

UNIVERSITETET I TROMSØ UIT

Det helsevitenskapelige fakultet
Institutt for farmasi

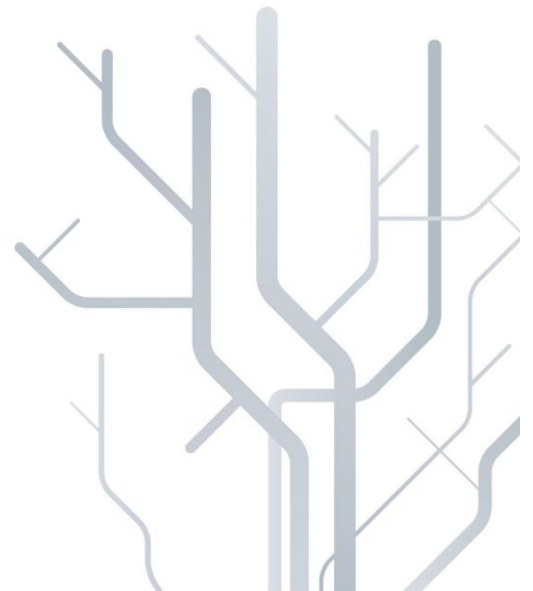
Master i farmasi
FAR-3901

Fettsyresammensetning og kvalitetsaspekter av kommersielle krilloljeprodukter



Kim Anh Thi Vu
Våren 2012

Hovedveileder: Professor Einar Jensen
Biveileder: Professor Ragnar Olsen



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Universitetet i Tromsø på Norges fiskerihøgskole høst 2011. Jeg vil takke hovedveileder Einar Jensen, professor ved Institutt for Farmasi ved Universitetet i Tromsø for god veiledning og hyggelige samtaler.

Jeg vil rette en stor takk til biveileder Ragnar Olsen, professor på Norges fiskerihøgskole for en veldig god veiledning og tilbakemelding på det skriftlige arbeidet i forbindelse med denne masteroppgaven. En positiv og imøtekommende veileder som alltid har vært tilgjengelig. En stor takk til Guro Edvinsen, avdelingsingeniør på Norges fiskerihøgskole for alt hjelp og spørsmål på lab. Arbeidet på lab ville ikke vært lett å gjennomføre uten deg. Jeg vil takke resten av avdelingen på Norges fiskerihøgskole for at jeg har fått være her. Det var veldig trivelig.

Jeg takke mine foreldre og søsken for alt hjelp og støtte jeg har fått fra dere. Jeg ville ikke klart å gjennomføre studiet uten dere.

Til slutt vil jeg takke mine venner for å ha bidratt til å gjøre studieperioden lettere og at jeg har fått mulighet til å bli kjent med dere. I tillegg for alle de morsomme og interessante studie dagene vi har hatt sammen. Dere er alltid der for meg og motiverer meg hele tiden.

Tromsø mai, 2012

Kim Anh Thi Vu

Innholdsfortegnelse

Forord	III
Innholdsfortegnelse	V
Sammendrag	VII
Forkortelser	IX
1. Introduksjon	1
2. Generell bakgrunn	3
2.1 Antarktisk krill	3
2.2 Lipidinnhold i Antarktisk krill.....	4
2.3 Krillolje som helsekost.....	4
2.4 Lipider	5
2.3.1 Fettsyrer.....	5
2.3.2 Triacylglyserol.....	7
2.2.3 Voksester	7
2.3.4 Membranlipider	8
2.5 Essensielle fettsyrer	12
2.6 Fast fase ekstraksjon.....	13
2.7 Gasskromatografi	14
2.8 Tynnsjiktskromatografi	15
3. Materialer og metoder	17
3.1 Materialer:	17
3.2 Varedeklarasjon av omega-3 produkter:	20
3.2.1 Krillprodukter	20
3.2.2 Andre Omega-3 produkter.....	21
3.3 Metoder	23
3.3.1 Fettklasseanalyse ved hjelp av tynnsjiktskromatografi	23
3.2.2 Fast fase ekstraksjon.....	23
3.2.3 Reekstraksjon av fraksjon B1 i frie fettsyrer	24
3.3.4 Måling av frie fettsyrer	24
3.3.5 Gasskromatografi	25
4. Resultater	27
4.1 Tynnsjiktskromatografi av kommersielle omega-3 produkter	27
4.2 Frie fettsyrer	28
4.3 Fettklasser analysert ved tynnsjiktskromatografi i krilloljeprodukter	29
4.4 Fettsyresammensetning i krilloljeprodukter	30

4.5 Lipidklasser separert ved SPE i Complete krillolje.....	31
4.6 Reekstraksjon av B1 fraksjon i frie fettsyrer.....	32
4.7 Fettsyresammensetning av utvalgte fraksjoner etter SPE rensing.....	33
5. Diskusjon.....	35
6. Konklusjon.....	39
7. Referanser:.....	41
8. Appendiks	45
8.1 Beregning av prosent frie fettsyrer:.....	45
8.2 GC-kromatogram av kommersielle omega-3 produkter.....	47

Sammendrag

Krill er rik på omega-3 fettsyrene EPA og DHA, noe som forklarer den store kommersielle interesse for fangst og foredling av krill. I krillolje er det mye fosfolipider sammenliknet med fiskeoljer. Flere hevder at EPA og DHA utnyttes bedre når de er bundet i fosfolipider enn når de fins i triacylglyserol (Bunea et al, 2004; Werner, Havinga et al, 2004). Det er gjort lite forskning på krillolje og helse. Studier som har blitt gjort av krillolje sammenlikner helseeffekten av krillolje med fiskeolje. En studie viste at krillolje reduserte kolesterol (LDL) og økte nivået av det gode kolesterolet (HDL). I tillegg hjelper det å kontrollere blodsukkernivået og kan dermed bidra til å forebygge diabetes (Bunea et al, 2004). I en dobbeltblind klinisk studie reduserte krillolje inflammasjon og artritt symptomer i en kort behandlingsperiode på 7 og 14 dager (Deutsch, 2007; Massrieh, 2008). En annen studie viste at kvinner med premenstruelt syndrom (PMS) ble mindre plaget (Sampalis et al, 2003).

Målet med oppgaven var å analysere innholdet av fettklasser og fettsyresammensetning av kommersielle krilloljeprodukter. Fire forskjellige krilloljeprodukter ble undersøkt. Fettklassene ble separert ved bruk av fast fase ekstraksjon og analysert ved tillaging av fettsyremetylestere for videre analyse med gasskromatografi. Fettsyreene fra Complete krillolje og utvalgte fraksjoner etter fast fase ekstraksjon ble identifisert ved å sammenlikne observerte retensjonstider med kjente fettsyrestandarder.

Analyse fra fettsyresammensetningen av Complete krillolje viste at innholdet av EPA var 16,7 % og 8,8 % DHA. Blant mettede fettsyrer var 16:0 den dominerende fettsyren og 18:1, 20:5n-3 og 22:5n-6 blant umettede og flerumettede fettsyrer. Fosfolipider, triacylglyseroler og frie fettsyrer var de viktigste fettklassene i krillolje. Ulike lipidklasser bestod av relativt forskjellige fettsyrer. EPA utgjorde 31,5 % og DHA 15 % i fraksjonen som inneholdt fosfolipider. Tilsvarende 24,6 % EPA og 16 % DHA i frie fettsyre fraksjonen. Fosfolipider og frie fettsyrer fraksjonene inneholdt mest flerumettede fettsyrer, mens den nøytrale lipidfraksjonen inneholdt mest mettede fettsyrer og lite flerumettede fettsyrer. Et av krilloljeproduktene hadde en relativt høy andel frie fettsyrer som er over den anbefalte grenseverdien for marine oljer til humant konsum i følge Global Organization for EPA and DHA (GOEDs), mens de tre andre krilloljeproduktene ligger innenfor den anbefalte grenseverdien.

Forkortelser

DAG	Diacylglyserol
DCM	Diklormetan
DHA	Dokosaheksaensyre (C22:6n-3)
EPA	Eikosapentaensyre (C20:5n-3)
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FFA	Frie fettsyrer
GC	Gasskromatografi
GOED	Global Organization for EPA and DHA
HPLC	High performance liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
LC-PUFA	Langkjededede flerumettede fettsyrer
MAG	Monoacylglyserol
n-3	Omega-3 fettsyrer
NL	Nøytrale lipider
PMS	Premenstruelt syndrom
PL	Fosfolipid
PUFA	Flerumettede fettsyrer
Rf	Retensjonsfaktor
SPE	Fast fase ekstraksjon (Solid Phase Extraction)
TAG	Triacylglyserol (Triacylglyserider)
TLC	Tynnsjiktskromatografi
VKM	Vitenskapskomiteen for mattrygghet
WWF	World Wildlife Fund

1. Introduksjon

Norge er en av verdens ledende produsenter av produkter som inneholder langkjedede omega-3 fettsyrer. Fisk og annen sjømat har et høyt innhold av langkjedede omega-3 fettsyrer, men de finnes nå også i kosttilskudd, farmasøytiske preparater og i funksjonelle matvarer. Omega-3 fettsyrer finnes også i planter, men disse fettsyrene er kortere enn de marine og har ikke de samme helseeffektene som marine omega-3 fettsyrene (Wang, Harris et al, 2006). Det er et stort salg av produkter med langkjedede omega-3 fettsyrer og disse selges både i dagligvarebutikker, på nettet og i apoteker.

