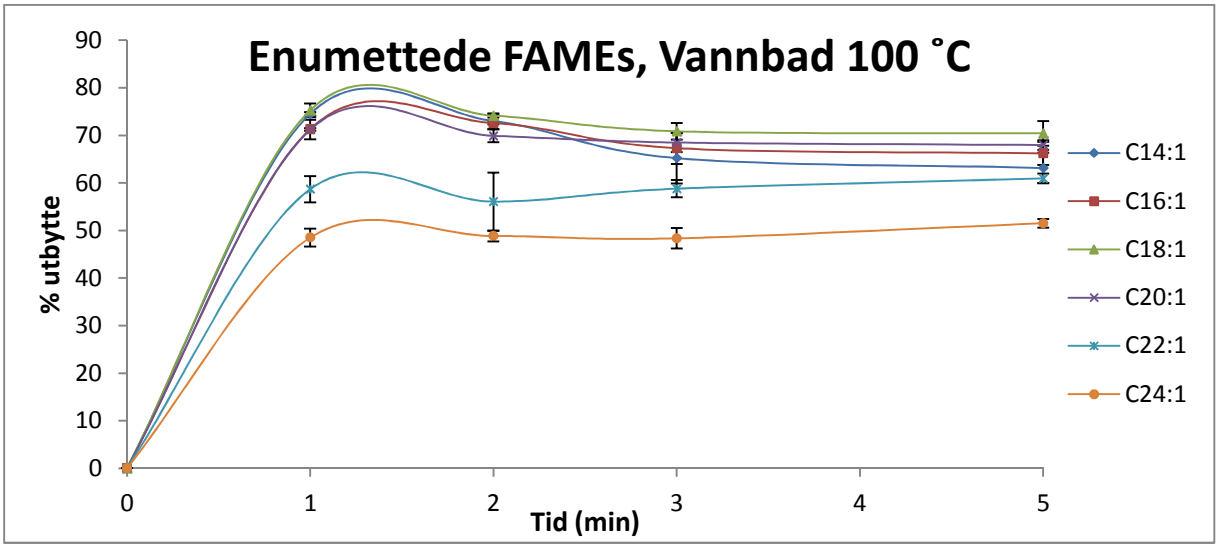
Tabell 3.11 gir gjennomsnittlig % utbytte fra 3 paralleller ± standardavvikene for mettede FAMEs.

TABELL 3.11: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR ENUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I 100 ˚C VANNBAD

Enumettede FAMEs				
FAME\Tid	**1min**	**2min**	**3min**	**5min**
C14:1cΔ9	74,54% ± 0,38	73,00% ± 1,65	65,22% ± 5,34	63,13% ± 3,21
C16:1cΔ9	71,29% ± 0,27	72,58% ± 0,28	67,30% ± 3,33	66,21% ± 2,42
C18:1cΔ9	75,26%	74,14%	70,87%	70,42%

	± 1,42	± 0,36	± 1,74	± 2,57
C20:1cΔ11	71,22% 2,03	69,90% ± 1,34	68,49% ± 2,02	67,97% ± 0,99
C22:1cΔ13	58,67% ±2,76	56,06% ± 6,11	58,79% ± 1,82	60,96% ± 1,00
C24:1cΔ15	48,51% ± 1,89	48,85% ± 1,14	48,36% ± 2,16	51,52% ± 0,92

Figur 3.17 viser optimaliseringskurven for enumettede FAMEs derivatisert på kokende vannbad



FIGUR 3.17: OPTIMALISERINGSKURVE FOR ENUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502

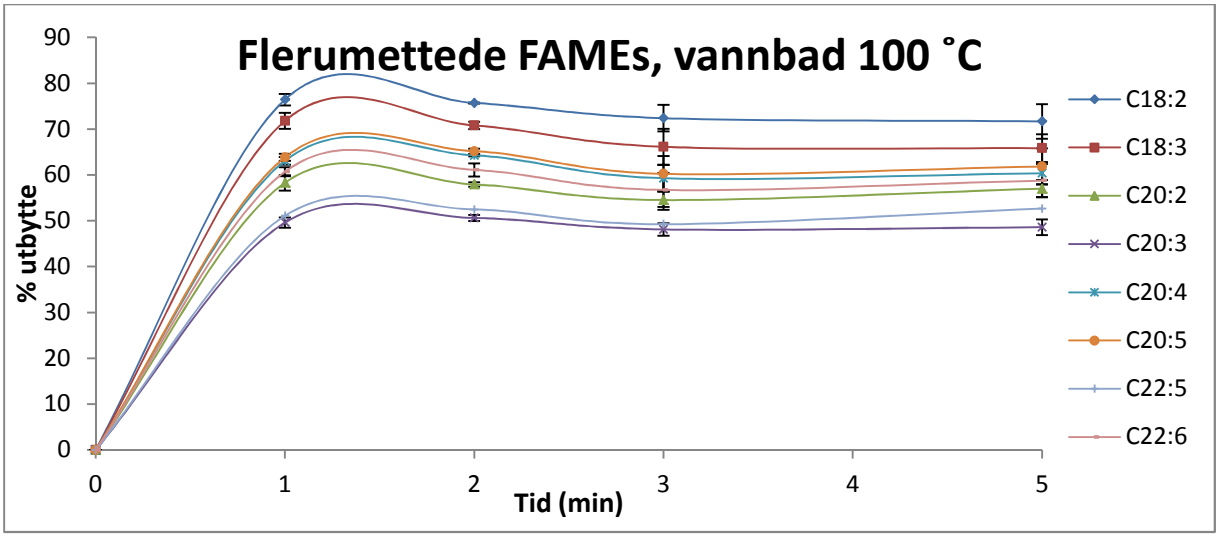
Igjen sees de vedvarende lavere utbyttene til C22:1cΔ13 og C24:1cΔ15. Begge oppnår sine maksimale utbytter ved 5 minutter, da henholdsvis 60,96% ± 1,00 og 51,52 ± 0,92. C14:1cΔ9, C18:1cΔ9 og C20:1cΔ11 ser ut til å nå sine maksimale utbytter etter 1 minutt, henholdsvis 74,54% ± 0,38, 75,26 ± 1,42 og 71,22 ± 2,03, mens C16:1 har høyst utbytte etter 2 minutter på 72,58 ± 0,28. Ingen større avvik ble funnet mellom parallellene, så det er god presisjon i metoden. I forhold til utbytter som er rapportert tidligere, er dette noe dårligere utbytter enn forventet.

Tabell 3.12 viser gjennomsnittlig beregnet utbytte av flerumettede FAMEs derivatisert på kokende vannbad.

TABELL 3.12: GJENNOMSNITTLIG % UTBYTTE ± STANDARDAVVIK FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502 DERIVATISERT I 100 ˚C VANNBAD

Flerumettede FAMEs				
FAME\Tid	**1min**	**2min**	**3min**	**5min**
C18:2cΔ9,12	76,43% ± 1,25	75,68% ± 0,09	72,38% ± 2,92	71,68% ± 3,77
C18:3cΔ9,12,15	71,78% ±1,75	70,79% ± 0,82	66,14% ± 3,91	65,82% ± 3,02
C20:2cΔ11,14	58,28% ± 1,68	57,91% ±0,49	54,52% ± 2,15	56,99% ± 1,85
C20:3cΔ11,13,17	49,59% ± 1,13	50,61% ± 0,67	48,11% ± 1,38	48,59% ± 1,73
C20:4cΔ5,6,11,14	63,06% ± 0,85	64,26% ± 0,23	59,27% ± 2,87	60,35% ± 2,36
C20:5cΔ5,8,11,14,17	63,82% ± 0,76	65,16% ± 0,59	60,24% ± 3,68	61,84% ± 3,95
C22:5cΔ7,10,13,16,19	51,07% ± 1,12	52,46% ± 0,52	49,25% ± 2,84	52,65% ± 3,21
C22:6cΔ4,7,10,13,16,19	60,69% ±0,96	61,08% ± 1,40	56,71% ± 3,69	58,76% ± 3,62

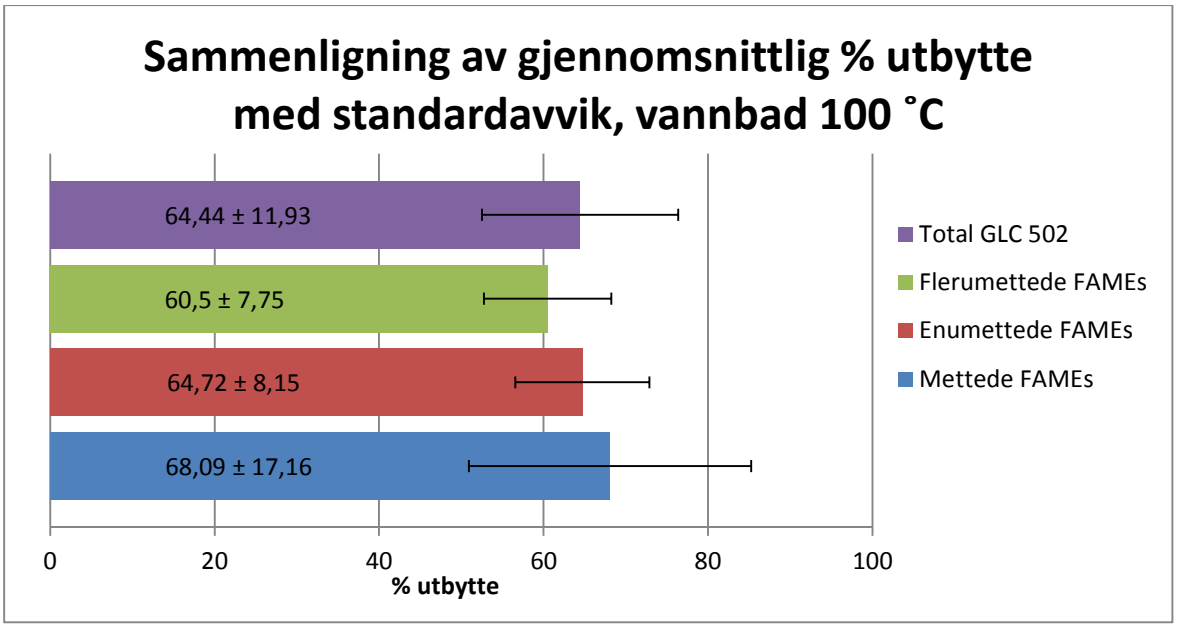
Figur 3.18 viser optimaliseringskurven for flerumettede FAMEs derivatisert på kokende vannbad.



FIGUR 3.18: OPTIMALISERINGSKURVE FOR FLERUMETTEDE FAMES I REFERANSESTANDARD GLC 502.

Igjen er utbyttene lavere enn forventningene tilsier, og de individuelle utbyttene er fortsatt noe spredt. Som i de øvrige metodene har C18:2cΔ9,12 det høyeste utbyttet, det maksimale på 76,43 ± 1,25. Den med det laveste utbyttet er C20:3cΔ11,14,17 (48,11% ± 1,38), dette var også tilfelle ved derivatiseing på 70 ˚C vannbad. Den hadde derimot høyere utbytte ved begge mikrobølgemetodene (58,33% ± 1,31 ved 70W, 61,62% ± 1,57 ved 70 ˚C). Ellers er både standardavvikene og RSD til de ulike FAMEs lave, så presisjonen i metoden er god.

Figur 3.19 viser gjennomsnittlig totalutbytte for mettede, enumettede og flerumettede FAMEs og det totale gjennomsnittlige utbyttet av alle FAMEs i referansestandard GLC 502 derivatisert på kokende vannbad.



