

UNIVERSITETET I TROMSØ UIT

Det helsevitenskapelige fakultet
Institutt for farmasi

Vår 2012

Lipidklasser og fettsyresammensetning i omega-3 produkter

Master i farmasi

FAR 3901



Sureeporn A. Eriksen

Veiledere:

Professor Einar Jensen, Universitetet i Tromsø
Professor Ragnar L. Olsen, Universitetet i Tromsø



Forord

I forbindelse med avslutningen på mastergradsstudiet ved Institutt for farmasi, på Universitetet i Tromsø, skal det utarbeides en masteroppgave. Denne skal reflektere emner som har inngått i studiet, og det var naturlig for meg å velge en oppgave innen farmasøytisk kjemi. Mastergradsoppgaven ble gjennomført i samarbeid med Norges fiskerihøgskole og Universitetet i Tromsø, høsten 2011 og våren 2012, og temaet var lipidklasser og fettsyresammensetning i omega-3 produkter.

Jeg vil gjerne få takke hovedveileder Einar Jensen ved Institutt for Farmasi ved UIT for veiledningen og i tillegg har veileder Ragnar Olsen vært en god støttespiller underveis i prosessen. I forbindelse med arbeidet på laboratoriet vil jeg takke Guro Kristine Edvinsen for god og viktig hjelp. Takk også til Birthe Vang og Alice Marie Pedersen som har bidratt med diverse tips. Det var en trivelig avdeling å være tilknyttet i forbindelse med laboratoriearbeidet.

Jeg ønsker også å få takke min flotte og tålmodige familie som stiller opp for meg og har støttet meg gjennom dette studieløpet, og som godtar at "Mamma" er borte fra hjemmet store deler av året.

Til slutt vil jeg takke alle andre som på en eller annen måte har bidratt til å gjøre studietiden gjennomførbart for meg. Hjertelig tusen takk alle sammen.

Sureporn A. Eriksen

Tromsø, mai 2012

Innhold

Forord	3
Sammendrag	7
Forkortelser	8
1. Innledning.....	9
2. Generell bakgrunn	11
2.1 Kilder til marine omega-3 fettsyrer	11
2.1.1 Marine oljer	11
2.1.2 Tran	12
2.1.3 Depotfett.....	13
2.1.4 Fosfolipider	13
2.1.5 Fettsyrer.....	15
2.2 Fettløselige vitaminer	17
2.2.1 Vitamin A (Retinol)	17
2.2.2 Vitamin D	18
2.2.3 Vitamin E	19
2.3 Eikosanoider.....	19
2.4 Essensielle fettsyrer.....	20
2.5 Lipidkvalitet.	21
2.6 Tynnsjiktskromatografi(TLC)	22
2.7 Fastfase ekstraksjon (SPE).....	23
2.7.1. SPE apparat	24
2.8 Gasskromatografi (GC)–flammeionisasjonsdetektor (FID).....	25
3. Materialer og metoder	27
3. 1 Materialer	27
3.2 Metoder	33

3.2.1 Fettklasseanalyse	33
3.2.1.1 Tynnsjiktskromatografi (TLC)	33
3.2.2 Fast fase ekstraksjon (SPE)	33
3.2.3 Fettsyresammensetning	34
3.2.4 Frie fettsyrer (%)	35
4. Resultater.....	37
4.1 Fettklasser i Krill olje og andre marine oljer.....	37
4.1.2 Isolering av fettklasser ved bruk av fast fase ekstraksjon (SPE).....	39
4.2 Analyse av fettsyresammensetning	41
4.2.1 Total fettsyresammensetning.....	41
4.3 Stabilitet av lagret krill og fiskeolje	44
5. Diskusjon.....	45
6. Referanser.....	49
7. Appendiks.....	53
GC Kromatogrammer fra analyser av fettsyrer	53

Sammendrag

Nasjonalt råd for ernæring anbefaler å spise fisk og sjømat fordi de inneholder de flerumettede omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA: 20:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA: 22: 6n-3). Mye forskning viser kobling mellom omega-3 fettsyrene og helsegevinster. Helsegevinstene er at disse fettsyrene er betennelsesdempende, de reduserer risiko for å utvikle sykdommer som revmatoid artritt, hjerte -kar sykdommer, psoriasis, og de virker hemmende på utvikling av enkelte mentale lidelser og de reduserer tilfeller prostatakreft. Omega-3 fettsyrer er nødvendig for normal utvikling av fosteret under svangerskapet og er også spesielt viktig for normal neurologisk utvikling.

Mange av verdens kostholdsorganisasjoner anbefaler at man spiser fisk 1-2 ganger i uken eller får i seg 0,2-0,5 g EPA og DHA. Alternative kilder til EPA og DHA er helsekostprodukter. EPA og DHA i produktene bør være av god kvalitet og i riktig mengde for å dekke kroppens behov. Det er derfor viktig at produktdeklarasjon samsvarer med innholdet i produktene.

Målet med min oppgave var å undersøke fettclassesammensetningen av Omega-3 produktene; Lofot tran, Trippel Omega-3, Nordic Light krill & fiskeolje, Omega-3 med krillolje (blanding av krill og fiskeolje) og Complete Krillolje (krillolje). I et av blandings produktene av krill & fiskeolje (Nordic Light krill & fiskeolje) ble fettsyresammensetningen undersøkt i noen av fettclassene i produktet. Tilslutt ble det målt frie fettsyrer av de to krill & fiskeoljeproduktene i 2 perioder for å se stabilitet ved lagring.

Resultatene viste at Lofot tran inneholdt triacylglyserider; Trippel Omega-3 inneholdt metyl- og etylestere; Nordic Light krill & fiskeolje inneholdt polare lipider, kolesterol, diacylglyserider, frie fettsyrer og triacylglyserider; Omega-3 med krillolje (blanding av krill og fiskeolje) inneholdt triacylglyserider, metyl og etylester. Det siste produktet som ble undersøkt var Complete Krilloljeproduktet som inneholdt tilsvarende fettclasser som Nordic light krill & fiskeolje, men med mer polare lipider og frie fettsyrer.

Ved undersøkelse av fettsyresammensetningen i Nordic Light krill & fiskeolje, viste denne et innhold av omega-3 (n-3) 63.9 %, omega-6 (n-6) 3.2 %, og langkjedede flerumettede omega-3 (Lc n-3) 63,2 %. EPA var 31,8 % og DHA 26 %.

Ved lagring av Krill & fiske olje produktene i romtemperatur i ca 2 måneder vistes en viss forskjell i verdiene av de frie fettsyrene, men ikke noe som kan karakteriseres som dramatisk økning.

Forkortelser

DCM:	Diklormetan
DHA:	Dokosaheksaensyre
DPA:	Dokosapentaicsyre
EPA:	Eikosapentaensyre
FAME:	Fettsyremetylester
FFA:	Frie fettsyrer
Lc-PUFA:	Langkjedede flerumettede fettsyrer
MUFA:	Enumettede fettsyrer
MeOH:	Metanol
NaCl:	Natriumklorid
NL:	Nøytrale lipider
PL:	Polare lipider
PUFA:	Flerumettede fettsyrer
Rf:	Retardasjonsfaktor
SAT:	Mettede fettsyrer
SPE:	Fast-fase ekstraksjon
TAG:	Triacylglyserol (triglyserider)
TLC:	Tynnsjikt-kromatografi
WHO:	World Health Organisation

1. Innledning

I nyere tid er det blitt et sterkere fokus på kroniske kostholdsrelaterte sykdommer og på hvordan en kan forebygge disse. Sykdommer som hjerte/kar lidelser, kreft, diabetes 2, fedme etc. kommer inn i kategorien der en regner at inntak av fett, og da spesielt, de ”farlige” typene fettsyrer, altså de mettede, i kostholdet kan være en faktor som påvirker utviklingen av disse. (Simopoulos, 2008). Andre faktorer er lite fysisk aktivitet, røyking, alkoholbruk m.m. Det er i denne sammenhengen også slått fast at fisk og sjømat har positiv effekt på folkehelsen (Kris-Etherton et al., 2002). Nasjonalt råd for ernæring gir anbefalinger om å spise fisk og det finnes overbevisende dokumentasjon på at dette er positivt i forhold til hjerte-karsykdommer (Nasjonalt råd for ernæring, 2011). World Health Organisation (WHO) og andre ansvarlige organisasjoner har også gått ut med de samme anbefalingene om å spise fisk eller å innta de langkjedede omega-3 fettsyrene på andre måter (Kris-Etherton et al., 2009).

Begrunnelse for at fisk og sjømat har positiv effekt for helsen er at de, i tillegg til vitaminer og mineraler, også inneholder de langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrene; eikosapentaensyre (EPA: 20:5n-3) og dokosahekaensyre (DHA: 22 6n-3), samt et lavt innhold av mettede fettsyrer (Ruxton et al., 2004; Simopoluos, 1991). Menneskekroppen kan bare i liten grad selv syntetisere EPA og DHA, og siden dette er livsnødvendige forbindelser må vi få det tilført gjennom kosten eller som kosttilskudd (Frøyland et al., 2011).

Fokus på de marine omega-3 fettsyrene startet på Grønland på 1970-tallet. Forskerne Bang og Dyrberg, fant at eskimoene der hadde mye mindre dødelighet av hjerteinfarkt enn eskimoer hadde i Danmark (Bang et al., 1980). Det ble foreslått at forklaringen lå i at eskimoene på Grønland hadde en høyere andel av flerumettede fettsyrer (EPA og DHA) i blodet. Dette forklares med store inntak av marint fett med omega-3 fettsyrer fra mat av sel og fisk (Kromann & Green, 1980).

I ettertid er det blitt det gjort mye forskning som viser positive koblinger mellom omega-3 fettsyrer og helsegevinster. Antakelig fungerer EPA og DHA ved å produsere betennelsesdempende eicosanoider slik at sykdommer hvor betennelsesreaksjoner er involvert kan dempes eller redusere risikoen for å utvikle slike sykdommer, som revmatoid artritt, hjerte-kar sykdommer, psoriasis etc. Dette er også blitt foreslått at EPA og DHA kan hemme utvikling av enkelte mentale lidelser og redusere tilfeller av kreftformer som eksempelvis prostatakreft. (Lunn, & Theobald, 2006; Calder & Galli, 2009; Hedelin et al., 2006; Hibbeln, 2006). For normal utvikling av fosteret under svangerskapet er omega-3 fettsyrer også

nødvendige. For normal nevrologisk utvikling er det også spesielt viktig med tilstrekkelige mengder med DHA (Jensen, 2006; Ruxton, 2004).

Ansvarlige kostholdsorganisasjoner i verden anbefaler at man spiser fisk 1-2 ganger i uken eller får i seg 0,2 til 0,5 g EPA og DHA per dag (Iso et al., 2006). Dersom man ikke spiser fisk kan helsekostprodukter være et alternativ. Fokuset på de positive helseeffektene av EPA og DHA har ført til at salg av slike produkter har blitt "big business." Salget i 2006 i Norge var på nesten en halv milliard kroner, men myndigheter stiller små krav til innhold i produktene (Forskrift om kosttilskudd, 2004-05-20; Mattilsynet, veileder til kosttilskudd forskriften, 2005). Grunnen til dette er at Omega 3 blir definert som kosttilskudd, og ikke som legemiddel. Det er bare produsentene selv som kontrollerer produktene og det vil i praksis si at de kan mikse innholdet slik de selv finner det for godt. Det er derfor viktig at innholdet samsvarer med det som står på varedeklarasjonen, slik at en kan være trygg på kvantiteter og kvalitet i omega -3 produktene. I den senere tid har det vært et økende fokus på kvaliteten av innholdet i omega -3 produkter og at varierende kvalitet i form av "harsk" smak har presset fram et økt kvalitetsfokus fra forbrukersiden.

Antallet omega-3 produkter på markedet er stort og de selges i alle dagligvarebutikker og på nettet. De selges også på apotekene. På de vanlige butikkene har man generelt ingen kunnskap om de helsekostproduktene som selges. Kunder på et apotek forventer at man kan gi objektiv informasjon om produktene som selges. Det er derfor viktig at ansatte på apotekene også har kunnskap om helsekostproduktene som selges der.

Formålet med min oppgave var å undersøke fettclassesammensetningen i omega-3 produkter. I tillegg ble fettsyresammensetningen undersøkt i et av produktene og i noen av fettclassene i produktet.

2. Generell bakgrunn

2.1 Kilder til marine omega-3 fettsyrer

2.1.1 Marine oljer

Marine oljer kan grovt sett deles inn i 4 hovedgrupper: Fiskeoljer, leveroljer, olje fra sjøpattedyr og olje fra marine zooplanton (krill, raudåte). Om man ser bort fra leveroljer fra bruskfisk, består lipidene i fiskeoljene hovedsakelig (> 95 %) av triglyserider som kommer fra depotfettet. Torskeleveroljer får et triglyseridinnhold på mer enn 99 % ved at oljen raffineres slik at andre lipider fjernes. Krillolje inneholder mye fosfolipider mens olje fra raudåte inneholder mye voksesterer.

Under produksjon av fiskemel fra hel fisk, får en fiskeolje som er den største gruppen marine oljer. Denne ble vanligvis benyttet industrielt, eller alternativt brukt til faste margarinprodukter ved å herde (hydrogenere) dem. Gjennom herdingen skjer det en forandring der fettsyrene som før var flerumettede, blir omdannet til mettede fettsyrer og flerumettede fettsyrer med færre antall dobbeltbindinger. Dette gjør at smeltepunktet øker. De positive ernæringsmessige egenskapene som fiskefettet i utgangspunktet har, blir samtidig redusert og en har risiko for dannelse av transumettede fettsyrer. Tidligere ble også olje fra sjøpattedyr brukt på denne måten. Situasjonen i dag er forandret ved at størstedelen av den uherdede fiskeoljen nå går til fôr til oppdrettsfisk. Bare en mindre del (<30 %) går til industriell bruk eller herding.

Når det gjelder fettsyresammensetningen i olje, er denne påvirket av variabler som geografi, dvs fangstområder, årstid (Gunstone et al., 1986) og hva de aktuelle artene spiser (McGrill & Moffat 1992). Fiskeolje fra Sør-Amerika har generelt sett et høyere innhold av langkjedede omega-3 fettsyrer nettopp fordi den industrielle fisken fra dette geografiske området spiser føde med et høyere innhold av denne typen fettsyrer (tabell 1).

Tilgangen på føde for artene til enhver tid, vil også virke inn på fettsyresammensetningen siden mange arter vandrer over forholdsvis store områder.