Fisk er en begrenset ressurs og dermed er det økende behov for å finne alternative marine omega-3 kilder. Krillolje er en av dem og har utviklet seg til en viktig kilde til omega-3 fettsyrer. Det er to store aktører som produserer krillolje, et kanadisk firma, Neptune og Aker Biomarin fra Norge. Begge produsentene har egne patenterte prosesser for å ekstrahere olje fra Antarktisk krill. Tradisjonelle omega-3 produkter på dagens marked inneholder omega-3 fettsyrer bundet til triglyserider (fiskeolje og tran), mens krillolje inneholder en høy andel omega-3 fettsyrer bundet til fosfolipider. Det fins også produkter hvor fettsyrene er forestret til etanol (etylestere). Etylester finnes kun i små mengder naturlig og er ofte syntetiske. Etylester av EPA og DHA ble i utgangspunkt utviklet som legemiddel til behandling av hjerte-karsykdommer og ikke til den friske befolkningen. Nå inngår etylestere i flere n-3 kosttilskudd (Vitenskapskomiteen for mattrygghet, 2011). Disse produktene har gjerne et svært høyt innhold av EPA og DHA. Det hevdes at omega-3 bundet til fosfolipider gir bedre opptak i kroppen enn fettsyrer i triglyseridform (Bunea et al, 2004; Werner, Havinga et al, 2004). Krillolje har et høyt innhold av fosfolipider og astaxanthin som beskytter kroppen mot frie radikaler.

I de siste 100 årene har det vestlige kostholdet endret seg og inntaket av omega-6 fettsyrer er høyere enn marine omega-3 fettsyrer. Ubalansert forhold mellom omega-6 fettsyrer og marine omega-3 fettsyrer i kosten kan føre til negative helseeffekter.

Omega-3 fettsyren DHA er den viktigste flerumettede fettsyren som finnes i hjernen og spiller en viktig rolle i hjernens funksjon, samt for normal vekst og utvikling. Omega-3 fettsyrer har en rekke positive helseeffekter og det har blitt spesielt godt dokumentert at de kan hemme utvikling av hjerte-karsykdommer (sammenfattet av Psota et al. 2006, Deckelbaum et al, 2008). Det har blitt foreslått at omega-3 fettsyrer reduserer betennelsestilstander og derved bidrar til å redusere risikoen for hjerte-karsykdommer og leddgikt. Det hevdes også at utvikling av noen kreftformer (prostatakraft) kan hemmes (Lunn

& Theobald 2006; Calder 2006; Hibbeln et al. 2006, Hedelin et al. 2006). Omega-3 fettsyrer er svært konsentrert i hjernen og synes å være viktig for kognitiv funksjon og atferd. Spedbarn som ikke får nok omega-3 fettsyrer fra sin mor under svangerskapet er i faresonen for å utvikle syn og nerveproblemer (Ruxton et al, 2004; Jensen, 2006).

Kvaliteten av mange omega-3 produkter på markedet i dag er ukjent. Både sammensetningen av fett og oksidasjonsnivå er i mange tilfeller ukjent. Det er derfor behov for bedre kvalitetskontroll innen bransjen. Kanskje særlig er kunnskapen om krilloljeprodukter mangelfull. Helsekostprodukter inkludert produkter med omega-3 fettsyrer, er nå blitt en viktig del av vareutvalget ved apotek. Kundene forventer at på et apotek kan man få objektiv informasjon om produktene som selges. Det er derfor viktig at betjeningen har god kunnskap om slike produkter også, ikke bare om legemidlene som selges.

Hovedformålet med denne oppgaven var å undersøke egenskaper til krilloljeprodukter som selges. Innholdet av frie fettsyrer ble bestemt. I tillegg ble fettklassene analysert ved tynnsjikt-kromatografi (TLC) og deretter separert med fast fase ekstraksjon (SPE). Fettsyresammensetningen ble også undersøkt.

2. Generell bakgrunn

2.1 Antarktisk krill

Krill er et zooplankton krepserik rik på omega-3 fettsyrer, hovedsakelig eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA).



Figur 1: Antarktisk krill (Bildet tatt fra WWF (World Wildlife Fund))

http://www.wwf.no/bibliotek/wwf_naturfakta/hav/krill/

Det finnes 85 forskjellige krillarter og disse varierer i størrelse. De to største gruppene av krillarter er Antarktisk krill (*Euphausia superba*) og Nordatlantisk krill (*Euphausia pacifica*). Antarktisk krill er en av de største artene og veier ca. 2 gram og blir inntil 6 cm lang. De lever i et av verdens reneste hav. Krill spiser planteplankton og er i dag den største marine biomassen og det finnes mellom 125-750 millioner tonn i følge FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). Fangsten er sterkt regulert og nøye overvåket. Det er derfor ingen fare for at andre dyrearter er truet som følge av dagens fangstkvoter. Organisasjonen CCAMLR (Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources) forvalter og regulerer Antarktisk krill. Norge og 25 andre medlemsland blant annet Australia, New Zealand, Chile, Argentina, Sør-Afrika, Japan, Sør-Korea, Kina, USA og EU er medlem av CCAMLR.

Krill er ansett som en viktig nøkkelart i det Antarktiske økosystemet som mange høyerestående arter er avhengig av. Krill er viktig næringskilde for hvaler, pingviner, blekksprut, sel, sjøfugl og fisk. Krill er en naturlig kilde til vitamin B12 og mineraler som magnesium, fosfor og kalsium. Det inneholder også protein, fett og karbohydrater (kitin). Det viktigste karotenoidet i krill er astaxanthin. Astaxanthin brukes som fargestoff i fiskefôr for å gi oppdrettslaksen den rosa fargen. Krillolje inneholder høyere mengde astaxanthin enn fiskeolje (Tou et al, 2007). Krill har et høyt innhold av hydrolytiske enzymer (proteaser,

karbohydraser, nukleaser og fosfolipaser) som gjør at organismen brytes ned raskt (Ellingsen, T. E. and V. Mohr, 1987). Den må derfor fryses ned raskt eller helst prosesseres direkte om bord. Aker Biomarin bruker direkte prosessering. Produksjon av krillolje er vanskelig og det er per i dag få som behersker teknologien og produserer god krillolje.

2.2 Lipidinnhold i Antarktisk krill

Fettsyresammensetning av Antarktisk krill fanget om vinteren inneholdt 3 % lipider på våtvektsbasis og mengden EPA og DHA utgjorde 19 % av den totale fettsyresammensetningen (Kolakowska et al, 1994). Men siden EPA og DHA er flerumettede fettsyrer, er de utsatt for oksidativ nedbrytning. Fettinnhold og sammensetning i krill er avhengig av arter, alder, og tiden mellom fangst og frysing (Kolakowska, 1991). De store fettklassene er fosfolipider, triacylglycerol og frie fettsyrer, men arten inneholder også voksester. Triacylglycerolene inneholder lite flerumettede fettsyrer. Fosfolipidene er derimot rik på langkjedet flerumettede fettsyrer, spesielt EPA (20:5 n-3) og DHA (22:6 n-3) (Clarke, 1980; Fricke et al, 1984).

2.3 Krillolje som helsekost

Krillolje har en rekke positive helseeffekter, hovedsakelig på grunn av det inneholder omega-3 fettsyrer som har dokumentert effekt. De studiene som har blitt gjort sammenlikner helseeffekten av krillolje med fiskeolje. En studie som inkluderte 120 menn og kvinner med mild til alvorlig hyperlipidemi ble gjennomført for å se på effekten av krillolje på kolesterolinnholdet i blodet. Det var 4 grupper på 30, en gruppe fikk 1,5 g krillolje daglig, en annen fikk 3 g krillolje daglig, den tredje 3 g fiskeolje daglig og fjerde gruppen fikk placebo. Studien viste at daglig inntak av krillolje reduserte total kolesterol, LDL og triglyserider og økte nivået av det gode kolesterolet (HDL). Lav dose krillolje reduserte triglyserider og LDL mer effektivt enn fiskeolje (Bunea et al, 2004). En annen studie viste at inntak av 300 mg Neptune krillolje gav en signifikant hemming av betennelse og reduserte artritt symptomer i en kort behandlingsperiode på 7 og 14 dager. For denne studien ble det rekruttert 90 pasienter med diagnosen kardiovaskulær sykdom og/eller revmatoid artritt og/eller artrose. EPA bidrar til å dempe inflammatoriske responser ved å redusere produksjonen av proinflammatoriske forbindelser som cytokiner (Deutsch, 2007; Massrieh, 2008). Neptune krillolje reduserte også signifikant symptomer forbundet med premenstruelt syndrom (PMS) sammenliknet med de som fikk fiskeolje (Sampalis et al, 2003).

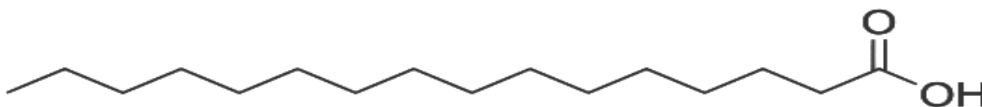
2.4 Lipider

Lipider er en stor gruppe av naturlig forekommende forbindelser som har til felles at de er uløselig i vann, men de løser seg lettere i organiske løsemidler (for eksempel eter, kloroform, benzen etc.). De kan inndeles i triacylglyserol, fosfolipider, steroler og voks. De biologiske funksjoner av lipider er energilagring i mange organismer, og fosfolipider og steroler er viktige strukturelle komponenter i biologiske membraner. Andre lipider spiller en viktig rolle som enzymatiske kofaktorer, elektronbærere, emulgatorer, hormoner og intracellulære signaloverførere.

