

**Lipidklasser og fettsyresammensetning i  
brunpølse  
(*Cucumaria frondosa*)**

Jan Roger S. Nicolaisen

*FAR-3901*

*Mastergradsoppgave i farmasøytisk analytisk kjemi  
Institutt for farmasi  
Det helsevitenskapelige fakultet  
Universitetet i Tromsø  
Vår 2011*



## **Forord**

Takk til hovedveileder Einar Jensen for veldig god veiledning, i tillegg til å ha tatt seg tid til litt avkoblende prat om andre utenom faglige temaer.

Takk til veileder Ragnar Olsen for å ha gitt god veiledning med dine ideer om hvordan utfordringer skulle (skapes) og løses.

Arbeidet på laboratoriet hadde ikke vært like lett å gjennomføre dersom det ikke hadde vært for veldig god hjelp av Hanne Mæhre, som har bidratt veldig mye for å gjøre ting mer forståelig.

I samme åndedrag retter jeg en takk til Birthe Vang for å ha fått meg på riktig kurs med Excel.

Og til resten av folket på avdelingen; det har vært veldig trivelig å tilbringe tiden der!

En takk må også rettes til dykker Tony Martinsen for å ha hentet opp og levert sjøpølsene som ble brukt til arbeidet.

Til slutt vil jeg takke alle andre som har bidratt til å gjøre studietiden gjennomførbar og så trivelig som mulig.

Jan Roger S. Nicolaisen

Tromsø, mai 2011



## Sammendrag

Ulike arter av sjøpølsen er en godt utnyttet ressurs i Øst-Asia, men er lite utnyttet i den vestlige verden. I asiatiske farvann er den årlige fangsten estimert til over 100 000 tonn, noe som har resultert i overfiske og minskende fangst. Det har derfor oppstått et behov for nye fangstområder. Ulike typer sjøpølser er registrert i anseelige mengder langs norskekysten og for øvrig i Nordatlantiske havområder. Forekomst og etterspørsel indikerer at sjøpølser kan bli et nytt eksportprodukt fra Norge. En utfordring er å utvikle gode og effektive fangstmetode for sjøpølser. For det meste blir de sett på som en bifangst i sammenheng med mer kommersielt fiske. Verdi av sjømat kan til en viss grad påvirkes av hvilke lipider og fettsyrer som forekommer i den aktuelle organismen. Langkjedede omega-3 fettsyrer er av særlig interesse. En av de artene som hittil er lite utnyttet er brunpølse (*Cucumaria frondosa*).

Målet med oppgaven var derfor å bestemme fettinnholdet og analysere lipider fra brunpølsen ved bruk av tynnsjikt-kromatografi og gasskromatografi. Lipidene ble ekstrahert og analysert ved tillaging av fettsyremetylestere for videre analyse med gasskromatografi. Fettsyrene fra brunpølse ble identifisert ved å sammenligne observerte retensjonstider med retensjonstider for kjente standarder av fettsyremetylestere. Ekstrahert lipidblanding ble separert i ulike fettklasser ved bruk av fast-fase ekstraksjon. Videre ble fettsyresammensetningen fra hver fraksjon analysert ved tillaging av fettsyremetylestere for analyse med gasskromatografi.

Analysene viste at innholdet av totalt fett i gjennomsnitt var ~3,5 % basert på frysetørket materiale (tørrvekt), og at innholdet av langkjedede omega-3 fettsyrer i brunpølsen var relativt høyt i forhold til den totale fettsyresammensetningen. Av de flerumettede fettsyrene i den totale fettsyresammensetningen som ble identifisert, var EPA, 20:5 n-3 (33 %) den dominerende fettsyren. Relativ mengde av de ulike fettsyrene var ulik i de ulike lipidklassene, slik at EPA utgjorde 70 % i fraksjonen for polare lipider og 11 % i nøytrale lipider. De dominerende fettklassene var polare lipider inkludert fosfolipider (~ 40 %) og frie fettsyrer (~ 20 %).



## Abstract

Different species of the sea cucumber are a well utilized resource in eastern parts of Asia, but not much used in western parts of the world. The annual harvest of sea cucumbers in Asian waters has been estimated to be over 100,000 tons. This has led to overfishing and decreasing catches. As a result, a demand for new fishing areas has occurred. Different species of sea cucumbers are observed in significant amounts along the Norwegian coastline and in other parts at the North Atlantic Ocean. Occurrence and demand indicates that sea cucumbers may become a new export product from Norway. One challenge is to develop good and effective harvesting methods for the sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). For the most it is considered as a bycatch in context with more commercial fishery. The value of seafood can to a certain degree be determined by the kind of lipids and fatty acid that are present in the actual organism. Long chained omega-3 fatty acids are of special interest.

The aim with the project was therefore to determine the lipid content and to analyze lipids from the sea cucumber with the use of thin layer chromatography and gas chromatography. The lipids were extracted and analyzed with the production of fatty acid methyl esters for further analysis with gas chromatography. The fatty acids from *Cucumaria frondosa* were identified by comparing observed retention times with retention times of known fatty acid methyl ester standards. The extracted oil was separated in the different lipid classes with the use of solid phase extraction. The fatty acid composition from each fraction was further analyzed by producing fatty acid methyl esters for gas chromatography.

The analysis showed that the content of total fat was on average ~3.5 % based on freeze-dried material, and the content of long chained omega-3 fatty acids in *Cucumaria frondosa* was relatively high compared to the total fatty acid composition. Of the polyunsaturated fatty acids, in the total amount, EPA 20:5 n-3 (33 %) was the most abundant fatty acid. The relative amounts of the different fatty acids were different in the different lipid classes. EPA was now present with an amount of 70 % in the fraction consisting of polar lipids and only 11 % in neutral lipids. The most dominant lipid classes were polar lipids including phospholipids (~ 40 %) and free fatty acids (~ 20 %).





# Innholdsfortegnelse

Forord	3
Sammendrag	5
Abstract	7
Innholdsfortegnelse	9
Forkortelser	11
1 Innledning	12
2 Generell bakgrunn	14
2.1 Fakta om brunpølsen	14
2.2 Lipider	16
2.2.1 Fettsyrer	16
2.2.2 Mettede fettsyrer	16
2.2.3 Umettede fettsyrer	16
2.2.4 Nomenklatur	18
2.2.5 Acylglyseroler	18
2.2.6 Voksesterer	18
2.2.7 Fosfolipider	19
2.2.8 Steroler	20
2.3 Lipidekstraksjon	20
2.4 Rensing med fast-fase kolonner (SPE)	20
2.5 GC-FID	21
2.6 TLC	22
3 Materialer og metoder	23
3.1 Utstyrliste	23
3.2 Metoder	25
3.2.1 Frysetørking	25
3.2.2 Ekstraksjon av fett	25
3.2.3 Fettsyresammensetning i totalt lipid	26
3.2.4 Fettsyresammensetning av hver SPE-fraksjon	26
3.2.5 GC	26
3.2.6 TLC	29
3.2.6a Analyse av fettklasser i ekstraherte lipider	29
3.2.6b Testing av ulike konsentrasjoner av ekstraherte lipider	29
3.2.6c Bestemmelse av fettklassefordeling	29
3.2.6d Videre rensing av nøytrale lipider	30
3.2.6e Kapasitetstesting av SPE-kolonnen	30
3.2.6f Bekreftelse av innhold på påsettingspunktet	30
3.2.7 SPE	31
4 Resultater	33
4.1 Tørrstoff og fettinnhold	33
4.2 Total fettsyresammensetning	33
4.3 Analyse av fettklasser i ekstraherte lipider	37
4.4 Fettsyresammensetning av de ulike fraksjonene etter rensing med SPE	38
4.5 Testing av ulike konsentrasjoner av ekstrahert lipidblanding	41

<u>4.6 Bestemmelse av fettklassefordeling</u>	<u>42</u>
<u>4.7 Videre rensing av nøytrale lipider</u>	<u>44</u>
<u>4.8 Kapasitetstesting av SPE-kolonnen</u>	<u>45</u>
<u>4.9 Bekreftelse av innhold i påsettingspunktet</u>	<u>46</u>
<u>5 Diskusjon</u>	<u>47</u>
<u>6 Referanser</u>	<u>52</u>
<u>7 Appendiks</u>	<u>55</u>

## Forkortelser

CAS:	Chemical Abstracts Service
DCM:	Diklormetan
EPA:	Eikosapentaensyre
FAME:	Fettsyremetyler
FFA:	Frie fettsyrer
FID:	Flammeionisasjonsdetektor
GC:	Gasskromatografi
HPLC:	High performance liquid chromatography
HPTLC:	High performance thin layer chromatography
MeOH:	Metanol
NaCl:	Natriumklorid
NL:	Nøytrale lipider
PL:	Polare lipider
RP-HPTLC:	Reversed phase high performance thin layer chromatography
RPM:	Revolutions per minute (omdreininger)
S.P.1 - S.P.7:	Sjøpølse 1 – sjøpølse 7
SPE:	Fast-fase ekstraksjon
TAG:	Triacylglyserider
TLC:	Tynnsjikt-kromatografi

# 1 Innledning

Etterspørselen etter sjømat har økt kraftig de siste årene. Årsaker til dette er blant annet at ernæringseksperter har anbefalt folk å spise mer sjømat og mindre rødt kjøtt. En grunn til denne anbefalingen er at sjømat inneholder mer omega-3 fettsyrer som er mer gunstig ernæringsmessig i forhold til det mettede fett som finnes i rødt kjøtt. I tillegg er sjømat en veldig god kilde til proteiner. Lipider fra marine organismer har også skapt interesse for utnyttelse i såkalte funksjonelle næringsmidler og helsekost. Dette har ført til at en rekke firma nå produserer ulike produkter basert på ulike varianter av marine lipider. En rekke av disse er lokalisert i Tromsø eller andre steder i Nord-Norge. Etterspørselen av omega-3 oljer er økende hvert år, og i de senere årene har etterspørselen økt med ca. 20 % hvert år, noe som indikerer et økt behov for flere kilder til omega-3 oljer [1]. Det bør rettes større fokus på å utnytte eksempelvis alger og oppdrettsfisk, forutsatt at de har tilfredsstillende kvalitet [1]. I norsk sammenheng er ikke brunpølsen utnyttet i særlig grad som næringsmiddel. Markedet i Øst-Asia er atskillig større [2, 3]. Anslått årlig fangst av sjøpølser er over 100 000 tonn [4]. En konsekvens av dette er et overfiske i noen havområder. Som følge av dette har etterspørselen etter sjøpølser fra andre steder i verden økt. Sett fra et næringsmiddelperspektiv, har brunpølsen en fordel i forhold til mye annen mat på grunn av sitt høye innhold av proteiner og gunstige fettsyrer. I en verden hvor fokuset på et sunnere kosthold blir mer og mer sentralt, bør potensialet til sjømat generelt ikke undervurderes. Om brunpølsen kommer til å bli utnyttet i større grad som næringsmiddel gjenstår å se, men et utvidet samarbeid med de nasjonene som utnytter denne typen ressurser gastronomisk, vil gi brunpølsen en større sjanse i et nasjonalt perspektiv.

I Øst-Asia har sjøpølsen i årevis også blitt brukt innen folkemedisinen til å behandle lidelser som revmatisme, hypertensjon, astma og anemi. Det høye innholdet av EPA er antatt å være en viktig del av mekanismen i sårtilheling [5, 6].

Norge har i lang tid vært en stor eksportør av sjømat. Tall fra 2009 viser at den totale omsetningen på norsk sjømateksport var på 44,6 milliarder kroner. Fra 2006 og fram til nå har det hvert år blitt satt ny eksportrekord. Mengden sjømat som ble eksportert fra Norge i 2009 var på 2,6 millioner tonn. Når det gjelder hvilke land Norge eksporterer mest til, er det Frankrike og Russland som er størst med henholdsvis 4,7 og 4,6 milliarder kroner. Begge viser en økning i forhold til året før. Fra havbruk er det i all hovedsak laks (23,6 milliarder kroner) som står for den

totale omsetningen (25,9 milliarder kroner). Når det gjelder villfanget sjømat, er det sild og makrell som bidrar mest til den totale omsetningen. (18,7 milliarder kroner). Norsk laks og ørret ble i 2009 eksportert til 96 land, noe som igjen bekrefter Norges sterke posisjon som leverandør av sjømat. Andre nasjoner som framstår som ledende eksportører av sjømat er Kina, Thailand, Chile, Danmark, Vietnam og USA for å nevne noen. USA, Japan, Spania og Frankrike er de nasjonene som importerer mest sjømat. Mesteparten av de viktigste eksportmarkedene for Norge ligger i Europa [7]. Ut i fra dette er det jo naturlig å opprettholde disse, men samtidig bør det arbeides med å etablere nye markeder.

Ved forskningsmiljøene på Universitetet i Tromsø er det økt interesse for å bygge opp kompetanse på lipidkjemi anvendt på marine organismer. Dette er viktig for å kunne utføre kvalitetskontroll av råstoff og ferdige produkter, men også for å kunne dokumentere lipidsammensetningen i arter som tradisjonelt har blitt lite utnyttet og for å kartlegge nye kilder til marine lipider. Siden det allerede foreligger mye litteratur som beskriver innholdet av lipidklasser og spesifikke fettsyrer for de råstoffene/organismene som brukes til produksjon og salg av omega-3-fettsyrer, var det en av grunnene til at jeg skulle gjøre analyser på brunpølser, *Cucumaria frondosa*. I tillegg var det av interesse siden organismen er å finne i nærområdene rundt Tromsø og at det muligens er store forekomster av brunpølser. Av det begrensede materialet som var å finne i databaser, var det gjort noen lignende analyser av brunpølser, men dette var gjort i Canada [3]. Sammensetning av fettsyrer i en organisme kan påvirkes av hva den beiter på, årstid og flere andre faktorer. Det var derfor viktig å utføre analyser på brunpølser fanget utenfor Tromsø. (Ringvassøy). Fra analysene som var blitt gjennomført og publisert, kunne man forvente å finne et høyt innhold av eikosapentaensyre (EPA), som er en omega-3-fettsyre. En annen omega-3-fettsyre, docosaheksaensyre (DHA), skal også være tilstede, men i en lavere mengde [3].

Formålet med oppgaven var å dokumentere fettinnholdet, fettsyresammensetningen og fettklassefordelingen i brunpølser.

## 2 Generell bakgrunn

### 2.1 Fakta om brunpølsen

Brunpølse, *Cucumaria frondosa*, hører til klassen Holothurioidea av virvelløse dyr. Brunpølsen består av en bløt kropp som har kalkplater på seg. Den har greinete fangarmer i munnåpningen som den bruker til å ta til seg næring som i hovedsak består av plankton og annet organisk materiale som flyter rundt i sjøen. Typisk størrelse er 20-30 cm lang [8]. Brunpølsens naturlige habitat er på harde overflater og finnes i relativt kjølige havområder som nordlige deler av Atlanterhavet. I norsk farvann finnes den i områdene fra Troms til Rogaland. Tettheten er varierende. På fiskebanken St. Pierre (45° N, 56° W) utenfor østkysten av Canada er det anslått en bestand på over 300 000 tonn [4]. Faktorer som er med på å påvirke bestanden, er relatert til områder og overflater. Det er vanlig at bestanden er høyere jo lengre ut i åpent hav man kommer, i forhold til havområder nærmere land. Dette kommer først og fremst av at fisket er større nærmere land, siden det er mer lønnsomt med tanke på tilgjengelighet, tids- og bunkersbesparelser [4].

Størrelsen på brunpølsen har vist seg å være avhengig av hvilken overflate de lever på. De som lever på harde overflater (berggrunn) er tyngre enn de som lever på mykere overflater (sand, leire) [4]. En konsekvens av den lavere kroppsvekten er en relativt tykkere kroppsvegg [4]. Dette fordi økt stressnivå som følge av manglende evne til å feste seg til grunnen gjør at de beveger seg i mer sirkulære bevegelser [4]. I næringsfrie perioder er det normalt at den bruker energilagrene som er i kroppsveggen til å opprettholde reproduksjonen, i tillegg til å opprettholde øvrige cellefunksjoner [9, 10]. Siden sjøpølser som befinner seg på sandbunn er mindre i størrelse på grunn av lavt inntak av næring samt økt forbruk av energilagre, vil reproduksjonsraten reduseres slik at mengden blir mindre enn hos brunpølser som befinner seg på berggrunn [11].

Når det gjelder fangst av brunpølser, vil det definitivt være lettere å tråle på sandbunn enn på hardere overflater. Siden sjøpølser som i hovedsak lever på mykere overflater er mindre enn de som lever på berggrunn, vil verdien av fangsten kunne bli lavere. Men det er verdt å merke seg at et tykkere lag rundt kroppen vil kunne være positivt i distribusjonen av ulike brunpølseprodukter [12].

Det er observert at brunpølsen vokser raskest når tilgangen til fytoplankton er størst. Dette skjer i tidsrommet fra april til mai [13, 14].