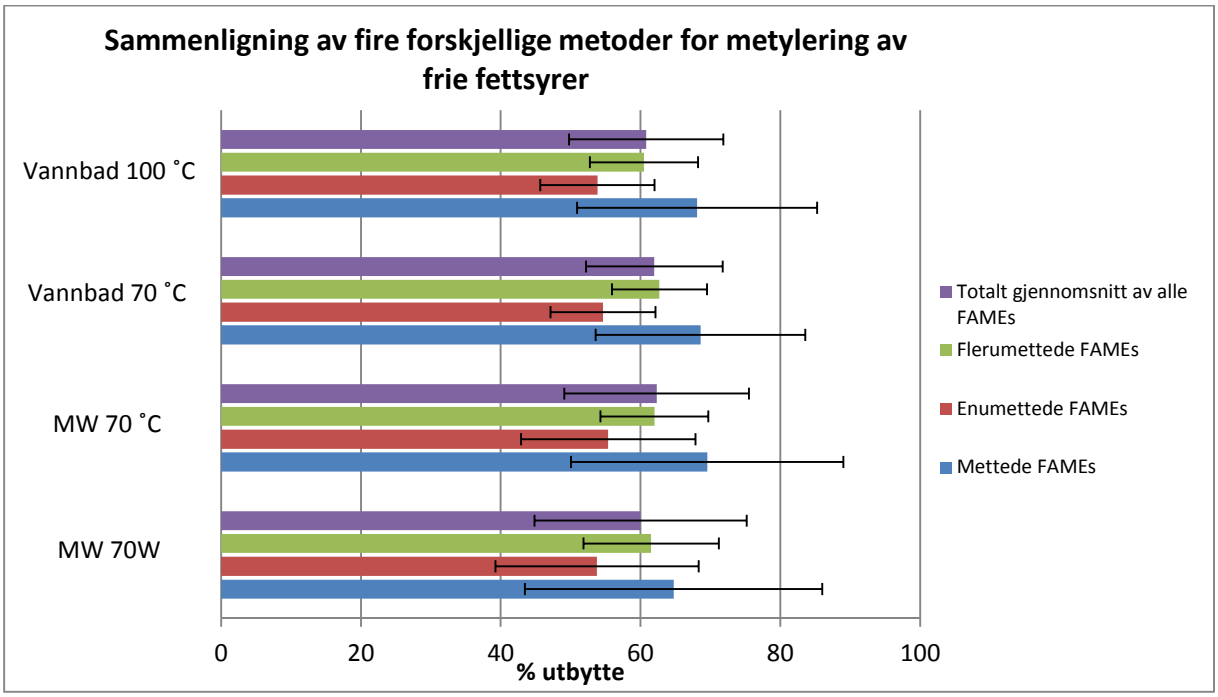
FIGUR 3.19: SAMMENLIGNING AV TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE FOR METTEDE, ENUMETTEDE OG FLERUMETTEDE FAMES OG TOTALT GJENNOMSNITTLIG UTBYTTE AV REFERANSESTANDARD GLC 502

Den samme trenden som er observert i øvrige metoder sees også her. De mettede FAMEs har det høyeste gjennomsnittsutbyttet (67,09%), men også er høyt standardavvik (± 17,16) og RSD (25,20%). Det sees en liten økning i standardavvik og RSD sammenlignet med tilsvarende metode ved 70 ˚C vannbad. Ved denne metoden sank utbyttene til C22:0 og C24:0 ned sammenlignet 70 ˚C vannbad, og dette førte til en økning i standardavvik og RSD for de mettede FAMEs i denne metoden. For enumettede og flerumettede er gjennomsnittsutbyttene henholdsvis 64,72% ± 8,15 og 60,50% ± 7,75, og RSD på henholdsvis 12,60% og 12,61%. Gjennomsnittlig utbyttet totalt for referansestandarden ligger på 64,44% ± 11,93, med et RSD

på 18,51. Både standardavviket og RSD er noe høyt, så presisjonen totalt kan ikke ansees som veldig god.

3.2.5 Sammenligning av metoder for metylering av GLC 502.

Figur 3.20 viser en sammenligning mellom alle metodene, da med hensyn på mettede, enumettede og flerumettede FAMEs, og totalt gjennomsnittlig utbytte referansestandard.



FIGUR 3.20: SAMMENLIGNING AV FIRE FORSKJELLIGE METODER FOR METYLERING AV FFA I REFERANSESTANDARD GLC 502

Spesielt mettede FAMEs hadde spredte resultater, da spesielt med tanke på C22:0 og C24:0 som ofte lå under 50%. Derav er standardavvikene betydelig høyere for disse sammenlignet med de enumettede og flerumettede FAMEs.

Fra resultatene presentert i avsnitt 3.1, og forventningene til resultatene, svarte ingen av metodene godt. Generelt er det store sprik mellom de forskjellige FAMEs i standarden, da spesielt med tanke på C22:0, C24:0, C22:1cΔ13 og C24:1cΔ15. Lavere utbytter av disse var vedvarende uavhengig av metode, og med lave standardavvik og RSD (se vedlegg 2), kan det konkluderes med at presisjonen er god, men nøyaktigheten dårlig.

Flere enkeltresultater så også ut til å være avvik, og disse ble ikke tatt med i beregningene av gjennomsnittlig utbytte, standardavvik og RSD. Da det bare ble kjørt 3 parallelle derivatiseringer og kun 1 injeksjon av hver vial, kan ikke presisjonen for disse utbyttene

gjøres helt rede for. Om flere parallelle derivatiseringer og/eller flere injeksjonsreplikater hadde blitt utført, kunne presisjonen i metoden økt betraktelig.

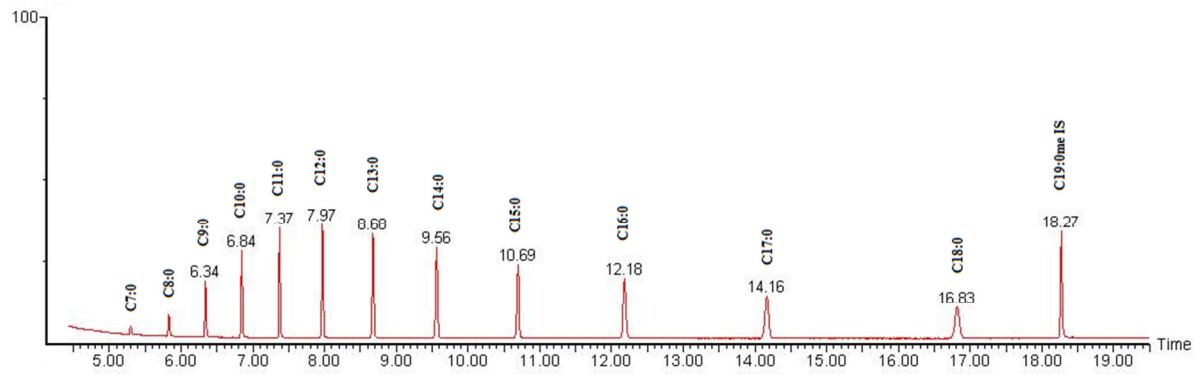
Generelt i hele metoden ble de observerte utbyttene lavere enn forventet. De mest tydelige så ut til å være vedvarende uansett metode brukt for derivatisering, og årsakene kan være mange. Først og fremst kan det ligge i operatøren, men da de samme resultatene viste seg over alle metoder, vil dette være lite sannsynlig. En annen mulighet er veieprosessen av standarden. Da denne standarden kom i en ampulle, og kun andel wt% ble oppgitt, kan feil ha skjedd underveis. En sannsynlig forklaring er at den beregnede vekten er høyere en den faktiske, og dette vil gi lavere utbytter av samtlige FAMEs. Men da utbyttene av C22:0, C22:1cΔ13, C24:0 og C24:1cΔ15 var såpass mye lavere enn de øvrige FAMEs konsekvent gjennom alle metodene, er det sannsynlig at det også er en annen feil. Det er lite sannsynlig at det er et avdampningsproblem, da dette er lang-kjedede fettsyrer, og disse har høye smelte- og/eller kokepunkt. En mulighet kan da være at wt% oppgitt med standarden ikke stemte. Om tilfellet er at det er mindre av C22:0, C22:1cΔ13, C24:0 og C24:1cΔ15 i standarden i forhold til det som var oppgitt, vil dette også føre til at de øvrige har oppgitt feil mengdeforhold, og beregningene blir feil. Om dette er tilfellet kan ingen endelig konklusjon dras ut av denne metodeutviklingen, da man er avhengig av å vite nøyaktig hvor mye man har av hver FFA før analysen for nøyaktige resultater. Presisjonen har jevnt over vist seg å være god, så med mer nøyaktige andeler av hver FFA, burde resultater med god nøyaktighet og presisjon kunne produseres.

Alle metodene har høye standardavvik og RSD, da muligens på grunn av feil vekt og wt% i standarden. Men med alle sammenlignet ser det ut til at 70 ˚C på vannbad er den mest stabile metoden, og den med best presisjon. Ved å bruke lukkede systemer under metyleringen, eliminerer man muligheten for at vann kommer i kontakt med reaksjonen, og man sparer seg for "tørke trinn" med $MgSO_4$. Dette sparer man noe tid på, så en metode på vannbad i 2-3 minutter vil ikke nødvendigvis ta så mye lengre tid enn 20-30 sekunder med mikrobølger.

3.3 Metodeutvikling del III

Det ble observert store sprik og avvik ved derivatisering av C10:0 og C12:0 i del I av metodeutviklingen, så et eget forsøk på korte FFA ble prøvd. Det var på forhånd forventet at dette kunne være problematisk, da tap kan skje i mye større grad enn om man kun har lengere FFA eller FAMEs.

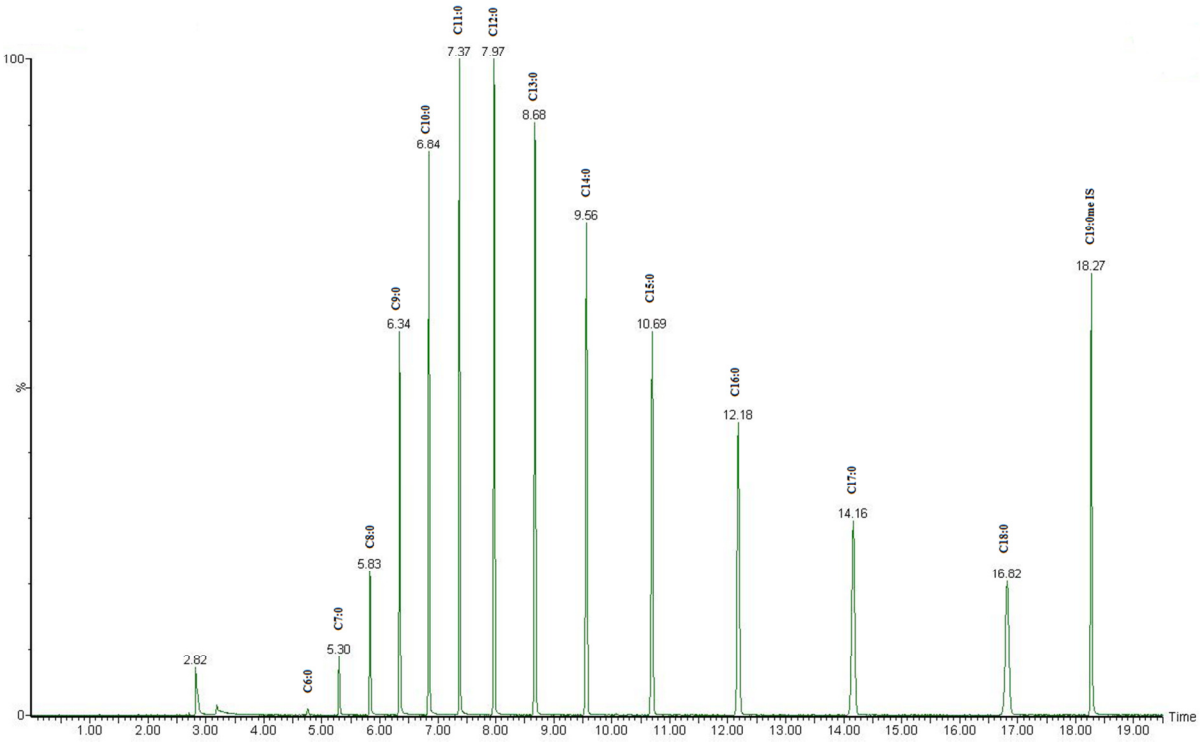
Figur 3.21 viser TIC av GLC 412. Kromatogrammet er beskjært. For original, se vedlegg.



FIGUR 3.21: TIC AV REFERANSESTANDARD GLC412.

Standarden skal inneholde alle partalls og oddetalls mettede fettsyrer fra C4:0-C18:0 + internstandard C19:0me. TIC viser imidlertid ikke fettsyrer lenger ned enn til C7:0, så noe har gått tapt.

Felles for alle FAMEs i deres respektive MS-spekter, er at "base peak" er ion ved *m/z* 74, som er McLafferty omleiringen om esteren. Dette ionet ble valgt ut for å få frem et SIM (Single Ion Montoring) kromatogram (Figur 3.22).