2.3.1 Fettsyrer

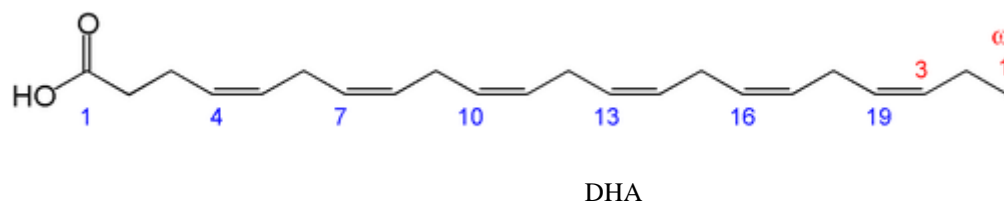
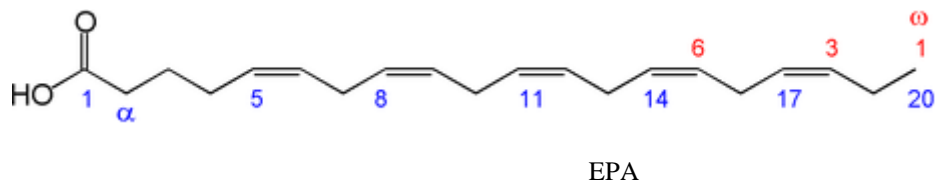
Fettsyrer er bygd opp av karboksylsyrer (COOH) med hydrokarbonkjede fra 4-36 karbonatomer. Fettsyrer kan være mettet (inneholder ingen dobbeltbinding) eller umettet (en eller flere dobbeltbindinger). En enkelt nomenklatur for disse forbindelsene angir kjedelengden og antall dobbeltbindinger som skilles med et kolon. For eksempel palmitinsyre som består av 16 karbonatomer er forkortet 16:0 og oljesyre som inneholder 18 karbonatomer og en dobbeltbinding skrives følgelig som 18:1. Posisjonen til dobbeltbindingen er betegnet som Δ (delta). En 20- karbonfettsyre med en dobbeltbinding mellom C-9 og C-10 (C-1 er karboksylkarbon) og en annen dobbeltbinding mellom C-12 og C-13 er angitt 20:2 ($\Delta^{9,12}$). Dobbeltbindingen i umettet fett forekommer stort sett i *cis*-konfigurasjon. Transfettsyrer er produsert ved fermentering og finnes i meieriprodukter og kjøtt fra drøvtyggere. De dannes også ved hydrogenering (herding) av fiske- eller vegetabiliske oljer. Kosthold rik med transfettsyrer er forbundet med økt LDL (dårlig kolesterol) og redusert HDL (god kolesterol). Fysikalske egenskaper til fettsyrene bestemmes av lengden på karbonkjeden og antall dobbeltbindinger. Smeltepunktet til fettsyrene øker med kjedelengden og minker når antall dobbeltbindinger øker.

Mettede fettsyrer har ingen dobbeltbinding (se figur 2) og har generell formel $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ hvor n er som oftest et partall.

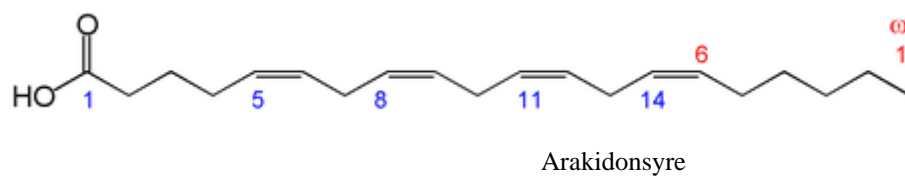


Figur 2: Kjemisk struktur av palmitinsyre

De umettede fettsyrene deles inn i enumettede og flerumettede fettsyrer. Flerumettede fettsyrer deles inn i to hovedgrupper; flerumettede fettsyrer også kalt PUFA (Polyunsaturated Fatty Acids) har 2 eller 3 dobbeltbindinger og langkjedede flerumettede fettsyrer (LC-PUFA) med 20 og 22 karbonatomer. Fettsyrer med 4-6 dobbeltbindinger kalles ofte HUFA (Highly Unsaturated Fatty Acids). Dersom det første dobbeltbindingen nærmest metylenenden sitter på det tredje karbonatomet i kjeden, er det en omega-3 fettsyre. EPA har totalt 20 karbonatomer og fem dobbeltbindinger og DHA har totalt 22 karbonatomer og 6 dobbeltbindinger (se figur 3). En omega-6 fettsyre har dobbeltbinding på karbonatom nummer 6 fra metylenenden (f. eks. arakidonsyre, figur 4).



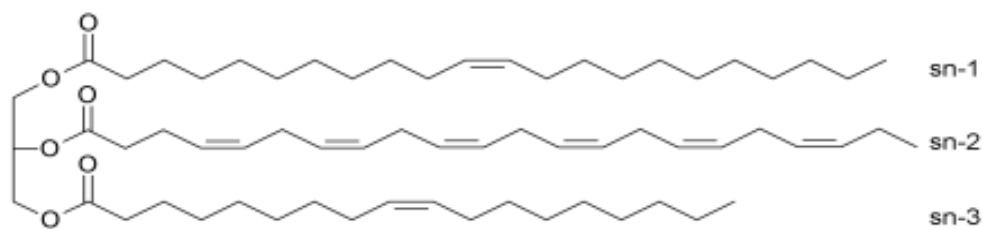
Figur 3: Kjemisk struktur av EPA (20:5 n-3) og DHA (22:6 n-3)



Figur 4: Kjemisk struktur av Arakidonsyre (20:4 n-6)

2.3.2 Triacylglycerol

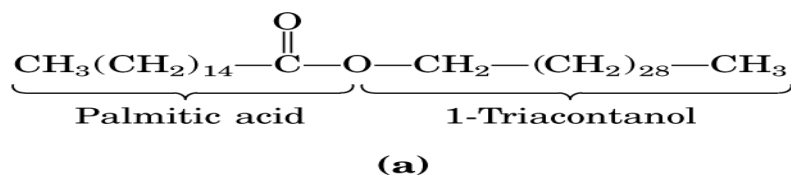
Triacylglycerol (TAG) kalles også triglyserider, fett eller nøytral fett. Triacylglycerol inneholder tre fettsyrer som er forestret til de tre hydroksylgruppene i glyserolmolekylet (figur 5). Fettsyrene utgjør den upolare delen av TAG. Triacylglycerol fungerer primært som energilager i de fleste organismer. Dersom man ønsker å kjenne til posisjonene hvor de enkelte fettsyrene er forestret i triacylglycerolmolekylet, kan en bruke enzymet lipase (enzymet som degraderer fett) fra pankreas som bryter esterbindingen i posisjon 1 og 3. Fettsyren i posisjon 2 blir ikke spaltet av og resultatet er en monoacylglycerol (MAG).



Figur 5 viser kjemisk struktur av triacylglycerol. De tre karbonatomene i glyserolmolekylet benevnes sn-1, sn-2 og sn-3.

2.2.3 Voksester

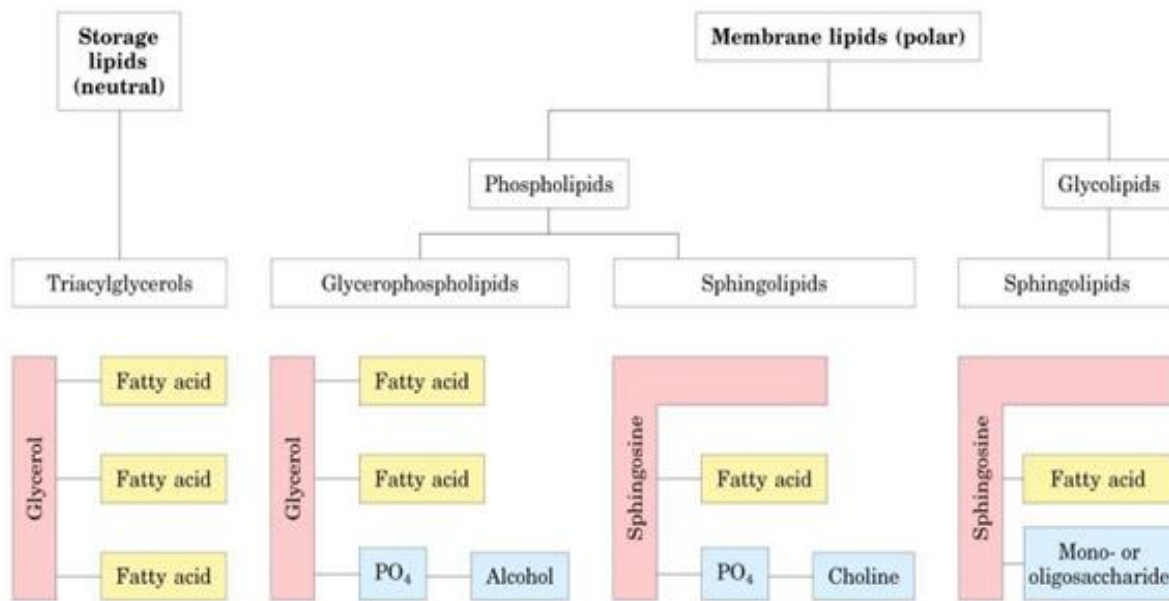
Biologisk voks (voksester) er fettsyrer med 14-36 karbonatomer og langkjedet alkoholer som består av 16-36 karbonatomer. Smeltepunktet til voksester er 60-100 °C og er generelt høyere enn triacylglyceroler. Voksester fungerer som energilager i noen organismer, for eksempel raudåte som er et zooplankton. Et viktig kjennetegn for voks er at de er vannavstøtende og har fast konsistens. Noen hudkjertler i virveldyr skiller ut voks for å beskytte hår og hud, holde det smidig og vannfast. En del fugler utnytter voks for å holde fjærene sitt vannavstøtende. Biologiske voks har flere bruksområder, spesielt innen kosmetikk og farmasøytisk tilvirkning. For eksempel lanolin og bivoks er brukt til produksjon av kremer, salver etc.