**Figur 2-1:** Brunpølse (*Cucumaria frondosa*)



**Figur 2-2:** Brunpølser etter sløyting

## 2.2 Lipider

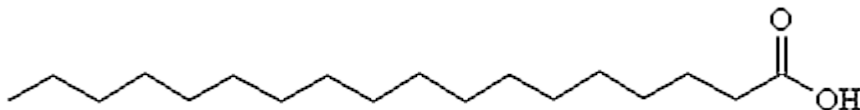
Lipider er en fellesbetegnelse på forbindelser som inndeles i fosfolipider, mono-, di-, og triglyserider, steroler og voks. Typisk for disse forbindelsene er deres lave løselighet i vann. Steroler og fosfolipider er typiske bestanddeler i biologiske membraner, mens nøytralt fett er en viktig energikilde for mange organismer. Noen lipider fungerer også som emulgatorer, intracellulære signaloverførere, enzymatiske kofaktorer og hormoner [15].

### 2.2.1 Fettsyrer

Karakteristisk for fettsyrer er at de er bygd opp av karboksylsyre med hydrokarbonkjeder som har en lengde på 4 til 36 karbonatomer. I mat er fettsyrer med 14 til 22 karbonatomer mest vanlig. Fettsyrene kan enten være mettede (ingen dobbeltbindinger) eller umettede (én eller flere dobbeltbindinger). Noen få unntak har metylgrupper, 3-karbonringer eller hydroksylgrupper som forgreininger.

### 2.2.2 Mettede fettsyrer

Disse fettsyrene har generell formel  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , hvor n som oftest er et partall. Som oftest finnes de mest vanlige fettsyrene i området 12-24 karbonatomer.



**Figur 2-3:** Strukturformel av n-stearinsyre (C18:0)

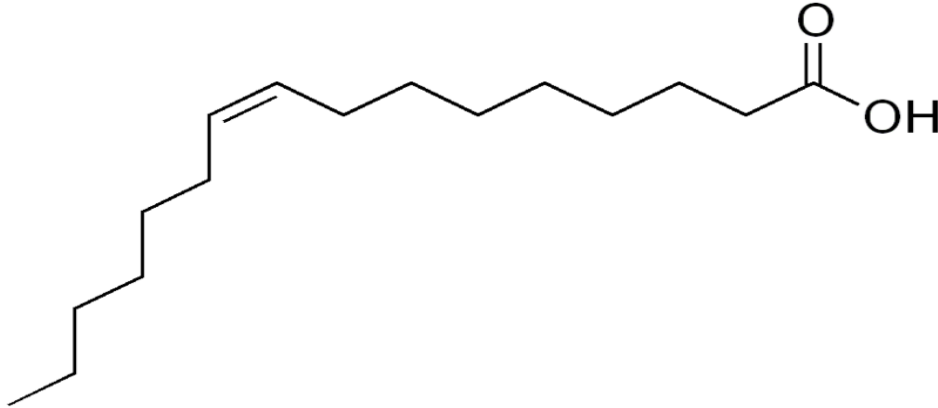
### 2.2.3 Umettede fettsyrer

Felles for disse fettsyrene er at de inneholder én eller flere dobbeltbindinger. Ved få unntak finnes det også trippelbindinger. Umettede fettsyrer kan deles inn i to underklasser:



- **Enumettede fettsyrer**

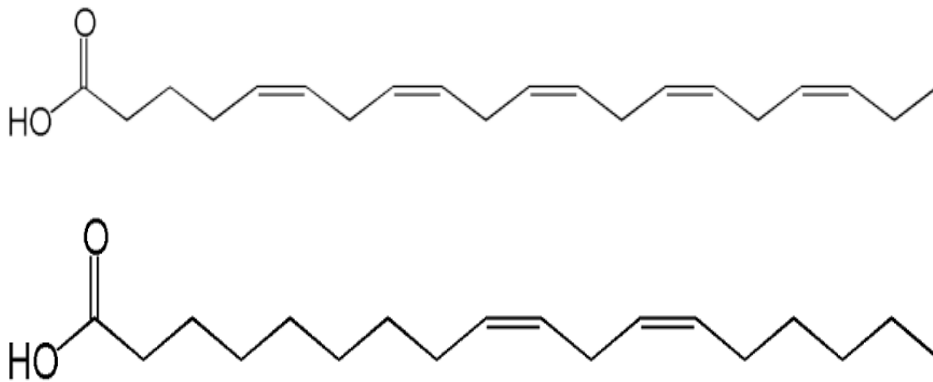
Generell formel er  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ . Antall karbonatomer er stort sett partall og den mest vanlige konfigurasjonen for naturlige, umettede fettsyrer er *cis*. Plasseringen av dobbeltbindingen i enumettede fettsyrer er typisk mellom karbon 9 og 10 fra karboksylgruppen.



**Figur 2-4:** Strukturformel av palmitolsyre (C16:1 n-7)

- **Flerumettede fettsyrer**

*cis*-konfigurasjonen går igjen også her, i tillegg til at dobbeltbindingene blir separert av en metylengruppe. To eksempler på flerumettede fettsyrer er eikosapentaensyre (20:5 n-3) og linolsyre (18:2 n-6). Typisk for disse fettsyrene er at dobbeltbindingene begynner på henholdsvis karbonatom tre eller seks fra metylendelen.



**Figur 2-5:** Strukturformel av eikosapentaensyre (20:5 n-3) og linolsyre (18:2 n-6).

#### 2.2.4 Nomenklatur

Nomenklaturen for fettsyrene er forholdsvis enkel; karbonkjeden og antallet dobbeltbindinger skiller med et kolon, slik at for eksempel stearinsyre, som har 18 karbonatomer og ingen dobbeltbindinger, skrives 18:0. For å indikere hvor en dobbeltbinding er plassert på karbonkjeden, merkes den med  $\Delta$  (delta), etterfulgt av hvilket karbonatom den er lokalisert etter. Et eksempel er arakidonsyre (20:4) som har dobbeltbindinger mellom karbonatomene 5 og 6, 8 og 9, 11 og 12 samt 14 og 15. Riktig måte å uttrykke denne på blir følgelig 20:4 ( $\Delta^{5, 8, 11, 14}$ ). Den trivielle metoden for å uttrykke hvor dobbeltbindingene er plassert, basere seg på å telle fra metylenden. I realiteten finner man riktig måte å vise plasseringen av dobbeltbindingen ved å ta antallet karbonatomer i fettsyren og trekke fra delta-verdien. En fettsyre som består av 16 karbonatomer og har én dobbeltbinding mellom karbonatom 9 og 10 fra karboksylenden, vil da uttrykkes som C16:1 n-7. De fysiske egenskapene bestemmes i all hovedsak av lengden på karbonkjeden og antallet dobbeltbindinger. Lengre karbonkjede og færre dobbeltbindinger, reduserer de polare egenskapene, i tillegg til en økning av smeltepunktet. Ernæringsmessig er antallet dobbeltbindinger og plasseringen av dem mest relevant.

#### 2.2.5 Acylglyseroler

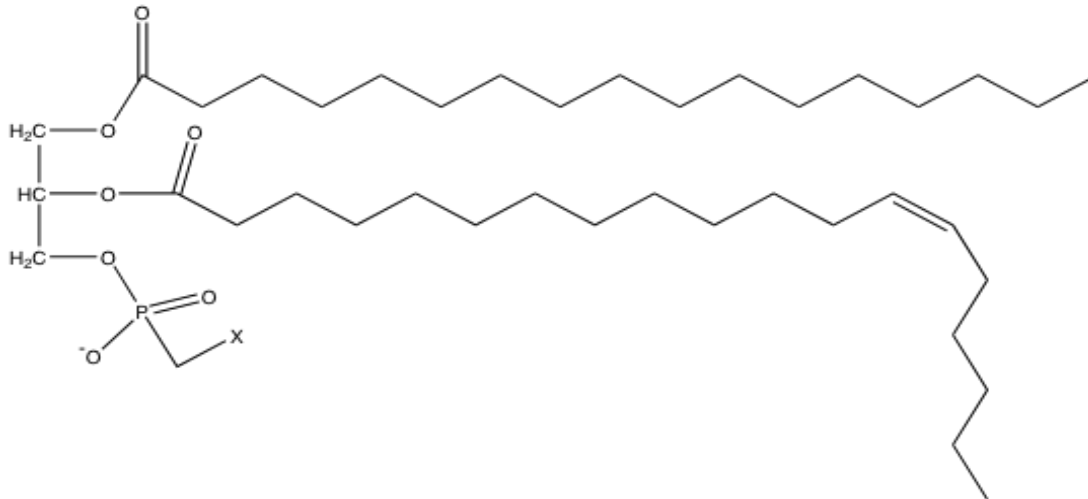
Disse lipidene består av mono-, di-, og tri-substituerte glyseroler. Mest vanlig triacylglyseroler, der fettsyrer er bundet ved hjelp av esterbindinger til hver sin hydroksylgruppe. Esterbindingene bidrar til deres upolare karakter. Triglyseridene fungerer som energilager. Ved energibehov frigjøres glyserol og fettsyrer fra fettvev ved hydrolyse av esterbindingene.

#### 2.2.6 Voksester

Voksester eller biologisk voks består av lange fettsyrer og alkoholer. Felles er at begge har lange karbonkjeder. Et kjennetegn for voks, er at de er meget vannavstøtende, noe som blant annet en del fugler utnytter for å holde fjørene beskyttet mot vann. Voks blir også brukt som energilager hos plankton. Voks er også mye utnyttet til bruk innen kosmetikk og farmasøytisk tilvirkning (kremer, salver etc.).

## 2.2.7 Fosfolipider

Fosfolipidene er delt i to grupper, svingofosfolipider og glyserofosfolipider. Forskjellen på disse to klassene er svingosin- og glyserolgruppen som utgjør alkoholdelen i de respektive klassene. Glyserofosfolipidene deles inn i klasser avhengig av hvilken gruppe som er bundet ved esterbinding til fosfatdelen. Innenfor hver klasse av fosfolipider har vi en rekke av typer som defineres av hvilke fettsyrer som er bundet til sn-1 og sn-2 posisjon.



**Figur 2-6:** Generell struktur av fosfolipider

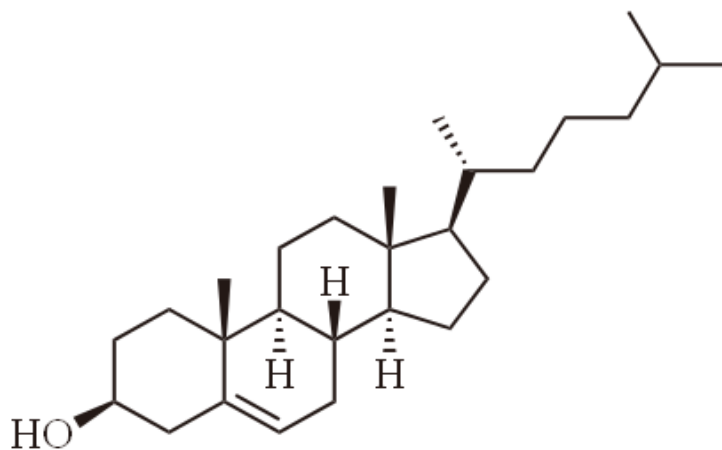
**Tabell 2-1:** Oversikt over noen klasser av fosfolipider

Navn på klasser	X	Struktur tilsvarende X	Netto ladning Ved pH = 7
Fosfatidinsyre	-	—H	-1
Fosfatidyletanolamin	Etanolamin	—CH <sub>2</sub> —CH <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>	0
Fosfatidylserin	Serin	—CH <sub>2</sub> —CH—NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>   COO <sup>-</sup>	-1
Fosfatidylglyserol	Glyserol	—CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub> —OH   OH	-1
Fosfatidylinositol	Inositol		0
Fosfatidylkolin	Kolin	—CH <sub>2</sub> —CH <sub>2</sub> —N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0

### 2.2.8 Steroler

Steroler er lipider som består av et rigid 4-ringsystem. På karbonatom 17 finner man ofte en alifatisk kjede. Sterolene finnes i de fleste eukaryote celler, men er stort sett fraværende hos bakterier. (Bakterier har dog lipider som har lignende egenskaper (hopanoider)) [16].

Kolesterol er den vanligste sterolen.



**Figur 2-7:** Struktur av kolesterol

Sterolene har egenskaper som gjør dem sentrale som forløpere til substanser med ulike biologiske funksjoner. Eksempelvis steroidhormoner og vitamin D.

## 2.3 Lipidekstraksjon

For å kunne gjøre analyser på lipider fra biologisk materiale, må det utføres væske-væske ekstraksjon. Prinsippet går ut på å bruke to ikke-blandbare løsemidler. Siden det er ønskelig å ekstrahere upolart stoff (lipider), er det naturlig å velge to løsemidler som har ulik vannløselighet. Ved å riste godt, vil lipidene føres over i den organiske fasen, mens mer polare stoffer vil føres over i den mer vannløselige fasen.

## 2.4 Rensing med fast-fase kolonner (SPE)

SPE (fast-fase kromatografi) er en nyttig metode for å rense ulike analytter fra hverandre og teknikken brukes for å rense og separere ulike lipidklasser. Siden det skal separeres lipider, er det

valgt å bruke normalfasekromatografi med en kolonne som har aminopropylgrupper som aktive grupper festet til sorbenten.



**Figur 2-8:** Aminopropyl som aktiv gruppe festet til silika

Normalfasekromatografi utnyttes ved at det oppstår polare interaksjoner mellom analytt og de funksjonelle gruppene på sorbenten. Dipolinteraksjoner og hydrogenbindinger avgjør graden av retensjon. Selve ekstraksjonsteknikken består av flere trinn; kondisjonering, påsetting av prøve, vask og eluering av ulike fraksjoner. Kondisjonering gjøres for å aktivere sorbenten. Prøven kan deretter settes på SPE-kolonnen. Analyttene i prøveløsningen vil da kunne oppnå god kontakt med de funksjonelle gruppene på overflaten. I påsetting av prøven vil analyttene fordele seg mellom sorbenten og løsningen. Målet er å få analyttene til å binde seg til sorbenten. Det er viktig å passe på at konsentrasjonen av analytter i prøveløsningen ikke blir for høy i forhold til kolonnens kapasitet. Det vil også oppnås god bindingsstyrke ved å bruke et løsemiddel med svak elueringsstyrke. Vasketrinnet har som formål å fjerne forurensninger fra prøven. Det brukes et løsemiddel med svakere elueringsstyrke enn det som er nødvendig for å eluere ut analyttene. Elueringen av ønsket analytt oppnås ved å bruke et løsemiddel som er i stand til å bryte interaksjoner mellom sorbent og analytt. Metoden som er brukt i oppgaven er basert på Kaluzny *et al.* [17], men med noen modifikasjoner.

## 2.5 GC-FID

Gasskromatografi går ut på å separere flyktige stoffer ved hjelp av analyttenes evne til å fordele seg mellom bæregassen og stasjonærfasen. En gasskromatograf består av en injektor, en kolonne og en detektor. I tillegg kreves det en bæregass (mobulfase) og trykkluft og hydrogen til FID (flammeionisasjonsdetektor). Vanlige bæregasser er H<sub>2</sub>, He og N<sub>2</sub>. (I analysene i denne oppgaven ble He brukt). Det er vanlig å bruke injeksjonsvolum mellom 0,5-2 µl. Splitt- eller splittløs injeksjon benyttes avhengig av mengden tilgjengelig analytt. Prinsippet for FID er at når organiske forbindelser brenner, så vil det dannes ioner. Ved å legge på et potensiale mellom en samlelektrode og brennerhodet, vil det oppstå en elektrisk strøm når det er ioner tilstede. I en ren

flamme av kun bæregass, luft og hydrogen dannes det ikke ioner. Strøm vil derfor kun registreres når de ulike analyttene elurerer ut av kolonnen og inn i detektoren.

## 2.6 TLC

Det ble brukt glassplater (10x10 cm) dekket med et tynt lag (0,1-0,2 mm) av silikapartikler. Aminopropylgruppene er kjemisk bundet til silanolgruppene på overflaten av silikapartiklene. I HPTLC brukes det små partikler (4-8  $\mu\text{m}$ ), noe som gir bedre separasjon og som gjør det lettere å detektere små mengder. Ved analyse settes det på en standard/referanse i tillegg til prøven(e) på en linje ca. 1 cm fra enden av platen før den settes i et kar med en mett atmosfære av mobilfase. Når mobilfasen har vandret til ca. 1 cm fra toppen av platen, tas den ut av mobilfasekaret. For å fremkalle flekken ble platene først sprayet med en kobbersulfatløsning og deretter varmet opp. De ulike forbindelsene kunne da ses som svarte flekker på platen. For at man skal kunne sannsynliggjøre en bestemt analytt i prøven, må den ha samme retensjonsfaktor som referansestandard. Dette kan gjøres ved å beregne analyttens retensjon. Retensjonsfaktoren ( $R_f$ ) er definert ved *flekkens avstand fra startlinjen/væskefrontens avstand fra startlinjen*. På grunn av silikaplatenes polare overflate, vil analytter med polare grupper retarderes mest og upolare analytter vil følgelig vandre lengst.