Tabell 1. Fettsyresammensetningen(%) i kommersielle fiskoljer. Tr = spormengder (McGrill & Moffat 1992).

Fatty acid	Russian fish oil	Chilean fish oil	South African anchovy oil	Indian sardine oil	Menhaden fish oil	Mackerel body oil	Capelin oil	Herring body oil
14:0	7,6	6,4	10,5	10,8	7,9	8,2	6,8	7,4
15:0	Tr	0,8	0,5	1,0	0,6	0,6	Tr	Tr
16:0	18,2	20,1	16,0	21,5	19,8	12,6	10,6	13,8
16:1	6,9	5,8	11,3	10,2	9,8	3,4	9,5	7,5
16:2	0,6	0,5	1,1	1,3	1,3	Tr	0,5	0,8
16:3	Tr	Tr	1,1	2,2	1,4	Tr	Tr	0,6
16:4	1,5	0,7	2,5	1,2	0,8	Tr	0,9	1,1
18:0	2,1	4,2	2,8	4,2	3,4	1,5	0,8	1,2
18:1	13,6	17,7	10,1	8,4	12,6	9,6	11,2	9,9
18:2	1,2	1,4	1,0	1,2	1,3	2,2	1,1	0,9
18:3	0,7	0,8	0,4	0,5	1,2	2,3	0,5	0,6
18:4	3,0	2,1	1,5	2,5	3,9	6,1	2,1	2,2
20:0	-	-	0,4	0,7	Tr	-	-	Tr
20:1	5,7	1,3	0,5	Tr	1,3	10,6	19,1	10,3
20:4	1,7	1,7	1,7	2,5	2,0	1,9	Tr	0,5
20:5	17,4	13,4	24,5	18,6	12,7	6,6	7,8	10,1
22:1	6,0	Tr	1,0	-	1,4	15,8	22,7	20,7
21:5	0,5	Tr	0,8	0,7	0,6	Tr	Tr	0,5
22:5	2,2	3,1	1,9	1,6	2,0	1,1	0,5	0,9
22:6	10,2	18,4	9,7	8,6	11,2	12,8	3,9	10,0

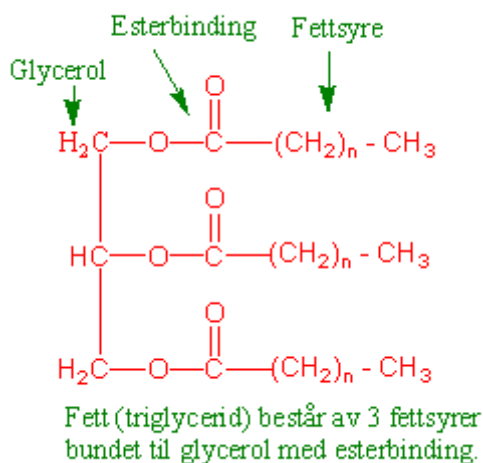
2.1.2 Tran

Torskelevertran har vært et viktig produkt i mer enn 150 år. Lever ble samlet i tønner og gjennom naturlig nedbrytning la den gå i oppløsning. Gjennom denne produksjonsmåten var tranen selvsagt av svært dårlig kvalitet. Etter omtrent 1850 ble produksjonen av tran forbedret ved at en begynte med dampkoking. Dette gav en mye bedre kvalitet og de helsebringende effektene av tran ble også etter hvert allment akseptert. Det var imidlertid ikke før på 1920 tallet at en fant sammenhengen mellom tran som forebygging og behandling av eksempelvis nattblindhet og Engelsk syke (Rakitt). Det viste seg etter hvert at det var innholdet av vitamin A og vitamin D som gav disse effektene. Tran ble på bakgrunn av dette et anbefalt kosttilskudd i solfattige strøk, eller områder med lavt grønnsaksforbruk. Tran som kosttilskudd fikk et synkende fokus etter at de billige syntetisk fremstilte vitaminene kom på markedet etter siste krig. Disse kunne lett tilsettes matvarer som smør og lignende. Tranen fikk imidlertid sin renesanse da en midt på 70-tallet fant sammenhengen mellom hjertekarlidelser og Omega -3 fettsyrene. Kvaliteten på dagens tran er mye bedre enn for bare 20-30 år siden fordi kravene til råstoffet er betydelig skjerpet, samtidig som en benytter

forbedrede metoder for dampkokingen, dvs en lavere temperatur for å redusere muligheten for harskning av produktet.

2.1.3 Depotfett

I levende organismer som dyr, fisk eller planter (plantefrø) har depotfett hovedfunksjon som energilager og består som oftest av triacylglyseroler (triglycider). Triacylglyseroler (TAG) er bygget opp av 3- karbonforbindelsen glycerol med 3 hydroksylgrupper (-OH) hvor 3 fettsyrer er festet med esterbinding mellom syregruppene i fettsyrene og hydroksylgruppene i glycerol. De tre fettsyrene kan være forskjellig, to kan være like eller alle tre kan være like. Det er fettsyrene som gir upolar karakter. Glycerol og fettsyrene blir frigjort fra fettvev ved hydrolyse av esterbindingene når det er behov for energi.



Figur 2

I stedet for 3-glyceroler forbindelsen som vises i figuren 2, kan det også finnes mono - og di-acylglyceroler (figur 3). Disse er nedbrytnings produkter av TAG



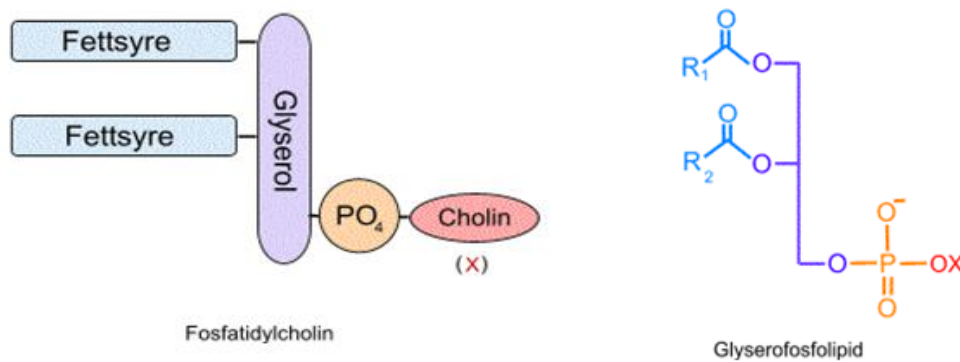
Figur 3. Mono - og di- acylglyceroler

2.1.4 Fosfolipider

Fosfolipider er en viktig bestanddel i biologiske membraner og det er forskjellige typer fosfolipider som er bestemt av hvilke type alkohol eller base molekylet inneholder (figur 4). Egenskapene til biologiske membraner er avhengig av hvilke fettsyrer som inngår og i hvor

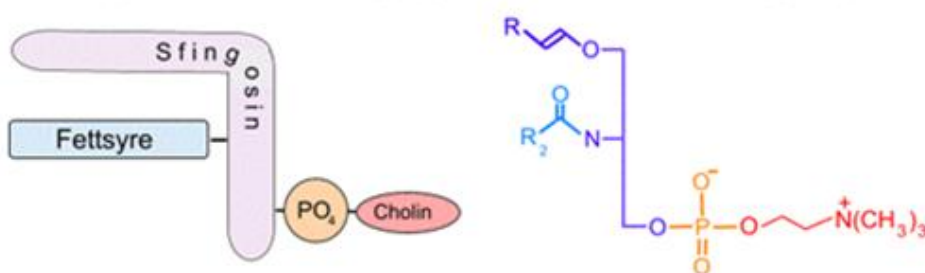
stor grad de er mettet eller umettet. Fosfolipider inneholder fosfat og er diglycerider. Det er festet fettsyrer til to av hydroksylgruppene i glycerol ("fettsyrehalene") i fosfolipidene, Til den tredje hydroksylgruppen er det festet et polart "hode" med et fosfat gruppe og en alkohol eller base.

Det er to grupper fosfolipider, der den viktigste og mest vanlige er glyserofosfolipider som er bygd opp av glyserol, to fettsyrer, en fosfatgruppe og etanolamin. Det mest vanligste glyserofosfolipidet i membraner er fosfatidylkolin.



Figur 4. Skjematisk framstilling og strukturformel for glyserofosfolipid. (X = er en base eller alkohol.)

Den andre gruppen av fosfolipid er Sphingolipidene. Det vanligste Sphingolipidet i dyr er såkalte Sphingomyelin. Sphingomyelin inneholder Sphingosin der sphingosin er bundet til ei fettsyre (denne konstruksjonen kalles ceramid) og videre til fosfor pluss kolin. Sphingomyelinenes egenskaper er mer eller mindre sammenfallende med fosfatidylkolins, de har ingen netto ladning i den polare delen. I planter er det phytosphingosin som er i stedet for glyserol.



Figur 5. Skjematisk framstilling og strukturformel for sphingomyelin

Fettsyrekjedene og hydrokarbonkjeden til sphingosine, utgjør de hydrofobe delene som ligger inne i membranen. Fosfatgruppa og alkoholen er den hydrofile delen av molekylene og stikker ut av membranen. I animalske organismer forekommer disse lipidene særlig i hjerne- og nervevev.

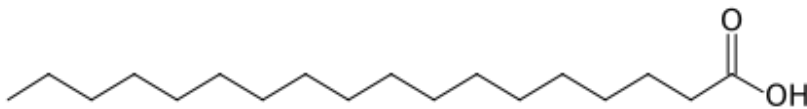
2.1.5 Fettsyrer

Fettsyrer har en hydrokarbonkjede som ender med en karboksylgruppe (-COOH). Fettsyrene i mat har som oftest mellom 12 og 22 karbonatomer, der fettsyrer med 16 og 18 C-atomer er vanligst i planter og dyrefett. Noen inneholder i tillegg en større andel av fettsyrer med 20 og 22 C-atomer og dette gjelder marine dyr og fisk. Unntaksvis finnes det også hydrokarbonkjeder med forgreninger av metylgrupper, 3-karbonringer eller hydroksylgrupper

Det er dobbelbindingene som bestemmer om fettsyrene er mettede eller umettede. Mettede er de som ikke har dobbelbindinger mens umettede har en eller flere dobbeltbindinger.

2.1.5.1 Mettede fettsyrer

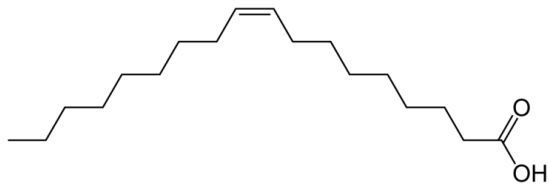
Generell formel til mettede fettsyrer er $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, og n er vanligvis et partall.



Figur 6. Strukturformel av n-stearinsyre (C18:0)

2.1.5.2 Umettede fettsyrer

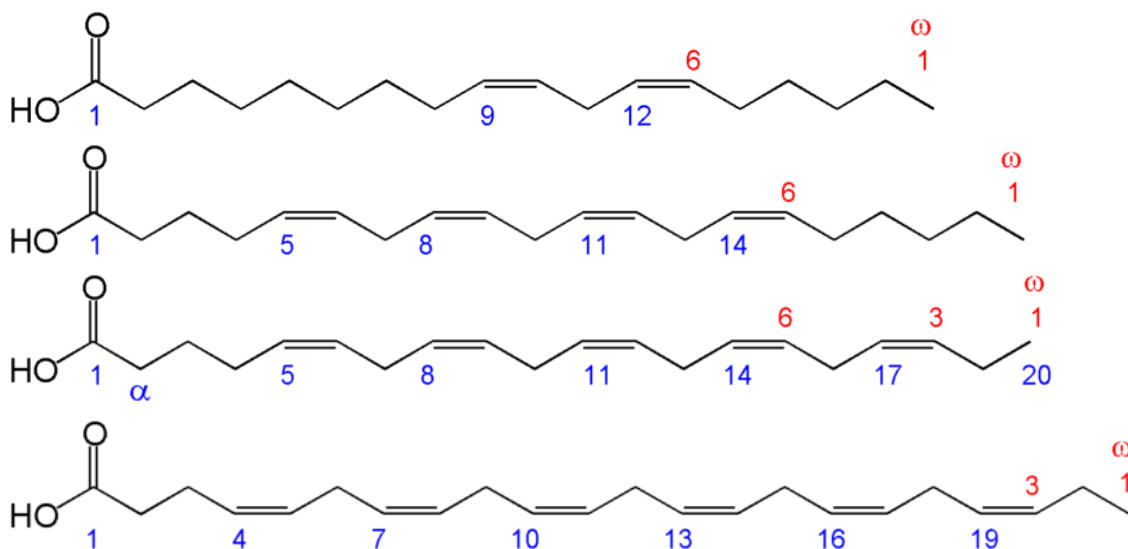
Umettede fettsyrer kan deles inn i to underklasser: Enumettede fettsyrer og flerumettede fettsyrer. Enumettede fettsyrer har en dobbeltbinding. Formelen for disse er $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, der den mest vanlige konfigurasjonen for naturlige, umettede fettsyrer er cis og antall karbonatomer stort sett er partall. Den typiske plasseringen av dobbeltbindingen i enumettede fettsyrer er mellom karbon 9 og 10 fra karboksylgruppen.



Figur 7. Strukturformel av oljesyre (C18:1 n-9)

Flerumettede fettsyrer har mer enn en dobbeltbinding. Ofte deles disse inn i to hovedgrupper; Første hovedgruppe har 2 eller 3 dobbeltbindinger og inneholder 18 karbonatom (polyunsaturated fatty acids; PUFA), mens den andre har ≥ 20 karbonatom (Long-chain PUFA; LcPUFA). Fettsyrer med ≥ 4 dobbeltbindinger kalles også for HUFA (Highly unsaturated fatty acids). Posisjonen til dobbeltbindingen nærmest metylenden av fettsyren er, i tillegg til antall dobbeltbindinger, også av betydning. Er den første dobbeltbindingen i en flerumettet fettsyre plassert på C-atom 3 fra metylenden, kalles den omega-3 fettsyre. Er den plassert på C-atom 6 fra metylenden, blir den tilsvarende kalt omega-6 (n-6) fettsyre.

I tillegg til at dobbeltbindingene blir separert av en metylengruppe, er Cis-konfigurasjonen også gjeldende her. Fire eksempler på flerumettede fettsyrer er linolsyre (18:2 n-6), Arakidonsyre (20:4 n-6), eikosapentaensyre (20:5 n-3) og Dokosaheksaensyre (22:6 n-3).