Figur 6: Biologisk voks (a) Triacontanoylpalmitat, hovedkomponenten i bivoks er en ester av palmitinsyre med alkoholen triacontanol (hentet fra Lehninger, Principles of biochemistry).

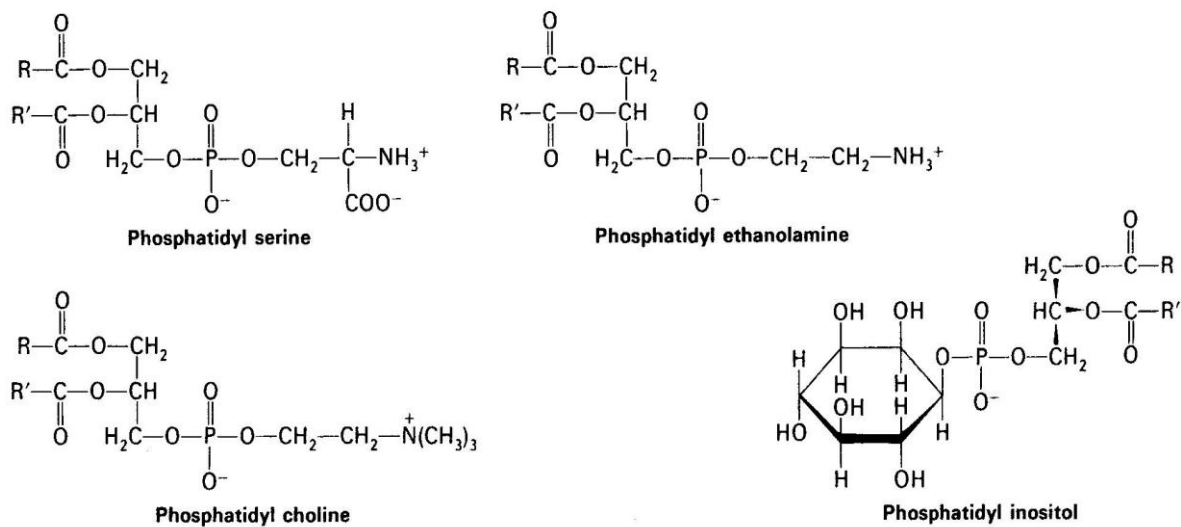
2.3.4 Membranlipider

Biologiske membraner er bygd opp av et dobbeltlag lipider som fungerer som barriere for passasje av polare molekyler og ioner. Membranlipider er amfipatiske. Det vil si at molekylene har en hydrofob og en hydrofil (polar) del. Strukturelle lipider deles inn i tre undergrupper: glycerofosfolipider, sfingolipider og steroler (figur 7 viser inndelingen av membranlipider). Fosfolipider er viktige strukturelementer i cellemembraner. De ligner på triacylglyseroler. En fettsyre i triacylglyserolstrukturen er erstattet med en fosfatgruppe i fosfolipidene. Alkohol/fosfatgruppen er polar og hydrofil, mens fettsyrekjeden er derimot upolar og hydrofob.



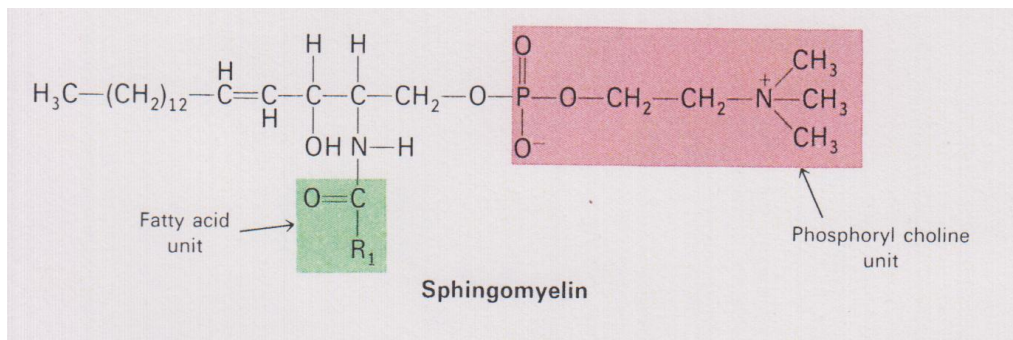
Figur 7 viser oversikt over triacylglyserol og membran lipider. Lipidene vist her har enten glyserol eller sfingosin som ryggrad (vist i rosa på figuren), som er koblet med en eller flere langkjedet alkylgrupper (vist i gult på figuren) og en polar hodegruppe (vist i blå på figuren). I triacylglyserol, glyserofosfolipider, er alkylgruppene fettsyrer som er esterbundet til molekylet (figuren er hentet fra Lehninger, Principles of biochemistry).

Fosfolipider deles inn i glycerofosfolipider og sfingolipider avhengig om alkoholen bundet i molekylet er glyserol eller sfingosine. Den vanligste er glyserol. Glycerofosfolipider også kalt fosfoglyserider er membran lipider hvor to fettsyrer er esterbundet til den første og andre karbonet i glyserolmolekylet. Det tredje C-atomet (sn-3) har en fosfatgruppe som igjen er bundet til glyserolmolekylet. Hvordan glycerofosfolipider klassifiseres er avhengig av hvilken gruppe som er bundet til fosfatdelen. Eksempler på alkoholer som er bundet til fosfoglyseridmolekylet er serin, etanolamin og kolin (figur 8).

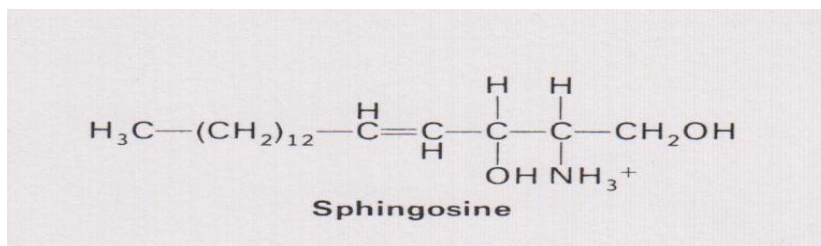


Figur 8 Kjemisk struktur av Fosfoglyserider (Fosfolipider). Hentet fra Ragnar Olsens forelesning

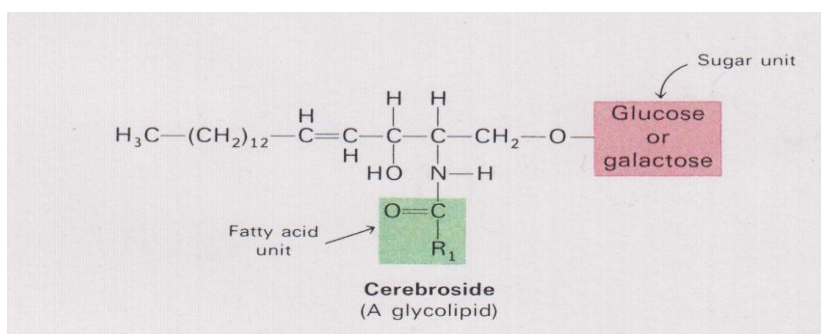
Sfingolipider inneholder sfingosin (dyr) eller fytosfingosin (planter), en fettsyre og en polar hodegruppe. En fettsyre bundet via en amidbinding til sfingosin gir ceramid som er strukturelt lik diacylglyserol. Sfingolipider deles inn i tre undergrupper; sfingomyelin, glykolipider og gangliosider. Felles for dem er at de er derivater av ceramid, men har forskjellige hodegrupper. Sfingomyelin inneholder bare en fettsyre og OH-gruppen i sfingosin er bundet til et fosforylert kolin og er derfor klassifisert som et fosfolipid. Sfingomyelin er tilstede i plasmamembraner i dyreceller og spesielt i myelin, en membran skjede som omslutter og isolerer axoner i noen neuroner. Glykolipider ligner på sfingomyelin, men har sukker del istedenfor fosfat og kolin (se figur 11, disse figurene under er hentet fra Olsens forelesning)



Figur 9 Sfingomyelin

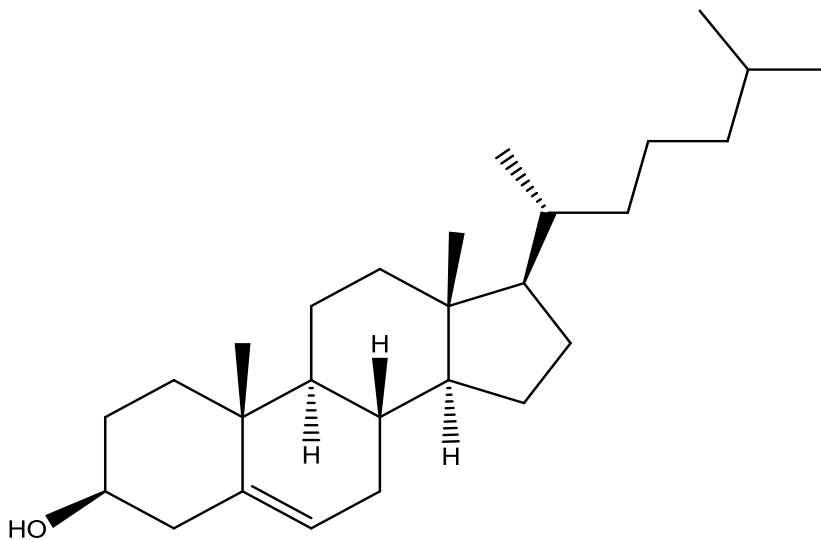


Figur 10 Sfingosin



Figur 11 Glykolipid (Glykocerebrosid)