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Utstysrliste

#### Kjemikalier

##### Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland):

Dietyleter, Pro analyse (CAS 60-29-7)

Eddiksyre 100 %, Pro analyse (CAS 64-19-7)

Heptan, Pro analyse (CAS 142-82-5)

Kobber(II)sulfat-5-hydrat, Pro analyse (CAS 7758-99-8)

Natriumklorid, Pro analyse (CAS 7647-14-5)

Orto-Fosforsyre 85 %, Pro analyse (CAS 9066-91-5)

Svovelsyre 95-97 %, Pro analyse (CAS 7664-93-9)

##### Sigma-Aldrich Inc.(St.Luis, MO, USA):

Diklormetan, Pro analyse (CAS 75-09-2)

Metanol, Pro analyse (CAS 67-56-1)

##### VWR International, LLC (West Chester, PA, USA):

Kloroform, Pro analyse (CAS 67-66-3)

#### Standarder

Fettsyremetylesterstandardene som ble brukt til å identifisere fettsyrene i prøvene ble kjøpt fra Supelco (Bellafonte, PA, USA) og bestod av: 47033, PUFA No.1 (Marine source); 47015-U, PUFA No.2 (Animal source); 47085-U, PUFA No.3 (from menhaden oil); 1891-1 AMP; 1893-1 AMP; 1895-1 AMP; 1898-1 AMP, i tillegg til GLC-68 FAME mix; GLC-96 FAME mix; GLC-411 FAME mix kjøpt fra NuChek Prep. Inc. (Elysian, MN, USA).

Hvilke fettsyrer de ulike standardene inneholder, står beskrevet i tabell 3-2.

**Glassutstyr**

Kimax-rør

Pyrex-rør

Erlenmeyerkolber

Rundkolber

Begerglass

Engangspipetter

**Diverse**

Trakter

Filtrerpapir

Teflonrør

Eppendorfpipetter (ulike volum)/pipettespisser

**Frysetørking**

Vir-Tis Genesis 35EL (SP Industries, Gardiner, NY, USA)

**Rotavapor**

Heidolph Laborota 4000 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany)

**Vakuumpumpe**

Büchi Vacuum Controller B-721 (Büchi Labortechnik AG, Flaviil, Switzerland).

**Nitrogen-evaporator**

N-EVAP (Organomation Assoc. Inc., Berlin, Germany)

Nitrogen (N<sub>2</sub>) 5.0 Ultra (Yara Praxair AS, Oslo, Norge)

**TLC**

HPTLC silica gel 60, 10x10 cm fra Merck (Darmstadt, Tyskland)

Standarder; 16-0A og 18-5A, begge med konsentrasjon 10 mg/ml (NuChek Prep. Inc., Elysian, MN, USA)

**SPE**

Visiprep vakummanifold (Supelco, Bellafonte, PA, USA).

Kolonnene som ble brukt var Mega Bond Elut aminopropylsilyl (5 g) engangskolonner (Varian Inc. Middelburg, Nederland).



## GC

Type: Agilent 6890N .Bæregass: Helium 5.0 Ultra (Yara Praxair AS, Oslo, Norge). Injektor: 7683 B autoinjektor . Kolonne: Varian Select FAME. Programvare: ChemStation. Sprøyte: Hamilton 701 ASN 10 µl (Hamilton Company, Reno, NV, USA).

## 3.2 Metoder

### 3.2.1 Frysetørking

Frysetørkingen ble gjort med Vir-Tis Genesis 35EL frysetørker (SP Industries, Gardiner, NY, USA). Frysetørkingen av de sløyde sjøpølsene, som ikke ble kuttet opp, gikk over 5 døgn, mens den gikk over 2 døgn for de som ble kuttet opp i biter på ca. 2x2 cm.



**Figur 3-1:** Oppkuttete sjøpølser før frysetørking.

### 3.2.2 Ekstraksjon av fett

Lipidekstraksjonen i dette arbeidet er basert på en modifisert variant av Folch-metoden [18]. 0,2 g av frysetørket prøvemateriale ble veid inn i et teflonrør før DCM (diklormetan) og MeOH

(metanol) i forholdet 2:1 med et totalvolum på 20 ml ble tilsatt. Blandingen ble satt i en orbitalrister i ca. 30 min. Fast materiale ble filtrert vekk ved bruk av filter og trakt. Væsken ble samlet opp i en erlenmeyerkolbe. Væsken ble vasket med 4 ml 0,9 % NaCl-løsning før den ble ristet en kort stund før blandingen ble sentrifugert i 20 min. ved 2000 RPM for å oppnå god fase-separasjon. En glasspipette ble koblet til et vakuum som ble brukt til å suge av den øverste fasen. Den organiske fasen ble overført til en rundkolbe for avdamping av løsemidler ved bruk av rotavapor (100 mbar, 40 °C) Etter at inndamping var ferdig, ble det tilsatt 2,5 ml DCM/MeOH (2:1) til kolben. Dette ble så overført til rør med spiss bunn. Disse var veid på forhånd. Løsemidlene ble dampet av under nitrogen (N<sub>2</sub>) til rørene var helt tørre. Rørene ble veid og mengde ekstrahert fett ble beregnet. Fettet ble løst i DCM/MeOH (2:1) slik at den totale konsentrasjonen ble 10 mg/ml.

### **3.2.3 Fettsyresammensetning i totalt lipid**

Tillaging av FAME ble utført med utgangspunkt i Stoffel *et al* [19] med noen justeringer. 100 µl av prøven (ekstraherte lipider 10 mg/ml) ble blandet med 900 µl DCM og 2 ml 2 % svovelsyre i metanol i et Kimax-rør. Røret ble ristet godt før det ble satt til koking (ved 100 °C) i 1 time. Etter nedkjøling ble 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaCl tilsatt og røret ble godt ristet. Den øverste fasen ble pipettert av og dampet av for løsemidler under N<sub>2</sub> og løst i 100 µl heptan for analyse.

### **3.2.4 Fettsyresammensetning av hver SPE-fraksjon**

50 µl av hver av fraksjonene fra SPE (NL, PL, FFA) ble løst i 950 µl DCM og 2 ml 2 % svovelsyre i metanol i et Kimax-rør og ristet godt. Resten ble utført som beskrevet i 3.2.3.

### **3.2.5 GC**

Fettsyremetylester (FAME) standarder og FAME fra de ulike lipidfraksjonene ble løst i heptan. Et injeksjonsvolum på 1 µl ble brukt (splittløs injeksjon). Gasskromatograf, var en Agilent 6890N med 7683 B autoinjektor. Detektor var en flammeionisasjonsdetektor (FID). Helium ble brukt som bæregass. Det ble brukt en fused silica kapillarkolonne med en polar stasjonærfase (Varian Select FAME, 50 m x 0,25 mm indre diameter, 0,25 µm tykk). 240 °C ble brukt som injeksjonstemperatur og 255 °C ble brukt som deteksjonstemperatur.

Temperaturprogram for separasjonskolonnen var som vist i tabell 3-1.

**Tabell 3-1:** Temperaturprogram for separasjonskolonnen.

Tid (minutter)	Temperatur °C	Rate
0	50	
2	50	-
12	150	10
39,5	205	2
42,8	255	15
52,8	255	-
Etter 52,8 minutt var kolonneovnen programmert til å gå tilbake til 50 °C		

**Tabell 3-2:** Sammensetning av fettsyrer i FAME som ble brukt. X indikerer tilstedeværelse av fettsyre.

Fettsyrer	1891-1	1893-1	1895-1	1898-1	GLC-68	GLC-96	GLC-411	PUFA-1	PUFA-2	PUFA-3
8:0		X					X			
10:0		X					X			
12:0		X					X			
12:1							X			
13:0				X						
14:0		X		X	X	X	X	X	X	X
14:1					X		X			
15:0				X						
16:0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16:1 n-7					X	X	X	X	X	X
16:2 n-4										X
16:3 n-4										X
17:0				X		X				
18:0	X		X		X	X	X	X	X	X
18:1 n-12							X			
18:1 n-9	X				X	X	X	X	X	X
18:1 n-7					X		X	X	X	X
18:2 n-6	X				X		X	X	X	X
18:3 n-6							X		X	
18:3 n-4										X
18:3 n-3	X				X	X	X		X	X
18:4 n-3								X		X
20:0			X		X	X	X			
20:1 n-15							X			
20:1 n-12							X			
20:1 n-9							X	X	X	X
20:2 n-6					X	X	X			
20:3 n-6					X	X	X			
20:3 n-3					X		X			
20:4 n-6							X		X	X
20:4 n-3										X
20:5 n-3								X	X	X
22:0			X			X	X			
22:1 n-11								X		
22:1 n-9					X	X	X	X		
22:2							X			
22:5 n-3								X		X
22:4 n-6						X	X		X	
22:6 n-3					X	X	X	X	X	X
24:0						X	X			
24:1 n-9						X	X	X		

### 3.2.6 TLC

#### 3.2.6a Analyse av fettklasser i ekstraherte lipider

Mobilfase bestående av heptan:dietyleter:eddiksyre 70:30:1 (v/v/v) ble laget og overført til mobilfasekammer med lokk på. Løsningen ble stående en kort stund for å få en atmosfære mettet med mobilfase. 0,7 µl av fettklassestandard 16-0A, ekstraherte lipider (5 mg/ml), fraksjon A (nøytrale lipider), fraksjon B (polare lipider), fraksjon C (frie fettsyrer) og fettklassestandard 18-5A ble applisert 1 cm fra kanten på HPTLC-platen og satt i mobilfasekammeret. Platen ble tatt ut av kammeret da mobilfasen var ca. 1 cm fra toppen av platen. Videre ble den stående i avtrekkskap et par minutter for avdamping av løsemidler før den ble sprayet med 10 % kobbersulfat i 8 % fosforsyre som beskrevet i Vaghela & Kilara [20]. Etter 10 min ble den lagt i ovn for oppvarming til 180 °C. Platen ble tatt ut av ovnen da 180 °C var nådd.

#### 3.2.6b Testing av ulike konsentrasjoner av ekstraherte lipider

Mobilfase bestående av heptan:dietyleter:eddiksyre 70:30:1 (v/v/v) ble laget og overført til mobilfasekammer med lokk på. Løsningen ble stående en kort stund for å få en atmosfære mettet med mobilfase. Ekstraherte lipider (5 mg/ml) ble fortynnet 5 og 20 ganger i kloroform. 0,7 µl av fettklassestandard 16-0A, råolje (5 mg/ml), råolje (1 mg/ml), råolje (0,25 mg/ml) og fettklassestandard 18-5A ble applisert 1 cm fra kanten av HPTLC-platen og satt i mobilfasekammeret. Resten ble utført som beskrevet i 3.2.6a.

#### 3.2.6c Bestemmelse av fettklassefordeling

Mobilfase bestående av heptan:dietyleter:eddiksyre 70:30:1 (v/v/v) ble laget og overført til mobilfasekammer med lokk på. Løsningen ble stående en kort stund for å få en atmosfære mettet med mobilfase. Ekstraherte lipider ble fortynnet 5 og 20 ganger i kloroform. 0,7 µl ekstraherte lipider (5 mg/ml), tre paralleller av ekstraherte lipider (1 mg/ml) og tre paralleller ekstraherte lipider (0,25 mg/ml) ble applisert 1 cm fra kanten på HPTLC-platen og satt i mobilfasekammeret. Resten ble utført som beskrevet i 3.2.6a. For å bestemme fordelingen av de ulike fettklassene, ble tynnsljiktplaten skannet i en vanlig papirskanner. Videre ble flekkene markert manuelt ved bruk av dataprogrammet JustTLC 3.0 (Sweday, Lund, Sweden) slik at fordelingen ble bestemt.

### **3.2.6d Videre rensing av nøytrale lipider**

Mobilfase bestående av heptan:dietyleter:eddiksyre 70:30:1 (v/v/v) ble laget og overført til mobilfasekammer med lokk på. Løsningen ble stående en kort stund for å få en atmosfære mettet med mobilfase. 0,7 µl av fettklassestandard 16-0A, fraksjon A (nøytrale lipider (5 mg/ml)), fraksjon A (etter ny runde med SPE), fraksjon B (polare lipider), fraksjon C (frie fettsyrer) og fettklassestandard 18-5A ble applisert 1 cm fra kanten på HPTLC-platen og satt i mobilfasekammeret. Resten ble utført som beskrevet i 3.2.6a.

### **3.2.6e Kapasitetstesting av SPE-kolonnen**

Mobilfase bestående av heptan:dietyleter:eddiksyre 70:30:1 (v/v/v) ble laget og overført til mobilfasekammer med lokk på. Løsningen ble stående en kort stund for å få en atmosfære mettet med mobilfase. 0,7 µl av fettklassestandard 16-0A, ekstraherte lipider (fortynnet til 1 mg/ml før SPE), fraksjon A (nøytrale lipider), fraksjon B (polare lipider), fraksjon C (frie fettsyrer) og fettklassestandard 18-5A ble applisert 1 cm fra kanten på HPTLC-platen og satt i mobilfasekammeret. Resten ble utført som beskrevet i 3.2.6a.

### **3.2.6f Bekreftelse av innhold på påsettingspunktet**

Mobilfase bestående av heptan:dietyleter:eddiksyre 70:30:1 (v/v/v) ble laget og overført til mobilfasekammer med lokk på. Løsningen ble stående en kort stund for å få en atmosfære mettet med mobilfase. 0,7 µl ekstraherte lipider (5 mg/ml), fettsyrestandard 1895 og kloroform ble applisert 1 cm fra kanten på HPTLC-platen og satt i mobilfasekammeret. Resten ble utført som beskrevet i 3.2.6a.

### 3.2.7 SPE

Kolonnen (aminopropylsilyl 5 g) ble aktivert med 20 ml heptan før de ekstraherte lipidene (10 mg/ml), løst i et 1:1 volum med DCM:MeOH 2:1 (v/v), ble applisert med et volum på 1 ml. Etter at prøven hadde trukket inn i kolonnen, ble mobilfase A (20 ml kloroform:isopropanol 2:1 (v/v)) tilsatt litt etter litt. Den eluerte væsken (nøytrale lipider) ble samlet opp. Ca. 5 ml heptan ble brukt til å vaske kolonnen med før mobilfase B (20 ml metanol) ble tilsatt litt etter litt. Den eluerte væsken (polare lipider) ble samlet opp. Ca. 5 ml heptan ble brukt til å vaske kolonnen før mobilfase C (20 ml kloroform:isopropanol 2:1 (v/v) + 1 ml eddiksyre) ble tilsatt litt etter litt. Den eluerte væsken (frie fettsyrer) ble samlet opp. De oppsamlede fasene ble dampet av for løsemidler ved bruk av rotavapor (med vakuum) før hver av prøvene ble løst i 0,5 ml kloroform for videre analyse på TLC.

#### Videre rensing av fraksjon A

Oppsamlet fett fra fraksjon A (løst i 0,5 ml kloroform) ble dampet av for kloroform ved hjelp av N<sub>2</sub>. DCM:MeOH 2:1 (v/v) ble tilsatt det tørkede fett tilsvarende volum 1:1. Kolonnen ble aktivert med 20 ml heptan før prøven ble applisert. Etter at prøven hadde trukket inn i kolonnen, ble mobilfase A (20 ml kloroform:isopropanol 2:1 (v/v)) tilsatt litt etter litt. Den eluerte væsken ble samlet opp. Ca. 5 ml heptan ble brukt til å vaske kolonnen med før mobilfase B (20 ml metanol) ble tilsatt litt etter litt. Den eluerte væsken ble samlet opp. Ca. 5 ml heptan ble brukt til å vaske kolonnen før mobilfase C (20 ml kloroform:isopropanol 2:1 (v/v) + 1 ml eddiksyre) ble tilsatt litt etter litt. Den eluerte væsken ble samlet opp. De oppsamlede fasene ble dampet av for løsemidler ved bruk av rotavapor (med vakuum) før hver av prøvene ble løst i 0,1 ml kloroform for videre analyse på TLC.

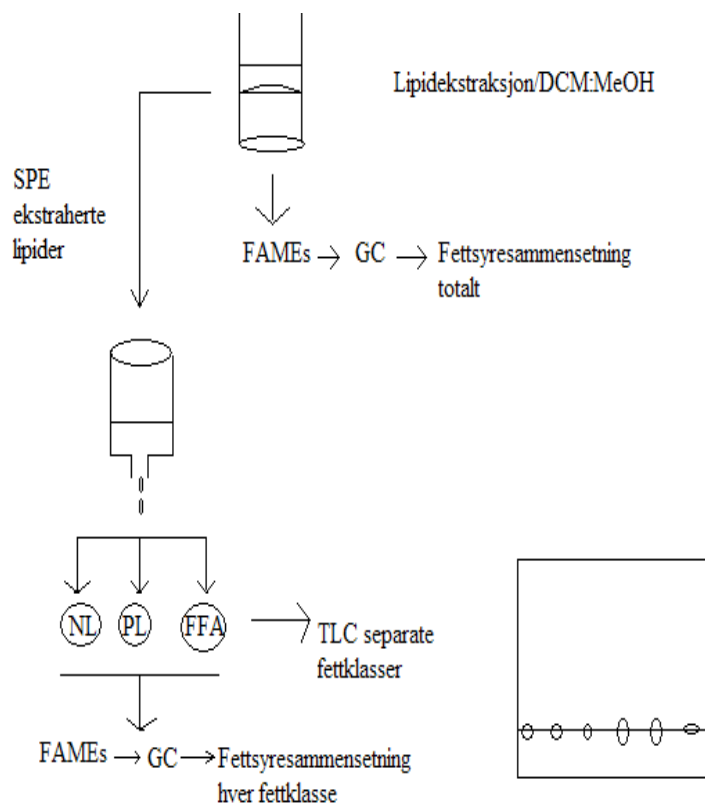
**Tabell 3-3:** Mobilfaser brukt til eluering av nøytrale lipider (NL), polare lipider (PL) og frie fettsyrer (FFA).