Figur 8. Strukturformel av linolsyre (18:2 n-6), Arakidonsyre (20:4 n-6), Eikosapentaensyre (20:5 n-3), og Dokosaheksaensyre (22:6 n-3).

2.1.5.3 Nomenklatur

I nomenklatur til fettsyrer er utgangspunktet karbonkjeden der antall karbon i kjeden kommer først, så et kolon og så antall dobbeltbindinger, slik at for eksempel palmitinsyre, som har 16 karbonatomer og ingen dobbeltbindinger, skrives 16:0. For å indikere hvor en eventuell dobbeltbinding er plassert på karbonkjeden fra karboksylgruppe, merkes den med Δ (delta), etterfulgt av hvilket karbonatom den er lokalisert etter. Et eksempel er dokosaheksaenssyre (22:6 n-3) som har dobbeltbindinger mellom karbonatomene 4 og 5, 7 og 8, 10 og 11, 13 og 14, 16 og 17 samt 19 og 20. Riktig måte å uttrykke denne på blir følgelig 22:6 (Δ 4, 7, 10, 13, 16, 19). Når denne nomenklaturen brukes, er C-atomet i syregrupper carbon nr. 1.

Ved de flerumettede fettsyrene Omega -3 eller omega-6, angir en om den første dobbeltbinding på karbonkjeden fra metylenden kommer på C-atom 3 eller C-atom 6. Eksempelvis vil docosaheksaenssyre (DHA) da uttrykkes som 22:6 n-3 Dvs en fettsyre som består av 22 karbonatomer og har 6 dobbeltbinding der første dobbeltbinding er på C-atom 3 fra metyl enden. Dette er den mest brukte nomenklaturen.

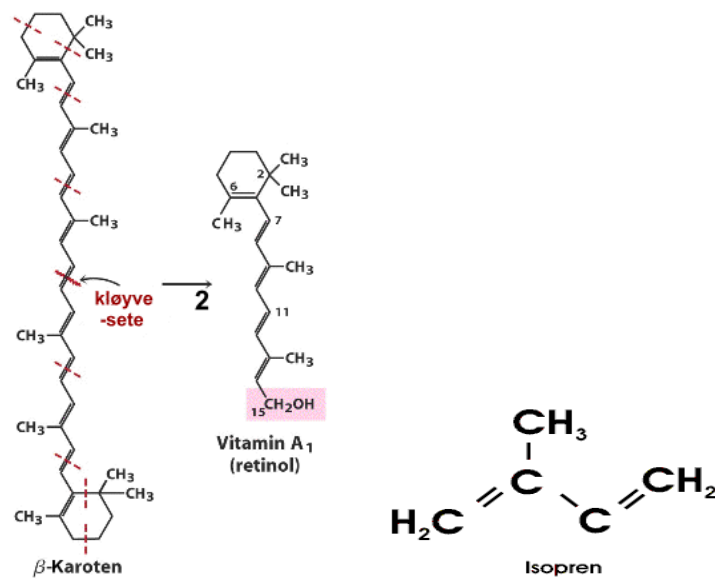
Lengden på karbonkjeden og antallet dobbeltbindinger bestemmer i all hovedsak de fysiske egenskapene. De polare egenskapene reduseres av lengre karbonkjeder og færre dobbeltbindinger, dette medfører også i tillegg en økning av smeltepunktet. Antallet dobbeltbindinger og plasseringen av dem har mest betydning i et helsemessig perspektiv.

2.2 Fettløselige vitaminer

Per definisjon er fettløselige vitaminer lipider. Det er 4 forskjellige vitaminer i denne gruppen av vitaminer, A, D, E og K. Disse vitaminene er bygget opp av isopren enheter.

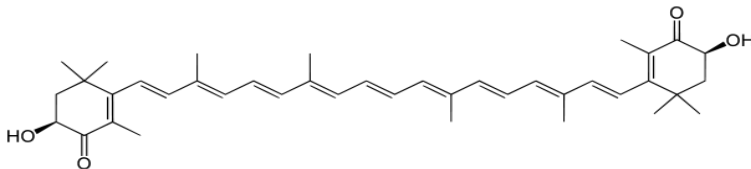
2.2.1 Vitamin A (Retinol)

Vitamin A er et av de umettede hydrokarboner som har karakteristiske lukter/smaker og farger. Kroppen får vitamin A gjennom kostholdet, både direkte som ferdige vitaminer og i tillegg indirekte via karotenoider (figur 9). Den kan dannes fra β -karoten (karotenoider) hos vertebrater (virveldyr). β -karoten finnes i gulrot og mange andre grønnsaker.



Figur 9. Hos vertebrater kan vitamin A dannes ved kløyving av β -karoten. Figuren viser at Vitaminer er bygd opp av isoprener.

Det er bare fotosyntetiske mikroorganismer som alger, sopp og planter som kan syntetisere gruppene av karotenoider. En gruppe er karotenoider som bare består av karbon og hydrogen kalles karotener. Eksempler er β -karoten og lycopen. Den andre gruppen kalles Xanthophyller og inneholder oksygen i tillegg til karbon og hydrogen. Eksempler er astaxanthin og canthaxanthin som i fisk er de viktige fettløselige pigmentene.



Figur 10. Astaxanthin

2.2.2 Vitamin D

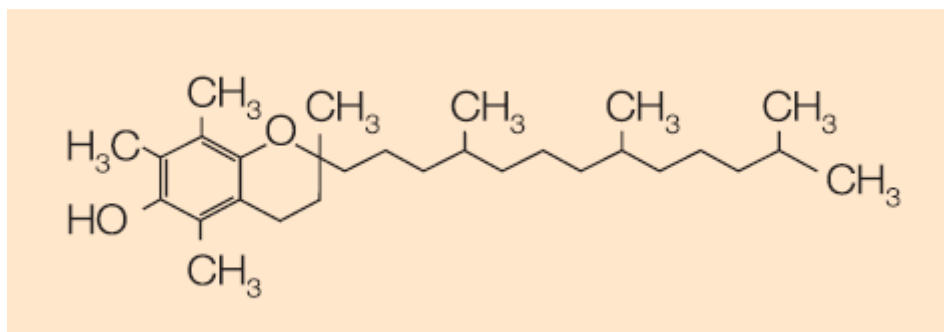
Vitamin D er fellesbetegnelse på en gruppe beslektede steroider. Mennesker får vitaminet gjennom aktivisering knyttet til sollys (UV stråling) mot hud, eller gjennom kosten/kosttilskudd. Vitamin D3 (cholecalciferol) blir dannet i huden fra kolesterolderivatet 7-dehydrokolesterol ved hjelp av en fotokjemisk reaksjon som er drevet av den ultrafiolette komponenten i sollys. Vitaminet som i utgangspunktet ikke er biologisk aktivt, omdannes først i lever og deretter i nyrene til det aktive hormonet 1,25-dihydroxy-vitamin D3 som vist i figur 11. Feit fisk og tran er kilder til D-vitamin. Margarin og melk er ofte og tilsatt vitamin D og kan derfor også være en kilde til inntak.



Figur 11. Vitamin D (cholecalciferol) som dannes i huden ved UV- bestråling av 7-dehydrokolesterol og oksideres deretter i lever og nyre til den aktive hormonformen.

2.2.3 Vitamin E

Tokoferoler og tokotrienoler er eksempler på beslektede stoffer som kommer under samlenavnet Vitamin E. DL-alfa-tokoferol er et syntetisert vitamin E. Disse fungerer som antioksidanter for umettede fettsyrer, spesielt i cellemembraner. Ved å reagere med og uskadeliggjøre reaktive former av oksygenradikaler og andre fri radikaler beskyttes de umettede fettsyrene. Jo høyere innhold av flerumettede fettsyrer i kosten, desto større behov for vitamin E (antioksidanter). I de fleste matvarer finnes små mengder av vitamin E. Det er kun vegetabiliske oljer som inneholder mye av E-vitaminet. Margarin, sammalt mel, egg og tran er andre kilder som inneholder vitamin E.

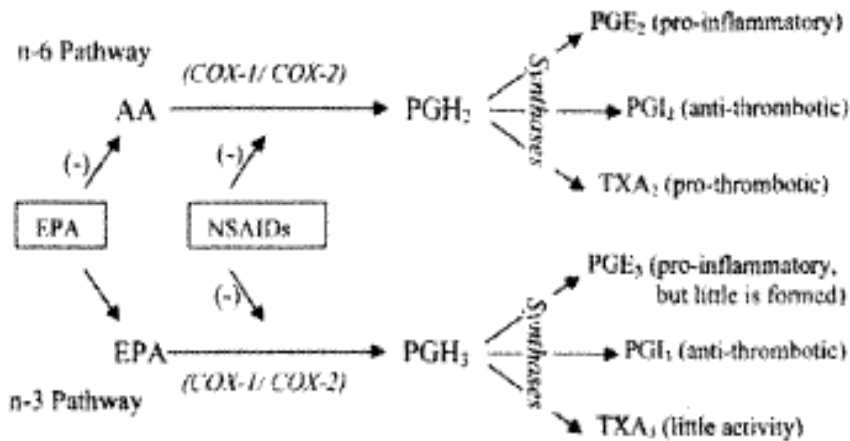


Figur 12. Kjemisk struktur av DL-alfa-tokoferol

2.3 Eikosanoider

En omfattende gruppe stoffer er Eikosanoider. De inndeles i 3 klasser. De tre klassene er prostaglandiner, tromboxaner og leukotriener. Disse er sentrale i utvikling av betennelsesreaksjoner, ved allergiske reaksjoner og ved celledeling. De betegnes ofte som hormonlignende stoffer, og som virkelige hormoner fungerer de ved små konsentrasjoner og de regulerer mange fysiologiske prosesser. De forskjellige fysiologiske effektene er avhengig av hvilken type flerumettede fettsyre de syntetiseres fra. Disse fettsyrene er arakidonsyre,

20:4n-6 (AA, ARA) og eikosapentaensyre, 20:5n-3 (EPA) fra fosfolipidene i cellemembranen.

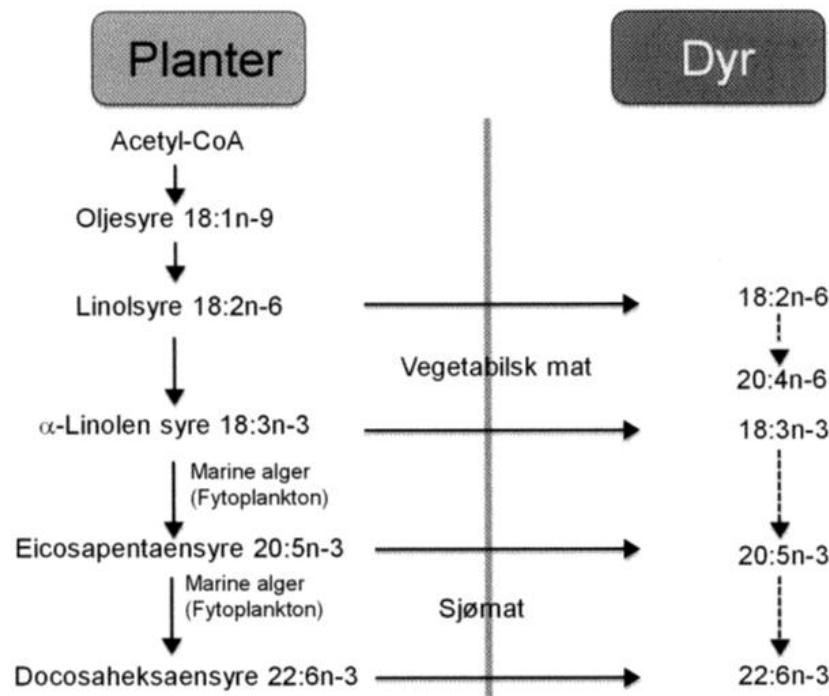


Figur 13. Dannelse av prostaglandiner fra arakidonsyre (AA) og eikosapentaensyre (EPA). Enzymene cyclooxygenase-1 og -2 (cox-1/cox-2) omdanner AA til prostaglandin H₂ (PGH₂) mens EPA omdannes til prostaglandin H₃ (PGH₃). Prostaglandin synthetase omdanner PGH₂ og PGH₃ til henholdsvis serie-2 prostaglandiner (PGE₂, PGI₂) og tromboxan (TXA₂) og serie-3 prostaglandiner (PGE₃, PGI₃) og tromboxan (TXA₃). NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) er legemidler (f.eks. Ibux og Naprosyn) som hemmer cyclooxygenasene og reduserer dannelse av de betennelsesfremmende prostaglandinene (først og fremst PGE₂). (modifisert fra Cleland et al. 2006)

2.4 Essensielle fettsyrer

Essensielle fettsyrer er fettsyrer som mennesker må få tilført gjennom kostholdet. Verken mennesker, dyr eller fisk har enzymer som er i stand til å plassere dobbeltbindinger nærmere metylenden i fettsyrer enn karbonatom nummer 9. Linolsyre (LA; 18:2n-6) og α -linolensyre (ALA; 18:3n-3) er de to essensielle fettsyrene for mennesker, dyr og fisk (figur 14). Det er arakidonsyre (ARA; 20:4n-6), EPA og DHA som er de mest viktige og altså ikke LA og ALA i seg selv, men de som syntetiseres ut fra disse C 18- fettsyrene. ALA kan syntetiseres videre i mennesker til EPA og DHA, men denne syntesen er svært ineffektiv (Schmidt et al., 2005).

Det er også vist at enzymene som er med på å omdanne ALA til EPA blir hemmet av LA (Uauy & Valenzuela, 2000). Det finnes store mengder av LA i det vestlige kostholdet. For syntesen av ARA er LA utgangspunktet. Omdanningen fra ALA til EPA er beregnet til å være kun 5 % og videre til DHA ned mot 0,5 % (Plourde & Cunnane, 2007). Dette tilsier at direkte tilførsel gjennom kosten, er den eneste reelle måte å få i seg større mengder av EPA og DHA



Figur 14. Linolsyre fra plantekost omdannes i dyr og mennesker til arakidonsyre. Omdannelsen av α -linolensyre til EPA og videre til DHA er lite effektiv hos dyr og mennesker (stiplet pil). Marin fisk og skaldyr har marine encellede alger i basis av sin næringskjede slike alger produserer mye EPA og DHA og derfor er sjømat rik på disse fettsyrene. (Olsen, 2012, pers.kom).