FIGUR 3.22: SIM AV REFERANSESTANDARD GLC 412.

Ved SIM av *m/z* 74 gir mer intense og skarpe topper, og toppen til C7:0 kommer litt tydeligere frem. I tillegg sees så vidt en topp like til venstre for C7:0, dette er C6:0. Denne vises ikke i TIC, da andelen er for lav til at den vises i TIC. C4:0 og C5:0 ble ikke funnet i noen av kromatogrammene, så det er sannsynlig at alt har gått tapt enten ved avdampning av løsningsmiddel før metylering, under oppvarming, og/eller avdampning etter metylering.

Tabell 3.13 viser de beregnede utbyttene til referansestandard GLC 412.

TABELL 3.13: GJENNOMSNITTLIG BEREGNET UTBYTTE AV FAMES I REFERANSESTANDARD GLC412 DERIVATISERT MED MIKROBØLGER VED 70W

FAME\Tid	10s	20s	30s	1min	3min	5min
C4:0	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d
C5:0	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d
C6:0	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d
C7:0	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d
C8:0	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d
C9:0	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d
C10:0	10,11% ± 7,74	5,760% ± 0	56,00% 20,73	61,20% ± 36,86	12,74% ± 6,77	14,57% ± 18,97
C11:0	30,32% ±23,81	11,58% ± 10,13	53,44% ± 39,50	81,53% ± 23,33	42,35% ± 19,98	34,97% ±25,25
C12:0	46,32% ± 41,09	28,13% ± 25,68	82,41% ± 56,19	121,27% ± 16,83	94,32% ± 22,39	86,53% ±24,61
C13:0	68,97% ± 32,20	52,25% ± 25,11	87,94% ± 41,24	115,86% ± 9,20	105,67% ± 9,81	105,42% ± 12,05
C14:0	97,32% ± 17,85	86,77% ± 15,63	110,98% ± 29,09	126,97% ± 7,21	125,49% ± 8,08	125,55% ±7,99
C15:0	105,46% ± 6,63	99,72% ± 5,51	113,28% ± 14,84	118,25% ± 4,87	120,64% ± 3,36	120,76% ± 4,90
C16:0	109,85% ±3,23	107,10% ± 1,21	114,62% ± 8,02	117,32% ± 4,63	120,09% ± 2,37	124,32% ± 3,67
C17:0	110,94% ± 1,78	109,02% ± 0,57	112,18% ± 5,23	112,16% ±2,17	114,27% ± 0,74	114,63% ± 2,76
C18:0	106,73% ± 0,75	106,44% ± 0,39	109,63% ± 2,61	108,36% ± 2,13	109,27% ± 1,21	109,52% ± 0,46

i.d = ikke detektert

Som forventet er dette ikke en egnet metode for derivatisering av korte og middels korte FFA. Da det har skjedd totalt tap av C4:0 og C5:0, og tilnærmet totalt av C6:0, vil de oppgitte wt%

i avsnitt 2.1 heller ikke stemme, derav får man mange utbytter godt over 100%. C15:0-C18:0 har lave RSD (se vedlegg X), så reproduserbarheten i disse er god. Fra C14:0 og nedover er det større sprik mellom parallellene, og en da en kraftig økning i RSD for disse. Det ble valgt å definere alle kortere enn C10:0 som "ikke detektert", da flertallet av parallellene ikke viste noe signal på disse, eller at det ble vanskelig å skille signalene fra støy.

4 Konklusjon

Del I av metodeutviklingen viste seg å være veldig vellykket, med gode utbytter etter kort tid og lave RSD. Det ble observert at den optimale effekten var 70W, og den ble brukt videre i del II og 3. Noe problemer oppstod med de korte FA, og dette har mest sannsynlig med den økende flyktigheten til FAMEs med avtagende kjedelengde.

I del II av metodeutviklingen ble 4 forskjellige metoder utført på en referansestandard. Utbyttene viste seg tidlig å ikke stemme overens med forventningene fra del I, og dette så ut til å være et vedvarende problem, spesielt på FAMEs C22:0, C22:1cΔ13, C24:0 og C24:1cΔ15. Da dette var et resultat som gikk igjen i 4 forskjellige metoder, kan det antas at den oppgitte mengden av de ulike FFA fra leverandør ikke var nøyaktige, og disse vil da påvirke alle resultatene. Det er også sannsynlig at beregnet vekt fra operatørens side var for høy, og dette vil da resultere i lavere utbytter. For å oppnå en metode med god nøyaktighet og presisjon er man avhengig av nøyaktige mengder så beregningene blir riktige. Fra sammenligning av alle metoder for metylering av referansestandard GLC 502, ble det observert at 70 ˚C vannbad var den mest pålitelige. De høye standardavvikene og RSD påvirkes nok i stor grad av unøyaktig veiing og mulig feil mengdesammensetning, men alt lagt sammen så var dette generelt den beste metoden. Å kjøre metyleringene i lukkede systemer er og en fordel da vann tilstede i reaksjonen kan føre til at den ikke går fullstendig, og derav får man dårligere utbytter.

Syrekatalysert metylering av korte og middels korte FFA viste seg å være en dårlig og upresis metode. Dette var til en viss grad forventet, da problemene med middels korte FFA oppstod allerede i del I. Det er sannsynligvis flyktigheten i kombinasjon med avdampning ved romtemperatur og hurtig oppvarming som fører til det store tapet, spesielt av de korteste. Det skal merkes at dette nødvendigvis ikke er et problem om de korte og middelskorte er

esterbundet til glyserol. Da kan transesterifisering gjøres med en basisk katalysator, og denne reaksjonen kan gå i romtemperatur.

5 Videre arbeid

I denne metoden er det kun brukt en type reagens, og den er veldig effektiv men også veldig kostbar. Mildere reagenser som HCl-metanol er noe som kan benyttes, og H_2SO_4-metanol er prøvd ut med med mikrobølger tidligere, og det viste betydelig reduserte reaksjonstider for for samme utbytte. Det er sagt atBCl_3- metanol kan virke på tilnærmet samme måte som BF_3-metanol, og dette gir mulighet for god sammenligning mellom veldig like syrekatalyserte derivatiseringer.

Det ble ikke oppnådd noen vellykket total derivatisering av de korte og middels korte FFA, og metoder burde utvikles på dette. En mulighet for å redusere tapet kan være å endre på avdampningsmetodene, det det sannsynligvis tapes mest. En annen mulighet er å konvertere de korte FFA til propyl eller butyl estere, da disse vil være mindre flyktige enn metylestere.

6. Referanser

Ahuja, S. (2003). *Chromatography and Separation Science*, b. 4. San Diego, California: Academic Press. 250 s.

Akoh, C. C. & Min, D. B. (2002). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2. utg. New York: Marcel Dekker.

Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. 1. utg. Ayr: The Oily Press.

Christie, W. W. & Han, X. (2010). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*. 4. utg., b. 24. Bridgewater: P.J. Barnes & Associates. 428 s.

Christie, W. W. (2011). *Preparation of Ester Derivates of Fatty Acids for Chromatographic Analysis*. Tilgjengelig fra: http://lipidlibrary.aocs.org/topics/ester_93/index.htm#B (lest 08.03.2011).

Devle, H., Rukke, E. O., Naess-Andresen, C. F. & Ekeberg, D. (2009). A GC-Magnetic Sector MS method for Identification and Quantification of Fatty Acids in Ewe Milk by Different Acquisition Modes. *Journal of Separation Science*, 32 (21): 3738-3745.

Devle, H. (2010). Figurer fra presentasjon, "Sector Instruments". *KJM313 Massespektrometri*.

Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3. utg. Chichester: Wiley. 539 s.

Dodds, E. D., McCoy, M. R., Rea, L. D. & Kennish, J. M. (2005). Gas Chromatographic quantification of Fatty Acid Methyl Esters: Flame Ionization Detection vs. Electron Impact Mass Spectrometry. *Lipids*, 40 (4): 419-428.

Downard, K. (2004). *Mass Spectrometry: a Foundation Course*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 210 s.

Eder, K. (1995). Gas-Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 671 (1-2): 113-131.

Ekeberg, D. (2010). Figurer fra presentasjon, "Introduksjon til massespektrometri". *KJM313 Massespektrometri*.

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., et al. (2005). A Comprehensive Classification System for Lipids. *Journal of lipid research*, 46 (5): 839-61.

Figur Elektromagnetisk Spektrum. (Tilgjengelig 09.03.2011). *http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRfaWJvRyNywk9fv0ZEd8pqov5s8C0t5UqnDA2TYZkW3ZeSfBRd*.

Fulk, W. K. & Shorb, M. S. (1970). Production of an Artifact during Methanolysis of Lipids by Boron Trifluoride-Methanol. *Journal of lipid research*, 11 (3): 276-277.

Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L. & Rousell, J. (1986). The use of Microwave-ovens for Rapid Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters*, 27 (3): 279-282.

Hamilton, R. J. & Hamilton, S. (1993). *Lipid Analysis: A Practical Approach*. Oxford ; New York: IRL Press. 310 s. s.

Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J. & Hadad, C. M. (2007). *Organic Chemistry: A Short Course*. 12. utg. Boston: Houghton Mifflin. 577 s.

IUPAC-IUB. (1977). Nomenclature of Lipids Recommendations (1976). *Lipids*, 12 (6): 455-468.

James, A. T. & Martin, A. J. P. (1952). Gas-Liquid Partition Chromatography - The Separation and Micro-Estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid. *Biochemical Journal*, 50 (5): 679-690.

James, A. T. & Martin, A. J. P. (1956). Gas-Liqiud Chromatography: Separation and Identification og the Methyl Esters of Saturated and Unsaturated Acids from Formic Acid to normal-Octadecanoic Acid. *Biochemical Journal*, 63 (1): 144-152.

Jie, M. & Yankit, C. (1988). The use of a Microwave-Oven in the Chemical Transformation og Long-Chain Fatty Acid Esters. *Lipids*, 23 (4): 367-369.

Kappe, C. O., Dallinger, D. & Murphree, S. S. (2009). *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols*. Weinheim: Wiley-VCH. 299 s.

Kramer, J. K. C., Fellner, V., Dugan, M. E. R., Sauer, F. D., Mossoba, M. M. & Yurawecz, M. P. (1997). Evaluating Acid and Base Catalysts in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total Trans Fatty Acids. *Lipids*, 32 (11): 1219-1228.

Lidstrom, P., Tierney, J., Wathey, B. & Westman, J. (2001). Microwave Assisted Organic Synthesis - a Review *Tetrahedron*, 57 (51): 9225-9283.

Lough, A. K. (1964). Production og Methoxy-Substituted Fatty Acids as Artifacts During Esterification of Unsaturated Fatty Acids with Methanol Containing Boron Trifluoride. *Biochemical Journal*, 90 (2): C4-&.

Loupy, A. (2006). *Microwaves in Organic Synthesis*. 2. utg., b. 1. Weinheim: Wiley-VCH. 523 s.

Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2005). *Biochemistry*. 3. utg. San Francisco, Calif.: Addison-Wesley. 1186 s.

Metcalfe, L. D. & Schmitz, A. A. (1961). Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry*, 33 (3): 363-364.

Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964). Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride-Methanol. *Journal of lipid research*, 5 (4): 600-608.

Oxford Dictionarys Online. (2011). *Lipid*. Tilgjengelig fra: http://www.oxforddictionaries.com/definition/lipid?view=uk (lest 09.03).

Schomburg, G., Behlau, H., Dielmann, R., Weeke, F. & Husmann, H. (1977). Sampling Techniques in Capillary Gas-Chromatography. *Journal of chromatography*, 142 (NOV): 87-102.

Vedlegg

Del I

Rådata del I.