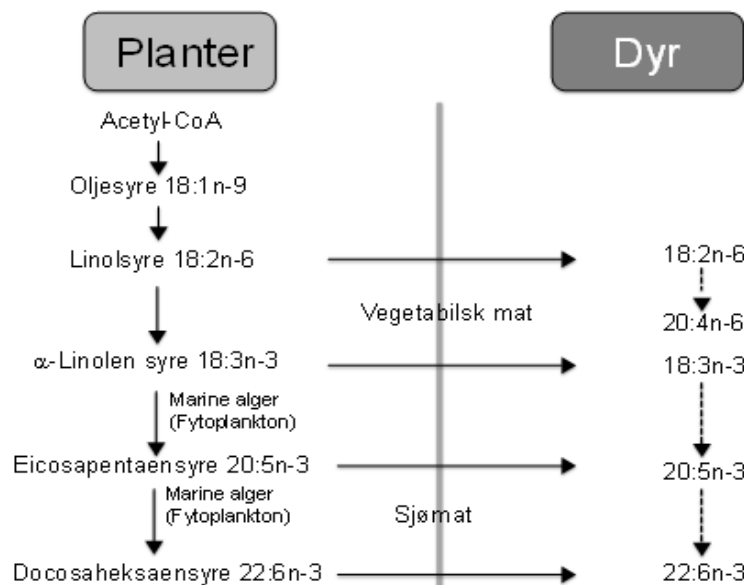
Steroler består av fire ringer og en hydroksylgruppe. Kolesterol er en viktig sterol i animalske vev og er amfipatisk med en polar hodegruppe (hydroksylgruppe på C-3) og et ikke-polar hydrokarbon del. Med utgangspunkt i kolesterol syntetiseres en rekke viktige stoffer, for eksempel steroidhormoner, gallsalter og vitamin D. En rekke hormoner syntetiseres fra kolesterol. For eksempel kjønnshormonene progesteron, østrogen og testosteron. Progesteron og østrogen er kvinnelige kjønnshormoner, mens testosteron er mannlig kjønnshormon. Den andre gruppen er de kortikoide hormonene fra binyrebarken. Kortisol, kortison og aldosteron er eksempler på slike hormoner. Gallsalter er polare derivater av kolesterol som virker som detergent i tarmen og hjelper med fordøyelsen av lipider. Calcitriol (1,25-dihydroxykalsiferol) er produsert fra vitamin D ved hydroksylering i lever og nyrer. 7-dehydrokolesterol i huden som blir eksponert for sol omdannes til vitamin D.



Figur 12: Kjemisk struktur av kolesterol

2.5 Essensielle fettsyrer

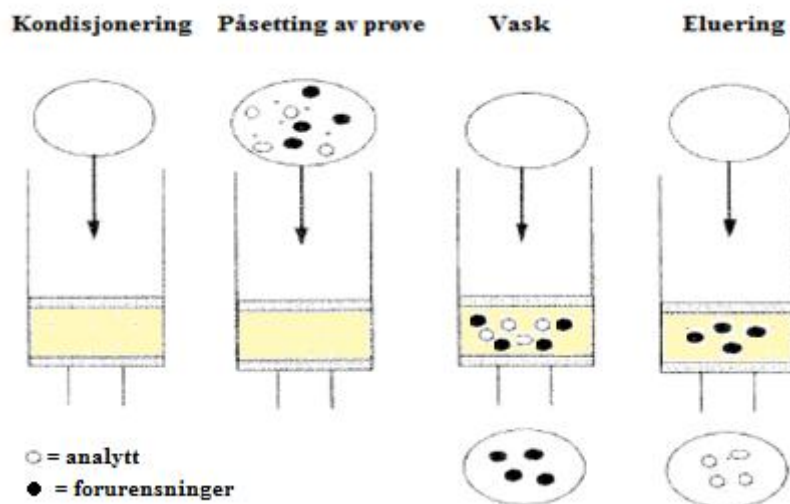
Essensielle fettsyrer er livsnødvendige, siden kroppen ikke kan syntetisere dem. De må derfor tilføres via kosten. For mennesker og dyr er linolsyre (18:2 n-6) og α -linolensyre (18:3 n-3) de to essensielle fettsyrene. Bare planter har enzymer som kan plassere dobbeltbindinger ($\Delta 12$ og $\Delta 15$ desaturaser) i omega-3 og omega-6 posisjon i oljesyre (18:1 n-9). Fettsyrene som dannes er linolsyre (18:2 n-6) og α -linolensyre (18:3 n-3). Se figur 13. Mennesker og dyr har enzym som kan plassere dobbeltbindingen ved $\Delta 9$ karbonatom i C-18 fettsyre (stearinsyre). Pattedyr og fisk har litt av enzymene $\Delta 6$ -desaturase og $\Delta 5$ -desaturase som kan omdanne α -linolensyre til EPA og DHA. Evnen mennesket har til å omdanne 18:2 n-6 til 20:4 n-6 og 18:3 n-3 til 20:5 n-3 (EPA) og 22:6 n-3 (DHA) er svært begrenset. For å få anbefalte mengder EPA og DHA bør man spise fisk eller ta helsekostprodukter med disse fettsyrene. Arakidonsyre og EPA er videre metabolisert til å produsere hormonlignende stoffer som kalles eikosanoider, som inkluderer prostaglandiner, tromboxaner, og leukotriener. Eikosanoidene regulerer blant annet betennelsesreaksjoner i kroppen, immunforsvaret og nervesystemet. Prostaglandiner medierer smerter og inflammasjon i alle vev. Antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) hemmer prostaglandinsyntesen. Tromboxaner regulerer platefunksjon og blodkoagulering. Leukotriener LTC_4 og LTD_4 virker gjennom plasmamembran reseptorer for å stimulere kontraksjon av glatt muskel i tarmen, pulmonal luftveier og luftrøret. De er mediatorer av alvorlig immunrespons kalt anafylakse.



Figur 13: Syntesen av essensielle fettsyrer (hentet fra Olsens kompendium “lipidkjemi med vekt på fisk”, 2007)

2.6 Fast fase ekstraksjon

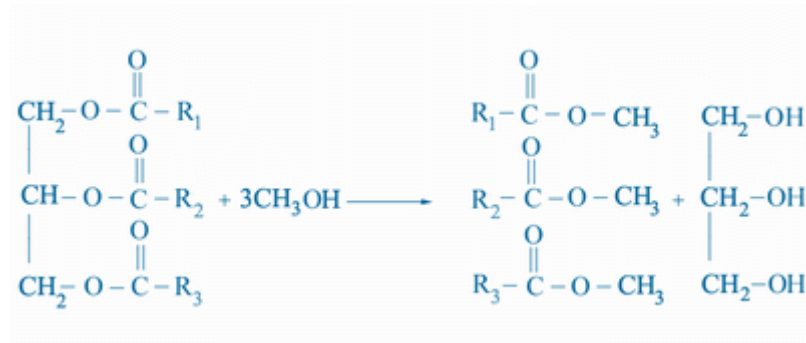
Fast fase ekstraksjon er en metode brukt for å rense stoffer i en løsning basert på deres fysiske og kjemiske egenskaper og blant annet til isolering av lipidklasser. Normalfaseekstraksjon ble valgt for å separere lipidene med en kolonne bestående av aminopropylgrupper som aktive grupper festet til sorbenten. I normalfaseekstraksjon oppstår det polare interaksjoner mellom analytt og de funksjonelle gruppene på sorbenten. Selektive interaksjoner oppnås ved å bruke sorbenter som gir interaksjon med analytten og ikke forurensninger i prøven. De mest polare stoffene elueres sist, mens de minst polare først. Fast fase ekstraksjonen består av fire trinn; kondisjonering, påsetting av prøve, vask og eluering (figur 14). Kondisjonering utføres for å aktivere sorbenten slik at den blir i stand til å ta imot prøven. Dette skal reise opp de funksjonelle gruppene og øker det aktive overflatearealet. Heptan blir vanligvis brukt for å fukte kolonnen i kondisjoneringstrinnet i en normalfaseekstraksjon. Deretter settes prøven på kolonnen og analytten vil fordele seg mellom den aktive overflaten og prøveløsningen. Målet er at analytten skal bli fullstendig fanget opp eller retardert av sorbenten. Formålet med vasketrinnet er å vaske forurensninger ut av kolonnen. Det brukes et løsemiddel med svakere elueringsstyrke enn det som er nødvendig for å eluere ut analytten. Til slutt kan analytten elueres ut med et løsemiddel som selektivt bryter interaksjoner mellom sorbent og analytt. Det er viktig å passe på at elueringen skjer langsomt slik at interaksjoner mellom analytt og sorbent rekkes å brytes fullstendig.



Figur 14: Prinsipp for fast fase ekstraksjon (modifisert variant fra "legemiddelanalyse", 2. utgave)

2.7 Gasskromatografi

Fettsyrene i olje er som regel bundet i ulike kjemiske strukturer. Disse gruppene nedsetter stoffenes flyktighet. For å analysere fettsyrene ved hjelp av gasskromatografi må de gjøres flyktig. Dette gjøres ved en forestringsreaksjon med metanol, slik at man får dannet metylerte fettsyrestere.