	Elueringsmiddel	Volum (ml)	Lipidklasser eluert
A	Kloroform:isopropanol 2:1 (v/v)	20	NL
B	Metanol	20	PL
C	Kloroform:isopropanol 2:1 (v/v) + 5 % eddiksyre	21	FFA



**Figur 3-2:** Instrumentering for separasjon med SPE.

### Flytskjema for separasjon av fettklasser ved hjelp av SPE





## 4 Resultater

### 4.1 Tørrstoff og fettinnhold

Sløyd brunpølse (n=7) hadde et gjennomsnittlig tørrstoffinnhold på  $14,8 \pm 2,7$  % og et fettinnhold på tørrstoffbasis lik  $3,7 \pm 0,6$  %.

Tørrstoff og fettinnhold i % av sløyd brunpølse er vist i tabell 4-1.

**Tabell 4-1:** Tørrstoff (%) og fettinnhold (%) basert på tørrvekt (n=7)

	S.P. 1	S.P. 2	S.P. 3	S.P. 4*	S.P. 5*	S.P. 6*	S.P. 7*	Gj. snitt med st.avvik
Tørrstoff (%)	11,9	12,4	11,8	16,3	16,4	15,8	18,7	$14,8 \pm 2,7$
Fettinnhold (%)	3,8	3,6	4,5	2,5	4,2	3,8	3,6	$3,7 \pm 0,6$

\*Disse sjøpølsene ble kuttet opp i små biter før frysetørking.

### 4.2 Total fettsyresammensetning

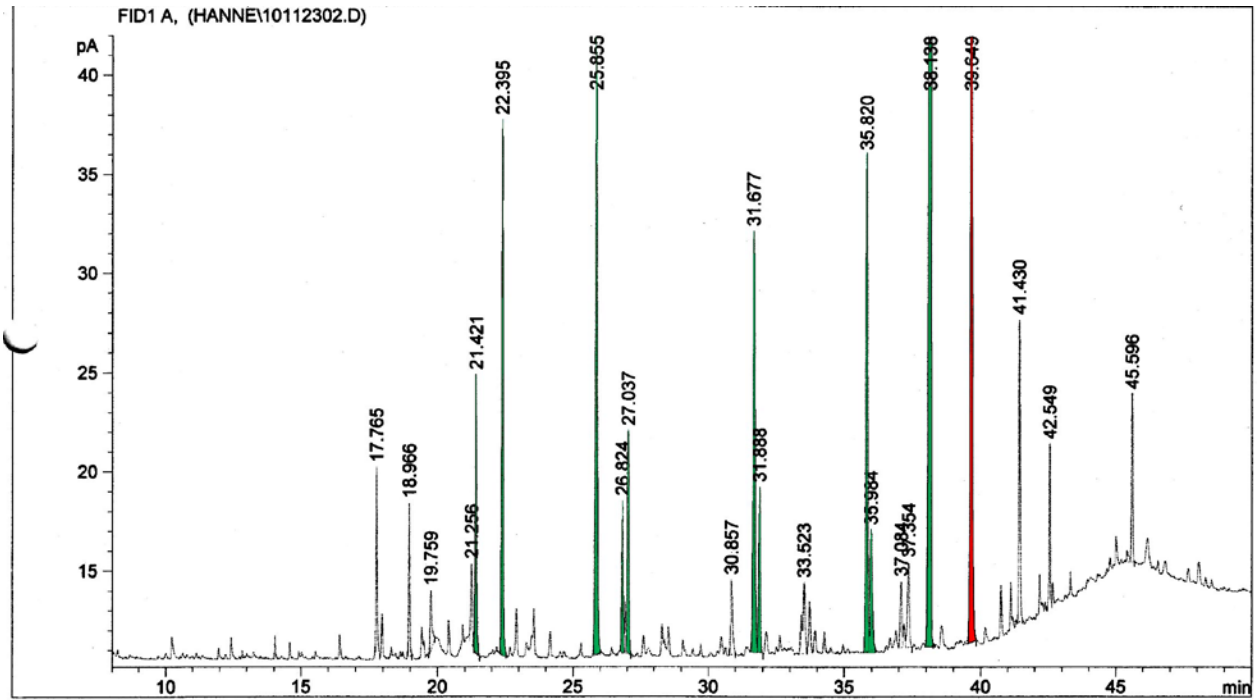
Analysene viste at de flerumettede fettsyrene utgjorde halvparten av den totale fettsyresammensetningen. Av de flerumettede fettsyrene var EPA (20:5 n-3) den mest dominerende med 32,7 % av total sammensetning. Mengden DHA (22:6 n-3) var lav i forhold til innhold i andre marine organismer med bare 1,5 %. Av de mettede fettsyrene var palmitinsyre (16:0) og stearinsyre (18:0) mest uttalt med henholdsvis 4,8 og 8,8 %. Andelen enumettede fettsyrer utgjorde omtrent en tredjedel av total sammensetning. Av de enumettede fettsyrene var palmitolsyre (16:1) og eikosensyre (20:1 n-12) mest representert med henholdsvis 6,0 og 6,4 %.

**Tabell 4-2:** Prosentvis fordeling av de ulike fettsyrene\* med standardavvik, total sammensetning (n=7)

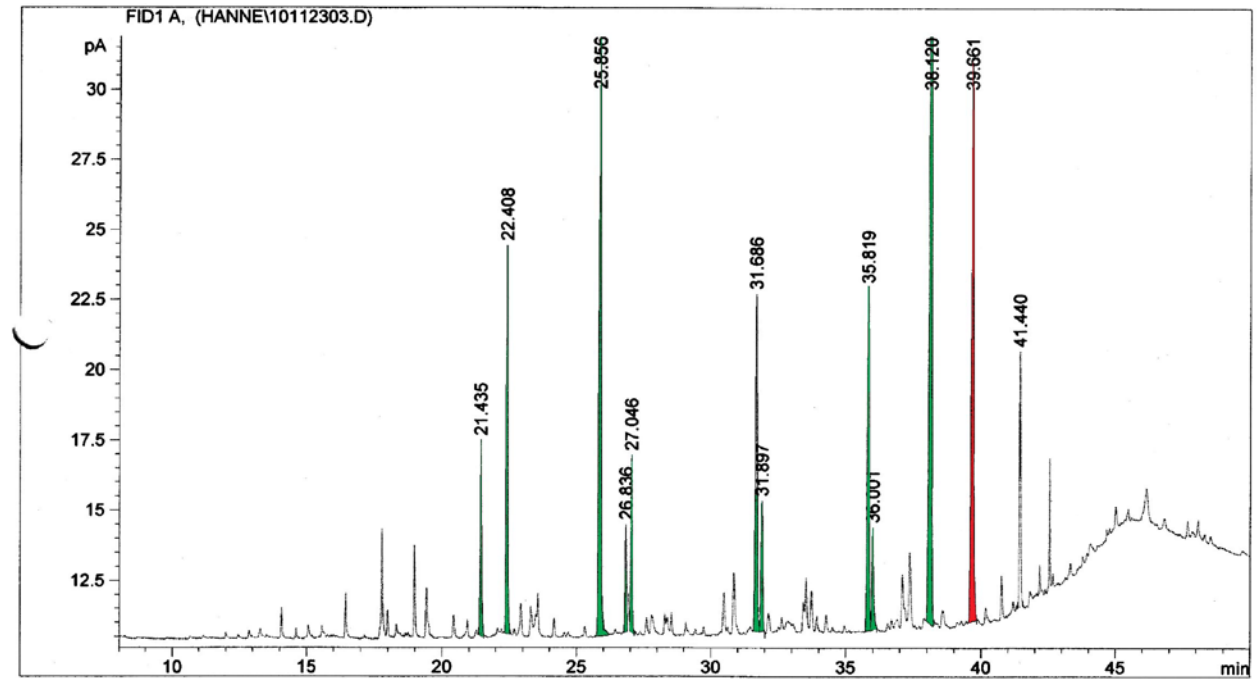
Fettsyrer	Fordeling	Systemisk navn	Trivialnavn
<b>Mettede</b>			
14:0	1,8 ± 0,9	n-Tetradekansyre	Myristinsyre
16:0	4,8 ± 1,8	n-Heksadekansyre	Palmitinsyre
18:0	8,8 ± 2,7	n-Oktadekansyre	Stearinsyre
20:0	1,2 ± 0,2	n-Eikosansyre	Arakinsyre
22:0	1,9 ± 0,4	n-Docosansyre	Beheinsyre
<b>Totalt mettede</b>	<b>18,5</b>		
<b>Enumettede</b>			
14:1	1,1 ± 0,7	<i>cis</i> -9-Tetradekensyre	Myristoleinsyre
16:1	6,0 ± 1,2	<i>cis</i> -9-Heksadekensyre	Palmitolsyre
18:1 n-9	4,9 ± 4,3	<i>cis</i> -9-Oktadekensyre	Oljesyre
18:1 n-7	2,7 ± 0,7	<i>cis</i> -11-Oktadekensyre	<i>cis</i> -Vaccensyre
20:1 n-12	6,4 ± 1,1	<i>cis</i> -8-Eikosensyre	
20:1 n-9	2,9 ± 0,6	<i>cis</i> -11-Eikosensyre	Gondoinsyre
24:1 n-9	3,4 ± 0,5	<i>cis</i> -15-Tetrakoensyre	Nevronsyre
<b>Totalt enumettede</b>	<b>27,4</b>		
<b>Flerumettede</b>			
18:2 n-6	2,4 ± 1,5	9,12-Oktadekadiensyre	Linolsyre
20:2 n-6	1,0 ± 0,5	11,14-Eikosadiensyre	
20:3 n-6	5,1 ± 1,8		
20:3 n-3	5,2 ± 1,0	8,11,14-Eikosatriensyre	Linolensyre
20:4 n-3	1,3 ± 1,2	5,8,11,14-Eikosatetraensyre	Arakidonsyre
20:5 n-3	<b>32,7 ± 4,9</b>	5,8,11,14,17-Eikosapentaensyre	(EPA)
22:6 n-3	1,5 ± 0,6	4,7,10,13,16,19-Docosaheksaensyre	(DHA)
<b>Totalt flerumettede</b>	<b>49,2</b>		
<b>Ikke identifiserte</b>	<b>4,9</b>		

\*Prosentvis fordeling er beregnet ut fra arealet under kromatografittoppene fra de enkelte fettsyrene og det er antatt at responsfaktoren for de enkelte fettsyremetylerne er rimelig like.

Figur 4-1 og 4-2 viser at fettsyresammensetningen er omtrent identisk mellom to parallelle prøver tatt fra samme individ. Signalene i grønt markerer et utvalg av identifiserte fettsyrer, mens signalet som er merket i rødt er ikke identifisert.

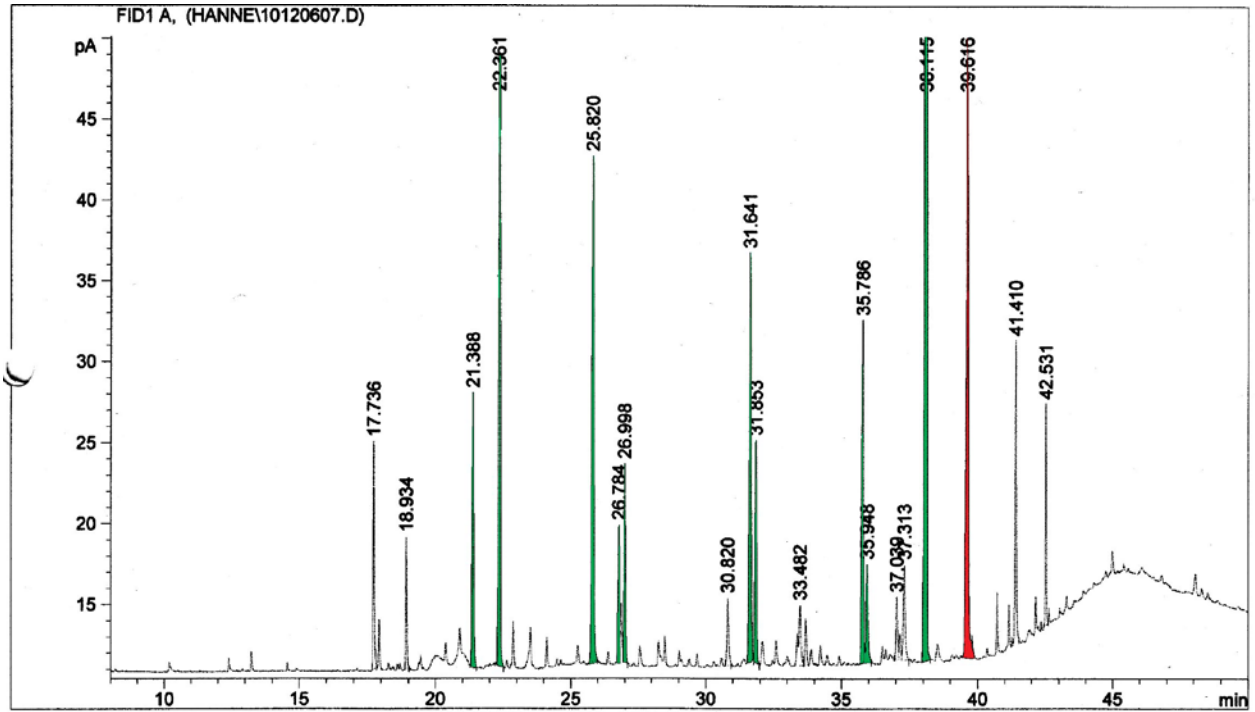


Figur 4-1: GC av sjøpølse 2, parallell A.



Figur 4-2: GC av sjøpølse 2, parallell B

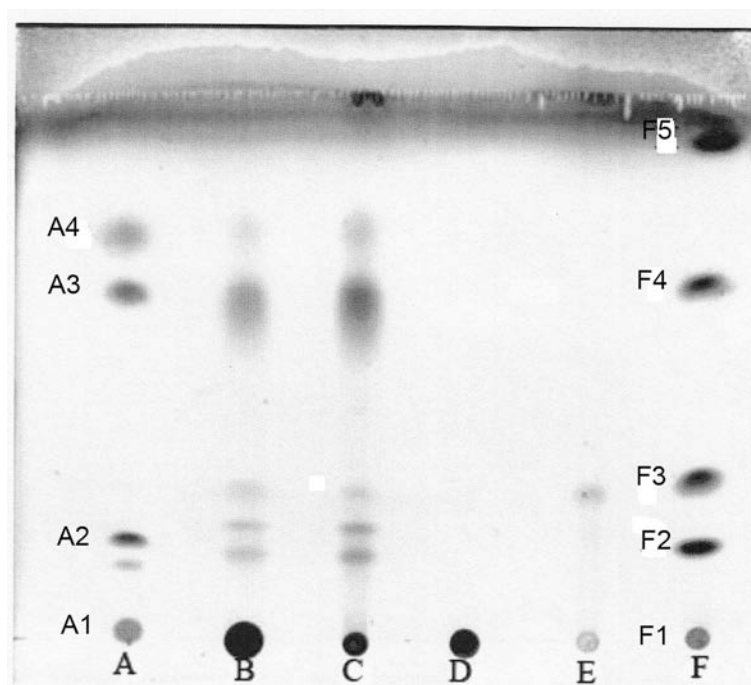
Figur 4-3 og 4-1 - 4-2 viser at fettsyrefordelingen er omtrent identisk mellom ulike individer. Signalene i grønt markerer et utvalg av identifiserte fettsyrer, mens signalet i rødt er ikke identifisert.



Figur 4-3: GC av sjøpølse 6, parallell A.

### 4.3 Analyse av fettklasser i ekstraherte lipider

Etter å ha ekstrahert lipider fra sjøpølsene, ble den videre rensset ved SPE med elueringsmidlene slik det står beskrevet i tabell 3-3. Av TLC er det tydelig å se at ekstrahert lipidblanding (B) er kraftig markert i påsettingspunktet, noe som kan tyde på høyt innhold av polare lipider. Det er også mulig å anslå at den inneholder noe kolesterol og diacylglyseroler (F2), triacylglyserider og nøytrale fettklasser (A4). Flekken som indikerer frie fettsyrer (F3) er svak, noe som kan tyde på et lavt innhold. Rensingen av de polare lipidene ser tilfredsstillende ut siden spor D er markant, og at det ikke er flekker i samme spor oppover platen.



**Figur 4-4:** A= fettklassestandard 16-0Å som inneholdt nøytrale fettklasser med palmitinsyre: monopalmitin (A1), dipalmitin (A2), tripalmitin (A3) og metylpalmitat (A4). B= originalolje fortynnet til 5 mg/ml i DCM:MeOH 2:1 (v/v), C= nøytrale lipider, D= polare lipider, E= frie fettsyrer, F= fettklassestandard 18-5A som var en blanding av polare og upolare fettklasser med oljesyre: lecithin (F1), kolesterol (F2), oljesyre (F3), triolein (F4) og kolesteryloleat (F5).