%utbytte, 65W C10:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	35,40081	85,66805	105,3681	116,4686	1,483916	78,61454	18,28772	113,9127	123,1121
P2	0	54,89056	17,77882	43,10298	93,41126	87,51032	18,05369	12,11181	113,2604	26,29865
P3	0	80,23365	99,71731	75,76066	18,68405	68,52178	100,4707	87,52624	89,04709	79,72917
P4	0	53,65102	55,27761	110,6519	0,184942	94,51574	82,0442	0,329507	40,28036	21,72701
P5	0	56,15497	8,451486	11,33846	37,82802	33,73634	1,760977	83,04415	93,36651	17,89545
Snitt	0	56,0662	53,37865	69,24443	37,52707	57,15362	56,18882	40,25989	89,97342	53,75247
Std. Avvik	0	14,27128	35,998	37,67875	34,9021	34,91182	38,85609	37,24011	26,82217	41,35363
RSD		25,45434	67,43895	54,41412	93,00514	61,08419	69,1527	92,49928	29,81122	76,93345

%utbytte, 65W C12:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	99,85259	114,5694	122,4172	845,4229	40,94044	97,0876	116,1187	127,6223	157,859
P2	0	99,29035	81,38189	102,2235	143,8313	136,8605	101,848	125,9457	162,3907	101,1296
P3	0	109,4093	124,5476	114,03	94,00721	114,409	123,271	109,6411	118,5634	120,2921
P4	0	104,1567	106,0581	119,5932	17,57353	118,1632	116,2789	21,3777	105,1175	90,13689
P5	0	106,2335	78,37121	77,20865	84,43044	94,63291	39,97782	102,9251	103,0231	93,1712
Snitt	0	103,7885	100,9856	107,0945	89,21883	109,0684	109,6213	113,6576	113,5816	94,81256
Std. Avvik	0	3,832289	18,2271	16,46813	4,788382	10,32184	10,58484	8,490793	10,06333	4,635396
RSD		3,692403	18,04919	15,37719	5,367009	9,463641	9,65582	7,470499	8,86	4,889011

%utbytte, 65W C14:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	110,3754	117,5517	120,5019	1210,536	87,37325	100,9381	155,5872	121,5792	144,5384
P2	0	102,9991	108,921	113,2828	131,0167	127,7963	127,463	153,9316	147,5727	119,3581
P3	0	106,4714	117,9076	112,4103	115,1973	115,7982	118,3044	112,4182	118,2258	119,333
P4	0	107,6219	113,3229	113,4015	87,43343	114,4444	115,2277	92,29096	116,7563	113,3609
P5	0	108,6736	109,1394	108,8227	109,0074	113,2434	89,04056	106,2156	104,2087	107,5369
Snitt	0	107,2283	113,3685	113,6838	110,6637	114,4953	110,1948	103,6416	115,1925	114,8972
Std. Avvik	0	2,474155	3,892846	3,794186	15,62999	1,04362	13,5829	8,416072	6,577993	4,901818
RSD	0	2,307372	3,433798	3,33749	14,12386	0,911496	12,32626	8,120363	5,710436	4,266263

%utbytte, 65W C15:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	101,1535	106,3358	108,914	995,0696	90,21377	95,94314	139,5759	108,5051	123,6923
P2	0	94,79859	102,6229	103,7718	114,7552	114,3193	114,9123	133,8113	127,7583	109,852
P3	0	97,42298	107,0126	103,8531	106,1062	105,5932	107,5031	103,81	107,1801	108,4867
P4	0	97,25997	105,1145	104,1231	96,04596	104,3028	105,4007	96,50065	107,3998	105,1067
P5	0	98,86494	102,3792	102,7747	104,7957	105,5958	93,52443	99,77396	98,49969	100,451
Snitt	0	97,89999	104,693	104,6873	105,4258	104,005	103,4567	114,6944	105,3962	105,9741
Std. Avvik	0	2,086719	1,891878	2,162211	6,630984	7,76821	7,829266	18,20247	4,013214	3,62658
RSD		2,131481	1,807072	2,065398	6,289718	7,469074	7,567671	15,87041	3,807743	3,422138

%utbytte, 65W C16:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	98,71994	104,4985	105,7233	701,9993	95,22614	95,79332	127,1088	104,1911	115,3517
P2	0	93,93621	101,7851	102,8169	109,9766	107,8844	111,9333	122,4621	117,557	108,2854
P3	0	92,36364	105,2302	101,6573	104,7431	104,2869	104,0304	102,7272	105,569	105,1778
P4	0	94,47402	102,0085	101,1166	99,9786	102,285	102,9705	99,07964	105,302	105,4446
P5	0	97,20703	101,825	102,4049	105,9123	104,5905	98,4383	98,38888	96,67178	99,96041
Snitt	0	95,34017	103,0695	102,7438	105,1527	102,8546	100,3081	100,0653	102,9335	104,7171
Std. Avvik	0	2,301697	1,485604	1,601623	3,563205	4,216198	3,347506	1,903315	3,651933	3,004194
RSD		2,414194	1,441361	1,558852	3,388602	4,099183	3,337223	1,902073	3,547858	2,868867

%utbytte, 65W C18:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	91,02052	96,61183	96,50841	351,6801	94,69123	94,85214	102,727	96,62906	99,21059
P2	0	88,47322	95,92093	94,8622	97,41678	96,27001	101,4886	103,5882	97,69044	95,35942
P3	0	83,46833	97,62464	96,26923	95,98988	96,51443	95,99118	96,32589	97,10602	96,9064
P4	0	86,72565	94,50748	95,07124	95,76359	95,29774	96,58168	94,81873	96,35533	96,95907
P5	0	89,13472	97,22288	96,47678	96,69158	96,21468	95,64045	94,75842	95,59187	94,96093
Snitt	0	87,76449	96,37755	95,83757	96,46546	95,79762	96,91082	98,44365	96,67454	96,67928
Std. Avvik	0	2,550205	1,098214	0,718826	0,647096	0,690638	2,356373	3,899221	0,706311	1,49881
RSD		2,905737	1,139492	0,750046	0,670806	0,720934	2,431486	3,960865	0,730607	1,550291

%utbytte, 70W C10:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	2,409428	11,37684	79,917	78,66564	78,15199	55,82408	60,07741	45,4814	18,82402
P2	0	1,136828	28,60608	8,559492	2,230944	80,53692	67,68359	94,2927	33,38667	23,77827
P3	0	66,0076	87,11069	8,62776	26,80541	33,04012	3,078381	44,94521	53,04389	3,795431
P4	0	0	67,23277	53,21898	71,69536	72,14903	34,39009	78,50976	35,47738	15,50039
P5	0	66,27234	74,25083	1,6364	33,52888	37,4458	48,40936	86,08678	48,31886	16,8549
Snitt	0	33,95655	50,33611	24,68516	35,30772	57,29371	43,74885	71,35053	45,0577	15,81316
Std. Avvik	0	32,1867	31,28219	32,01437	27,61085	22,12177	24,46677	19,79788	7,259595	7,382739
RSD		94,78791	62,14662	129,6907	78,20061	38,61117	55,9255	27,74735	16,11177	46,68732

%utbytte, 70W C12:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	53,62789	67,25866	93,45788	93,39297	93,3003	89,32572	93,39651	87,7934	78,93481
P2	0	45,93742	77,59044	71,99675	39,13165	95,81372	96,03542	101,6555	85,95195	82,7287
P3	0	87,39176	95,78493	68,3399	74,90962	79,29913	41,98706	93,34401	94,37069	61,99842
P4	0	18,04277	92,82614	97,73279	93,10404	94,10433	83,13214	97,47585	85,15899	14,4795
P5	0	89,32594	94,44703	33,97923	80,15513	86,37783	88,84393	98,43491	87,63348	80,23213
Snitt	0	58,86515	85,58144	73,10131	76,13868	89,77906	79,86486	96,86136	88,1817	63,67471
Std. Avvik	0	26,84268	11,26744	22,69594	19,86301	6,146895	19,37535	3,169063	3,251567	25,66341
RSD		45,6003	13,16575	31,04724	26,08794	6,846691	24,26017	3,271751	3,687349	40,30392

%utbytte, 70W C14:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	86,46511	92,14664	96,43259	97,64864	95,769	96,8326	100,7232	98,10488	95,99141
P2	0	85,16275	94,54557	93,38788	80,15745	97,38255	99,24595	102,4298	99,95302	97,78172
P3	0	91,30423	98,49381	95,2665	94,51233	94,63204	85,84216	102,0603	101,7454	92,65485
P4	0	69,19931	96,9634	101,5029	95,70077	97,89605	94,46971	101,2839	98,07269	66,10201
P5	0	91,30023	97,44458	80,22641	96,29757	97,74957	96,31735	102,4559	99,51111	104,0289
Snitt	0	84,68633	95,9188	93,36326	92,86335	96,68584	94,54155	101,7906	99,47742	91,31177
Std. Avvik	0	8,133622	2,287565	7,097526	6,432772	1,275949	4,609085	0,681178	1,358544	13,13636
		9,60441	2,384898	7,602055	6,927138	1,319685	4,875195	0,669195	1,365681	14,38627

%utbytte, 70W C15:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	85,01596	88,26667	91,47577	90,84579	89,85319	91,11583	94,57075	91,35407	90,58921
P2	0	85,63871	90,84244	90,04287	83,78211	90,95808	92,6595	96,7655	94,38979	93,57298
P3	0	84,84437	91,83302	92,08325	90,77379	89,7096	86,9684	95,45467	95,43602	89,9068
P4	0	77,18131	90,81177	95,32255	89,81387	91,18667	89,15921	92,94727	92,36068	78,81995
P5	0	85,72941	91,02056	84,31091	90,63095	91,62208	91,81977	95,86632	94,44172	98,38737
Snitt	0	83,68195	90,55489	90,64707	89,1693	90,66592	90,34454	95,1209	93,59646	90,25526
Std. Avvik	0	3,268336	1,202919	3,60892	2,718773	0,754434	2,046146	1,29608	1,502216	6,451942
RSD		3,905664	1,328386	3,981286	3,049002	0,832103	2,264825	1,362561	1,604992	7,14855

%utbytte, 70W C16:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	86,8714	89,40529	92,11096	91,68928	91,48561	92,69542	96,77217	92,57581	92,76188
P2	0	88,19287	92,92535	91,47525	88,82977	91,26375	94,79241	96,07044	94,9376	93,72043
P3	0	84,7633	92,61619	93,43984	93,27943	91,39382	90,97475	96,71425	94,61379	92,24914
P4	0	82,98405	91,85305	94,64858	90,92822	92,67373	91,23212	94,90387	93,16096	87,95827
P5	0	85,03457	92,17226	88,97637	91,87569	92,99531	92,80997	96,52421	94,83333	98,56425
Snitt	0	85,56924	91,79443	92,1302	91,32048	91,96245	92,50093	96,19699	94,0243	93,05079
Std. Avvik	0	1,799869	1,249676	1,920069	1,458717	0,722718	1,365527	0,6919	0,967433	3,391358
RSD		2,103407	1,361385	2,084082	1,597361	0,785883	1,47623	0,719253	1,028918	3,64463

%utbytte, 70W C18:0										
Paraleller/Tid (min)	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	85,33612	90,25512	90,38819	90,93454	91,47336	91,83483	92,89819	91,38407	90,48284
P2	0	85,64577	93,34928	89,7601	90,12802	89,95014	92,41228	92,279	93,28087	92,65336
P3	0	83,47732	91,81561	91,10933	92,99049	90,19087	92,31074	93,47181	93,37386	91,551
P4	0	84,14609	92,53617	92,83923	91,12331	90,68122	91,96893	92,25253	91,90061	90,66865
P5	0	84,92108	91,08258	90,84897	91,61629	91,64625	91,89161	92,51672	91,20615	93,14648
Snitt	0	84,70528	91,80775	90,98916	91,35853	90,78837	92,08368	92,68365	92,22911	91,70047
Std. Avvik	0	0,793677	1,081063	1,032338	0,946464	0,674729	0,233033	0,457099	0,925753	1,055325
RSD		0,936987	1,177529	1,134573	1,035989	0,743189	0,253066	0,493182	1,003753	1,150839

%utbytte, 75W C10:0										
Paraleller/Tid	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	37,37127	3,788254	22,95509	45,64585	78,40867	92,36863	3,264432	4,948106	94,2264
P2	0	28,81835	21,6868	56,14803	44,00396	46,54559	58,06731	54,14607	42,61708	0
P3	0	35,69157	31,39501	0,265362	78,28296	6,468135	0	0	8,359434	1,254926
P4	0	39,9266	0,416609	17,94381	20,93958	26,69682	74,81746	95,89649	54,20822	0,587857
P5	0	55,63097	76,33675	0	26,84332	0	77,68864	106,4855	61,83431	88,18947
Snitt	0	39,48775	43,13952	32,34898	43,14314	39,5298	75,73551	64,94813	52,88653	46,06466
Std. Avvik	0	8,871561	27,30108	20,21242	20,00247	26,545	12,18076	38,39521	23,48639	45,19431
		22,46661	63,28554	62,48241	46,36304	67,15185	16,08328	59,11673	44,40901	98,1106