Figur 15 Transesterifisering

Katalysatoren kan være en base, en syre eller et enzym. I denne oppgaven benyttes en syre (H_2SO_4) som katalysator, kombinert med oppvarming for å øke reaksjonshastigheten. Prinsippet går ut på å separere flyktige stoffer basert på stoffenes evne til å fordele seg mellom to faser, hvorav den ene fasen er mobil og den andre stasjonær. I gasskromatografi er mobilfasen en gass (helium i dette tilfellet). Separasjonen er avhengig av en rekke eksperimentelle faktorer, som for eksempel type stasjonær- og mobilfase, lengde og diameter på kolonne, trykk, temperatur og analyttens kjemiske og fysikalske egenskaper.

Prøven injiseres i kolonnen med en sprøyte og vanlig injeksjonsvolum er 0,5-2 μl . Det benyttes splitt eller splittløs injeksjon avhengig av mengde tilgjengelig analytt. Temperaturen i injektoren er høy (240 $^{\circ}\text{C}$) og prøven vil derfor fordampes spontant og blandes med heliumgassen. Gassblandingen fraktes gjennom kolonnen og prøvemolekylene vil bremses i større eller mindre grad gjennom kolonnen og dermed får man separasjon. Ved bruk av GC-kolonne med en polar stasjonærfase vil retensjonstiden avhenge av antall karbonatomer og antall dobbeltbindinger i fettsyren. Jo flere karbonatomer og antall dobbeltbindinger desto lengre tid bruker fettsyren gjennom kolonnen. Toppene i kromatogrammet identifiseres ved å sammenlikne retensjonstiden med kjente fettsyrestandarder.

2.8 Tynnsjiktskromatografi

Tynnsjiktskromatografi (TLC) ble brukt til å separere ulike fettklasser. Det er en enkel metode med kort analysetid og krever ikke mye utstyr for å utføre. I TLC er stasjonærfase (silika, SiO₂) lagt utover en plate. Silikapartiklene har en polar og svakt sur overflate slik at stoffer med polare grupper og basiske stoffer retarderes mest. Stasjonærfasen var lagt på glassplater (10x10 cm). I HPTLC er partikkelstørrelse 2-10 µm, noe som gir bedre separasjon enn normale TLC-plater. Ca. 1 µl av prøveløsninger og standarder settes på platene langs en startlinje på 1 cm fra kanten før den settes i et kar med mobilfase. Mobilfasen er ofte en blanding av flere løsemidler. Ved å endre polariteten i mobilfasen kan retensjonstiden (Rf-verdien) endres. Jo mer polart løsemiddelet er, jo lengre opp vil det flytte en polar forbindelse på platen. Platen tas ut av elueringskaret når mobilfasen har vandret til ca. 1 cm fra toppen av platen. Flekkene på platen ble fremkalt ved å spraye med en kobbersulfatløsning og deretter varmet opp. Rf-verdien benyttes for å synliggjøre et bestemt stoff på platen. Retensjonsfaktoren er definert som:

$$R_f = \frac{\text{Flekkens avstand fra startlinjen}}{\text{Væskefrontens avstand fra startlinjen}}$$

3. Materialer og metoder

3.1 Materialer:

Kjemikalier

MercKGaA (Darmstadt, Tyskland):

Dietyleter, Pro analyse

Eddiksyre 100 %, Pro analyse

Heptan, Pro analyse

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

Orto-Fosforsyre 85 %, Pro analyse

Natriumklorid, Pro analyse

Svovelsyre 95-97 %, 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

Diverse utstyr

Erlenmeyerkolbe, begerglass, engangspipetter, rundkolbe, pyrex-rør, kimax-rør, trakter, pipettespisser, sprøyter, kanyler

Standarder

Fettsyrestandarder brukt for å identifisere fettsyrene i prøvene ble kjøpt fra Supelco (Bellafonte, PA, USA). PUFA No.1 (Marine source); 47015-U, PUFA No.2 (Animal source); 47085-U, PUFA No.3 (from menhaden oil); 1891-1 AMP.

Innholdet i fettsyrestandardene er beskrevet i tabell 1.

Tabell 1: Fettsyresammensetning i fettsyrestandarder, der x angir fettsyrer i standard.

Fettsyrer	PUFA-1	PUFA-2	PUFA-3
14:0	x	x	x
16:0	x	x	x
16:1 n-7	x	x	x
16:2 n-4			x
16:3 n-4			x
18:0	x	x	x
18:1 n-9	x	x	x
18:1 n-7	x	x	x
18:2 n-6	x	x	x
18:3 n-6		x	
18:3 n-3	x	x	x
18:3 n-4			x
18:4 n-3	x		x
20:1 n-9	x	x	x
20:4 n-6		x	x
20:4 n-3			x
20:5 n-3	x	x	x
22:5 n-3	x	x	x
22:6 n-3	x	x	x

TLC

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

TLC-standarder 16-0A og 18-5A (NuChek Prep. Inc, Elysian MN, USA). Standard 16-0A inneholdt palmitinsyre, monopalmitin, dipalmitin, tripalmitin og metylpalmitat. Standard 18-5A bestod av kolesterol, kolesteryloleat, triolein, oljesyre og lecithin.

SPE

Mega Bond Elut (5 g) aminopropyl engangskolonner (Varian Inc. Middelburg, Nederland)

Visiprep vakuum manifold (Supelco, Bellafonte, PA, USA)

Rotavapor

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

Nitrogen-evaporator

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

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

Gasskromatografi

GC: Agilent 6890N med en 7683B auto injector (splitt/slittløs) og en flammeioniseringsdetektor (FID)

Bæregass: Helium5.0 Ultra (Yara Praxair AS, Oslo, Norge)

Kolonne: Varian CP7419 kapillærkolonne (50 m x 250 µm x 0,25 µm nominal)

Programvare: ChemStation

Sprøyte: Hamilton 701 ASN 10 µl (Hamilton Company, Reno, NV, USA).

3.2 Varedeklarasjon av omega-3 produkter:

3.2.1 Krillprodukter

Complete krillolje (Complete)

Dosering: 1-2 kapsler daglig

1 kapsel inneholder 500 mg ren Neptune krillolje (NKO®)

EPA	75 mg
DHA	45 mg
Totalt omega-3	150 mg
Fosfolipider	210 mg
Astaxanthin	600 µg
Best før	09/2012
Batch nr	61525509
Firma	Weifa As



Life krill oil (Life)

Dosering: 1-2 kapsler daglig

1 kapsel inneholder 500 mg krillolje

EPA	57,5 mg
DHA	32,5 mg
Totalt omega-3	115 mg
Fosfolipider	200 mg
Astaxanthin	40 µg
Best før	09/2012
Batch nr	0825
Firma	Life As



OmegaRed krillolje (OmegaRed)

Anbefalt døgndose er 1-2 kapsler per døgn

2 kapsler (1000 mg) inneholder:

EPA	115 mg
DHA	65 mg
Øvrige omega-3	50 mg
Totalt omega-3	230 mg
Fosfolipider	400 mg
Astaxanthin	50 µg
Best før	10/2013
Batch nr	1002425
Firma	Medica Nord As



Superba Ishavskrill (Superba)

Anbefalt dosering: 1-2 kapsler daglig

1 kapsel (500 mg) inneholder:

100 % ishavskrillolje	500 mg
Marine fosfolipider	200 mg
Omega-3 fettsyrer	108 mg
hvorav EPA	55 mg
hvorav DHA	25 mg
Astaxanthin	50 µg
Best før	10/2012
Batch nr	0101351
Firma	Nordic Pharma As

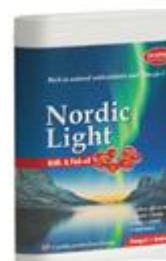


Nordic Light krillolje (Nordic Light)

Dosering: 2 kapsler daglig

1 kapsel inneholder:

Fiskeolje konsentrat, TG 3322	350 mg
Krillolje	150 mg
EPA	129 mg
DHA	88 mg
Totalt omega-3 med fosfolipider	263 mg
Astaxanthin	17 mcg
Best før	01/2012
Batch nr	58500410
Firma	Northern Light Products AS



3.2.2 Andre Omega-3 produkter

For sammenligningens skyld ble andre omega-3 produkter også undersøkt, en fettsyrestylester konsentrat (Omega-3 trippel) og en torskeleverolje (Lofottran)

Omega-3 Trippel konsentrert (Omega-3 Trippel)

Innhold per døgndose 2 kapsler

Fiskeolje	1000 mg
EPA	330 mg
DHA	220 mg
Totalt omega-3	650 mg
Vitamin A	250 µg (31 %)
Vitamin D	10 µg (200 %)
Vitamin E	10 mg (83 %)
Best før	17.08.2013
Batch nr	434707
Firma	Biopharma As



Lofot Tran (Lofottran)

Tran fra torsk pr. døgndose (5 ml)

EPA	0,4 g
DHA	0,5 g
Totalt omega-3 fettsyrer	1,1 g
Vitamin A	250 µg (31 %)
Vitamin D	10 µg (200 %)
Vitamin E	10 µg (100 %)
Best før utgangen av	09/2013
Batch nr	34000559
Firma	Lofoten As



3.3 Metoder

3.3.1 Fettklasseanalyse ved hjelp av tynnsjiktskromatografi

Ulike fettklasser i oljeprøvene ble separert vha. av tynnsjiktskromatografi etter en modifisert metode beskrevet av Vaghela & Kilara (1995). Prøvene ble løst til en konsentrasjon på 25 mg/ml i diklormetan og 1 µl av prøven, standard 16-0A og standard 18-5A ble applisert på HPTLC-platen. Mobilfase (heptan:dietyleter:eddiksyre, 70:30:1) ble laget og overført i et elueringskar i mettet atmosfære. Platen ble satt i elueringskaret og ble tatt ut av kammeret når mobilfasen var ca. 1 cm fra toppen på platen. Platen ble satt i avtrekkskap i noen minutter til den var tørr for å dampe av løsemidler. Videre ble platen sprayet med 10 % kobbersulfat og 8 % fosforsyre. Etter 10 min ble platen satt i en varmeovn for oppvarming til 160 °C og tatt ut av ovnen når 160 °C var nådd. Ved å bruke kjente standardblandinger ble fettklassene i oljeprøvene identifisert.