2.5 Lipidkvalitet.

Lipider kan tape kvalitet på to måter, enten ved hydrolyse eller ved oksidasjon. Ved lagring av næringsmidler vil triglyserider (TAG) og fosfolipider omdannes til frie fettsyrer. Lipaseenzymer katalyserer og bryter ned triglyserider til frie fettsyrer og glycerol. Fosfolipaseenzymer omdanner fosfolipider direkte til frie fettsyrer. Måling av innhold av frie fettsyrer er en klassisk metode for å bestemme kvalitet.

Per i dag er det ikke noen regulering av kvalitetskriterier for marine oljer fra myndighetene. Tre organisasjoner anbefaler kvalitetsparametere for fett og oljer. Codex Alimentarius, (FAO) "Codex standard for edible fats and oils not covered by individual

standard” anbefaler Codex til fett og oljer generelt. Den Europeiske farmakopen (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.) har utarbeidet kvalitetsparametre for noen typer marine oljer til de landene der slike oljer markedsføres som legemidler.

Den globale organisasjonen for EPA og DHA (GOED) har laget anbefalinger for oksidasjonsstatus og for enkelte andre kvalitetsparametre for marine oljer.

En norsk arbeidsgruppe arbeider med utgangspunkt i verdier anbefalt av GOED's om å få etablert Codex standard for marine oljer. Codex verdi for frie fettsyrer (syre verdi) i fiskeolje er 3 mg KOH/g, og foreslått til 20 mg KOH /g fett for krillolje. Dette tilsvarer henholdsvis 1,5 % og 10 % FFA i fett.

For de kommersielle partnerne er det frivillig å følge disse anbefalingene

2.6 Tynnsjikt-kromatografi(TLC)

Kromatografi er en betegnelse på separasjonsmetoder som brukes til å skille stoffer i en blanding fra hverandre. Prinsippet bak kromatografi er at komponenter med ulikheter i fysiske og kjemiske egenskaper som molekylvekt, kokepunkt, elektrisk ladning, pKa, hydrofilisitet, lipofilisitet m.m. vandrer med ulik hastighet gjennom det kromatografiske systemet og vil kunne detekteres til ulike tider på et gitt punkt, eller detekteres på ulike punkter ved en gitt tid.

Fasene i Tynnsjikt-kromatografi (TLC) kan være normalfase kromatografi eller omvendtfase kromatografi. Forskjellen mellom de to fasene er at i normalfase kromatografi er stasjonærfasen mer polar enn mobilfasen mens i omvendtfase kromatografi er stasjonærfasen hydrofob og mobilfasen en vandig løsning. TLC med normalfase er en enkel og vanlig metode for å separere fettklasser i en prøve.

Det brukes en TLC- plate dekket med et tynt lag (0,1-0,2 mm.) av silikapartikler, som er den stasjonære fasen. Silikaen sin porøsitet gjør at de har et stort overflateareal som igjen gir en stor kontaktflate til mobilfasen. Aminopropylgruppene er kjemisk bundet til silanogruppene på overflaten av silikapartiklene. Mobilfasen består som regel av en blanding av organiske løsemidler. Ved TLC-analyse ble alltid en referanse løsning analysert på samme plate som de ulike prøvene. Før analysen starter, må atmosfære i tynnsjikt-kammeret være mettet med mobilfase. Prøvene appliseres ca 1cm fra enden av platen. Elueringen avsluttes når mobil fase er ca 1 cm fra den øvre enden av TLC-platen. For å fremkalle flekkene ble platen først sprayet med en kobbersulfatløsning og deretter satt i varmeskap som gradvis ble varmet opp til 180 °C. TLC-systemet separerer klassene i prøven etter deres retensjonsfaktor.

Retensjonen er et samspill mellom egenskapene til stoffet, stasjonærfasen og mobilfasen. Siden silikaplatene har polare overflater vil stoffer med polare grupper retarderes mest og det upolare stoff vil vandre lengst.

For å kunne påvise et bestemt stoff i prøven må stoffet ha samme retensjonsfaktor som referansestandard. Dette kan gjøres ved å beregne stoffenes retensjon. Retensjonsfaktoren (R_f) er definert ved flekkens avstand fra startlinjen. Ved å sammenligne resultatet med standardblandingen kan man finne ut hvilke fettklasser prøven inneholder.

2.7 Fastfase ekstraksjon (SPE)

Fast fase ekstraksjon er en metode som brukes til å isolere, rense og oppkonsentrere stoffer fra væske. Den baserer seg på stoffenes fysiske og kjemiske egenskaper, dvs. stoffers sin evne til å fordele seg mellom overflaten av et fast stoff og en løsning. Dette skjer under betingelse av at det faste stoffet har funksjonelle grupper på overflaten som gir interaksjon med stoffet. Disse faste stoffene kalles sorbent. Det er mange typer sorbenter en kan velge mellom, og dette avhenger av type interaksjon under ekstraksjonene. En velger den typen sorbent som gir interaksjon med analytten, men ikke med uønskede stoffer som forurensinger. Hvis interaksjonen mellom sorbenten og stoffet er sterkere enn mellom stoffet og løsningen, vil stoffet absorberes til sorbenten og isoleres. Silikabaserte sorbent-materialer er det som er mest brukt. En kan opparbeide stoffene i en omvendt-faseekstraksjon eller i ionebytte ekstraksjon når stoffene er løst i vann. En normal fase ekstraksjon benyttes når stoffene er løst i organiske løsemidler. Siden det er lipider som skal isoleres, velger en normalfaseskolonne med polar funksjonell gruppe, aminopropyl, som festes på den silika baserte sorbenten (figur15).



Figur 15. Aminopropyl som festes på silika

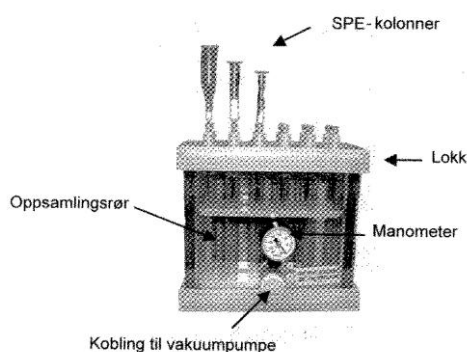
Prinsippet bak en normalfase ekstraksjon er at stoffene retarderes med polar interaksjon mellom polare funksjonelle grupper på overflaten av sorbenten og polare grupper på analytten. Retensjonsgraden er avhengig av stoffers sin polaritet. De minst polare stoffene vil retarderes svakere enn de mer polare stoffene. Disse polare interaksjonene inkluderer hydrogenbindinger, dipol-dipol bindinger, og induisert-dipol-dipol-bindinger.

Ekstraksjonsprosessen inneholder vanligvis fire trinn; kondisjonering og ekvilibrerings av sorbenten, påsetting av prøve, vasking og eluering av de ulike lipidklassene. Kondisjonering er det første trinnet som aktiverer sorbenten ved at de funksjonelle gruppene reiser seg og gir

et stort overflateareal. Med stor overflateareal vil prøveløsningen få god kontakt. Analytten vil absorbere /retarderes bedre. Deretter kan prøven settes på kolonnen. I påsettingstrinnet vil analytten fordele seg mellom sorbenten og løsningen. Målet i dette trinnet er at sorbenten skal fange opp analytten fullstendig. For å få dette til må det være nok interaksjoner mellom analytten og sorbenten. Det er viktig at det prøven er løst i, ikke er et sterkt elueringsmiddel. Det neste trinnet er vasking hvor en vasker ut en rekke forurensinger som kan retarderes på sorbenten og som er svakere bundet til sorbenten enn analytten. Vaskeløsningen kan altså ha en høyere elueringsstyrke enn prøveløsningen, men ikke så høy at analytten elueres ut. Siste trinnet er at analytten elueres ut av kolonnen ved å bruke elueringsmiddel. En bør bruke et minst mulig elueringsvolum men som likevel er i stand til å kunne bryte alle interaksjonen mellom analytten og sorbenten. I denne oppgaven ble det brukt en metode som er modifisert etter Vaghela og Kilara (1995).

2.7.1. SPE apparat

Den enkleste apparatur til SPE trenger bare en sprøyte som enten suger eller presser væsken gjennom kolonnene. Vakuumboks (figur 16) benyttes i SPE når en ønsker å opparbeide 10-15 prøver samtidig. Ved å koble boksen til enten en vannstrålepumpe eller en mekanisk pumpe, vil boksene få vakumeffekt slikt at væsken kan suges gjennom kolonnene. Inne i vakuumboksene, kan oppsamlingsrør fange opp fraksjonene etter ekstraksjonen.



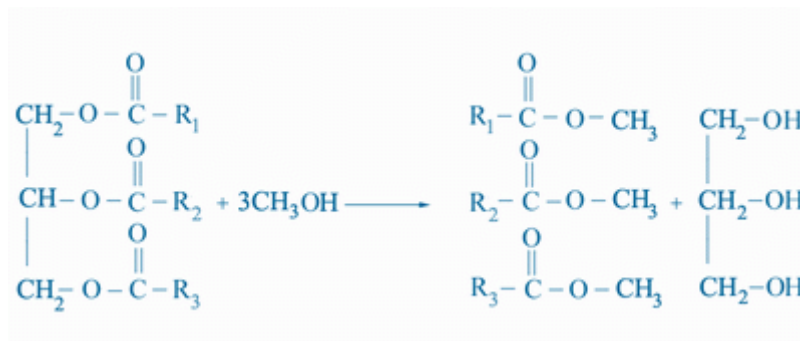
figur 16. Vakuumboks til SPE

2.8 Gasskromatografi (GC)–flammeionisasjonsdetektor (FID)

En gasskromatograf består av en injektor, en kolonne og en detektor. I tillegg kreves det en bæregass (mobilfase) og trykkluft og hydrogen til FID. Bæregass kan være: helium (He), hydrogen (H) eller nitrogen (N₂). Helium gass er mest brukt fordi den er sikrere i bruk enn hydrogen og gir smale topper i kromatogrammet selv ved høye mobilfasehastigheter (ca 60 cm/sekund).

Separasjonen er avhengig av en rekke eksperimentelle faktorer, som for eksempel type stasjonær-fase, lengde av kolonne, temperatur, og analyttenes kjemiske og fysikalske egenskaper. Injeksjonsvolumene som vanligvis brukes ligger mellom 0,5-2 µl og mengden tilgjengelig analytt avgjør om en bruker splitt- eller splittløs injeksjon.

For å kunne benytte gasskromatografi til å analysere fettsyrer i olje, må en frigjøre disse fra de ulike kjemiske strukturer som de normalt er bundet til. Ved forestringsreaksjon med metanol vil det bli dannet metylestere. For å øke farten på reaksjonen, benyttes en katalysator i kombinasjon med oppvarming. Katalysator kan være en base, en syre eller et enzym. I denne oppgaven ble det benyttet syre (H₂SO₄) sammen med oppvarming.



Figur 17. Transesterifisering

3. Materialer og metoder

3.1 Materialer

Følgende olje produkter ble undersøkt i oppgaven:

1. Lofot tran, tran fra torsk, Lofot produkt AS; 2. Trippel Omega-3: Konsentrert Omega-3 fra Biopharma AS; 3. Nordic Light krill & fiskeolje kapsler fra Northern Light AS; 4. Omega-3 med krillolje fra Biopharma ; 5. Complete Krillolje kapsler fra Weifa. (tabell 2)

Disse oljene ble kjøpt fra apotek og helsekostbutikk i slutten av 2011 og i begynnelse av 2012.

Tabell 2. Deklarasjoner av oljer fra forskjellige produkter: Lofot tran, Trippel Omega-3, Nordic Light krill & fiskeolje, Omega-3 med krillolje og Complete Krillolje.

Produkter	EPA (mg)	DHA (mg)	Total Omega-3	Antioksidant	Andre	Best før	Anbefalt Døgn dose
<u>Lofot tran:</u> Tran fra torsk Innhold per 5 ml:	400	500	Ca 1000	DL-Alfa- tokoferol	Tran Vitamin A 250 µg Vitamin D 10 µg Vitamin E 10 mg	09.2013	Barn/voksne 5 ml
<u>Trippel Omega-3:</u> Konsentrert Omega-3 Innhold per kapsel, 500 mg :	165	110	325	DL-Alfa- tokoferol	Vitamin A 250 µg Vitamin D 10 µg Vitamin E 10 mg Gelatin Glyserol Retinyl palmital kolekalsiferol	17.08.2013	2 kapsler
<u>Nordic Light krill & fiskeolje</u> Innhold per kapsel, * 500 mg:	129	88	263 med fosfolipid	Astaxantin 17 µg	Fiske olje 350 mg Krill olje 150 mg	01.2012	Voksne: 2kapsler Barn over 8 år: 1 kapsel
<u>Omega-3med krillolje</u> Innhold per kapsel, 550 mg:	100	197	317,5		Dokosapentaic syre (DPA) 18 mg Fiske olje 450 mg Krill olje 100 mg	15. 08.2013	2 kapsler
<u>Complete Krillolje</u> Innhold per kapsel, 500 mg:	75	45	150	Astaxantin 600 µg	Fosfolipider 210 mg	04.2012	2 kapsler

* I deklarasjoner er det skrevet at hver kapsel innhold 500 ml.!



Figur 18. Bildene viser produktene som ble undersøkt.

Kjemikalier brukt under arbeidet med oppgaven var fra

Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland) :

Dietyleter, Pro analyse

Eddiksyre 100 %, Pro analyse

Heptan, Pro analyse

Kobber(II)sulfat-5-hydrat, Pro analyse

Natriumklorid, Pro analyse

Orto-Fosforsyre 85 %, Pro analyse

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

Diklormetan, Pro analyse

Metanol, Pro analyse

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

Kloroform, Pro analyse

Vekt

Sartorius, BP 110 S fra Labequip, Canada

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).

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 (N₂) 5.0 Ultra (Yara Praxair AS, Oslo, Norge)

GC maskin

Type: Agilent 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Injektor: en 7638B autoinjekt. Kolonne: kappilarkolonne, Varian CP 7419, Coating select FAME (Varian Inc., Middelburg, Nederland).

Bæregass : Helium.