%utbytte, 75W C12:0										
Paraleller/Tid	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	56,92183	62,40567	85,10547	100,6131	103,3461	112,1825	44,77646	43,66316	122,2651
P2	0	79,77175	87,28637	89,75881	101,7498	100,2661	104,1118	107,4803	98,56324	85,71824
P3	0	76,96971	89,14336	37,96249	104,5348	58,26979	42,03868	3,403095	87,18329	69,2727
P4	0	87,57034	41,16258	83,15287	80,9649	86,86714	104,0351	115,9045	112,5858	52,83736
P5	0	93,33306	94,84941	0	76,88355	53,07796	102,9155	118,7218	105,268	110,0465
Snitt	0	84,41121	90,42638	86,00571	102,2993	96,82642	103,6875	114,0356	105,4723	88,02799
Std. Avvik	0	6,451355	3,218126	2,770975	1,64749	7,153649	0,546752	4,775814	24,37252	25,5048
RSD		7,64277	3,558836	3,22185	1,610461	7,388116	0,527308	4,188004	23,10797	28,97351

%utbytte, 75W C14:0										
Paraleller/Tid	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	85,53358	88,67545	99,22646	104,776	106,5148	108,7002	87,52744	92,05602	117,9087
P2	0	97,35273	102,7117	98,75205	108,5363	105,2785	109,3587	113,7833	111,6612	110,2912
P3	0	92,10068	102,2962	88,14804	105,2907	94,3846	90,98606	71,627	111,3079	113,8874
P4	0	100,8003	89,50082	97,57368	101,1541	103,1922	104,3643	113,9636	117,0218	104,2544
P5	0	99,38243	97,61873	0	96,95914	94,75374	103,5894	113,4333	111,992	108,4053
Snitt	0	95,03394	96,16058	95,92506	103,3432	100,8248	103,3997	113,7267	106,7543	110,9494
Std. Avvik	0	5,592813	6,050931	4,530206	3,958844	5,218258	6,61317	0,220182	8,489497	4,664593
RSD		5,885069	6,292528	4,722652	3,830772	5,17557	6,395732	0,193606	7,952371	4,204252

%utbytte, 75W C15:0										
Paraleller/Tid	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	83,17601	86,29046	93,84088	96,34956	95,78727	97,90167	93,66469	95,51508	108,7163
P2	0	90,5513	95,37592	91,25109	98,34222	97,36323	99,48622	104,1432	102,3185	102,3343
P3	0	87,72195	95,15032	87,70243	96,71238	92,36331	92,18175	88,02925	104,9613	107,9396
P4	0	92,55772	88,94557	92,6096	94,26362	94,77965	95,62862	101,9173	108,3559	101,395
P5	0	92,75785	92,31949	0	91,62133	91,40076	95,24089	102,2559	102,7641	98,93943
Snitt	0	89,35297	91,61635	91,351	95,45782	94,33884	96,08783	98,00207	102,783	103,8649
Std. Avvik	0	3,580913	3,53881	2,297042	2,316619	2,189715	2,490973	6,1548	4,21524	3,816869
RSD		4,007604	3,86264	2,514523	2,426851	2,321118	2,592392	6,280275	4,101107	3,674839

%utbytte, 75W C18:0										
Paraleller/Tid	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	87,68033	94,33457	93,37415	92,60971	92,40021	93,57431	95,1653	96,29206	96,85148
P2	0	88,17294	94,04844	91,72412	94,27736	93,94078	94,27536	95,94845	95,48057	95,79687
P3	0	87,11336	93,3332	93,79614	92,2808	93,39175	92,69775	96,08534	97,29765	98,06266
P4	0	90,34183	91,96736	91,90576	93,56846	92,01917	92,13659	95,10966	97,57682	97,23527
P5	0	91,24041	91,80886	0	91,41555	92,72561	93,91413	94,71633	95,96126	94,91103
Snitt	0	88,90977	93,09848	92,70004	92,83038	92,8955	93,31963	95,40502	96,52167	96,57146
Std. Avvik	0	1,597763	1,04192	0,899884	0,999099	0,690073	0,78969	0,524812	0,795758	1,104511
RSD		1,797061	1,119158	0,970748	1,076263	0,742849	0,846221	0,550088	0,824434	1,143724

%utbytte, 75W C16:0										
Paraleller/Tid	0	0,167	0,33	0,5	1	3	5	10	15	20
P1	0	87,94915	90,34947	94,45903	94,43284	94,90759	96,98628	98,33714	99,71692	104,892
P2	0	91,54765	96,55819	91,58864	96,07461	96,04586	97,94485	102,1493	101,7213	101,0438
P3	0	86,96046	95,22004	92,41496	93,94318	93,90325	93,17024	95,76648	102,5997	106,1858
P4	0	92,69711	93,06482	92,82302	94,19393	94,56481	93,95145	100,8715	104,3988	102,0191
P5	0	91,93543	92,50909	0	92,53659	93,50165	95,08206	99,71925	102,774	98,02698
Snitt	0	90,21796	93,54032	92,82141	94,23623	94,58463	95,42698	99,36873	102,2421	102,4335
Std. Avvik	0	2,307498	2,163335	1,044834	1,130906	0,88057	1,797783	2,197865	1,53034	2,885977
RSD		2,557693	2,312729	1,125639	1,200076	0,930986	1,883936	2,211828	1,496781	2,817414

Del I

Mikrobølger, 70W

% utbytte, C14:0							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	87,68314	81,08378	73,02773	85,05231	98,9614	94,99729
P2	0	95,5823	91,86714	80,2802	80,71675	85,1203	88,14192
P3	0	77,69185	87,47675	90,7043	81,84475	79,2335	83,72606
Gj. Snitt	0	86,99	86,81	81,34	82,54	82,18	88,96
Std. Avvik	0	7,32	4,43	7,26	1,84	2,94	4,64
RSD		8,415599	5,10029	8,919691	2,225157	3,581787	5,213018

% utbytte, C16:0							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	67,62968	78,84375	80,48538	85,78981	88,73475	82,44189
P2	0	77,62639	83,64073	79,07574	80,86269	79,03772	81,06487
P3	0	73,40965	82,85093	77,57059	81,39768	77,78024	80,81064
Gj. Snitt	0	72,89	81,78	79,04	82,68	81,85	81,44
Std. Avvik	0	4,10	2,10	1,19	2,21	4,89	0,72
RSD		5,621921	2,567984	1,505706	2,669702	5,979912	0,879938

% utbytte, C18:0							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	79,34387	84,17781	85,99366	90,39902	89,9809	84,66892
P2	0	81,12815	89,89221	85,27022	87,78578	84,55615	84,11798
P3	0	79,26775	83,04931	81,97173	86,05885	85,30342	86,83761
Gj. Snitt	0	79,91	85,71	84,41	88,08	86,61	85,21
Std. Avvik	0	0,86	3,00	1,75	1,78	2,40	1,17
RSD		1,075696	3,494981	2,073806	2,025564	2,771604	1,377729

% utbytte, C20:0							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	64,47094	65,04506	67,87238	63,18966	64,18455	64,24427
P2	0	58,87523	68,48561	72,15674	68,82576	65,12478	66,25669
P3	0	58,29052	66,95891	67,24319	66,33558	70,03814	64,46793
Gj. Snitt	0	60,55	66,83	69,09	66,12	66,45	64,99
Std. Avvik	0	2,79	1,41	2,18	2,31	2,57	0,90
RSD		4,60134	2,106181	3,159803	3,487929	3,86259	1,385738

% utbytte, C22:0							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	44,79432	43,74865	45,05458	41,34822	36,50276	37,5945
P2	0	41,45266	44,16324	47,4841	43,93646	41,30068	43,57302
P3	0	44,09046	52,66495	45,89604	37,02701	44,34762	44,36175
Gj. Snitt	0	43,45	43,96	46,14	40,77	40,72	41,84
Std. Avvik	0	1,44	0,21	1,01	2,85	3,23	3,02
RSD		3,310721	0,471597	2,182986	6,990804	7,930671	7,220818

% utbytte, C24:0							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	32,62287	29,1392	28,83937	19,9912	17,33038	33,32972
P2	0	27,71136	29,71063	30,77161	28,17271	27,54083	27,67252
P3	0	40,35395	33,98327	35,82564	26,78581	30,15765	29,01936
Gj. Snitt	0	33,56	30,94	31,81	27,48	27,54	30,01
Std. Avvik	0	5,20	2,16	2,95	0,69	1,31	2,41
RSD		15,50508	6,984976	9,259075	2,52353	4,750813	8,040946

%utbytte, C14:1							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	90,93422	69,89853	62,36761	71,43528	87,20444	82,47473
P2	0	75,81025	79,89209	70,47067	66,28335	67,98495	74,45838
P3	0	70,17329	73,3804	81,24046	73,30785	63,74879	68,01248
Gj. Snitt	0	72,99	74,39	71,36	70,34	65,87	71,24
Std. Avvik	0	2,82	4,14	7,73	2,97	2,12	3,22
RSD		3,86137	5,567772	10,83303	4,222333	3,215697	4,524363

%utbytte, C16:1							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	67,81564	72,7199	72,96726	78,63018	83,74524	72,83065
P2	0	73,09779	77,69704	79,2771	73,68889	72,65058	73,54577
P3	0	66,73502	72,32185	71,79793	75,38733	69,74835	72,81445
Gj. Snitt	0	69,22	74,25	74,68	75,90	75,38	73,06
Std. Avvik	0	2,78	2,45	3,28	2,05	6,03	0,34
RSD	0	4,016354	3,293734	4,39869	2,700658	8,001511	0,466708

%utbytte, C18:1							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	69,34837	72,83363	75,72953	80,38711	79,24355	77,90611
P2	0	70,54526	77,36028	75,12003	77,35233	74,77478	75,31181
P3	0	68,55454	80,74356	72,42037	77,05396	72,71824	74,22605
Gj. Snitt	0	69,48	76,98	74,42	78,26	75,58	75,81
Std. Avvik	0	0,82	3,24	1,44	1,51	2,72	1,54
RSD	0	1,177623	4,209507	1,932169	1,924076	3,604109	2,036389

%utbytte, C20:1							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	65,59364	67,9483	72,32647	69,93256	68,77406	66,06117
P2	0	65,13026	71,84968	66,91575	69,85164	70,10444	66,17725
P3	0	64,50293	67,99353	66,8257	65,54794	68,50543	66,59229
Gj. Snitt	0	65,08	69,26	68,69	68,44	69,13	66,28
Std. Avvik	0	0,45	1,83	2,57	2,05	0,70	0,23
RSD		0,686826	2,639993	3,744581	2,992404	1,011337	0,343998

%utbytte, C22:1							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	49,67011	53,23317	51,36143	46,39208	42,26562	47,38655
P2	0	53,46928	55,49244	48,35203	48,44748	50,05731	49,64726
P3	0	46,92615	52,30874	50,45912	51,3118	50,13878	50,46559
Gj. Snitt	0	50,02	53,68	50,06	48,72	47,49	49,17
Std. Avvik	0	2,68	1,34	1,26	2,02	3,69	1,30
RSD	0	5,363208	2,491289	2,519051	4,141241	7,775547	2,648504

%utbytte, C24:1							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	36,29952	37,79258	44,10592	29,78998	27,63026	29,56423
P2	0	36,15852	36,97123	42,51056	38,58297	35,18574	32,72991
P3	0	37,38872	39,21754	50,53344	31,38222	35,50717	36,33754
Gj. Snitt	0	36,62	37,99	45,72	33,25	32,77	32,88
Std. Avvik	0	0,55	0,93	3,47	3,83	3,64	2,77
RSD	0	1,501308	2,442559	7,585217	11,50435	11,10568	8,416631

%utbytte, C18:2							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	72,961	76,44458	76,33317	80,23979	81,6624	76,43768
P2	0	75,11206	80,93411	76,21992	77,43031	75,98703	77,99918
P3	0	68,49738	74,82655	73,18251	77,14827	76,53819	81,04651
Gj. Snitt	0	72,19	77,40	75,25	78,27	78,06	78,49
Std. Avvik	0	2,75	2,58	1,46	1,40	2,56	1,91
RSD	0	3,816165	3,337946	1,939358	1,783042	3,273543	2,438209