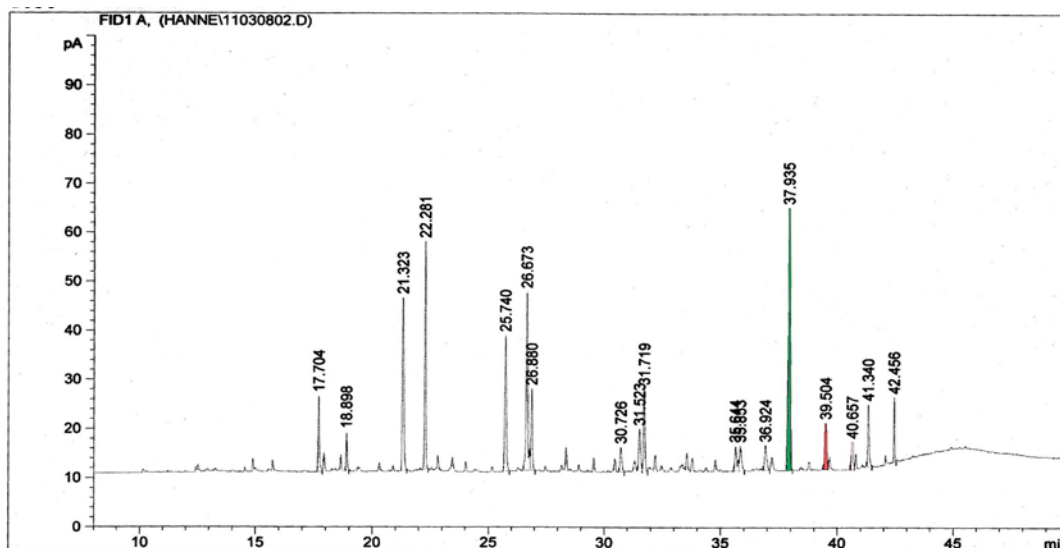
#### 4.4 Fettsyresammensetning av de ulike fraksjonene etter rensing med SPE

Etter å ha rensset lipidblandingen med SPE, viste analysene at EPA (20:5 n-3) utgjorde 70 % av den polare fraksjonen, mens den bare utgjorde om lag 11 % i de nøytrale lipidene. Andre fettsyrer som var mest uttrykt i fraksjonen med de nøytrale lipidene var palmitolsyre (16:1) med 14,2 % og linolensyre (20:3 n-3) med 14,3 %. De dominerende fettsyrene i fraksjonen med frie fettsyrer var palmitinsyre (16:0) og stearinsyre (18:0) med henholdsvis 26,8 og 29,4 %.

**Tabell 4-3:** Prosentvis fordeling av de ulike fettsyrene i fraksjon A, B og C. (n=2)

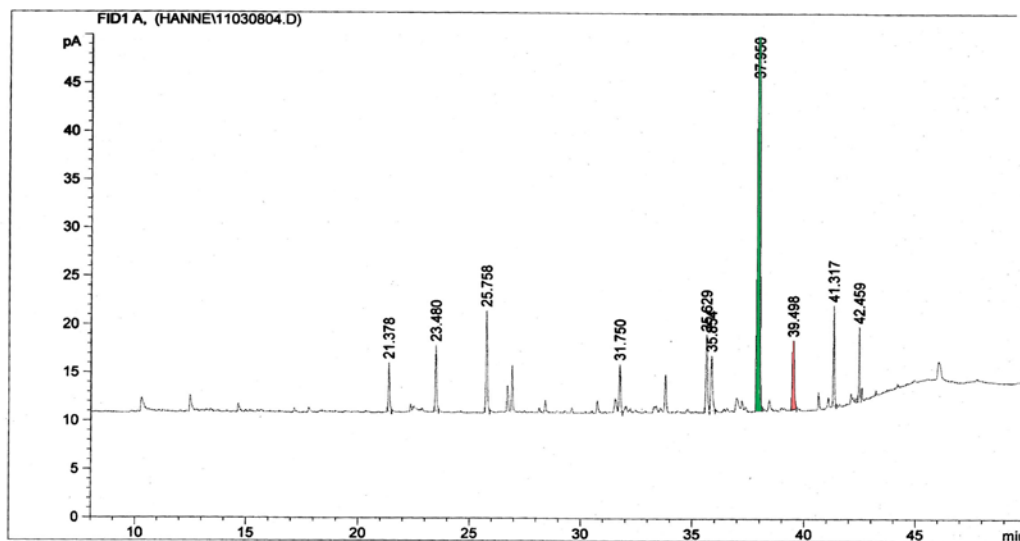
<b>Fettsyrer</b>	<b>Nøytrale lipider</b>	<b>Polare lipider</b>	<b>Frie fettsyrer</b>
<b>Mettede</b>			
14:0	3,9		
16:0	9,7	2,5	26,8
18:0	9,6	6,0	29,4
20:0	2,5		
22:0		4,1	
<b>Totalt mettede</b>	<b>25,7</b>	<b>12,6</b>	<b>56,2</b>
<b>Enumettede</b>			
14:1	2,3		
16:1	14,2		
18:1 n-9	9,3		
18:1 n-7	5,2		
20:1 n-12	4,2		
20:1 n-9	3,7	2,5	
24:1	3,8	5,1	
<b>Totalt enumettede</b>	<b>42,7</b>	<b>7,6</b>	
<b>Flerumettede</b>			
20:3 n-3	14,3	4,6	
20:4 n-3	3,4		
20:5 n-3	10,9	<b>70,1</b>	
22:6 n-3	2,2	2,5	
<b>Totalt flerumettede</b>	<b>30,8</b>	<b>77,2</b>	
<b>Ikke identifiserte</b>	<b>0,8</b>	<b>2,6</b>	<b>43,8</b>

Signalet som er uthevet i grønt, viser EPA (20:5 n-3), mens signalet i rødt viser den uidentifiserte fettsyren.



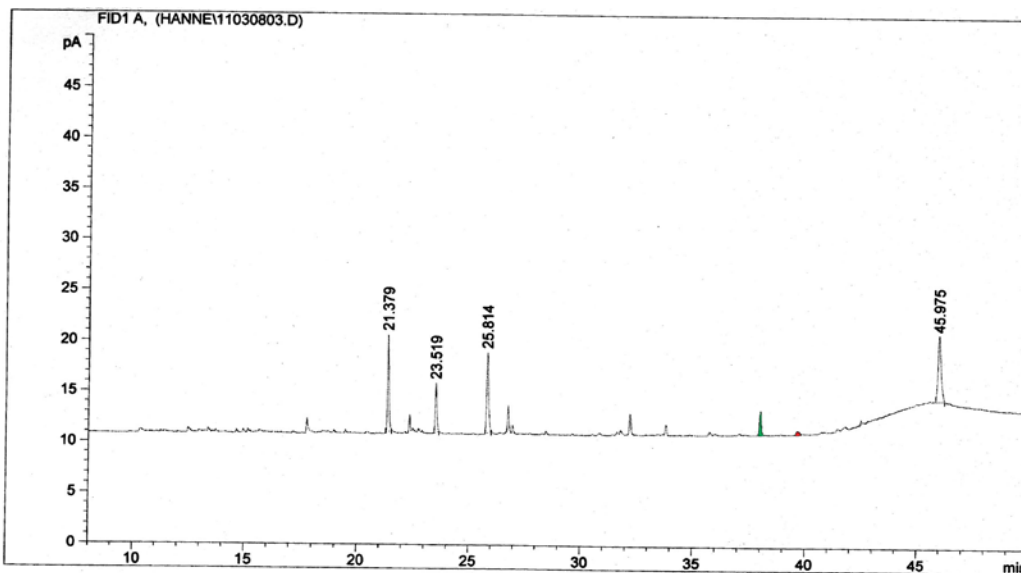
Figur 4-5: GC av fraksjon A (nøytrale lipider) fra sjøpølse 5.

Signalet i grønt viser hvor markant EPA (20:5 n-3) er tilstede i den polare fraksjonen. Kromatogrammet viser også at fettsyrefordelingen er forandret i forhold til den nøytrale fraksjonen (fig. 4-5).



Figur 4-6: GC av fraksjon B (polare lipider) fra sjøpølse 5.

Det svake signalet som er merket i grønt, er mest sannsynlig EPA (20:5 n-3). Her ser man at fettsyren har en minimal tilstedeværelse i denne fraksjonen. I tillegg viser kromatogrammet at det er få andre fettsyrer som er tilstede sammenliknet med fig. 4-5 og 4-6.

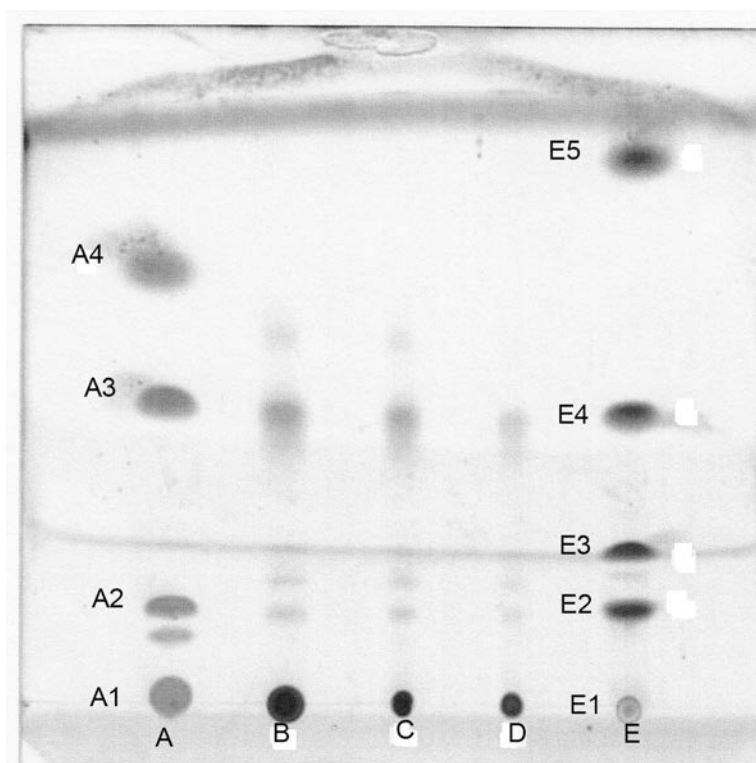


**Figur 4-7:** GC av fraksjon C (frie fettsyrer) fra sjøpølse 5.



## 4.5 Testing av ulike konsentrasjoner av ekstrahert lipidblanding

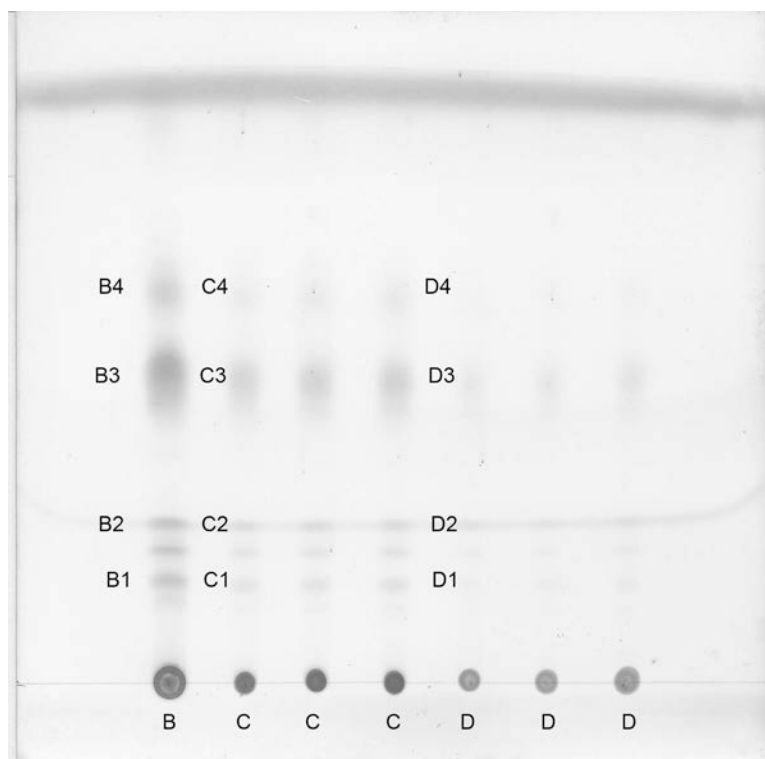
Intensjonen med å prøve ut forskjellige konsentrasjoner av ekstrahert lipidblanding, var å se om flekken for polare lipider ble relativt mindre intens ved lavere konsentrasjoner, og for derved å kunne velge beste konsentrasjon for å anslå prosentvis fettklassefordeling. Det ble påsatt lipidblanding i konsentrasjonene 5, 1 og 0,25 mg/ml. Intensiteten av flekkene ble svakere med avtagende konsentrasjoner.



**Figur 4-8:** A= fettklassestandard 16-0A som inneholdt nøytrale fettklasser med palmitinsyre: monopalmitin (A1), dipalmitin (A2), tripalmitin (A3) og metylpalmitat (A4). B= lipidblanding fortynnet til 5 mg/ml i DCM:MeOH 2:1 (v/v), C= lipidblanding fortynnet 5 ganger i kloroform, D= lipidblanding fortynnet 20 ganger i kloroform, E= fettklassestandard 18-5A som var en blanding av polare og upolare fettklasser med oljesyre: lecithin (E1), kolesterol (E2), oljesyre (E3), triolein (E4) og kolesteryloleat (E5).

## 4.6 Bestemmelse av fettklassefordeling

Ekstrahert fett ble analysert for å finne hvilke fettklasser som var tilstede i prøven. Analysen viste at det ble målt litt forskjellig fordeling av lipidklasser avhengig av hvilke konsentrasjoner prøven bestod av. Likevel er det snakk om så små forskjeller at det sannsynligvis ikke er signifikant forskjell. De det var mest forskjell mellom, var polare lipider og metylerte fettsyrer. De mest markante fettklassene var polare lipider, metylerte fettsyrer og frie fettsyrer som til sammen sto for omtrent 80 % av total fettklassefordeling. (Tabell 4-4, 4-5 og 4-6). I spor B1, C1 og D1 kan det se ut som det er to separate flekker, men de ble tatt med i beregningen som om det var én flekk (kolesterol). Det samme gjelder for B2, C2 og D2 (frie fettsyrer).



**Figur 4-9:** TLC av ekstrahert lipidblanding fortynnet til 5 mg/ml i DCM:MeOH 2:1 (v/v) (B), lipidblanding fortynnet 5 ganger i kloroform (C) og lipidblanding fortynnet 20 ganger i kloroform (D).

**Tabell 4-4:** Fordeling av lipidklasser basert på måling av flekkene på TLC, ekstraherte lipider

---

<u>Lipidklasser</u>	<u>Fordeling</u>
Polare lipider (B)	27 %
Kolesterol (B1)	13 %
Frie fettsyrer (B2)	17 %
Triacylglyserider (B3)	11 %
Metylte fettsyrer (B4)	32 %

---

**Tabell 4-5:** Fordeling av lipidklasser basert på måling av flekkene på TLC, 5 ganger fortynnet (n=3)

---

<u>Lipidklasser</u>	<u>Fordeling</u>
Polare lipider (C)	30 %
Kolesterol (C1)	12 %
Frie fettsyrer (C2)	18 %
Triacylglyserider (C3)	9 %
Metylte fettsyrer (C4)	31 %

---

**Tabell 4-6:** Fordeling av lipidklasser basert på måling av flekkene på TLC, 20 ganger fortynnet (n=3)

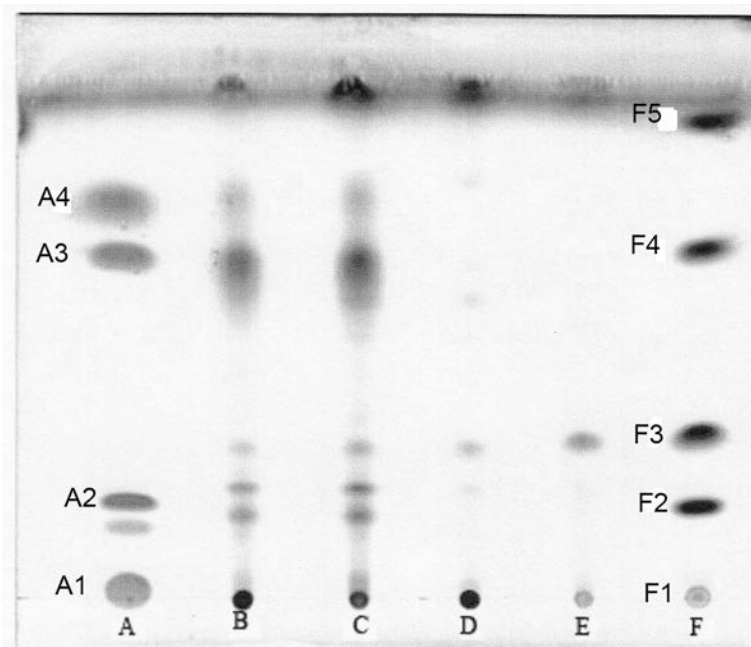
---

<u>Lipidklasser</u>	<u>Fordeling</u>
Polare lipider (D)	39 %
Kolesterol (D1)	13 %
Frie fettsyrer (D2)	21 %
Triacylglyserider (D3)	7 %
Metylte fettsyrer (D4)	20 %

---

## 4.7 Videre rensing av fraksjon A (nøytrale lipider)

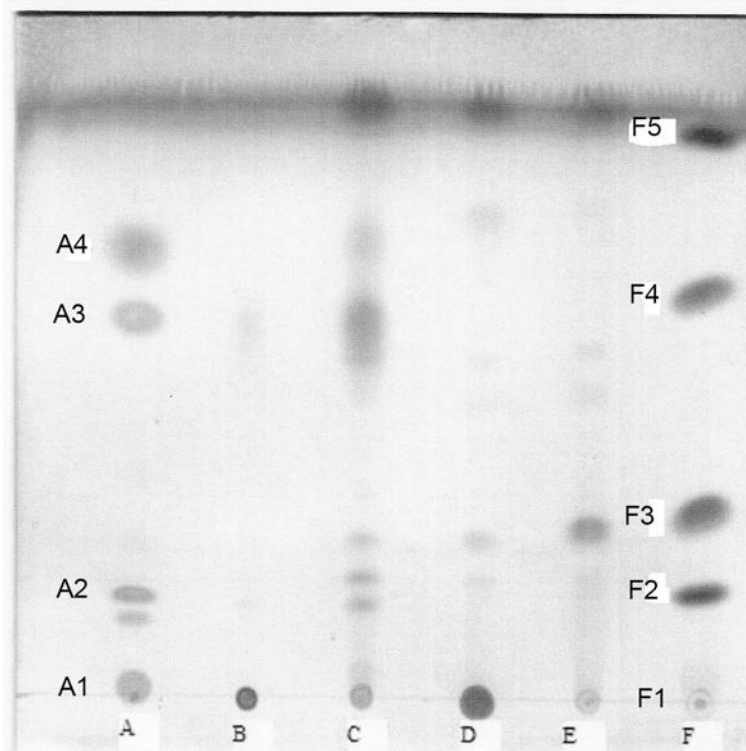
Den nye A-fraksjonen (nøytrale lipider), spor C, har blitt litt svakere i forhold til opprinnelig fraksjon, spor B. Dette kan indikere mindre innhold av polare lipider. Ellers er flekkene oppover platen så godt som uforandret. De polare lipidene (D) har fått en forurensning i form av frie fettsyrer, i tillegg til at det kan se ut som det er spor av TAG og voksesterer. De frie fettsyrene (E) ser ut til, med unntak av de polare lipidene som har blitt påvist tidligere, og ikke ha spor av andre forbindelser.