Glassutstyr Diverse

Kimax-rør

Pyrex-rør

Erlenmeyerkolber

Rundkolber

Begerglass

Diverse

Engangspipetter

Trakter

Eppendorfpipetter (ulike volum)/pipettespisser

Aluminium folie

Standarder

Fettsyrestandarder som ble benyttet var 47033, PUFA No.1 (Marine source); 47015-U, PUFA No.2 (Animal source); 47085-U, PUFA No.3 (from menhaden oil); 1891-1 AMP; 1895-1 AMP; 1898-1 AMP; ble kjøpt fra Supelco (Bellafonte, PA, USA). (tabell 3). I tillegg til disse ble det brukt fettklassestandardene 16-0A, 18-0A og 18-5A var kjøpt fra NuChek Prep. Inc., Elysian, MN, USA (tabell 4).

Tabell 3. viser oversikten over fettsyresammensetning i fettsyrrermetylester standarder. X indikerer tilstedeværelse av fettsyrer.

	1891-1	1895-1	1898-1	PUFA-1	PUFA-2	PUFA-3
Fettsyre						
13:0			x			
14:0			x	x	x	x
15:0			x			
16:0	x	x	x	x	x	x
16:1 n-7				x	x	x
16:2 n-4						x
16:3 n-4						x
17:0			x			
18:0	x	x		x	x	x
18:1 n-9				x	x	x
18:1 n-7	x			x	x	x
18:2 n-6	x			x	x	x
18:3 n-6					x	
18:3 n-3	x			x	x	x
18:4 n-3				x		x
20:0		x				
20:1 n-9				x		
20:4 n-3						x
20:4 n-6					x	
20:5 n-3				x	x	x
22:0		x				
22:5 n-3				x		x
22:6 n-3				x	x	x

Tabell 4. Innhold av fettklassestandarder 16-0A, 18-0A og 18-5A.

16-0A	18-0A	18-5A
monopalmitin	monostearin	Lecitin
dipalmitin	distearin	kolesterol
tripalmitin	tristearin	oljesyre
metylpalmitat	metylstearin	triolein
		kolesteryloleat

3.2 Metoder

3.2.1 Fettklasseanalyse

3.2.1.1 Tynnsjiktskromatografi (TLC)

For å analysere fettklasser ved hjelp av TLC, brukes følgende fremgangsmåte: Oljeprøver løst i diklormetan (DCM) til en konsentrasjon på 25 mg/ml får vi ved å først trekke oljen ut av kapselen ved hjelp av sprøyte med kanyle. Deretter ble oljen veid ved hjelp av analysevekt for så å tilsette DCM til oljen. Mobilfasen som ble brukt i TLC, var laget av heptan: dietyleter: eddiksyre 70:30:1 (V/V/V). Videre ble mobilfasen tilsatt i et elueringskammer til bunnen på dette var dekket og lokket ble satt på. Apparaturen ble ikke brukt før etter at atmosfæren i kammeret var mettet med mobil fase. 1 µl av oljeprøven og fettklassestandard ble applisert på HP-TLC platen og satt inn i mobilfasekammeret. Etter at mobilfasen hadde beveget seg til det gjensto ca 1 cm til toppen av platen, ble platen tatt ut av kammeret. Denne ble så satt opp mot kammeret for å tørke. Etter platen hadde tørket, ble den sprayet med en kobberløsning som inneholdt 10 % Kobbersulfat i 8% fosforsyre (Vaghela & Kilara, 1995). Platen ble deretter lufttørket i 10 minutter for så å bli satt inn i en kald varmeovn og oppvarmet til 180 °C.

3.2.2 Fast fase ekstraksjon (SPE)

Fettklassene i oljeprøvene ble isolert med normal fase SPE. Fremgangsmåten er modifisert fra Vaghela og Kilara (1995). Konsentrasjonen av oljeprøver i diklormetan var 20 mg/ml. Her ble det benyttet Mega Bond Elut (5 g) aminopropyl SPE engangskolonner. Kolonnene ble plasserte i en Visiprep vakuum manifold. I hver prøve ble fraksjoneringen utført med to kolonner. Kolonnen ble først kondisjonert (aktivert) med 20 ml heptan. 2ml prøveløsning ble deretter applisert i denne. Når prøveløsningen hadde trukket inn i kolonnen, ble 20 ml mobilfase A1 tilsatt. 20 ml av mobilfasene B1 og C1 ble deretter fortløpende tilsatt i kolonnen. Fraksjonene A1, B1 og C1 ble samlet opp hver for seg. Før ny mobilfase ble tilsatt ble kolonnen vasket med 10 ml Heptan og denne ble så samlet opp med den foregående fraksjon. Rotavapor ble så benyttet for å dampe tørr hver fraksjon. Prøvene A1 og C1 ble så løst i 1ml DCM for videre tynnsjiktskromatografi (TLC) og GC- analyse. Prøve B1 ble løst i DCM til en konsentrasjon på 20 mg/ml. Mengde av de ulike klasser ble bestemt ved å veie prøveglass før eluering og etter avdamping av eluert fraksjon. Fra fraksjon B1, ble en 500 µl løsning tatt ut for analyse på TLC og GC. Resten av løsningen fra fraksjon B1 ble så rensset videre med SPE, med samme fremgangsmåte som nevnt ovenfor med elueringsmiddel A2, B2 og C2.

Tabell 5. Mobilfaser løsninger for separasjon av fettklasser ved Fast fase ekstraksjon, Mega Bond Elut (NH₂). Lipidklasser: nøytrale lipider (NL), frie fettsyrer (FFA), og fosfolipider(PL)

Elueringsmiddel	Volum (ml)	Lipidklasser eluert
A1,A2 Diklormetan: Isopropanol 2:1 (V/V)	20	NL
B1,B2 Diklormetan: Isopropanol 2:1 (V/V) + Eddiksyre 5%	20	FFA
C1,C2 Metanol	20	PL

3.2.3 Fettsyresammensetning

I analyse av fettsyresammensetningen i oljeprøvene, ble det benyttet en metode av Stoffel et al. (1959) som ble modifisert. Diklormetan:metanol 2:1 (v/v) ble benyttet til å løse opp oljen for å få en endelig konsentrasjon på 10 mg/ml. Etter at 100 µl av denne løsningen hadde blitt tilsatt diklormetan (0,9 ml) og 2 % H₂SO₄ metanol (2,0 ml), ble denne varmet i avtrekksskap i en time på 100°C. Etter dette ble så heptan (3,5 ml) og 5 % NaCl (3,5 ml) tilsatt og rørene godt ristet. Heptanfasen som da bestod av heptan og lipider ble pipettert over i nye rør og dampet tørr ved hjelp av nitrogengass. Dette ble gjort i en N-EVAP. Etter dette ble prøvene så løst i heptan (100 µl) for deretter å separere de metylerte fettsyrene ved hjelp av en gaskromatograf, der det ble benyttet en fused silica kappilarkolonne. Kolonnen var 50 m lang, den har en indre diameter på 0,25 mm og tykkelsen av stasjonær fasefilmen var 0,25 µm. Det ble injisert 1 µl og injektor ble brukt i splitt løsningsmode. En flammeionisasjonsdetektor (FID) ble benyttet som detektor. Helium ble benyttet som bæregass i separasjonen.

Injektortemperatur var 240 °C og detektortemperatur var 250 °C. Temperaturprogram på kolonnen var som følger.

Start med 50 °C i 2 minutter

Økning med 10 °C i minuttet til 150 °C

Økning med 2 °C i minuttet til 205 °C

Økning med 15 °C i minuttet til 255 °C, for så å holdes på denne temperatur i 10 minutter.

Det ble brukt seks standardblandinger av kjente fettsyremetylestere for å identifisere prøvene med de ukjente fettsyrene. De fettsyrestandarder som ble benyttet her var 1891-1AMP, 1895-1AMP, 1898-1AMP, PUFA-1, PUFA-2 og PUFA-3. 100 µl av standardene ble hver for seg satt i GC rør, og analysert ved hjelp av samme programmet som prøvene med de

ukjente fettsyrene. Av hver standard ble det kjørt to parallelle analyser, og det ble analysert tre paralleller av hver oljeprøve.

Retensjonstiden til toppene i prøvene, ble sammenlignet med retensjonstidene til fettsyrene i standardene for å identifisere fettsyrene. Det vil si at samme retensjonstid indikerer samme fettsyre. For å finne mengden av de enkelte fettsyrene, kommer en frem til dette ved å beregne arealet under toppene, altså forholdet mellom den enkelte fettsyres areal under toppen og arealet av alle toppene samlet.

3.2.4 Frie fettsyrer (%)

Det ble benyttet en titreringsmetode til å måle mengden av frie fettsyrer i olje. Denne metoden er beskrevet av Ke et al.(1976). Fra Nordic Light krill og fiskeolje ble det tilfeldig plukket 6 kapsler fra boksen. 6 kapsler av Omega-3 med krillolje ble plukket ut fra 3 forskjellige brett. Oljen ble trukket ut med sprøyte, blandet godt. Deretter ble 0,1-1g olje løst i 75 ml kloroform:metanol:isopropanol 2:1:2 (v/v/v) og tilsatt 4 dråper indikator (0,5 % meta-cresolpurpur). En titrerte så løsningene med 0,05 M NaOH til omslag fra klar til fiolett farge. Det ble titrert en blindprøve med løsemiddel og indikator på tilsvarende måte. Følgende formel ble brukt for å beregne prosentandelen frie fettsyrer:

$$\text{Frie fettsyrer(\%)} = \frac{(\text{pr-bl}) \times M(\text{mol/l}) \times 282(\text{g/mol})}{m(\text{g}) \times 1000(\text{ml/l})} \times 100 \%$$

Hvor:

pr = titreringsvolum av prøve (ml)

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml)

M = molaritet av NaOH (0,05 mol/l)

282 = molekylvekt til oljesyre (g/mol)

m = vekt av prøve (g)

Tre paralleller av hver oljeprøve, samt den blanke prøven, ble analysert, og dette ble utført i januar og mars 2012.

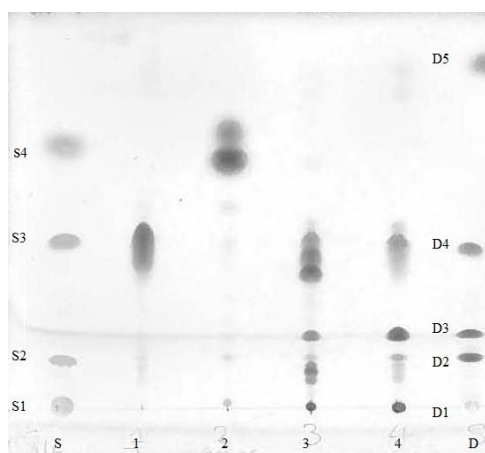
I analysene i begge 2 periodene ble det brukt samme produkter, fra de samme pakkene, og disse ble lagret i rom temperatur i mellomtiden.

4. Resultater

4.1 Fettklasser i Krill olje og andre marine oljer

Analyse av fettklasser i 4 forskjellige marine oljeprodukter

Fettklasser i krillolje og andre marine oljeprodukter ble separert ved å bruke tynnsjikt-kromatografi (TLC). 4 forskjellige oljeprodukter ble analysert og det ble brukt 2 standardblandinger for å identifisere de enkelte fettklassene i disse produktene. Prøvene fra 4 produkter inneholdt flere fettklasser (figur 18). Lofot tran ble analysert i spor 1. Resultatet viste et høyt innhold av triacylglyserider (TAG). Spor av litt mer polare stoffer som kan være kolesterol og diacylglycerol kan ses. Polare lipider (fosfolipider) er ikke til stede. Trippel Omega-3 ble analysert i spor 2. Dette produktet domineres av fettsyreestere, og to fraksjoner med litt forskjellig retensjonstid. Andre fettklasser er til stede bare i små mengder. Analyse av Nordic Light krill og fiskeolje vist i spor 3. Dette produktet har et sammensatt innhold. Det inneholder TAG som synes å være 3 forskjellige hovedtyper. I tillegg inneholder produktet frie fettsyrer i ganske stor konsentrasjon. Stoffer som kan være kolesterol og diacylglyseroler er til stede. Produktet inneholder også polar lipider (fosfolipider). Det fjerde produktet som ble analysert var Complete Krillolje (spor 4). Dette produktet inneholder de samme fettsyrerklassene som Nordic Light krill og fiskeolje. Andel fosfolipider og frie fettsyrer er imidlertid større. I tillegg ser man dessuten forekomst av ikke polare lipider som kan være voksesterer.



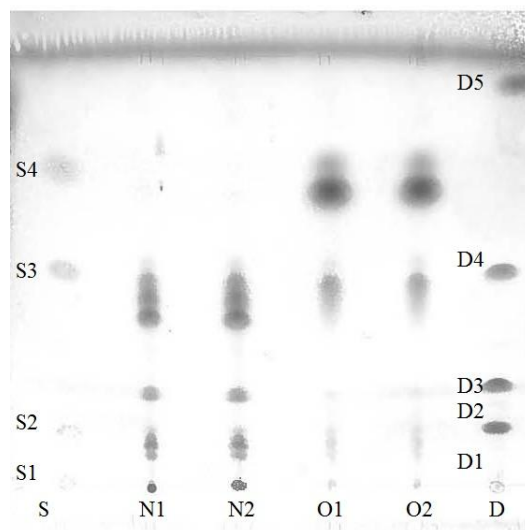
Figur 19. Tynnsjikt-kromatografi av 4 marine olje produkter (1, 2, 3, 4) og 2 standardblandinger (S og D). 1. Lofot tran; 2. trippel omega-3; 3. Nordic Light krill og fiskeolje; 4. Complete Krillolje. Standard S (16-0A): monopalmitin (S1), dipalmitin (S2), tripalmitin (S3), og metylpalmitat (S4). Standard D (18-5A): Lecitin (D1), kolesterol(D2), oljesyre(D3), triolein (D4) og kolesteryloleat (D5).

Analyse av fettklasser i 2 typer krill og fiskeolje produkter

To produkter med krill og fiskeolje ble kvalitativt analysert ved å bruke tynnsjiktskromatografi (TLC). To standardblandinger ble analysert samtidig for å identifisere enkeltkomponentene i disse produktene. Hvert produkt ble analysert med 2 parallelle prøver. Det var ingen vesentlige forskjeller mellom de 2 paralleller, visuelt samsvarte altså N1 og N2, det samme gjaldt for O1 og O2.

Nordic Light krill og fiskeolje ble analysert i spor N1 og N2. Dette produktet har et sammensatt innhold. Det viste innhold av TAG som ser ut til å inneholde 3 forskjellige hovedtyper. I tillegg inneholder produktet frie fettsyrer i forholdsvis store konsentrasjoner. Stoffer som kan være kolesterol og diacylglyseroler er til stede. Produktet inneholder også polare lipider (fosfolipider).