%utbytte, C18:3							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	70,63527	70,65649	71,80115	75,42002	73,68684	71,65324
P2	0	66,87041	75,77829	70,13734	74,51113	72,53169	72,02226
P3	0	65,50979	70,13202	69,81758	73,91866	71,53999	71,40339
Gj. Snitt	0	67,67	72,19	70,59	74,62	72,59	71,69
Std. Avvik	0	2,17	2,55	0,87	0,62	0,88	0,25
RSD	0	3,203468	3,528345	1,231909	0,827493	1,208629	0,354576

%utbytte, C20:2							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	56,06375	56,49128	59,06455	54,87636	55,91712	56,42851
P2	0	52,55286	59,25104	56,02354	58,36737	58,86852	55,79042
P3	0	51,23621	56,87644	52,50873	55,49446	55,98694	53,92496
Gj. Snitt	0	53,28	57,54	55,87	56,25	56,92	55,38
Std. Avvik	0	2,04	1,22	2,68	1,52	1,38	1,06
RSD	0	3,823954	2,120898	4,794953	2,704309	2,415747	1,918022

%utbytte, C20:3							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	55,98449	42,66156	58,20672	59,0097	54,55853	55,75346
P2	0	50,9485	43,95879	55,21517	59,47357	59,22371	55,46058
P3	0	51,86141	42,49802	56,3406	56,49753	56,23323	13,14198
Gj. Snitt	0	52,93	43,04	56,59	58,33	56,67	55,61
Std. Avvik	0	2,19	0,65	1,23	1,31	1,93	0,15
RSD		4,138837	1,518336	2,180186	2,241457	3,404932	0,263345

%utbytte, C20:4							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	66,80282	56,63323	72,22083	79,03005	69,84174	72,19407
P2	0	66,88306	59,2286	69,18541	73,99829	75,72738	72,33464
P3	0	60,32829	56,57568	69,90879	73,60326	71,08513	73,84709
Gj. Snitt	0	64,67	57,48	70,44	75,54	72,22	72,79
Std. Avvik	0	3,07	1,24	1,29	2,47	2,53	0,75
RSD		4,748941	2,152532	1,83784	3,270117	3,507203	1,028018

%utbytte, C20:5							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	59,42217	62,87361	65,28823	65,83106	64,80103	63,96972
P2	0	58,79171	65,67703	63,04228	66,1525	65,13519	64,44999
P3	0	58,93126	69,27786	62,79336	64,07507	63,80694	62,84249
Gj. Snitt	0	59,05	65,94	63,71	65,35	64,58	63,75
Std. Avvik	0	0,27	2,62	1,12	0,91	0,56	0,67
RSD		0,457897	3,975066	1,761212	1,397068	0,873517	1,056787

%utbytte, C22:5							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	44,92403	47,20818	47,41021	45,97751	40,73935	49,59557
P2	0	45,47999	49,54093	46,60188	47,7657	45,24393	45,97233
P3	0	43,71019	51,54925	46,53295	44,00282	47,69367	45,0133
Gj. Snitt	0	44,70	49,43	46,85	45,92	44,56	46,86
Std. Avvik	0	0,74	1,77	0,40	1,54	2,88	1,97
RSD		1,653003	3,588475	0,850175	3,347066	6,463582	4,210995

%utbytte, C22:6							
Paralleller/Tid (min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	51,33384	53,12858	54,3162	53,10256	50,05314	49,64087
P2	0	51,90448	54,29954	54,95287	52,58825	52,10998	51,13186
P3	0	49,78458	58,49919	55,0005	51,977	53,19355	57,59876
Gj. Snitt	0	51,01	55,31	54,76	52,56	51,79	52,79
Std. Avvik	0	0,90	2,31	0,31	0,46	1,30	3,45
		1,755933	4,168992	0,569721	0,875407	2,515042	6,542867

Mikrobølger, 70W

% utbytte, C18:0				
Paralleller/Tid (mir	0	1	3	5
P1	0	81,50967	88,08895	82,31292
P2	0	89,97036	83,11785	88,55827
P3	0	81,44618	83,57327	84,63831
Gj. Snitt	0	84,31	84,93	85,17
Std. Avvik	0	4,00	2,24	2,58
RSD		4,748566	2,642009	3,025959

%utbytte, C18:1				
Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	75,93917	77,80559	66,05837
P2	0	71,12576	68,45779	71,51803
P3	0	65,49199	73,42359	72,99576
Gj. Snitt	0	70,85	73,23	70,19
Std. Avvik	0	4,27	3,82	2,98
RSD	#DIV/0!	6,025806	5,214739	4,250762

% utbytte, C20:0				
Paralleller/Tid (mir	0	1	3	5
P1	0	63,01896	73,96511	66,46408
P2	0	78,2284	69,11551	72,2278
P3	0	66,56222	69,01279	75,18477
Gj. Snitt	0	64,79	70,70	71,29
Std. Avvik	0	1,77	2,31	3,62
RSD		2,734394	3,268443	5,079304

%utbytte, C20:1				
Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	71,33668	72,25509	70,75083
P2	0	75,42851	75,14804	63,46082
P3	0	63,49097	70,34848	72,00411
Gj. Snitt	0	70,09	72,58	68,74
Std. Avvik	0	4,95	1,97	3,77
RSD		7,067304	2,718453	5,47997

% utbytte, C22:0

Paralleller/Tid (mi	0	1	3	5
P1	0	54,9851	57,70794	50,97244
P2	0	71,70513	61,37572	58,62529
P3	0	56,60746	57,48949	63,68473
Gj. Snitt	0	55,80	58,86	57,76
Std. Avvik	0	0,81	1,78	5,23
RSD		1,453821	3,028875	9,047046

%utbytte, C22:1

Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	61,34634	67,44827	50,89313
P2	0	72,08126	66,60202	60,78847
P3	0	60,50816	65,26334	69,57038
Gj. Snitt	0	60,93	66,44	60,42
Std. Avvik	0	0,42	0,90	7,63
RSD	#DIV/0!	0,687854	1,353918	12,62795

% utbytte, C24:0

Paralleller/Tid (mi	0	1	3	5
P1	0	28,89341	37,52558	29,04691
P2	0	37,7704	40,92286	29,45107
P3	0	34,94123	38,29096	42,6406
Gj. Snitt	0	33,87	38,91	33,71
Std. Avvik	0	3,70	1,46	6,32
RSD		10,93225	3,739194	18,7318

%utbytte, C24:1

Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	37,46887	41,2222	33,64738
P2	0	49,57789	44,44487	31,23777
P3	0	44,05221	44,1733	49,01206
Gj. Snitt	0	43,70	43,28	32,44
Std. Avvik	0	4,95	1,46	1,20
RSD		11,32679	3,371956	3,713658

%utbytte, C18:2

Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	72,49235	85,34796	73,43479
P2	0	76,8106	73,38057	75,35033
P3	0	67,19105	74,24347	78,28551
Gj. Snitt	0	72,16	77,66	75,69
Std. Avvik	0	3,93	5,45	1,99
RSD	0	5,451416	7,017357	2,63552

%utbytte, C18:3

Paralleller/Tid (min)	0	1	3	5
P1	0	72,20889	76,21191	69,12954
P2	0	72,71633	70,50969	66,48729
P3	0	61,42899	65,31553	70,05147
Gj. Snitt	0	68,78	70,68	68,56
Std. Avvik	0	5,21	4,45	1,51
RSD		7,5677	6,296123	2,20332

%utbytte, C20:2

Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	56,52239	62,71027	57,42053
P2	0	67,60627	63,15837	60,41123
P3	0	55,01306	59,5382	66,27117
Gj. Snitt	0	59,71	61,80	61,37
Std. Avvik	0	5,61	1,61	3,68
RSD		9,402598	2,607291	5,990131

%utbytte, C20:3

Paralleller/Tid (min)	0	1	3	5
P1	0	54,72056	61,98565	55,37167
P2	0	65,6361	63,33682	58,35407
P3	0	52,86336	59,5342	66,08165
Gj. Snitt	0	53,79	61,62	59,94
Std. Avvik	0	0,93	1,57	4,51
		1,726279	2,55429	7,529915

%utbytte, C20:4

Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	63,61914	74,99008	61,75939
P2	0	78,27638	71,36009	68,25501
P3	0	62,18189	67,79095	74,08306
Gj. Snitt	0	62,90	71,38	68,03
Std. Avvik	0	0,72	2,94	5,03
#VALUE!	#DIV/0!	1,142476	4,117472	7,398782

%utbytte, C20:5

Paralleller/Tid (min)	0	1	3	5
P1	0	57,46356	64,09775	56,39373
P2	0	67,86484	61,54517	62,19253
P3	0	51,22874	60,45924	68,68077
Gj. Snitt	0	54,35	62,03	62,42
Std. Avvik	0	3,12	1,53	5,02
#VALUE!	#DIV/0!	5,736214	2,458501	8,040061

%utbytte, C22:5

Paralleller/Tid (min	0	1	3	5
P1	0	45,7609	54,42299	49,27136
P2	0	54,67971	50,83096	45,35526
P3	0	42,4697	47,2733	54,5207
Gj. Snitt	0	47,64	50,84	49,72
Std. Avvik	0	5,16	2,92	3,75

%utbytte, C22:6

Paralleller/Tid (min)	0	1	3	5
P1	0	54,68563	59,12303	49,207
P2	0	56,82342	56,65236	52,16317
P3	0	46,87855	63,77804	60,37972
Gj. Snitt	0	52,80	59,85	53,92
Std. Avvik	0	4,27	2,95	4,73

Tradisjonell, 70 ˚C vannbad

% utbytte, C16:0					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	78,93734	80,04478	81,81486	76,42334
P2	0	77,53866	78,64493	76,97069	80,81669
P3	0	64,14365	66,88345	78,26002	75,7276
Gj. Snitt	0	73,54	75,19	79,02	77,66
Std. Avvik	0	6,67	5,90	2,05	2,25
RSD		9,068049	7,849467	2,592477	2,901274

%utbytte, C16:1					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	72,34075	69,97694	72,22211	69,70837
P2	0	71,134	73,74893	70,19159	72,51832
P3	0	56,04931	60,14973	70,73376	68,83243
Gj. Snitt	0	71,74	71,86	71,05	70,35
Std. Avvik	0	0,60	1,89	0,86	1,57
RSD		0,841088	2,624432	1,20822	2,234858

% utbytte, C14:0					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	92,40666	96,06199	90,77756	82,8548
P2	0	89,75937	90,12477	89,38826	98,36825
P3	0	29,47252	38,01922	81,21516	83,04191
Gj. Snitt	0	91,08	93,09	87,13	88,09
Std. Avvik	0	1,32	2,97	4,22	7,27
RSD		1,453231	3,188847	4,841898	8,252409

%utbytte, C14:1					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	74,53749	68,56182	67,29933	66,4766
P2	0	71,24229	74,06296	70,3285	78,5258
P3	0	19,18027	30,37214	66,06102	67,21644
Gj. Snitt	0	72,89	71,31	67,90	70,74
Std. Avvik	0	1,65	2,75	1,79	5,51
RSD		2,260398	3,857076	2,640196	7,794708

% utbytte, C18:0					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	77,76413	79,37965	80,63288	78,6487
P2	0	78,39462	78,00169	79,24232	79,23006
P3	0	76,02865	75,85864	77,72896	77,00915
Gj. Snitt	0	77,40	77,75	79,20	78,30
Std. Avvik	0	1,00	1,45	1,19	0,94
RSD		1,29258	1,863377	1,497285	1,201035

%utbytte, C18:1					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	72,84867	70,94268	72,42886	73,41595
P2	0	73,58263	73,98612	72,26844	75,26965
P3	0	69,18293	71,42082	73,52038	72,63227
Gj. Snitt	0	71,87	72,12	72,74	73,77
Std. Avvik	0	1,92	1,34	0,56	1,11
RSD		2,677716	1,853005	0,764685	1,499001

% utbytte, C20:0					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	67,93136	68,64014	68,6662	69,9922
P2	0	70,99256	69,66678	70,25117	69,78194
P3	0	69,14972	68,64911	69,95851	68,7663
Gj. Snitt	0	69,36	68,99	69,63	69,51
Std. Avvik	0	1,26	0,48	0,69	0,54
RSD		1,814312	0,698498	0,989046	0,770013