**Figur 4-10:** A= fettklassestandard 16-0A som inneholdt nøytrale fettklasser med palmitinsyre: monopalmitin (A1), dipalmitin (A2), tripalmitin (A3) og metylpalmitat (A4). B= opprinnelige nøytrale lipider, C= nye nøytrale lipider, D= polare lipider, E= frie fettsyrer, F= fettklassestandard 18-5A som var en blanding av polare og upolare fettklasser med oljesyre: lecithin (F1), kolesterol (F2), oljesyre (F3), triolein (F4) og kolesterylleat (F5).

## 4.8 Kapasitetstesting av SPE-kolonnen

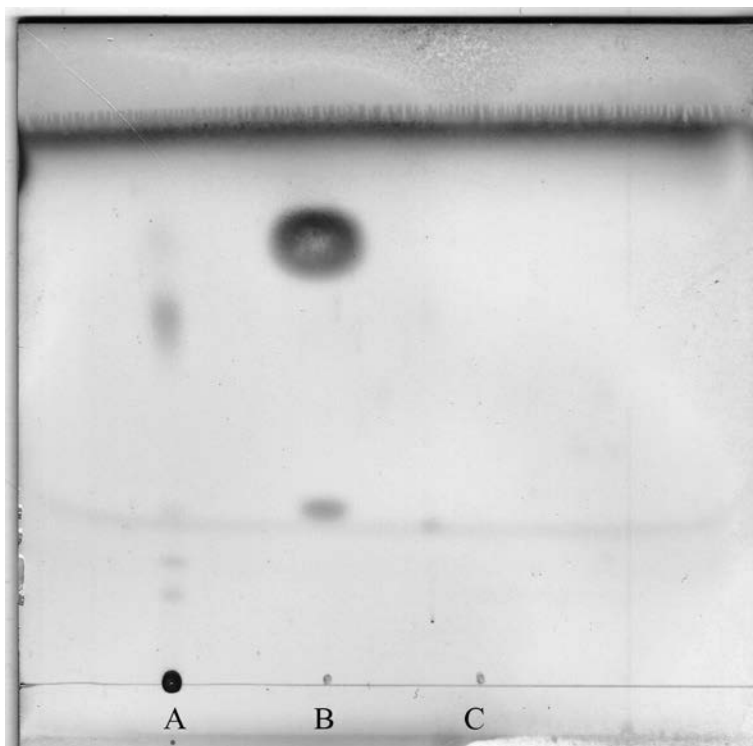
Etter å ha brukt ekstrahert lipidblanding med konsentrasjon 1 mg/ml i SPE, er det tydelig at sporene på lipidblandingen (B) er svakere enn det de har vært ved høyere konsentrasjon. Det er likevel tydelig å se at det er tilstedeværelse av polare lipider, siden spor (B) fremdeles er relativt mørk. De nøytrale lipidene (C) har den samme strukturen som ved de andre analysene (fig. 4-4/4-10). De polare lipidene (D) inneholder forurensninger av frie fettsyrer, noe som også viste seg gjeldende i den videre rensingen av de nøytrale lipidene (fig. 4-10).



**Figur 4-11:** A= fettklassestandard 16-0A som inneholdt nøytrale fettklasser med palmitinsyre: monopalmitin (A1), dipalmitin (A2), tripalmitin (A3) og metylpalmitat (A4). B= lipidblanding 1 mg/ml, C= nøytrale lipider, D= polare lipider, E= frie fettsyrer, F= fettklassestandard 18-5A som var en blanding av polare og upolare fettklasser med oljesyre: lecithin (F1), kolesterol (F2), oljesyre (F3), triolein (F4) og kolesteryloleat (F5).

## 4.9 Bekreftelse av innhold i påsettingspunktet

For å utelukke eventuelle muligheter for at startflekkene kunne inneholde løsemiddel eller annet fett som igjen kunne være med på å påvirke resultatene i fettclassesammensetningen, ble det påsatt råolje (A), fettsyrestandard (B) og ren kloroform (C) for å bekrefte dette. Av bildet kan man se at verken fettsyrestandarden eller kloroform gir noe som helst utslag på linjen. (De to flekkene på startlinjen viser bare blyantmerkingen).



**Figur 4-12:** Ekstraherte lipider fortynnet til 5 mg/ml i DCM:MeOH 2:1 (v/v) (A), fettsyrestandard 1895-1 (B) og kloroform (C).

## 5 Diskusjon

Det anbefales å spise sjømat. En hovedårsak er at slik mat inneholder langkjedede omega-3 fettsyrer som er blitt dokumentert å ha positive helseeffekter, spesielt hjerte-kar systemet [6, 21, 22]. Sjømat er etterspurte produkter i hele verden. Mengden vill fisk som man kan fange i verdenshavene kan ikke økes mer [23]. Den økte etterspørselen har i stor grad blitt tilfredsstilt gjennom oppdrett. Like viktig er det å kartlegge muligheten for å høste på ikke-utnyttede ressurser i havet. En slik ressurs er sjøpølser som har blitt undersøkt i denne oppgaven.

Sjøpølsene ble høstet i slutten av oktober og i midten av november. Av dette kommer det fram av analysene hvordan fettsyresammensetningen er for denne tiden av året. Det skulle være sannsynlig å anta at fettinnholdet varierer med årstiden, men at dette er noe som jeg ikke har kunnskap om, annet enn at de inntar mest næring i perioden april-mai [13, 14].

Til å begynne med, ble det forsøkt å frysetørke hele, sløyde sjøpølser. Selve frysetørkingen gikk etter planen, men det oppstod vanskeligheter da de skulle homogeniseres. Et nærmest steinhardt materiale gjorde det umulig å bruke noen av de apparatene som vanligvis ble brukt til lignende formål. Dette kan forklares med et høyt innhold av kollagen og tensilin. Tensilin gjør at hudlaget blir stivere ved at den kryssbinder med kollagen fibrer [24-26]. Ved bruk av hammer og handmakt, ble materialet brutt opp i mindre biter som videre ble brukt til lipidekstraksjon. Neste gang ble sjøpølsene kuttet opp i små biter med kniv før frysetørking. Det tørkede materialet ble deretter malt opp ved bruk av en mekanisk kvern slik at det ble pulverisert. Dette ga følgelig en mer homogen blanding av prøvematerialet.

Bestemmelse av fett ble gjort med en modifisert Folch-metode [18]. Dette ble gjort av hensyn til helse, miljø og sikkerhet, i form av å bytte ut kloroform med diklormetan. Det andre som ble gjort, var at 0,2 g frysetørket prøvemateriale ble brukt i stedet for 1 g. Dette ble gjort for å prøve å få mest mulig fett ekstrahert ut av prøvematerialet. Tidligere erfaringer hadde vist at denne måten var mer effektiv. Den siste forandringen var å bruke 2,5 ml DCM:MeOH 2:1 (v/v) i stedet for 5 ml heptan før beregning av mengde ekstrahert fett. Årsaken til dette var at det var mye polart fett i prøvene, og siden heptan er upolart, ville det være naturlig å anta at mer polart fett ble løst i en blanding av DCM:MeOH enn det ville ha blitt i heptan.

Innledningsvis ble tørrstoff og fettinnhold i sløyd brunpølse analysert og beregnet. Tørrstoffinnholdet er litt lavere enn det man finner i fiskemuskel. Resultatet fra bestemmelse av fettinnhold betyr at 100 g sjøpølse gir 0,5 g fett. Dette er omtrent det samme innholdet som man finner hos torsk som blir betegnet som en mager fisk. Næringsverdien av fett er avhengig av fettsyresammensetningen.

Fettsyresammensetningen i totalt ekstrahert lipid viste at EPA utgjorde om lag en tredjedel. Andelen flerumettede fettsyrer var omtrent 50 %, noe som er vanlig i marine organismer. Det er interessant å se hvor lite DHA utgjør av fettsyresammensetningen. Vanligvis er denne fettsyren representert i større grad i andre marine organismer. Det som kommer tydelig fram av GC-analysene, er at fettsyresammensetningen er så godt som lik mellom parallellene fra samme individ. Siden de ulike parallellene viser bortimot den samme fettsyresammensetningen, kan man på et godt grunnlag si at dette er den konkrete fettsyresammensetningen i dette individet. Videre så viser sammenlikninger mellom to individer at fettsyresammensetningen også her er så godt som den samme. Etter å ha kjørt mange forskjellige fettsyremetylerstandarder og videre ha sammenlignet retensjonstidene med retensjonstidene til prøvene til å bekrefte fettsyrene i de forskjellige prøvene, var det likevel noen topper som ikke kunne identifiseres. Det er en mulighet for at disse kan være fettsyrer, men noen av disse toppene utgjør dog en mindre andel totalt sett, så det er ikke dermed sikkert at de er av den store betydningen. Derimot så er toppen som kommer rett etter EPA (markert i rødt) mer interessant siden den utgjør ca. 10 % av totalt fettsyreinhold. En antagelse muliggjør at det er 22:3. Grunnen til at det kan være denne fettsyren, er at kromatogrammet til fettsyrestandard GLC-411 viser en retensjonstid for 22:1 og 22:2 som gjør at de kommer ut før 22:4. Tiden mellom signalene til 22:1 og 22:2 er ca. 0,9 min. Mellom 22:2 og 22:4 er tiden ca. 2 min. Med disse tidsdifferansene skulle det være logisk at 22:3 ville ha kommet ut omtrent 1 min. etter 22:2 og 1 min før 22:4, noe som passer godt med retensjonstiden til toppen. En mulig årsak til at det kun er detektert fettsyrer fra C<sub>14</sub> og oppover, er at de kortkjedede fettsyrene dekomponerer under frysetørkingen.

Innholdet av lipidklasser ble analysert med HPTLC. Resultatene viste at polare lipider var den dominerende fettklassen. I tillegg var triacylglyserol, kolesterol og frie fettsyrer tilstede i mindre mengder. Andre ikke-identifiserte lipidklasser ble også påvist. Spesielt kan det nevnes at det synes som om fett ekstrahert fra brunpølsen inneholder metylerte fettsyrer. Innhold av metylerte



fettsyrer i biologisk fett i relativ mengde er imidlertid usikkert. Et høyt innhold av polare lipider (fosfolipider) er det man kan forvente av fettinnhold som ble funnet. Som nevnt tidligere, kan fettinnholdet være sesongavhengig og ved høyere fettinnhold vil først og fremst TAG eller andre nøytrale lipider (depotfett) dominere. Lipidklassene i det ekstraherte fettene ble forsøkt separert ved hjelp av SPE. Fokus var på nøytrale lipider, polare lipider og frie fettsyrer. Den dominerende mengden av polare lipider førte til at disse utgjorde en forurensning i de nøytrale lipidene. En måte å redusere dette problemet på, kunne ha vært å applisere mindre fett på SPE-kolonnen. Tilsvarende så man små mengder fosfolipider i frie fettsyre-fraksjonen. Dette kunne vært unngått ved å bruke et større elueringsvolum for fosfolipidene. Fraksjonen med fosfolipider var imidlertid tilsynelatende ren. Dette er ikke overraskende tatt i betraktning den relative mengden.

Analysene av fettsyresammensetningen i de ulike fraksjonene (NL, PL, FFA) viste at den var forskjellig i forhold til den totale fettsyresammensetningen. Den mest interessante observasjonen var å se hvordan fordelingen av EPA forandret seg. EPA utgjorde en stor andel av fettsyrene i den polare fraksjonen. Faktisk utgjør den bortimot det dobbelte i forhold til mengden i den totale fettsyresammensetningen. Dette er veldig interessant siden det er gunstig med et høyt innhold av omega-3 fettsyrer som nevnt tidligere.

Årsakene til at tillagingen av FAME av lipidene fra hver fraksjon etter SPE ble forskjellig fra den totale lipidsammensetningen, var på grunn av at hver fraksjon ble dampet av for løsemidler og deretter løst i 100 µl kloroform, i tillegg til at en liten mengde ble brukt til TLC og noe hadde dampet av ved overføring/åpning av glass. Dermed var det ikke 100 µl igjen til å bruke til metylering. Figur 4-7 viser svake signaler, noe som kan skyldes for lav konsentrasjon av prøven som ble injisert i gasskromatografen. En mulig løsning på dette, hadde vært å løse lipidene fra fraksjonen i en mindre mengde kloroform slik at konsentrasjonen hadde blitt høyere.

Det ble også gjort forsøk med å kvantifisere innholdet av lipidklasser i de ekstraherte lipidene fra brunpølsen. For å få et bedre beregningsgrunnlag for kvantifiseringen, ble det først testet ut ulike konsentrasjoner av de ekstraherte lipidene på TLC (fig. 4-8). Ved å bruke den laveste konsentrasjonen til beregningen, vil man med større sannsynlighet ligge innenfor det lineære området slik at resultatene blir mer reelle. En usikkerhet med denne måten å kvantifisere lipidklasser på er at markeringen av flekkene på TLC-platen gjøres manuelt. Dette gjør at det

vanskelig å få til en standardisert metode. Dette gjelder i hovedsak dersom flere TLC-plater skal analyseres i form av kvantifisering av lipidklasser. En alternativ måte å gjøre kvantifiseringen på, kan være å bruke en GelDoc plateleser (Gel Documentation System). I bestemmelsen av fettklassefordeling er det mest sannsynlig at det er voksesterer tilstede, men på grunn av overlapping med væskefronten, er det ikke grunnlag for å ta det med i beregningen. Derfor er tallene i tabell 4-4, 4-5 og 4-6 basert på de andre fettklassene, som var mer sikre å beregne ut fra. Dette gjør også at tallene som er oppgitt i tabellen ikke blir helt reelle når det gjelder total fettklassefordeling. Hadde de potensielle voksesterne blitt detektert, ville de ha utgjort en andel som igjen ville ha påvirket fordelingen av de andre fettklassene. En mulig metode som kunne ha gjort det mulig å detektere eventuelle voksesterer, hadde vært å bruke RP-HPTLC. Siden stasjonærfasen er upolar og voksesterne også er det, ville de ha fått en sterkere retensjon i forhold til normalfase-TLC slik at de ville ha blitt lettere å identifisere. Fettklassestandarder (18-5A) i fig. 4-8 viser at voksesterne (E5) vil befinne seg i området hvor væskefronten i fig. 4-9 er.

Grunnen til at det ble brukt en modifisert variant av Kaluzny-metoden [17], var at det tidligere var blitt brukt samme variant ved avdelingen til å separere lipidklasser fra marine organismer med gode resultater. Til å begynne med var dette vanskelig å få til siden de polare lipidene ble forurenset med frie fettsyrer. Mange varianter med løsemiddelsammensetning ble prøvd, i tillegg til å variere rekkefølgen av mobilfase B og C (tabell 3-3). Syrestyrken ble variert mellom 2-5 % og det viste seg at 5 % var det som skulle til for at de frie fettsyrene ble fjernet fra de polare lipidene. Forklaringen på dette var at det måtte en såpass syrestyrke til for å få lav nok pH til å bryte de ioniske interaksjonene med aminogruppene på kolonnen. Det var også viktig å få rensert de polare lipidene av den grunnen at de utgjorde en vesentlig del av den totale lipidmengden. Grunnen for og ikke å bruke dietyleter, var at det ble vurdert at den kunne påvirke analyttene slik at de ble ustabile på grunn av peroksiddannelse, slik at separasjonene kunne ha blitt dårligere. Resultatene viste at dette var et nyttig trekk. Det ble ikke lagt like stor vekt på å rense de nøytrale lipidene ytterligere, siden TLC viste en tilfredsstillende separasjon. Hadde det derimot vært ønskelig og i tillegg vært mer tid tilgjengelig, kunne det ha vært mulig å separere de videre [17].