Omega-3 med krillolje (blanding krill og fiskeolje) ble analysert i spor O1 og O2. Dette produktet domineres av fettsyreestere, 2 typer med litt forskjellig retensjonstid. I tillegg inneholder produktet en god del TGA. Andre fettklasser er til stede også men bare i små mengder.

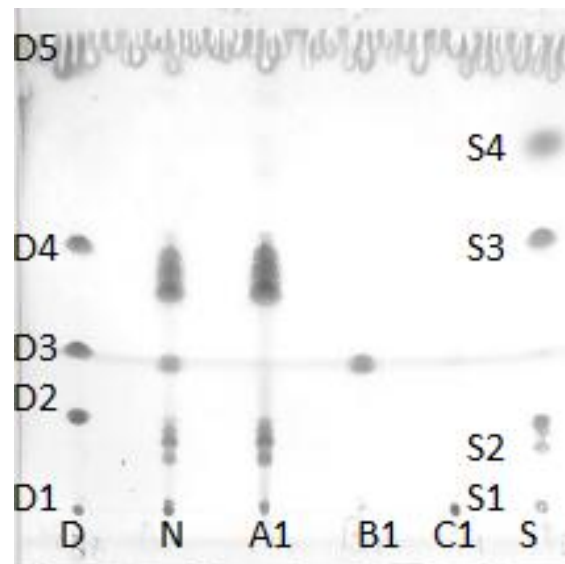


Figur 20. Tynnsjikt-kromatografi av 2 krill & fiskeoljer produkter (N1, N2 og O1,O2) og 2 standardblandinger (S og D). N1 og N2 Nordic Light krill og fiskeolje; O1 og O2 Omega-3 med krillolje. Standard S (16-0A): monopalmitin (S1), dipalmitin (S2), tripalmitin (S3), og metylpalmitat (S4). Standard D (18-5A): Lecitin (D1), kolesterol (D2), oljesyre(D3), triolein (D4) og kolesteryloleat (D5).

4.1.2 Isolering av fettklasser ved bruk av fast fase ekstraksjon (SPE)

TLC analyse av ren Nordic Light krill og fiskeolje vise i spor 1. Analyse av SPE fraksjon 1 vises i spor A1, fraksjon 2 i spor B1. og fraksjon 3 i spor C1 (se figur 21).

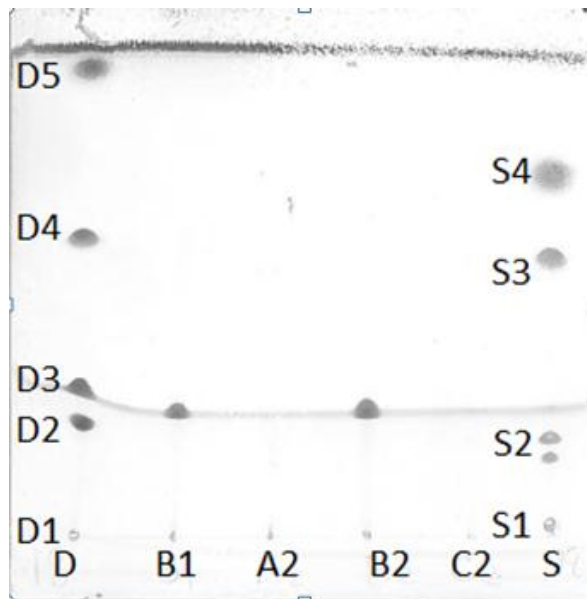
Spor A1 viser et klart utslag i påsettingspunktet og det indikeres dermed at produktet kan ha innhold av polare lipider (D1). Det samme gjelder mulig innhold av kolesterol (D2) der en også har et klart og mørkt utslag. Frie fettsyrer har ingen utslag og kan derfor være fraværende i denne fraksjonen. Prøven inneholdt triacylglyserider (D4). Spor B1 har et svakt utslag i påsettingspunktet, og det kan derfor være en mulig indikasjon på polare lipider (D1). Det eneste utslaget utover dette, er frie fettsyrer (D3), der en har et forholdsvis klart utslag. Spor C1 har kun et synlig utslag og det er i påsettingspunktet og dette indikerer da at prøven kan inneholde polare lipider(D1).



Figur 21. Tynnsjiktromatografi Nordic Light krill og fiskeolje (N) etter SPE trinn1 og Ufraksjonert fettklassestandarder 18-5A (D) og 18-0A (S). N. Nordic Light krill og fiskeolje; A1. teoretisk Nøytrale lipider fraksjon; B1.teoretisk frie fettsyrer fraksjon; C1.teoretisk polare fraksjon. Standard D (18-5A): Lecitin (D1), kolesterol(D2), oljesyre(D3), triolein (D4) og kolesterylloleat (D5). Standard S (18-0A): monostearin(S1), distearin(S2), tristearin(S3), metylstearin(S4).

Kolonne 2.

Fraksjon B1 fra SPE kolonne 1 ble videre isolert med 2. kolonnen. Det ga ingen utslag på Spor A2 heller ikke på C2. Spor B2 viste kraftig utslag på frie fettsyre og det indikeres da mulig innhold av dette i prøven. Det er noe utslag i påsettingspunktet.



Figur 22. Tynnsjikkromatografi av fraksjon B1 etter SPE trinn2 og ufraksjonert standardblandinger (D, S). B1. teoretisk frie fettsyrer fraksjon fra SPE trinn 1; A2.teoretisk Nøytrale lipider fraksjon; B2. teoretisk frie fettsyrer fraksjon; C2.teoretisk polare fraksjon. Standard D (18-5A): Lecitin (D1), kolesterol (D2), oljesyre(D3), triolein (D4) og kolesteryloleat (D5), Standard S (18-0A): monostearin(S1), distearin(S2), tristearin(S3), metylstearin(S4)

4.2 Analyse av fettsyresammensetning

4.2.1 Total fettsyresammensetning

Total fettsyresammensetning i Nordic Light krill og fiskeolje ble undersøkt ved bruk av gasskromatografi (GC). Analysene viste at prosentandelen av de flerumettede fettsyrer var på 67,1 %. EPA (20:5 n-3) utgjorde nesten halvparten av andelen flerumettede fettsyrer, (31,8 %). Mengden av DHA (22:6 n-3) var litt lavere (26,0 %). Andelen av enumettede fettsyrer var nesten en syvendedel av den totale fettsyresammensetningen (14,5 %). I denne kategorien var det Oljesyre (18:1 n-9) med 5,8 % som var det mest av. De mettede fettsyrer utgjorde en prosentandel på 11,1 %, og av disse mettede fettsyrene var det palmitinsyre som dominerte med en andel på 6,5 %.

SPE metoden ble brukt til å fraksjonere Nordic Light oljen med de elueringsmidlene som er beskrevet i tabell 5. I alle fraksjoner fra SPE kolonne 1, ble fettsyresammensetning analysert med GC. Fraksjon B1 (teoretisk frie fettsyre fraksjon) fra SPE kolonne1 ble videre fraksjonert i SPE kolonne 2. med elueringsmidlene som er beskrevet i tabell 5. I disse fraksjonene ble så den fettsyresammensetning analysert med GC. Den nøytrale lipidfraksjonen og den polare lipidfraksjonen fra SPE kolonne 2 ga ingen toppe i GC-kromatogrammet. Dette indikerer at disse to fraksjonene ikke inneholder lipider.

Analyse av fraksjon A1 viste en sammensetning av flerumettede fettsyrer omstrent som sammensetningen av flerumettede fettsyrer i den ufraksjonerte oljen. Enumettede fettsyrer var ganske like. Andelen mettede fettsyrer viser heller nesten ikke forskjell fra Nordic Light krill og fiskeolje (se tabell 6).

Summen av mettede fettsyrer fra fraksjon B1 og B2 er klart høyere enn i oljen og i fraksjon A1. Høyest andel av mettede fettsyrer ble funnet i fraksjon C1.

Tabell 6. Prosentvis fordeling av de ulike fettsyrene i Nordic Light Ren olje (N), nøytrale lipider spor A1 figur 21, polar lipider spor C1 figur 21, frie fettsyrer etter 1.SPE, spor B1 figur 21, frie fettsyrer etter 2.SPE spor B2 figur 22, og fraksjoner separert med SPE. (n=3)

Fettsyrer	Nordic Light Ren olje N	Nøytrale lipider etter SPE 1 A1	Polare lipider etter SPE 1 C1	Frie fettsyrer etter SPE 1 B1	Frie fettsyrer Etter SPE 2 B2
Mettede					
14:00	2,5± 0,5	2,7± 0,0	2,1± 0,1	3,2± 0,3	3,4± 0,1
16:00	6,5± 0,4	3,9± 0,1	27,1± 0,5	15,0± 1	15,1± 0,5
18:00	2,1± 0,0	2,3± 0,0	2,5± 0,2	3,9± 0,2	4,4± 0,2
∑ SAT	11,1	8,9	31,7	22,1	22,9
Enumettede					
16:1 n-7	1,7± 0,1	1,8± 0,0	1,6± 0,1	2,6± 0,2	2,6± 0,1
18:1 n-9	5,8± 0,1	6,1± 0,1	6,5± 0,0	6,9± 0,3	7,1± 0,3
18:1 n-7	3,2± 0,1	2,7± 0,0	4,6± 0,1	6,1± 0,4	6,4± 0,2
20:1n-9	3,8± 0,1	2,7± 0,8	2,7± 0,0	3,7± 0,2	3,8± 0,1
∑MUFA	14,5	13,3	15,40	19,2	19,9
Flerumettede					
18:2 n-6	1,4± 0,0	1,3± 0,0	1,7± 0,0	2,1± 0,1	2,0± 0,1
18:3n-3	0,7± 0,1		1,5± 0,0	1,4± 0,1	1,4± 0,0
18:4 n-3		1,6± 0,1			
20:4 n-6	1,8± 0,0	2,0± 0,0	0,6± 0,01	1,3± 0,1	1,3± 0,0
20:4 n-3	1,5± 0,1	1,4± 0,1	1,2± 0,0	0,6± 0,0	0,7± 0,0
20:5 n-3	31,8± 0,6	32,4± 0,3	28,4± 0,4	23,5± 1,2	24,9± 0,4
22:5 n-3	3,9± 0,1	4,3± 0,0	1,0± 0,1	1,1± 0,0	1,2± 0,0
22:6 n-3	26,0± 0,6	27,8± 0,2	14,1± 0,3	16,1± 0,6	17,1± 0,3
∑PUFA	67,1	70,80	48,5	46,1	48,6
∑ n-3	63,9	67,5	46,2	42,7	45,3
∑ n-6	3,2	3,3	2,3	3,4	3,3
∑ Lc n-3	63,2	65,9	44,7	41,3	43,9

Tabell 7. Fettsyresammensetning (%) i produkt Nordic Light ren olje og i fettklasser isolert ved SPE: Mettede fettsyrer (SAT), enumettede fettsyrer (MUFA) flerumettede fettsyrer (PUFA), omega-3(n-3), omega-6 (n-6) og lang kjede flerumettede omega-3 fettsyrer (Lc n-3) i de ulike fettklasser i Nordic Light krill og fiskeolje

Fettsyrer	Nordic Light ren olje	Nøytrale lipider etter 1. SPE	Polare lipider etter 1. SPE	Frie fettsyrer etter 1. SPE	Frie fettsyrer etter 2. SPE
∑ SAT	11,1	8,9	31,7	22,1	22,9
∑ MUFA	14,5	13,3	15,40	19,2	19,9
∑ PUFA	67,1	70,80	48,5	46,1	48,6
∑ n-3	63,9	67,5	46,2	42,7	45,3
∑ n-6	3,2	3,3	2,3	3,4	3,3
∑ Lc n-3	63,2	65,9	44,7	41,3	43,9

4.3 Stabilitet av lagret krill og fiskeolje

For å se om lagring av produkter i romtemperatur kan føre til et økt innhold av frie fettsyrer, ble det gjennomført en måling av frie fettsyrer (FFA) på to ulike tidspunkt. Den første målingen ble gjort den 31. januar, og den andre målingen ble utført den 21. mars. Det vil si at produktene sto i vanlig romtemperatur i 50 døgn, mellom målingene.

En kan beregne verdien av frie fettsyrer ved hjelp av følgende likning:

$$\% \text{ FFA} = \text{syreverdi}/1,99.$$

Resultater gjennomsnitt % frie fettsyrer og beregnet verdi av frie fettsyrer er vist på tabell 8.

Produkter	Gjennomført dato	Gjennomsnitt i % frie fettsyrer	Beregnet verdi av frie fettsyrer (mg KOH/ g)
Nordic Light krill og fiskeolje	31.01.2012	6,39 ± 1,31	12,78
	21.03.2012	5,18 ± 0,08	10,36
Omega- 3 med krillolje	31.01.2012	0,48 ± 0,26	0,96
	21.03.2012	0,59 ± 0,09	1,18

Tabell 8. Gjennomsnitt frie fettsyrer (%) av Nordic Light krill og fiskeolje, Omega-3 med krillolje og beregnet verdi av frie fettsyrer.

5. Diskusjon

Det er i dag allment akseptert at Omega-3 fettsyrer har gunstige helsemessige effekter. Hovedkilden for dette stoffet er marin fisk og annen sjømat. Nå får en omega-3 i ”omtrent alt” som overhode kan puttes i munnen, og det vrirler av produkter som selges som helsefremmende Omega-3 produkter. Salget går så det suser etter, for hvem vil vel ikke unngå å havne opp med hjerte kar lidelser og andre sykdommer, og vi vil vel alle ha et godt og langt liv.

Det er i denne jungelen av produkter, grunn til å stanse opp litt, og dukke ned i materien og se om det er slik at disse vidunderproduktene virkelig holder hva de lover, eller sagt på en annen måte, inneholder det som sies på pakningen. I denne oppgaven har jeg valgt å utføre klassifisering av fett i utvalgte produkter, og da er det naturligvis viktig også å fokusere på de sunne fettsyrene

EPA og DHA er de flerumettede fettsyrene som forskningen primært legger vekt på som de sunne og som finnes i den marine faunaen. Det blir fra kostholdsekspertisens hold sagt at ved å spise 1-2 måltid med fisk i uken, så dekker en behovet kroppen har for disse stoffene. Alternativt kan en spise kosttilskudd med 0,2 – 0,5g EPA- DHA pr dag for å dekke behovet.