%utbytte, C20:1					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	72,86178	70,52869	69,64404	71,23994
P2	0	71,19402	70,79332	72,24701	72,00827
P3	0	72,71372	72,48158	71,97068	71,30186
Gj. Snitt	0	72,26	71,27	71,29	71,52
Std. Avvik	0	0,75	0,86	1,17	0,35
RSD		1,043119	1,213729	1,63758	0,487325

% utbytte, C22:0					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	52,37452	53,37986	55,09674	55,40086
P2	0	55,23631	54,15167	56,69039	64,96397
P3	0	55,1941	55,42084	52,60001	56,24162
Gj. Snitt	0	54,27	54,32	54,80	58,87
Std. Avvik	0	1,34	0,84	1,68	4,32
RSD		2,467785	1,549104	3,072145	7,344413

%utbytte, C22:1					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	63,7596	60,86507	59,56777	62,24214
P2	0	63,74101	64,83473	61,66072	59,96351
P3	0	62,25691	63,61082	59,96297	65,10823
Gj. Snitt	0	63,25	63,10	60,40	62,44
Std. Avvik	0	0,70	1,66	0,91	2,10
RSD		1,113051	2,630323	1,503259	3,371154

% utbytte, C24:0					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	39,08506	39,98748	42,94588	47,03548
P2	0	44,66068	43,81592	45,83918	40,15764
P3	0	46,59882	45,24589	42,33786	44,38919
Gj. Snitt	0	43,45	43,02	43,71	43,86
Std. Avvik	0	3,19	2,22	1,53	2,83
RSD		7,330677	5,160648	3,494878	6,45821

%utbytte, C24:1					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	50,46738	49,53779	48,20831	51,86123
P2	0	51,87953	54,50519	50,77003	52,31725
P3	0	53,23943	52,56525	51,04673	54,33849
Gj. Snitt	0	51,86	52,20	50,01	52,84
Std. Avvik	0	1,13	2,04	1,28	1,08
RSD		2,182233	3,915634	2,555235	2,037371

%utbytte, C18:3					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	70,87474	67,27491	69,5762	70,18132
P2	0	70,90741	70,24063	69,14138	71,36806
P3	0	67,15126	68,07418	70,97195	68,825
Gj. Snitt	0	69,64	68,53	69,90	70,12
Std. Avvik	0	1,76	1,25	0,78	1,04
RSD		2,531453	1,828259	1,117215	1,4816

%utbytte, C18:2					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	76,22459833	72,68925	76,96641	73,90341
P2	0	76,4175552	73,95602	73,83534	73,1515
P3	0	72,73674711	75,69529	76,834	73,68648
Gj. Snitt	0	75,13	74,11	75,88	73,58
Std. Avvik	0	1,69	1,23	1,45	0,32
RSD		2,251547692	1,662655	1,905417	0,429444

%utbytte, C20:3					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	52,15648	51,27937	52,22093	52,57364
P2	0	53,09455	53,92726	53,22276	53,89221
P3	0	52,93543	52,83646	51,86886	54,03632
Gj. Snitt	0	52,73	52,68	52,44	53,50
Std. Avvik	0	0,41	1,09	0,57	0,66
RSD		0,777347	2,062545	1,093779	1,230229

%utbytte, C20:2					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	57,44816488	56,90887	58,73332	59,86134
P2	0	58,27146887	60,1712	59,65865	57,7352
P3	0	60,37393366	58,80933	58,79189	57,87121
Gj. Snitt	0	58,70	58,63	59,06	58,49
Std. Avvik	0	1,23	1,34	0,42	0,97
RSD		2,098722411	2,281903	0,716336	1,661506

%utbytte, C20:5					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	66,39621	58,98099	62,71737	65,16675
P2	0	65,00766	67,00777	64,795	63,8373
P3	0	63,00685	62,3754	65,45668	66,60178
Gj. Snitt	0	64,80	62,79	64,32	65,20
Std. Avvik	0	1,39	3,29	1,17	1,13
RSD		2,146804	5,23967	1,814366	1,731344

%utbytte, C20:4					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	65,7871242	62,1296	63,15969	65,27445
P2	0	65,13431308	66,26589	64,13934	68,70819
P3	0	63,27470264	63,42608	67,27914	66,05616
Gj. Snitt	0	64,73	63,94	64,86	66,68
Std. Avvik	0	1,06	1,73	1,76	1,47
RSD		1,644320897	2,701525	2,709158	2,203827

%utbytte, C22:6					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	63,2404	58,18186	58,51477	61,97867
P2	0	62,18253	63,61339	61,38515	60,23027
P3	0	62,13169	58,88438	63,8132	63,57106
Gj. Snitt	0	62,52	60,23	61,24	61,93
Std. Avvik	0	0,51	2,41	2,17	1,36
RSD		0,817506	4,004839	3,536358	2,203197

%utbytte, C22:5					
Paralleller/Tid (min)	0	3	5	7	10
P1	0	52,42530928	52,2868	51,93425	55,62887
P2	0	54,50519025	54,8857	53,49149	54,4751
P3	0	54,00009148	53,04282	55,64916	55,61706
Gj. Snitt	0	53,64	53,41	53,69	55,24
Std. Avvik	0	0,89	1,09	1,52	0,54
RSD		1,651176627	2,043781	2,836935	0,97959

Tradisjonell 100 ˚C

% utbytte, C16:0					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	79,94357	78,75306	80,50705	78,24859
P2	0	78,10979	77,98772	78,34778	76,38538
P3	0	85,06245	81,21588	77,99705	77,46034
Gj. Snitt	0	81,04	79,32	78,95	77,36
Std. Avvik	0	2,94	1,38	1,11	0,76
RSD		3,630529	1,736393	1,405731	0,987071

%utbytte, C16:1					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	71,01958	72,86194	64,87061	63,67218
P2	0	71,557	72,30659	65,03484	69,46142
P3	0	76,16924	71,99623	72,00505	65,49331
Gj. Snitt	0	71,29	72,58	67,30	66,21
Std. Avvik	0	0,27	0,28	3,33	2,42
RSD		0,376939	0,382554	4,940563	3,650588

% utbytte, C18:0					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	78,11669	77,75327	79,58336	79,6045
P2	0	78,93143	77,30707	78,71044	77,51513
P3	0	81,96611	78,7362	78,81902	80,14418
Gj. Snitt	0	79,67	77,93	79,04	79,09
Std. Avvik	0	1,66	0,60	0,39	1,13
RSD		2,078959	0,766044	0,491462	1,433537

%utbytte, C18:1					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	73,58006	74,57353	70,21876	66,93463
P2	0	75,15161	73,68127	69,1416	73,05017
P3	0	77,05696	74,16083	73,25212	71,27958
Gj. Snitt	0	75,26	74,14	70,87	70,42
Std. Avvik	0	1,42	0,36	1,74	2,57
RSD		1,888869	0,491792	2,4556	3,648513

% utbytte, C20:0					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	68,42511	67,66669	66,69383	70,41207
P2	0	69,10882	67,62187	70,28051	68,43235
P3	0	68,86776	68,0726	67,95551	69,60716
Gj. Snitt	0	68,80	67,79	68,31	69,48
Std. Avvik	0	0,28	0,20	1,49	0,81
RSd		0,411532	0,299086	2,174718	1,169922

%utbytte, C20:1					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	68,388	71,63312	67,24015	66,57346
P2	0	73,00206	69,70976	66,89283	68,58892
P3	0	72,27426	68,36758	71,34974	68,74666
Gj. Snitt	0	71,22	69,90	68,49	67,97
Std. Avvik	0	2,03	1,34	2,02	0,99
RSD		2,843888	1,917173	2,955159	1,455613

% utbytte, C22:0					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	49,44562	50,27827	51,94885	53,81435
P2	0	53,1779	51,3254	53,16493	53,95849
P3	0	51,15401	49,69898	52,41254	53,87493
Gj. Snitt	0	51,26	50,43	52,51	53,88
Std. Avvik	0	1,53	0,67	0,50	0,06
RSD		2,976077	1,334564	0,95433	0,109673

%utbytte, C22:1					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	54,82357	60,14938	56,28944	59,55526
P2	0	61,16635	60,62095	60,59281	61,52421
P3	0	60,03395	47,42442	59,47433	61,79879
Gj. Snitt	0	58,67	56,06	58,79	60,96
Std. Avvik	0	2,76	6,11	1,82	1,00
RSD		4,707437	10,90305	3,101284	1,639121

% utbytte, C24:0					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	36,08457	38,25325	39,34194	41,44453
P2	0	41,55839	37,89394	43,782	44,83479
P3	0	36,85213	37,72229	40,6933	40,76013
Gj. Snitt	0	38,17	37,96	41,27	42,35
Std. Avvik	0	2,42	0,22	1,86	1,78
RSD		6,340474	0,582848	4,502589	4,207063

%utbytte, C24:1					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	46,23009	47,28308	45,33047	50,5054
P2	0	50,86684	49,95985	50,24581	52,73538
P3	0	48,43554	49,30009	49,49077	51,31593
Gj. Snitt	0	48,51	48,85	48,36	51,52
Std. Avvik	0	1,89	1,14	2,16	0,92
RSD		3,903649	2,33102	4,469471	1,788917

%utbytte, C18:3					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	69,46446	70,05051	63,5168	62,51617
P2	0	72,1858	70,3834	63,22717	69,8234
P3	0	73,68148	71,93976	71,66781	65,11841
Gj. Snitt	0	71,78	70,79	66,14	65,82
Std. Avvik	0	1,75	0,82	3,91	3,02
RSD		2,432054	1,163185	5,915692	4,594477

%utbytte, C18:2					
Paralleller/Tid (mir	0	1	2	3	5
P1	0	74,83739	75,63981	70,81324	66,97519
P2	0	77,8909	75,80651	69,86739	76,19608
P3	0	76,55233	75,59909	76,46993	71,86508
Gj. Snitt	0	76,43	75,68	72,38	71,68
Std. Avvik	0	1,25	0,09	2,92	3,77
RSD		1,635213	0,118571	4,027461	5,254996

%utbytte, C20:3					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	48,73714	50,95753	46,50163	46,44277
P2	0	51,19698	49,67699	47,96611	50,6699
P3	0	48,84955	51,20778	49,86415	48,64645
Gj. Snitt	0	49,59	50,61	48,11	48,59
Std. Avvik	0	1,13	0,67	1,38	1,73
RSD		2,28657	1,324666	2,861204	3,552929

%utbytte, C20:2					
Paralleller/Tid (mir	0	1	2	3	5
P1	0	55,99085	57,78582	51,64856	54,54556
P2	0	59,98284	58,56997	55,08635	59,02653
P3	0	58,85749	57,38211	56,83511	57,40839
Gj. Snitt	0	58,28	57,91	54,52	56,99
Std. Avvik	0	1,68	0,49	2,15	1,85
RSD		2,883831	0,851562	3,951523	3,250766

%utbytte, C20:5					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	64,66261	65,83785	56,99716	57,28846
P2	0	63,97793	64,40231	58,05377	66,92262
P3	0	62,8226	65,23057	65,65538	61,29432
Gj. Snitt	0	63,82	65,16	60,24	61,84
Std. Avvik	0	0,76	0,59	3,86	3,95
RSD		1,189776	0,903	6,402674	6,390661

%utbytte, C20:4					
Paralleller/Tid (mir	0	1	2	3	5
P1	0	63,20651	64,18292	56,3675	57,61015
P2	0	64,02282	64,56993	58,26402	63,36229
P3	0	61,94744	64,01664	63,18779	60,09141
Gj. Snitt	0	63,06	64,26	59,27	60,35
Std. Avvik	0	0,85	0,23	2,87	2,36
RSD		1,35377	0,360734	4,849323	3,903039

%utbytte, C22:6					
Paralleller/Tid (min)	0	1	2	3	5
P1	0	59,72594	60,14041	52,76269	54,07553
P2	0	61,99583	63,06469	55,73797	62,89025
P3	0	60,35113	60,03994	61,63473	59,32919
Gj. Snitt	0	60,69	61,08	56,71	58,76
Std. Avvik	0	0,96	1,40	3,69	3,62
RSD		1,577378	2,296596	6,501063	6,16122