3.2.2 Fast fase ekstraksjon

Separasjonen av lipidklassene ved fast fase ekstraksjon (SPE) ble utført med en modifisert metode opprinnelig beskrevet av Vaghela & Kilara (1995). Kolonnen (5 g aminopropylsilyl) ble plassert i en vakuum manifold og løsningen blir eluert gjennom undertrykk. Kolonnen ble først aktivert med 20 ml heptan og 10 mg olje løst i 2 ml diklormetan ble tilsatt etter kondisjoneringen. Kolonnen ble fortløpende tilsatt elueringsmiddel A og vasket med 10 ml heptan før elueringsmiddel B ble tilsatt og vasket med 10 ml heptan. Deretter ble elueringsmiddel C tilsatt litt etter litt. Tabell 2 viser hvilke fettklasser som skal elueres med de ulike elueringsmidlene. De eluerte fraksjonene fikk samme betegnelse som elueringsmidlene. Det vil si A fraksjon inneholdt "nøytrale lipider", B fraksjon frie fettsyrer og C fraksjon fosfolipider. Etter at fraksjonen ble samlet opp ble hver fraksjon dampet tørr vha. en rotavapor (100-400 mbar, 40 °C) før hver av prøvene ble løst i diklormetan for videre analyse på TLC.

Tabell 2: Elueringsmiddel brukt for å separere ulike fettklasser

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

3.2.3 Reekstraksjon av fraksjon B1 i frie fettsyrer

Fraksjon B (frie fettsyrer) ble reekstrahert (refraksjonert) for å se om man kunne gjøre den renere. Ved første fraksjonering ble fraksjonene benevnt A1, B1 og C1, mens etter reekstraksjonen fikk de navnene A2, B2, C2. Kolonnen (5 g aminopropylsilyl) ble først aktivert med 20 ml heptan og deretter ble fraksjon B1 tilsatt etter kondisjoneringen. Kolonnen ble fortløpende tilsatt elueringsmiddel A og vasket med 10 ml heptan før elueringsmiddel B ble tilsatt og vasket med 10 ml heptan. Deretter ble elueringsmiddel C tilsatt litt etter litt. Etter fraksjonen ble samlet opp ble de behandlet som ved første ekstraksjon.

3.3.4 Måling av frie fettsyrer

Konsentrasjonen av frie fettsyrer (% FFA av totalt mengde olje) ble bestemt med metoden beskrevet av Ke & Woyewoda 1978. Det ble plukket 6 tilfeldige kapsler og innholdet i kapslene ble trukket ut ved hjelp av en sprøyte. Deretter ble oljene slått sammen og analysert. 0,1-1g olje løses i 75 ml kloroform:metanol:isopropanol (2:1:2) i en erlenmeyerkolbe tilsatt 4 dråper indikator (0,5 % meta-cresolpulver). Det lages tre paralleller av hver prøve. Deretter titreres prøvene med 0,05 M NaOH på røring til omslag fra klar til fiolett farge. En blindprøve med løsemiddel og indikator titreres på samme måte.

Prosentandelen frie fettsyrer beregnes følgende:

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

pr = titreringsvolum av prøve (ml)

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml)

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

282 = molekylvekt oljesyre (g/mol)

m = vekt av prøve

3.3.5 Gasskromatografi

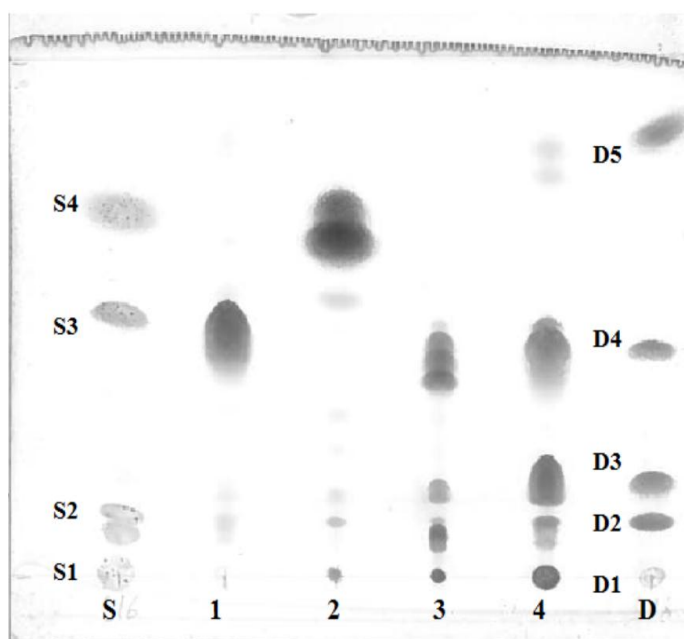
Fettsyresammensetningen i oljeprøvene ble bestemt ved å bruke gasskromatografi (GC). Oljeprøven ble løst i diklormetan til en konsentrasjon på 10 mg/ml. 100 µl av løsningen ble tilsatt 0,9 ml diklormetan og 2 % H₂SO₄ i metanol i en glassrør med lokk og kokt i en time på varmeblokk (100 °C) i avtrekksskap. Deretter ble 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaOH tilsatt og rørene ble ristet godt. Den øverste fasen, heptan og lipider ble pipettert over i nye rør og dampet tørr med nitrogengass. Prøvene ble løst i 100 µl heptan og de metylerte fettsyrene ble separert ved bruk av gasskromatografi. Det ble analysert tre paralleller av hver oljeprøve.

100 µl prøve løst i heptan ble overført til GC-rør og de metylerte prøvene ble analysert ved å bruke gasskromatografi (Agilent 6890N). Helium ble brukt som bæregass og kolonnen var Varian CP7419 kapillærkolonne. Temperaturprogrammet startet med 50 °C i to minutter og økte med 10 °C i minuttet til 150 °C, deretter 2 °C i minuttet til 205 °C og 15 °C i minuttet til 225 °C, hvor temperaturen ble holdt i 10 minutter. Fettsyrene i prøvene ble identifisert ved å bruke kjente standarder, PUFA-1, PUFA-2 og PUFA-3. Fettsyrene ble identifisert ved å sammenlikne retensjonstiden til toppene i prøvene med retensjonstiden til fettsyrestandardene

4. Resultater

4.1 Tynnsjiktskromatografi av kommersielle omega-3 produkter

Fettklassene i de kommersielle omega-3 produkter ble bestemt ved hjelp av tynnsjiktskromatografi (figur 16). Det ble analysert en torskeleverolje (Lofottran), en fettsyreetyler (Omega-3 trippel), et blandingsprodukt som bestod av både krill- og fiskeolje (Nordic light) og en ren krillolje (Complete krillolje). Som det framgår av figur 16 så inneholder Lofottran (1) nesten bare triacylglyserol (TAG). Det kan synes som om at det er små mengder kolesterol (D2) og frie fettsyrer. Omega-3 trippel (2) inneholder hovedsakelig fettsyreetylere og det kan se ut som at de foreligger i to hovedgrupper. I tillegg kan det se ut som om det er spor av polare lipider, kolesterol (D2), DAG (S2), frie fettsyrer og triacylglyserol. Nordic light krillolje (3) og Complete krillolje (4) inneholder mye av de samme fettklassene, fosfolipider, frie fettsyrer og TAG, men i Complete krillolje var det også påvist voksester (D5). Nordic Light inneholder mye triacylglyserol. Det kan se ut at det inneholder tre hovedtyper. I tillegg er det frie fettsyrer, kolesterol (D2) og fosfolipider (D1). Analyse av Complete krillolje viser at den består av relativt mer frie fettsyrer enn de andre produktene.



Figur 16 Tynnsjiktskromatografi av krillolje- og andre omega-3 produkter

S = Standard 16-0A inneholdt monopalmitin (S1), dipalmitin (S2), tripalmitin (S3) og metylpalmitat (S4).
1 = Lofottran, 2 = Omega-3 trippel, 3 = Nordic light, 4 = Complete. D = Standard 18-5A bestod av lecithin (D1), kolesterol (D2), oljesyre (D3), triolein (D4) og kolesteryloleat (D5).

4.2 Frie fettsyrer

Målingene av frie fettsyrer viste at Lofottran og Omega-3 trippel hadde et lavt innhold av frie fettsyrer (tabell 3). Produktene som inneholdt krillolje hadde et betydelig høyere innhold av frie fettsyrer. Nordic Light er en blanding av krill- og fiskeolje og inneholdt 6,4 % frie fettsyrer (FFA), mens Complete krillolje inneholdt 19,8 % FFA. Flere typer krilloljeprodukter ble undersøkt. Life krillolje, Superba Ishavskrill og OmegaRed inneholdt henholdsvis 8,5 %, 8,6 % og 7,6 % FFA (tabell 4). I de målingene som ble utført i desember 2011, viser tabell 3 at innhold av FFA i Complete krillolje var svært høyt. Måling av FFA i Complete krillolje ble derfor utført på nytt i januar 2012. Denne gangen viste også målingen at innhold av FFA er ganske høyt (22,5 %, se tabell 4). Innhold av frie fettsyrer kan også oppgis som syreverdi (acid value). Dette blir gjerne brukt i regelverket. Syreverdi er et mål for hvor mange mg KOH som må brukes for å nøytralisere de frie fettsyrene i 1 gram olje.