## **Konklusjon**

Brunpølse har et relativt lavt fettinnhold, men en interessant fettsyresammensetning. En tredjedel av fettsyrene er EPA, mens innholdet av DHA utgjør bare 1-2 %. Dette betyr at 100 g sløyd brunpølse med 0,5 % fett gir ca. 0,15 g EPA.

Resultatene viste også at metoden for separasjon av fettklasser bør forbedres, kanskje ved å bruke HPLC.

## 6 Referanser

1. 2010; Available from: <http://www.nofima.no/filearchive/matnyttig-nr-5-2010.pdf>.
2. O.Therkildsen, N. and C.W. Petersen, *A review of the emerging fishery for the sea cucumber *Cucumaria frondosa*: Biology, policy, and future prospects*, in *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*. 2006.
3. Zhong, Y., M.A. Khan, and F. Shahidi, *Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(4): p. 1188-1192.
4. So, J.J., J.F. Hamel, and A. Mercier, *Habitat utilisation, growth and predation of *Cucumaria frondosa*: implications for an emerging sea cucumber fishery*. *Fisheries Management and Ecology*, 2010. **17**(6): p. 473-484.
5. Fredalina, B.D., et al., *Fatty acid compositions in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus*, for wound healing*. *General Pharmacology*, 1999. **33**(4): p. 337-340.
6. Hankenson, K.D., et al., *Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 2000. **223**(1): p. 88-95.
7. fisk, E.f. 2010; Available from: <http://www.seafood.no/binary?id=132614>.
8. 2011; Available from: <http://www.caplex.no/web/ArticleView.aspx?id=9332320>.
9. J.-F. H. and M. A, *Evidence of chemical communication during the gametogenesis of holothuroids*. *Ecology*, 1996 **77**: p. 1600-1616.
10. V.M.M., D. and M. B.A, *Seasonal biochemical composition of tissues from *Cucumaria frondosa* collected in the Bay of Fundy, Canada: feeding activity and reproduction*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2002. **82**: p. 141-147.
11. Singh, R., et al., *Patterns of seasonal and tidal feeding activity in the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata : Holothuroidea) in the Bay of Fundy, Canada*. *Marine Ecology-Progress Series*, 1999. **187**: p. 133-145.
12. J.-F., H. and M. A, *Precautionary management of *Cucumaria frondosa* in Newfoundland and Labrador, Canada*. . In: V.Toral-Granda, A.Lovatelli & M.Vasconcellos (eds) *Sea*

- Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade. FAO Fisheries & Aquaculture Technical Paper 2008. **516**: p. 293-306.
13. Thompson, R.J., Deibel, D., Redden, A.M., McKenzie, C. H., *Vertical flux and fate of particulate matter in a Newfoundland fjord at sub-zero water temperatures during spring*. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES, 2008. **357**: p. 33-49.
  14. Afanasyev, Y.D., N.P. Nezlin, and A.G. Kostianoy, *Patterns of seasonal dynamics of remotely sensed chlorophyll and physical environment in the Newfoundland region*. Remote Sensing of Environment, 2001. **76**(2): p. 268-282.
  15. Nelson, D.L.C., M.M. , *Lehninger, Principles of Biochemistry*. 4th ed. 2005.
  16. BioSite. 2011 07.02.2010; Available from: <http://www.biosite.dk/leksikon/steroider.htm>.
  17. Kaluzny, M.A., et al., *Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns*. J Lipid Res, 1985. **26**(1): p. 135-40.
  18. Folch, J., M. Lees, and G.H.S. Stanley, *A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES*. Journal of Biological Chemistry, 1957. **226**(1): p. 497-509.
  19. Stoffel, W., F. Chu, and E.H. Ahrens, *Analysis of Long-Chain Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography - Micromethod for Preparation of Methyl Esters*. Analytical Chemistry, 1959. **31**(2): p. 307-308.
  20. Vaghela, M. and A. Kilara, *A rapid method for extraction of total lipids from whey protein concentrates and separation of lipid classes with solid phase extraction*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1995. **72**(10): p. 1117-1121.
  21. Frenoux, J.-M.R., et al., *A Polyunsaturated Fatty Acid Diet Lowers Blood Pressure and Improves Antioxidant Status in Spontaneously Hypertensive Rats*. The Journal of Nutrition, 2001. **131**(1): p. 39-45.
  22. Tapiero, H., et al., *Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies*. Biomedecine & Pharmacotherapy, 2002. **56**(5): p. 215-222.
  23. Nations, F.a.A.O.a.t.U., *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*: Rome. p. 218.
  24. Yamada, A., et al., *A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue*. Journal of Experimental Biology, 2010. **213**(20): p. 3416-3422.

25. Koob, T.J., M.M. Koob-Emunds, and J.A. Trotter, *Cell-derived stiffening and plasticizing factors in sea cucumber (Cucumaria frondosa) dermis*. Journal of Experimental Biology, 1999. **202**(17): p. 2291-2301.
26. Tipper, J.P., et al., *Purification, characterization and cloning of tensilin, the collagen-fibril binding and tissue-stiffening factor from Cucumaria frondosa dermis*. Matrix Biology, 2002. **21**(8): p. 625-635.

## 7 Appendiks

**Tabell 7-1:** Beregning av andel tørrstoff

	S.P. 1	S.P. 2	S.P. 3	S.P. 4*	S.P. 5*	S.P. 6*	S.P. 7*
Vekt s.p. (sløyd) i gram	115,45	89,70	91,44	56,62	32,76	48,20	25,19
Vekt etter frysetørking i gram	13,73	11,14	10,81	9,25	5,36	7,59	4,72
Andel tørrstoff i prosent	11,9	12,4	11,8	16,3	16,4	15,8	18,7

\*Disse sjøpølsene ble kuttet opp i små biter før frysetørking

### 7.1 Utbytte av fett etter ekstraksjon

**Tabell 7-2:** Mengde og utbytte av ekstrahert fett

	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
Innveid mengde s.p. i gram	0,199	0,201	0,201	0,201	0,199	0,204	0,207	0,201	0,200
Vekt glass i gram	11,096	11,055	10,768	11,083	13,576	13,727	11,024	11,066	13,691
Vekt glass + fett i gram	11,103	11,064	10,775	11,090	13,583	13,735	11,033	11,075	13,700
Fett ekstrahert i milligram	7	9	7	7	7	8	9	9	9
Utbytte i prosent	3,5	4,5	3,5	3,5	3,5	3,9	4,4	4,5	4,5

**Tabell 7-2 forts.:** Mengde og utbytte av ekstrahert fett

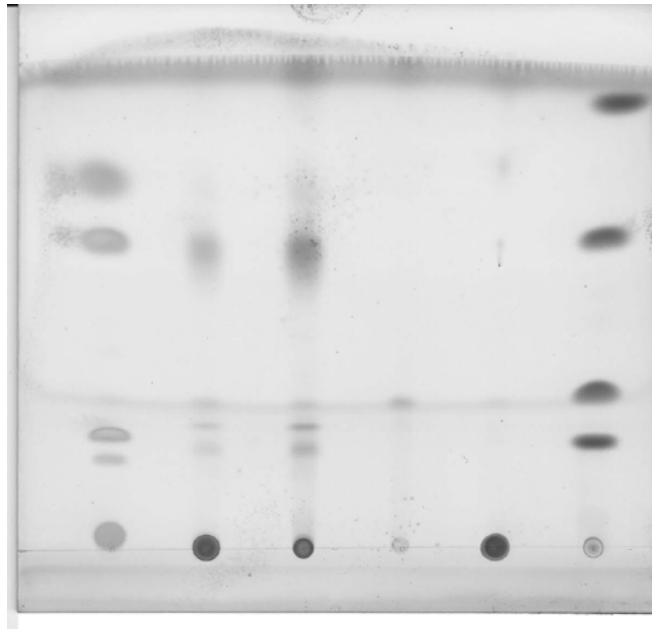
	4A	4B	4C	5A	5B	5C	6A	6B	6C
Innveid mengde s.p. i gram	0,203	0,200	0,200	0,200	0,200	0,203	0,206	0,202	0,202
Vekt glass i gram	13,442	13,269	13,384	13,276	13,617	13,261	13,423	13,079	13,334
Vekt glass + fett i gram	13,444	13,276	13,387	13,281	13,626	13,268	13,429	13,086	13,340
Fett ekstrahert i milligram	4	6	5	8	10	7	7	8	8
Utbytte i prosent	2,0	3,0	2,5	4,0	5,0	3,5	3,4	4,0	4,0

**Tabell 7-2 forts.:** Mengde og utbytte av ekstrahert fett

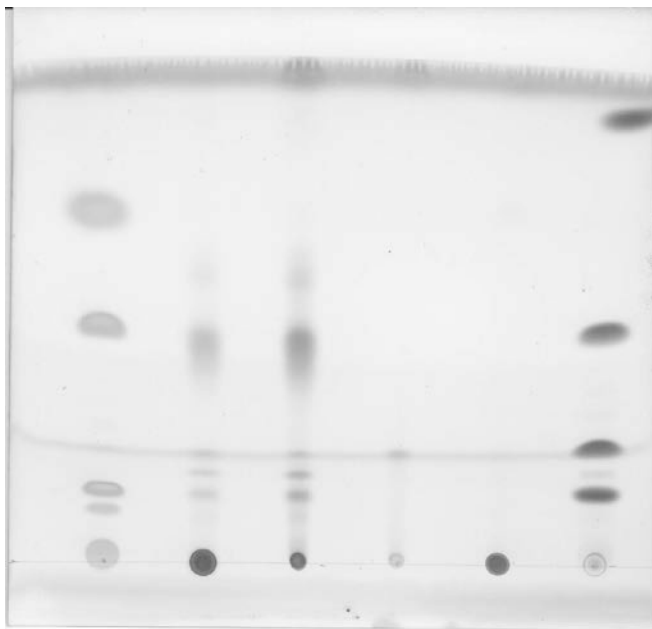
	7A	7B	7C
Innveid mengde s.p. i gram	0,205	0,200	0,203
Vekt glass i gram	13,225	13,624	13,538
Vekt glass + fett i gram	13,233	13,630	13,542
Fett ekstrahert i milligram	8	7	7
Utbytte i prosent	3,9	3,5	3,5



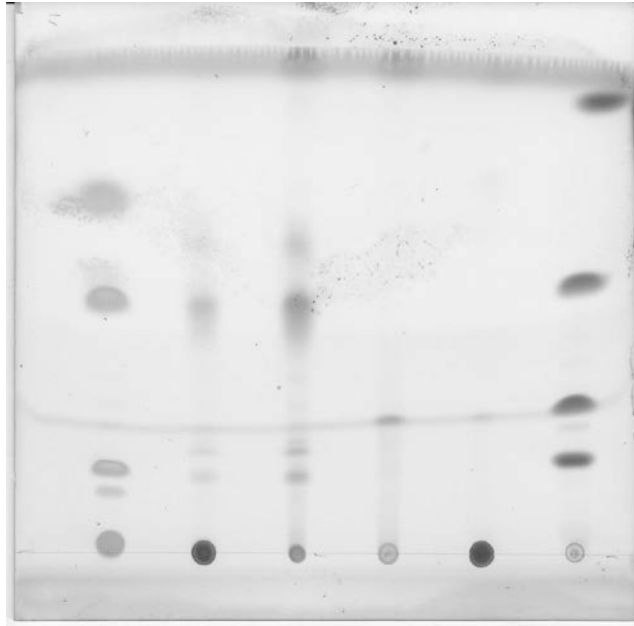
## TLC-bilder etter rensing med SPE av ekstraherte lipider



**Figur 7-1:** Sjøpølse 1. Utført på samme vis som i fig. 4-4.

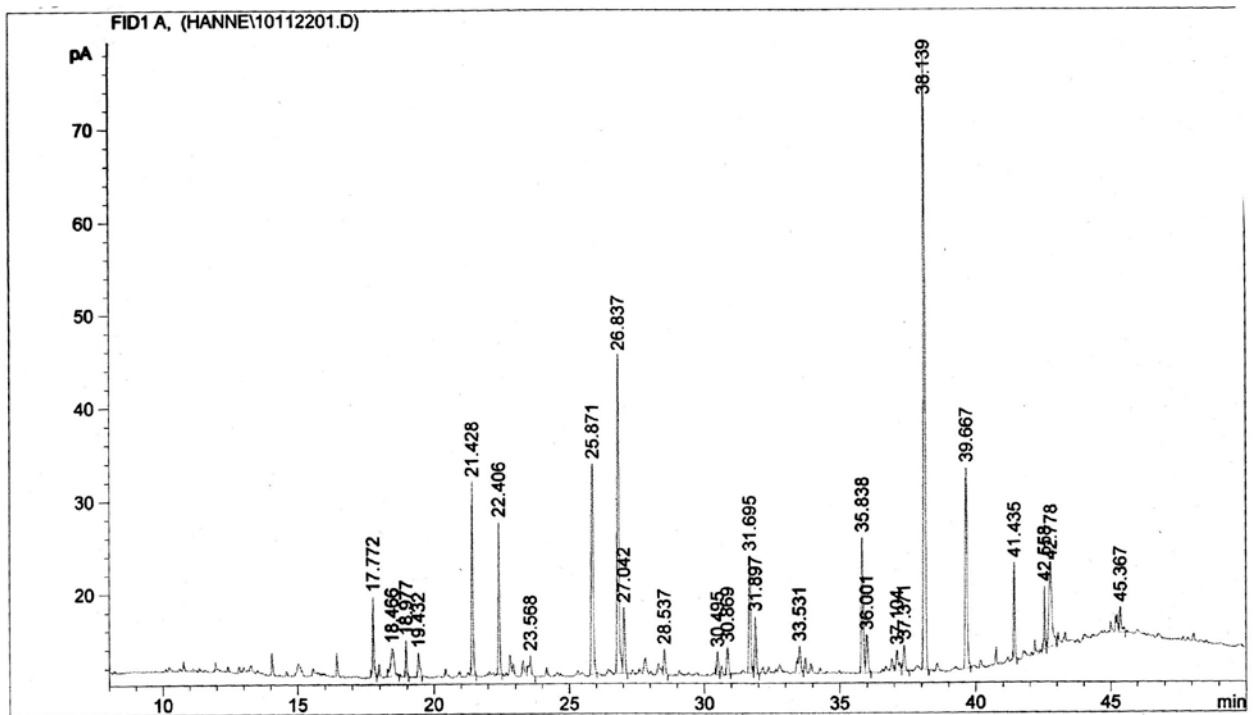


**Figur 7-2:** Sjøpølse 3. Utført på samme vis som i fig. 4-4.

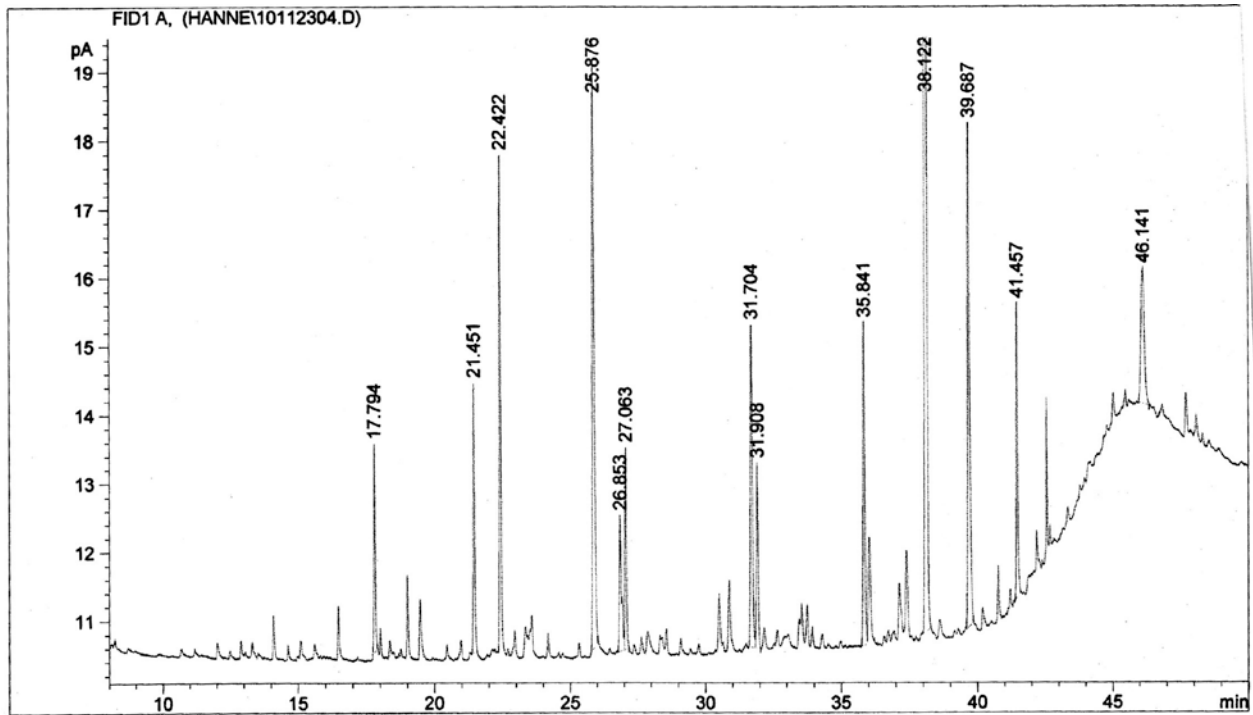


Figur 7-3: Sjøpølse 5. Utført på samme vis som i fig. 4-4.