%utbytte, C22:5					
Paralleller/Tid (mir	0	1	2	3	5
P1	0	50,53807	51,98683	45,74164	48,63795
P2	0	52,62605	53,1863	49,29493	56,50357
P3	0	50,0518	52,19348	52,69966	52,81181
Gj. Snitt	0	51,07	52,46	49,25	52,65
Std. Avvik	0	1,12	0,52	2,84	3,21
RSD	0	2,186486	0,99812	5,768688	6,102688

Del II: GLC412 70W

% utbytte C10:0							
Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	2,360657	i.d	76,73989	52,29926	18,45684	41,41111
P2	0	17,85518	i.d	i.d	21,16896	16,55143	1,405703
P3	0	i.d	5,760306	35,26618	110,1391	3,226462	0,913989
Gj. Snitt	0	10,10792	5,760306	56,00303	61,20243	12,74491	14,57693
Std. Avvik	0	7,747263	0	20,73685	36,86345	6,775363	18,97569
RSD	0	76,64547	0	37,02809	60,232	53,16131	130,1761

% utbytte C11:0							
Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	6,988655	1,124658	95,37105	72,07688	52,42756	70,31669
P2	0	53,64823	i.d	0,503903	58,88519	60,17468	21,77498
P3	0	i.d	22,04404	64,45712	113,643	14,45167	12,84545
Gj. Snitt	0	30,31844	11,58435	53,44402	81,53503	42,35131	34,97904
Std. Avvik	0	23,32979	10,45969	39,50451	23,33378	19,97993	25,25201
RSD	0	76,94916	90,29157	73,91755	28,61811	47,17666	72,19184

% utbytte C12:0							
Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	31,81577	20,3518	130,0062	108,5154	103,5256	119,7432
P2	0	102,3099	1,289509	3,501689	110,2545	115,9599	78,96574
P3		4,833019	62,74344	113,7193	145,0567	63,47797	60,91095
Gj. Snitt	0	46,31957	28,12825	82,40906	121,2755	94,32118	86,53995
Std. Avvik	0	41,09507	25,68399	56,19072	16,83082	22,39242	24,60805
RSD	0	88,72075	91,31031	68,18512	13,87817	23,74061	28,43548

% utbytte C13:0

Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	62,6718	54,24364	115,0449	107,6441	107,335	121,7432
P2	0	111,1781	20,5497	29,66069	111,2656	116,7738	101,4985
P3	0	33,06655	81,95249	119,103	128,6958	92,91066	93,02295
Gj. Snitt	0	68,97214	52,24861	87,93619	115,8685	105,6732	105,4216
Std. Avvik	0	32,19859	25,10725	41,24029	9,189962	9,812716	12,04869
RSD	0	46,68347	48,05343	46,89798	7,931372	9,285911	11,42906

% utbytte C14:0

Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	91,2269	90,88466	133,4715	118,8075	126,4619	134,8211
P2	0	121,5812	65,90889	69,89223	125,7686	134,8695	126,5206
P3	0	79,13706	103,515	129,5855	136,3543	115,1499	115,3094
Gj. Snitt	0	97,31507	86,76951	110,9831	126,9768	125,4938	125,5504
Std. Avvik	0	17,85453	15,62595	29,09889	7,214207	8,079533	7,995109
RSD	0	18,34714	18,00857	26,21922	5,681514	6,438193	6,36805

% utbytte C15:0

Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	102,8918	101,2987	122,8217	112,0378	119,5053	125,7348
P2	0	114,5606	92,31995	92,31404	118,7591	125,2152	122,4545
P3	0	98,94041	105,5305	124,6926	123,9473	117,2075	114,1052
Gj. Snitt	0	105,4643	99,71639	113,2761	118,2481	120,6426	120,7648
Std. Avvik	0	6,631262	5,508018	14,84208	4,875456	3,366601	4,895811
RSD		6,287687	5,523684	13,10257	4,123075	2,790557	4,054004

% utbytte C16:0

Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1		107,1848	107,2499	118,7684	111,494	116,9	122,6468
P2		114,3929	105,5449	103,4148	117,6561	122,5703	129,4169
P3		107,9593	108,5078	121,6951	122,8241	120,8154	120,9152
Gj. Snitt	0	109,8457	107,1009	114,6261	117,3248	120,0952	124,3263
Std. Avvik	0	3,230874	1,214214	8,017131	4,631426	2,370244	3,668359
RSD		2,941284	1,133711	6,994158	3,947526	1,973637	2,950589

% utbytte C18:0							
Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1	0	107,0618	106,9075	109,523	105,939	110,2165	109,3097
P2	0	105,6835	106,461	106,494	108,0137	107,5609	109,1033
P3	0	107,4437	105,9485	112,8807	111,1336	110,0344	110,1624
Gj. Snitt	0	106,7297	106,439	109,6325	108,3621	109,2706	109,5251
Std. Avvik	0	0,756014	0,391828	2,608502	2,134933	1,211208	0,458437
RSD	0	0,708345	0,368124	2,379313	1,970184	1,108448	0,418568

% utbytte C17:0							
Paralleller/Tid(min)	0	0,167	0,333	0,5	1	3	5
P1		108,4329	109,1216	116,3431	109,1127	113,6707	117,3918
P2		112,1755	108,2687	104,8007	113,4083	115,3131	115,6516
P3		112,2091	109,6608	115,3966	113,9711	113,8381	110,8681
Gj. Snitt	0	110,9392	109,017	112,1802	112,1641	114,274	114,6372
Std. Avvik	0	1,77226	0,573087	5,232347	2,169818	0,737929	2,758225
RSD		1,597506	0,525685	4,664236	1,934504	0,645755	2,406048

Verdier, stolpediagram

DEL I

	65W	70W	75W
C10	57,06	41,95	48,58
C12	102,73	79,11	96,8
C14	114,83	94,51	102,902
C15	106,02	90,44	93,84
C16	103,83	92,06	96,1
C18	96,66	90,92	93,58
Gjennomsnitt	105,335	91,9825	96,6055
Standardavvik	6,483535	1,57341	3,765072
RSD	6,155157	1,710554	3,897369

Del II

70W

Mettet	Enumettet	Flerumettet
84,8	71,03	76,61
79,95	75,75	71,56
84,99	75,09	55,87
65,67	67,81	56,02
42,81	49,85	68,86
30,22	36,54	63,73
		46,39
		53,03
64,74	62,67833333	61,50875
21,28	14,54	9,6852845
32,8711511	23,20065512	15,7461898

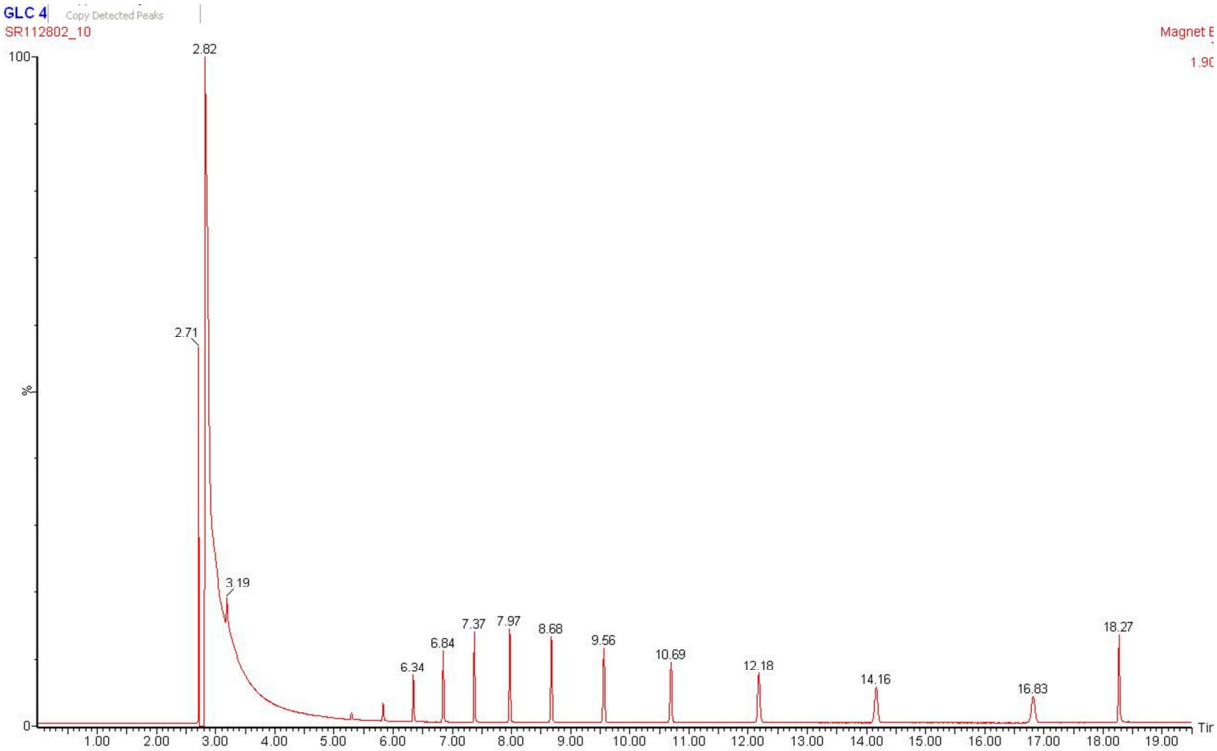
Tradisjonell 70 ˚C

Mettede FAMEs	
C14:0	88,56
C16:0	76,35
C18:0	78,16
C20:0	69,37
C22:0	55,56
C24:0	43,51
Gjennomsnitt	68,585
Standardavvik	14,99999
RSD	21,87066
Enumettede FAMEs	
C14:1cΔ9	70,71
C16:1cΔ9	71,25
C18:1cΔ9	72,62
C20:1cΔ11	71,58
C22:1cΔ13	62,3
C24:1cΔ15	51,73
Gjennomsnitt	66,69833
Standardavvik	7,517804
RSD	11,27135
Flerumettede FAMEs	
C18:2cΔ9,12	74,67
C18:3cΔ9,12,15	69,55
C20:2cΔ11,14	58,72
C20:3cΔ11,13,17	52,84
C20:4cΔ5,6,11,14	65,05
C20:5cΔ5,8,11,14,17	64,28
C22:5cΔ7,10,13,16,19	54
C22:6cΔ4,7,10,13,16,19	61,48
Gjennomsnitt	62,57375
Standardavvik	6,967184
RSD	11,13436
Total	
Gjennomsnitt	65,95236
Standardavvik	10,51522
RSD	15,94366

MW 70 ˚C

C14:0	96,29
C16:0	74,31
C18:0	84,8
C20:0	68,93
C22:0	57,47
C24:0	35,5
Gjennomsnitt	69,55
Standardavvik	19,47631
RSD	28,00333
C14;1	75,85
C16:1	75,45
C18:1	71,42
C20:1	70,47
C22:1	62,59
C24:1	39,81
Gjennomsnitt	65,93167
Standardavvik	12,47129
RSD	18,91548
C18:2	75,17
C18:3	69,34
C20:2	60,96
C20:3	58,45
C20:4	67,44
C20:5	59,6
C22:5	49,4
C22:6	55,52
Gjennomsnitt	61,985
Standardavvik	7,280955
RSD	11,74632
Total GLC 502	65,82222
Standardavvik	13,93659
RSD	21,17307

Tradisjonell 100˚C

Mettede FAMEs	
C14:0	89,88
C16:0	79,17
C18:0	78,93
C20:0	68,6
C22:0	52,02
C24:0	39,94
Gjennomsnitt	68,09
Standardavvik	17,15616
RSD	25,1963
Enumettede FAMEs	
C14:1cΔ9	68,97
C16:1cΔ9	69,35
C18:1cΔ9	72,67
C20:1cΔ11	69,4
C22:1cΔ13	58,62
C24:1cΔ15	49,31
Gjennomsnitt	64,72
Standardavvik	8,157639
RSD	12,60451
Flerumettede FAMEs	
C18:2cΔ9,12	74,04
C18:3cΔ9,12,15	68,63
C20:2cΔ11,14	56,93
C20:3cΔ11,13,17	49,23
C20:4cΔ5,6,11,14	61,74
C20:5cΔ5,8,11,14,17	62,76
C22:5cΔ7,10,13,16,19	51,36
C22:6cΔ4,7,10,13,16,19	59,31
Gjennomsnitt	60,5
Standardavvik	7,752316
RSD	12,81375
Total	
Gjennomsnitt	64,43667
Standardavvik	11,93213
RSD	18,51761

Kromatogram til del III