I første del av oppgaven ble 4 forskjellige marine oljeprodukter undersøkt. Lofot tran, Trippel Omega-3, Nordic Light krill og fiskeolje, og Complete Krillolje, ble analysert for å identifisere fettklasse ved hjelp av TLC. I Nordic Light krill og fiskeolje og Omega-3 med krillolje (blanding krill og fiskeolje produkt) ble det også målt prosentverdi av frie fettsyrer i 2 perioder for å se om lagring i romtemperatur har noe betydning for stabiliteten i produktene. De ulike klassene av lipider i Nordic Light krill og fiskeoljen ble forsøkt isolert ved hjelp av SPE. De ulike SPE- fraksjonene og den rene Nordic Light krill og fiskeoljen ble analysert ved bruk av GC for å finne fettsyresammensetning og deretter analysert ved hjelp av TLC.

I Nordic Light krill og fiskeolje produktet viste innholdsdeklarasjonen 500 ml per kapsel! Dette var helt klart feilskrevet. Deklarasjonen er den viktigste informasjonen der kunden kan få opplysning om produktet og veiledning om bruken av dette. Omega-3 produkter er definert som helsekostprodukter, og derfor er kravene ikke så strenge som til legemidler men likevel bør produsenten passe godt på å ha riktig informasjon til kunder. Alle produktene ga anbefalt dosering av EPA og DHA som innholdt 0,2-0,5 mg, noe som dekker det daglige behovet (Iso et al., 2006).

I analysen av fettklassene i de forskjellige marine oljeproduktene, kan en kommentere disse på grunnlag av resultatene som kom frem i Produkt 1, som var Lofot tran som er et

produkt med torskelerver som råstoff. Her viste det seg at tranen inneholdt mye triacylglycerol (TAG), også kalt triglyserider. Dette samsvarer med at levende organismer som fisk har depotfett med hovedfunksjon som energilag og at dette som oftest er av TAG. En kan se at produktet inneholder svært lite av andre fettklasser, f.eks: mono-acylglyceroler, og diacylglyceroler, som er nedbrytningsprodukter av TAG, og at en da kan anta at kvaliteten i dag er forbedret seg i forhold til tidligere. Dette vil trolig kunne ha sin årsak i forbedrede produksjonsprosesser, noe som igjen kan ha blitt utløst av økt markedsfokus på kostholdsprodukter og økt konkurranse med flere produkt i markedet etc. Produkt 2; Trippel Omega-3 (konsentrert omega-3), inneholder mye etylestere av fettsyrene og ikke TAG. Dette tyder følgelig på at produsenten har produsert produktet selv fordi etylestere av fettsyrer ikke finnes i naturen. Antakelig er TAG blitt hydrolysert til frie fettsyrer og etter isolering av EPA og DHA er disse blitt forestret med etanol.

Produkt 3, Nordic Light krill og fiskeolje er som navnet sier en blanding av fiskeolje og krillolje. Krillolje viser et høyt innhold av fosfolipider og det gir utslag på polar lipider og frie fettsyrer samt TAG. GC-analysene viste at de frie fettsyrer mest sannsynlig kommer fra hydrolyse av fosfolipider. TAG er fra fiskeolje.

Complete Krillolje inneholdt mye frie fettsyrer og fosfolipider, noe som er typiske for krilloljer. Ved å sammenligne blandingsproduktet krill og fiskeolje med reint krilloljeprodukt ser en tydelig forskjell på innhold av frie fettsyrer og fosfolipider, med mye større innhold av disse i krilloljer enn i blandingsprodukt. Antarktisk krill er kjent for innhold av svært aktive hydrolytiske enzymer som raskt bryter lipider etter fangst og de frie fettsyrene blir dannet (Kawamura et al., 1981).

I et separat forsøk med 2 blandingsprodukter krill og fiskeolje, ble Nordic light krill og fiskeolje og Biopharma Omega-3 med krill olje undersøkt. Nordic Light krill og fiskeolje inneholder fiskeolje og krillolje i forholdet 7:3. I Biopharma produktet er forholdet mellom fiskeolje og krillolje 4,5:1. Dette blir bekreftet ved TLC-undersøkelsen fordi den polare flekken er mye svakere for produkt 2 enn i Nordic Light krill og fiskeolje. Det er også spennende å se at Biopharma produktet, egentlig ikke inneholder fiskeolje men fettsyre etylester istedenfor TAG. Små mengder av TAG sees imidlertid i produktet, men dette kommer antakelig fra krilloljen. Produkt 2 viser ikke innhold av FFA. Dette kan enten være på grunn av det lave innholdet av krillolje, alternativt kan produsent ha fjernet disse.

Nordic Light krill og fiskeolje ble fettklasse analysert ved hjelp av SPE. Lipidklassene i det ekstraherte fettet hadde fokus på å separere nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider.

Teoretisk nøytral lipid fraksjon (A1, figur 21) inneholdt ikke bare nøytrale lipider men også polare lipider, kolesterol og TAG. Siden det ikke viste noen utslag av frie fettsyrer, kan dette tyde på at det var kun frie fettsyrer som har blitt separert ut. Fraksjon B1 (frie fettsyrer) fra SPE kolonne 1 var ikke helt ren, men inneholdt også polare lipider. Det videre trinnet var SPE 2, å separere frie fettsyrer med kolonne 2. På kolonne 2 var fraksjonen av frie fettsyrer renere (B2, figur 22), men det er fremdeles litt spor i påsettingspunktet som kanskje var polare lipider. På polar lipider spor vist ingen ting, da kan en se at sporet som mistenkte polarlipid klassen, ikke var der. I ettertid tenker en at det kunne vært interessant å separere den teoretisk nøytrale lipid (A1, figur 21) videre.

Analysen av fettsyresammensetning i Nordic Light krill og fiskeolje viste at nesten 2/3 av fettsyrene var langkjedede omega-3 fettsyrer. Dette betyr at produktet er svært rikt på de helseviktige omega-3 fettsyrene. To kapsler av produktet vil gi cirka 0,6 gram av disse fettsyrene. Dette er mer enn den mengde som anbefales som daglig inntak. Andelen av de mettede fettsyrene var på 11,1 %, og var den laveste av fettsyregruppene. Dette er gunstig siden mettede fettsyrer har negative helseeffekt ved å øke nivåene av dårlig kolesterol, low density lipoprotein (LDL) og som medfører tette blodårer. De umettede fettsyrene øker nivåene av gode kolesterol, high density lipoprotein (HDL) ved å frakte LDL til leveren der disse blir brutt ned for deretter å fjernes fra kroppen.

Fraksjonene isolert ved fast fase ekstraksjonen ble også analysert med hensyn på fettsyresammensetning. Resultatene viste at nøytrale lipider hadde en litt forskjellig fettsyresammensetning enn de polare lipider og frie fettsyrer. Særlig kan man merke seg at de nøytrale lipider hadde et betydelig lavere innhold av mettede fettsyrer. Innholdet av omega-3 fettsyrer er høyere, cirka 67 % mot 42-46 % i de polare lipider og i de frie fettsyrene. Det er noenlunde likt innhold av omega-3 fettsyrer i FFA og i de polare lipider (fosfolipider), og kan tyde på at de frie fettsyrene kommer fra de polare lipider. Innholdet av de mettede fettsyrene i de ulike fraksjonene bekrefter denne tolkningen.

Analysene av fettsyresammensetningen i de ulike fraksjonene (NL, FFA og Polar lipider) med GC, på kolonne 2 viste ingen signal på nøytrale lipider fraksjonen (A2, figur 22) heller ikke på polar lipider fraksjonen (C2, figur 22). Dette var i samsvar med resultatene i TLC analysen.

Det prosentvise innholdet av de frie fettsyrene i Nordic Light krill og fiskeolje og Omega-3 med krillolje ble undersøkt 2 ganger med 2 måneders mellomrom. Resultatene bekrefter at Omega-3 med krillolje hadde et lavere innhold av krillolje fordi % FFA var lavere enn i Nordic Light krill og fiskeolje. Resultatene viser ingen økning i FFA i produktene under

lagringen. Konklusjonen er at de frie fettsyrene dannes før oljen kapsles inn. Mest sannsynlig at dannelsen skjer før oljen er separert fra proteinene, siden det da er enzymer til stede.

Konklusjon

Flere produkter med krill olje selges som rene krilloljer, eller krilloljer blandet med fiskeolje eller etylestere av fettsyrer. Resultatene fra det blandingsproduktet som jeg undersøkte, viste at dette hadde et høyt innhold av EPA og DHA. To kapsler kan godt dekke det behovet som vanligvis anbefales per dag. Ved å analysere produkter innenfor kategorien, kan en se om produktinnholdet stemmer i forhold til varedeklarasjonen, og dermed kan forbruker få en trygghet for at en får det en er forespeilet fra produsenten, og at det er de riktige fettsyrene som er i produktet og ikke noe annet. Denne oppgaven var bare en svært liten del av de forsknings prosesser som foregår. Det er lærerikt å ”grave seg ned” i disse problemstillingene og det har vært interessant og få muligheten til å belyse et tema som er så aktuelt i en folkehelsesammenheng.

Som apotekpersonale kommer en og opp i salgssituasjon av omega -3 produkter, og det er da viktig å ha en kunnskap rundt denne produktkategorien. Mange kunder er etter hvert bevisste på hva de kjøper av kostholdsprodukter, og dette stiller suksessivt høyere krav til kompetanse i apotekene.

6. Referanser

1. Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. & Appel, L.J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. American Heart Association, *Circulation* 2002, 106:2747-2757.
2. Iso, H., Kobayashi, M., Ishihara, J., Sasaki S., Okada K., Kita, Y., Kokubo, Y. & Tsugane, S. Intake of Fish and n3 Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease Among Japanese. American Heart Association, *Circulation* 2006, 113:195-202.
3. Kris-Etherton, P.M., Grieger, J.A., & Etherton, T.D. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential Fatty Acids* 2009, 81:99-104.
4. Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer. Metodologi og vitenskapelig kunnskapsgrunnlag. Nasjonalt råd for ernæring 2011, Helsedirektorat.
5. Næringsstoffer i fisk og annen sjømat.
http://www.matportalen.no/matvaregrupper/tema/fisk_og_skalldyr/naeringsstoffer_i_fisk_og_annen_sjomat-1 08.12.2011
6. Innhold av marine omega-3 fettsyrer i ulike fiskeslag
http://www.matportalen.no/kosthold_og_helse/tema/naringsstoffer/innhold_av_marine_omega-3_fettsyrer_i_ulike_fiskeslag 08.12.2010
7. Olsen, R. L. Lipidkjemi med vekt på fisk. Kompendium 3. utgave, 2007. Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø.
8. Frøyland, L., Bentsen, H., Graff, I.E., Myhrstad, M., Paulsen J.E., Retterstøl, K. & Ulven, S.M. Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified foods. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) 2011, ISBN: 978-82-8259-035-8.
9. Bang, H.O., J. Dyerberg, and H.M. Sinclair, The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr*, 1980. 33(12):2657-61.
10. [Kromann N.](#), & [Green A.](#) Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *ACTA Medica scandinavica* 1980, 208:401-406.
11. Psota, T.L., S.K. Gebauer, and P. Kris-Etherton, Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am. J. Cardiol.*, 2006, 98(4A):3i-18i.

12. Lunn, J and Theobald H. E. The health effects of dietary unsaturated fatty acids British Nutrition Foundation *Nutrition Bulletin*, 2006, 31:178–224.
13. Cleland, L.G., James, M.J., Proudman, S.M. (2005) Fish oil: what the prescriber needs to know. *Arthritis Research & Therapy* 2006, 8:202 (doi:10.1186/ar1876)
14. Calder, P. C., and Galli, C., Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review. *Ann Nutr Metab* 2009, 55:123–139.
(online: September 15, 2009)
15. Hedelin, M., Chang, E.T., Wiklund, F., Bellocco, R., Klint, A., Adolfsson, J., Shahedi, K., Xu, J., Adami, H-O., Grönberg, H., and Augustsson, Bølter, K. Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism. *International Journal of Cancer* (online 25 october 2006)
16. Hibbeln, J.R., Nieminen, L.R.G. Blasbalg, T.L., Riggs, J.A., and Lands, W.E.M. Healthy intakes of n_3 and n_6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity 1–5 *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):1483S–93S.
17. Jensen, C.L., Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr*, 2006. 83 (6 Suppl): 1452S-1457S.
18. Ruxton, C.H., et al., The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 2004, 17: 449–459. (first published on line 2007 *Journal of Human Nutrition and Dietetics* Volume 20, Issue 3, pages 286–287, June)
19. Forskrift om kosttilskudd. <http://www.lovdata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20040520-0755.html> (09.12.2011)
20. Veileder til kosttilskuddforskriften, mattilsynet.
http://www.mattilsynet.no/portal/page?_pageid=54,40083&_dad=portal&_schema=PORTAL&navigation1_parentItemId=2023&navigation2_parentItemId=2023&navigation2_selectedItemId=2225&_piref54_40088_54_40083_40083.artSectionId=5426&_piref54_40088_54_40083_40083.articleId=19245
21. Simopoulos AP., The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008 Jun;233(6):674-88. Epub 2008 Apr 11.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18408140>

22. Tou, J.C., Jaczynski, J., Chen, Y. C. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. *Nutrition Reviews* 2007, 65(2): 63–77.
23. Krill monograph, alternative medicine Review, Volume 15, Number 1.
24. Vaghela, M. N. & Kilara, A. *A rapid method for extraction of total lipids from wheyprotein concentrates and separation of lipid classes with solid-phase extraction.* Journal of the American Oil Chemists Society 1995, 72: 1117-1121.
25. Neilson, D. L. & Cox, M. M., Lehninger Principles of Biochemistry, fourth edition, W.H Freeman and Company New York 2004. Kapitlene 2 og 10.
26. Sand, O., Sjaastad Ø. V., Haug, E., & Toverud, K. C., Menneskets Fysiologi, Gyldendal Akademisk, Oslo 2001. Kapittel 5.
27. Pedersen-Bjergaard, S. & Rasmussen, K. E. Legemiddelanalyse, 2 utgave, fagbokforlaget, Bergen 2010.
28. Christie, W. W. Lipid analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids, third edition, The Oily Press, Bridgewater: P.J. Barnes & Associates, England.
29. Aursand, M. et al., Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils 2011 (VKM) ISBN: 978-82-8259-035-8.
30. Kawamura, Y., Nishimura, K., Igarashi, S., Doi, E & Yonezawa, D. Characteristics of autolysis of Antarctic krill. *Agricultural and Biological Chemistry* 1981, 45:93-100.
31. Gigliotti, J. C., et al., Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Food Chemistry* 2011, 125: 1028–1036.
32. Christie, W., William: About Lipids
<http://lipidlibrary.aocs.org/lipids.html> (01.12.2011)
33. Bulletin 910: Guide to Solid Phase Extraction
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (28.11.2011)
34. Fett (Lipider) av Halvor Aarnes Ernstsens. 2011 Institutt for biologi Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, universitet i Oslo (08. 04.2012).
<http://www.mn.uio.no/bio/tjenester/kunnskap/plantefys/plfys/biokjemi/fett.html>
35. Krill
<http://animals.nationalgeographic.com/animals/invertebrates/krill/> (05. 04.2012)