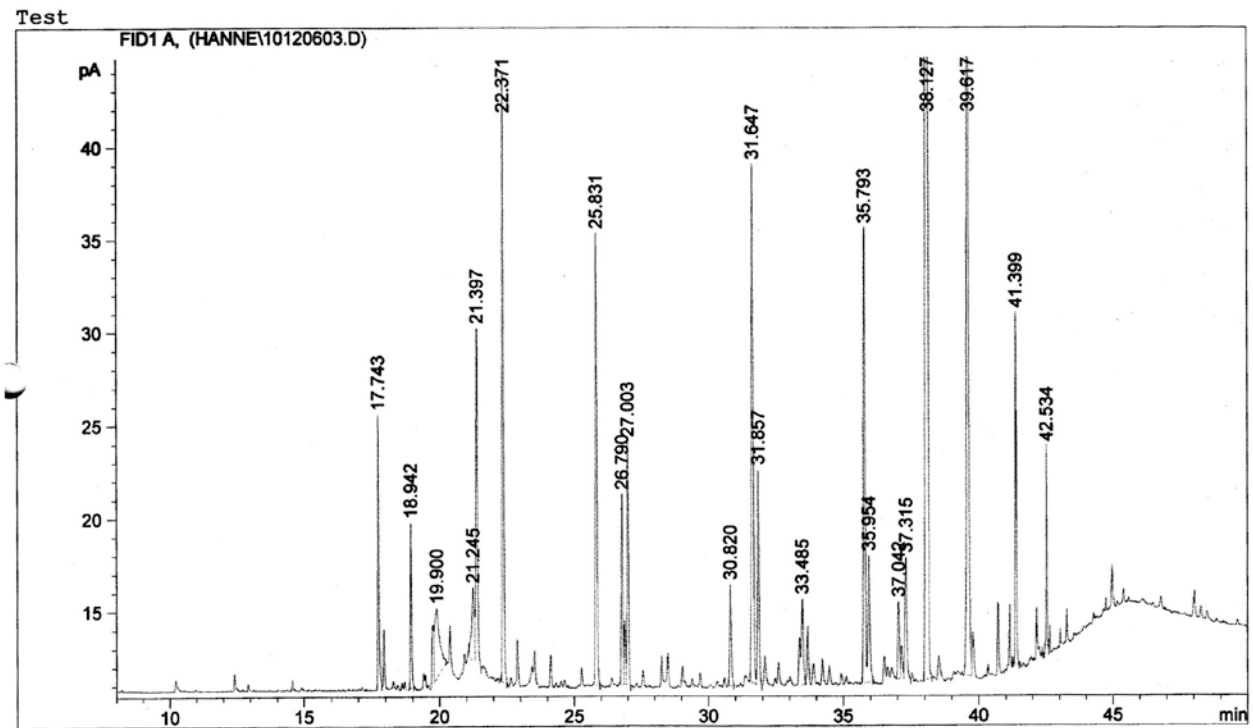
## GC-kromatogrammer av total fettsyresammensetning



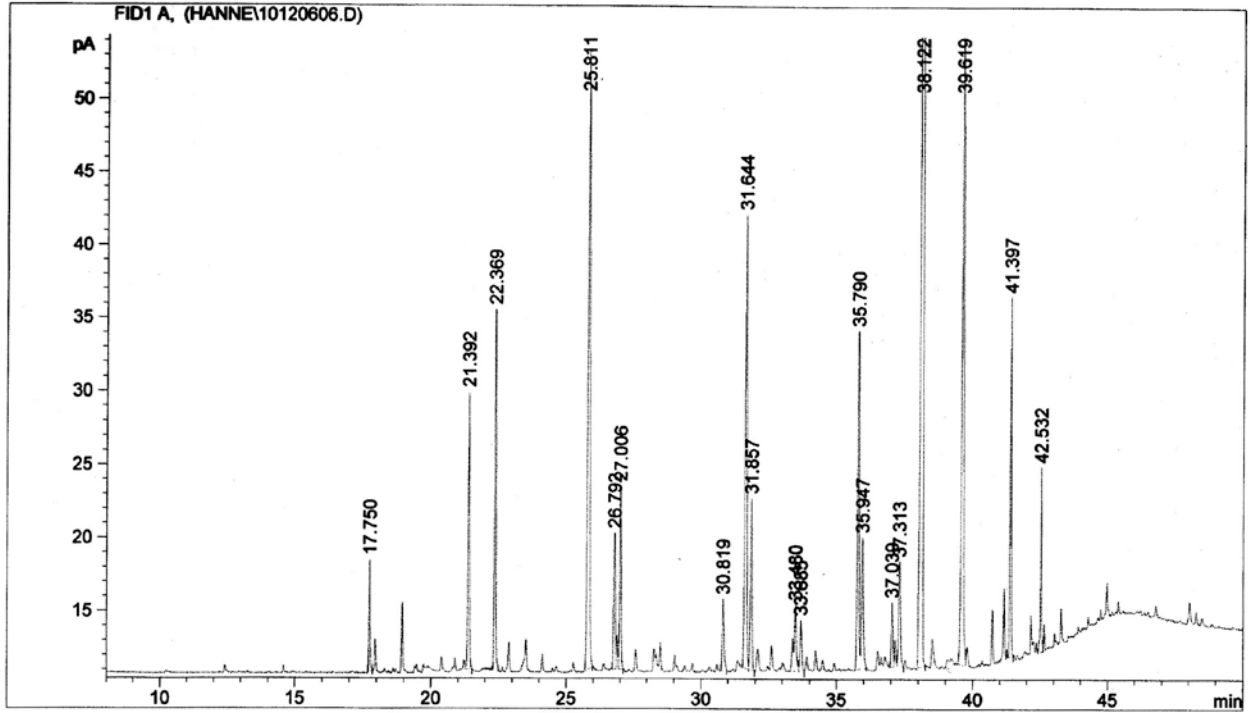
Figur 7-4: Sjøpølse 1, parallell A.



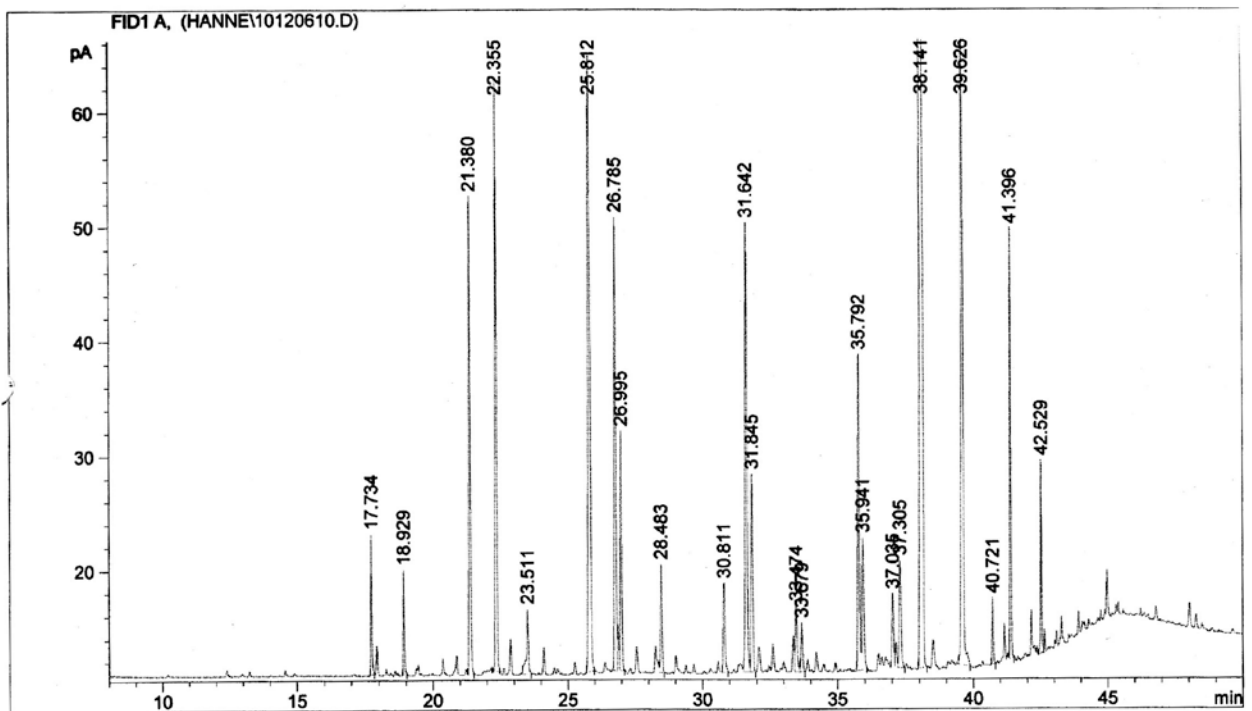
Figur 7-5: Sjøpølse 3, parallell B.



Figur 7-6: Sjøpølse 4, parallell C.

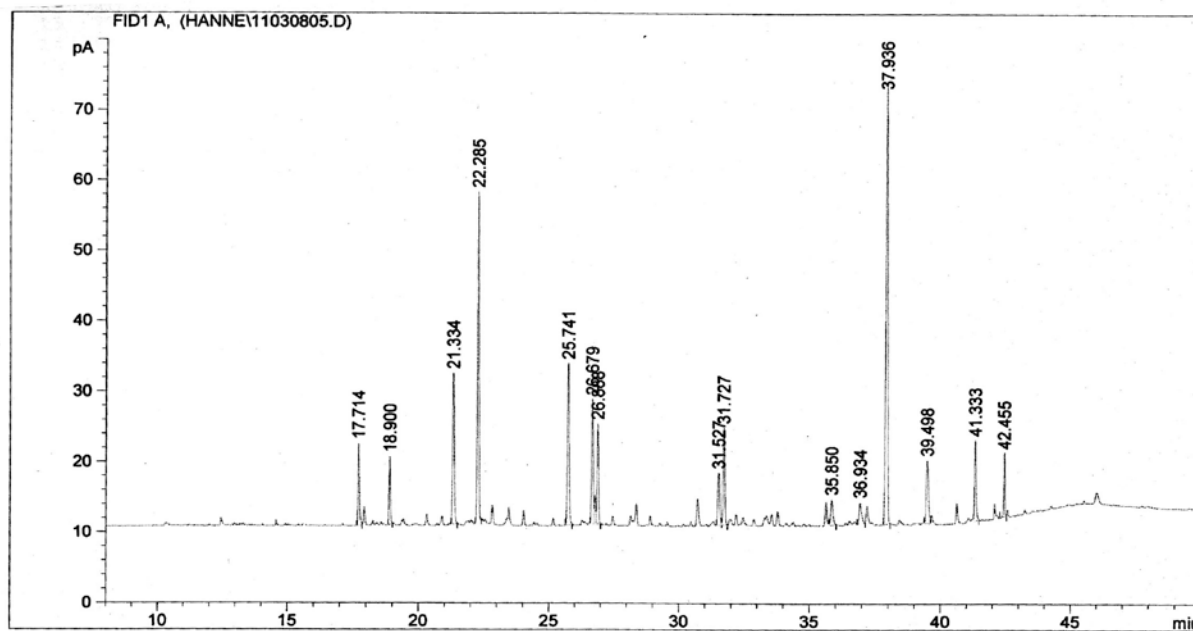


Figur 7-7: Sjøpølse 5, parallell C.

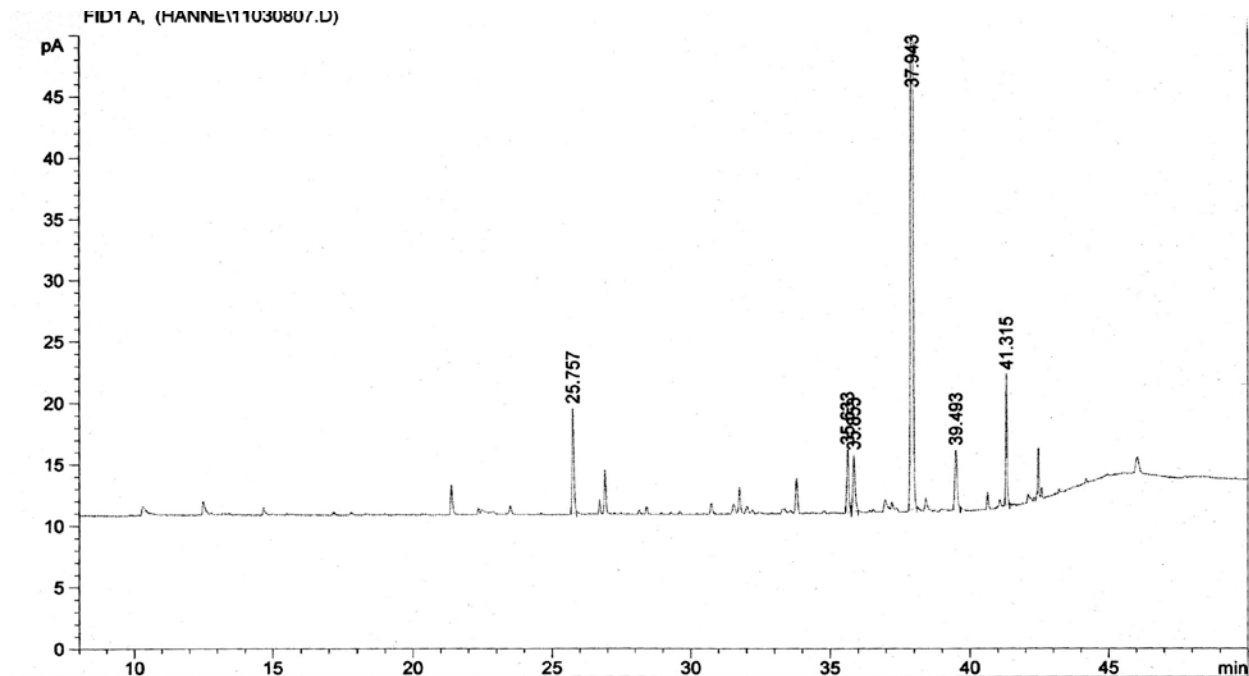


Figur 7-8: Sjøpølse 7, parallell A.

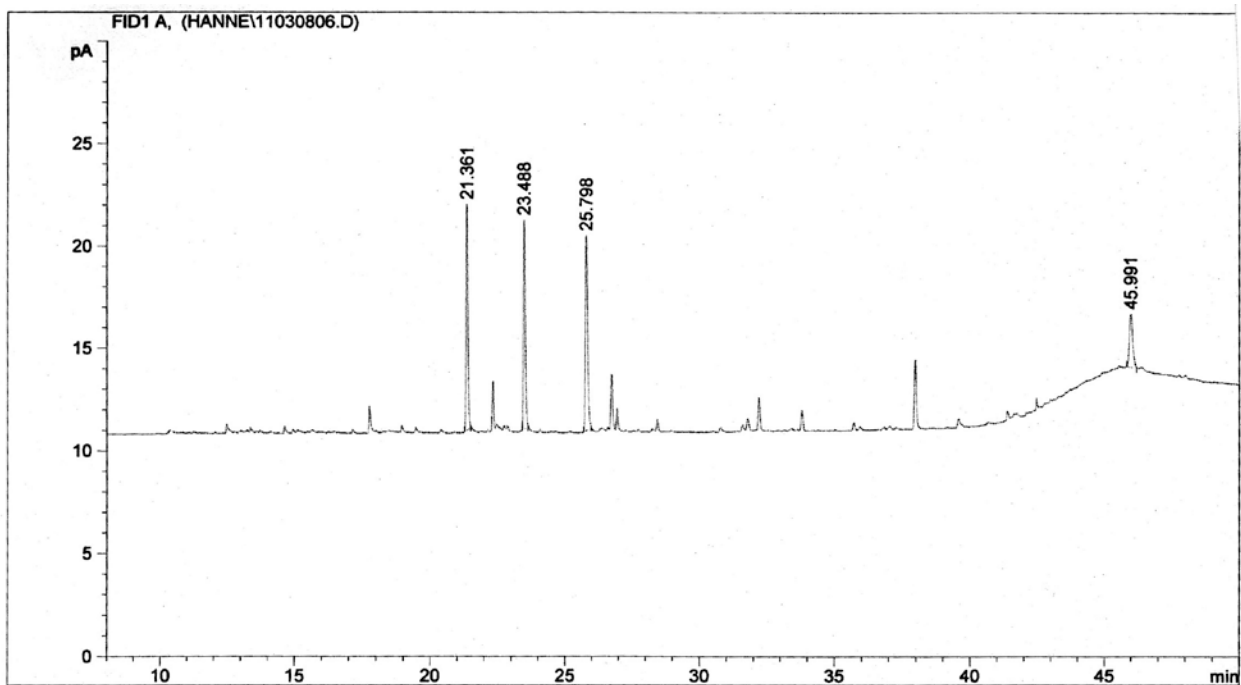
## GC-kromatogrammer av hver fraksjon etter rensing med SPE



Figur 7-9: Sjøpølse 7 – NL



Figur 7-10: Sjøpølse 7 – PL



Figur 7-11: Sjøpølse 7 - FFA