36. Can Vegetable Oils Satisfy the Nutritional Requirements of Farmed Fish? 09.09.2003

Av John Sargent, Emeritus Professor, Institute of Aquaculture, University of Stirling

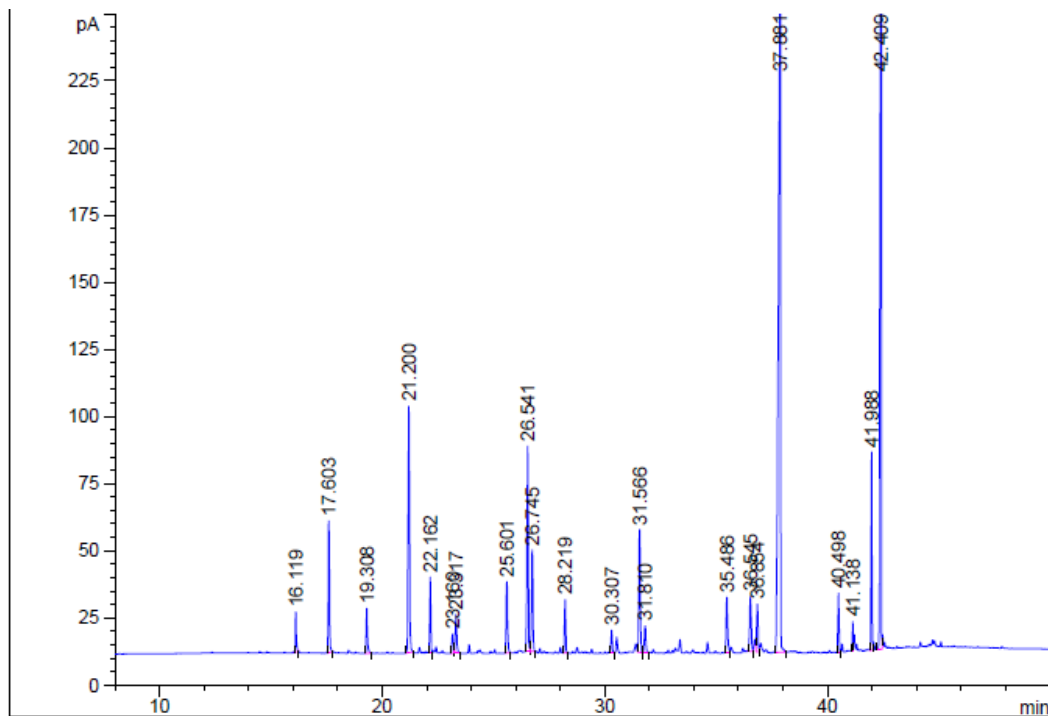
<http://www.skretting.no/Internet/SkrettingNorway/webInternet.nsf/wPrIdPrint/FFD2272E83E7320BC125740B0037D769!OpenDocument> (24.04.2012)

37. DL-alpha-tocopherol

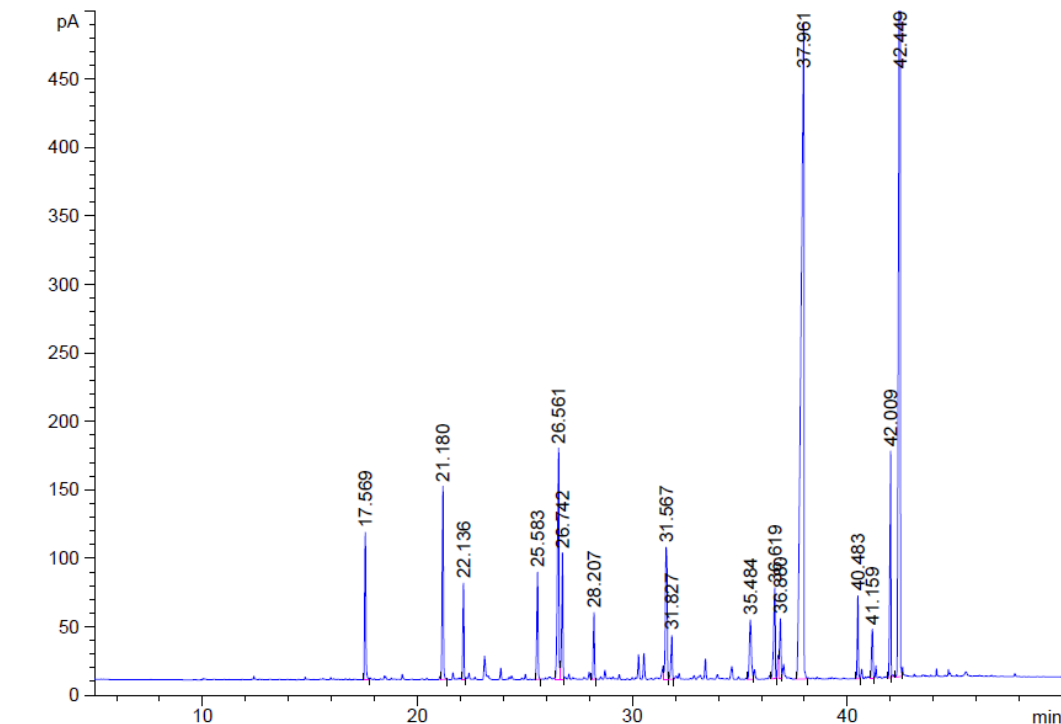
http://www.basf.cl/carechemicals/nutricionhumana/fichastecnicas/vitaminas/liposolubles/dl_alpha_tocopherol.pdf 29.04.2012

7. Appendiks

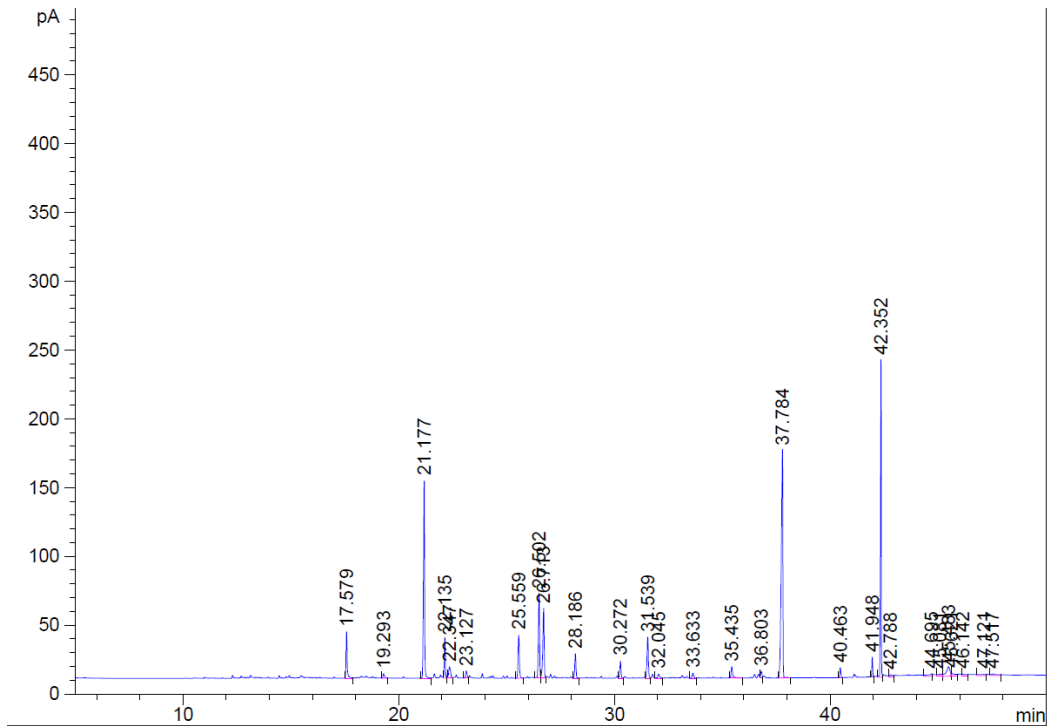
GC Kromatogrammer fra analyser av fettsyrer



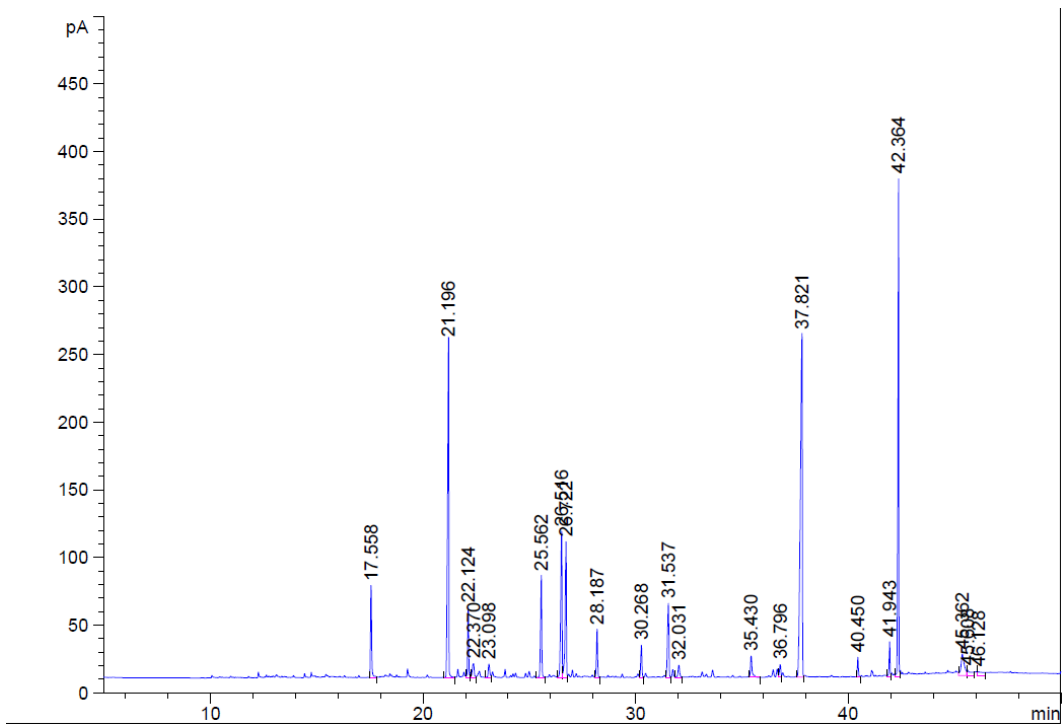
Figur 22: GC av ikke- fraksjonert krill og fiskeolje(N)



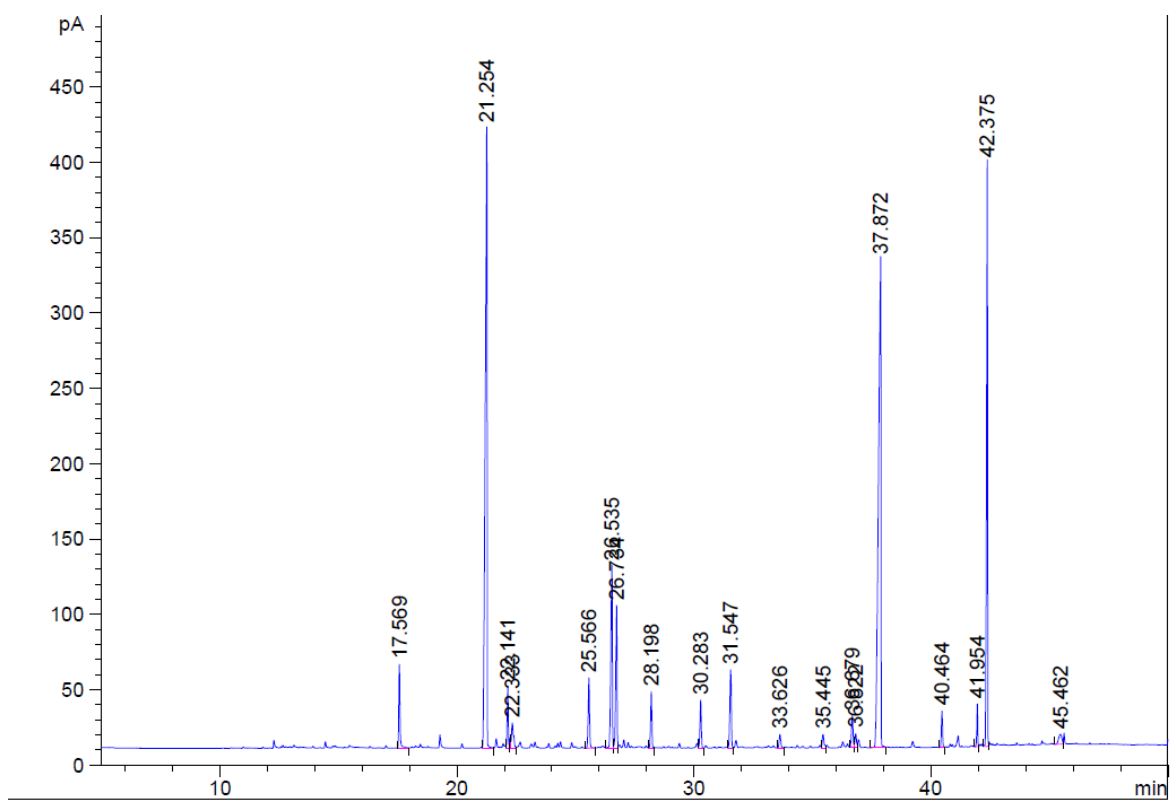
Figur 23. GC av fraksjon A1 (Teoritisk Nøytral lipider) etter SPE trinn 1



Figur 24. GC av fraksjon B1(Teoritisk frie fettsyrer) etter SPE. trinn 1



Figur 25. GC av fraksjon B2(Teoritisk frie fettsyrer) etter SPE. trinn 2



Figur 26. GC av fraksjon C1 (Teorisk polare lipider) etter SPE. trinn 1