Tabell 3 viser oversikt over prosent frie fettsyrer av ulike omega-3 produkter (analysert 12.12.11)

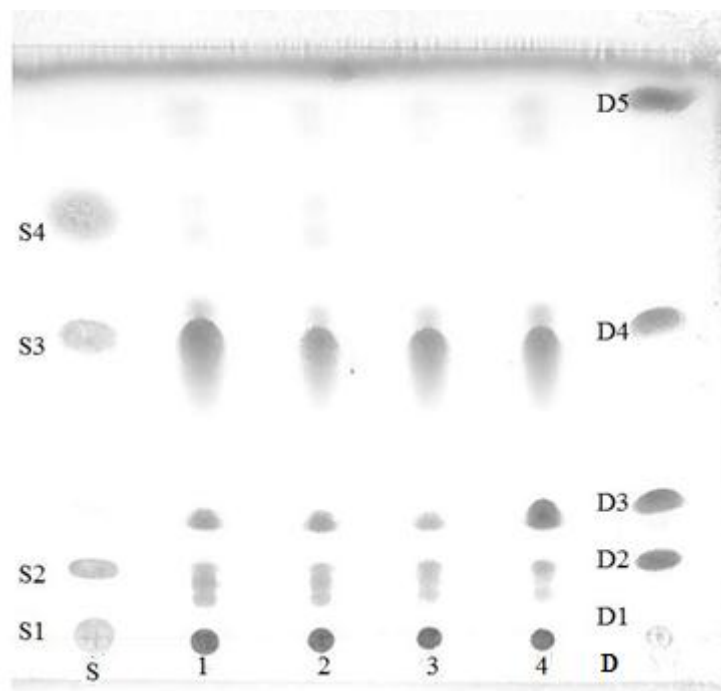
Prøve	Frie fettsyrer (%)	Beregnet syreverdi (mg KOH/g)
Lofottran	0,1 ± 0,01	0,2
Omega-3 trippel	0,1 ± 0,02	0,2
Nordic light	6,4 ± 0,7	12,8
Complete	19,8 ± 0,4	39,6

Tabell 4 viser oversikt over prosent frie fettsyrer av ulike krilloljeprodukter (analysert 07.01.12)

Prøve	Frie fettsyrer (%)	Beregnet syreverdi (mg KOH/g)
Life krillolje	8,5 ± 0,7	16,9
Superba Ishavskrill	8,6 ± 1,0	17,2
OmegaRed	7,6 ± 0,5	15,1
Complete	22,5 ± 0,4	44,9

4.3 Fettklasser analysert ved tynnsjiktskromatografi i krilloljeprodukter

Fettklassene i de fire krilloljeproduktene ble analysert ved hjelp av tynnsjiktskromatografi (figur 17). De ulike krilloljeproduktene inneholder de samme fettklassene. Tre av produktene, Life, Superba Ishavskrill og OmegaRed har de samme relative mengdene av de forskjellige fettklassene. Det fjerde produktet, Complete krillolje inneholder tydelig en høyere andel frie fettsyrer. Det er også tydelig at produktene inneholder fosfolipider og triacylglycerol. Det kan også se ut som de inneholder små mengder kolesterol (D2).



Figur 17 viser tynnsjiktskromatografi av ulike krilloljeprodukter

S = Standard 16-0A inneholdt monopalmitin (S1), dipalmitin (S2), tripalmitin (S3) og metylpalmitat (S4).

1 = Life krillolje, 2 = Superba Ishavskrill, 3 = OmegaRed, 4 = Complete krillolje. D = Standard 18-5A bestod av lecithin (D1), kolesterol (D2), oljesyre (D3), triolein (D4) og kolesteryloleat (D5).

4.4 Fettsyresammensetning i krilloljeprodukter

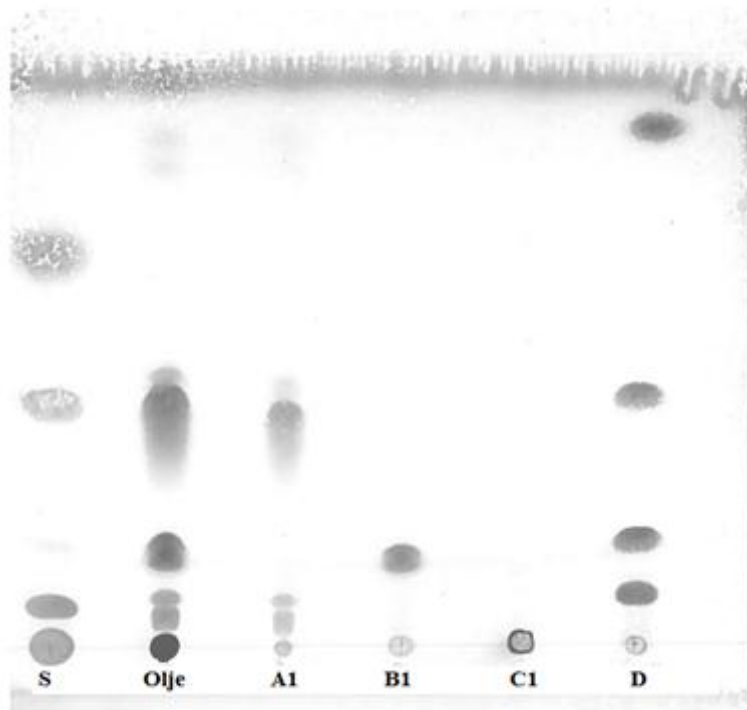
Analysene viser den totale fettsyresammensetning i de ulike krilloljeproduktene (se tabell 5). Fettsyresammensetning i krilloljeprodukter var ganske lik. De dominerende fettsyrene var 16:0, 16:1 n-7, 18:1 n-9, 18:1 n-7, 20:5 n-3 og 22:6 n-3. Superba- og Life krillolje inneholdt mye flerumettede fettsyrer på henholdsvis 29,7 % og 28,3 % sammenliknet med de andre krillproduktene. Innholdet av EPA var høyest i ishavskrill med 20,9 %, 20,2 % i Life krillolje, 16,7 % i Complete krillolje og 16,0 % i OmegaRed krillolje. Mengden DHA var 8,8 % i Complete krillolje, 8,5 % i OmegaRed og 8,2 % i Ishavskrill og 8,0 % i Life krillolje. Life krillolje hadde høyest innhold av enumettede fettsyrer med 31,6 %, mens mengden mettede fettsyrer er nesten lik i de fire krilloljeproduktene ca. 31-34 % (Appendiks 8.2 viser kromatogrammene fra GC-kjøringene).

Tabell 5 Fettsyresammensetning i arealprosent av ulike krilloljeprodukter

Fettsyrer	Complete krillolje	OmegaRed	Superba Ishavskrill	Life krillolje
Mettede				
14:0	9,6 ± 0,7	10,6 ± 0,3	10,5 ± 0,5	8,4 ± 1,6
16:0	21,5 ± 0,6	22,7 ± 0,5	21,4 ± 0,5	21,6 ± 0,5
18:0	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,02	1,6 ± 0,05
Σ SAT	32,6	34,6	33,3	31,6
Enumettede				
16:1 n-7	6,2 ± 0,2	6,4 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,3 ± 0,3
18:1 n-9	11,6 ± 0,3	12,4 ± 0,4	10,5 ± 0,1	12,7 ± 0,4
18:1 n-7	8,0 ± 0,2	7,9 ± 0,5	7,7 ± 0,1	8,3 ± 0,2
20:1 n-9	4,3 ± 0,1	4,8 ± 0,1	3,1 ± 0,03	3,3 ± 0,1
Σ MUFA	30,1	31,5	28,8	31,6
Flerumettede				
16:2 n-4	0,8 ± 0,02	0,7 ± 0,02	0,7 ± 0,01	0,7 ± 0,02
18:2 n-6	1,7 ± 0,03	1,8 ± 0,01	1,7 ± 0,02	1,6 ± 0,05
18:3 n-3	1,2 ± 0,02	1,3 ± 0,02	0,7 ± 0,01	0,6 ± 0,02
20:4 n-6	0,5 ± 0,01		0,6 ± 0,01	0,5 ± 0,002
20:4 n-3		0,6 ± 0,01	0,7 ± 0,03	0,7 ± 0,03
20:5 n-3 (EPA)	16,7 ± 0,3	16,0 ± 0,7	20,9 ± 0,4	20,2 ± 0,8
22:6 n-3 (DHA)	8,8 ± 0,2	8,5 ± 0,4	8,2 ± 0,1	8,1 ± 0,3
Σ PUFA	29,7	28,9	33,5	32,4
n-3	26,7	26,4	30,5	29,6
n-6	2,2	1,8	2,3	2,1
LC-n-3	26,0	25,1	30,4	29,5

4.5 Lipidklasser separert ved SPE i Complete krillolje

Fettklasser i oljeprøvene ble bestemt kvalitativt ved å bruke tynnsjiktskromatografi. Det ble brukt to TLC-standarder som en kvalitetskontroll. I denne delen ble Complete krillolje analysert nærmere og det ble gjennomført en fast fase ekstraksjon for å separere fettklasser. De fettklassene som ble samlet opp var “nøytrale lipider” (A1), frie fettsyrer (B1) og fosfolipider (C1). Ulike fettklasser ble separert ved fast fase ekstraksjon (se figur 18). A1 fraksjon inneholder “nøytrale fettsyrer” og spor av polare lipider. Det ble også påvist spor av polare lipider i fraksjon B. Fraksjonene separert etter SPE ser tilfredsstillende for C1 fraksjonen (fosfolipider).

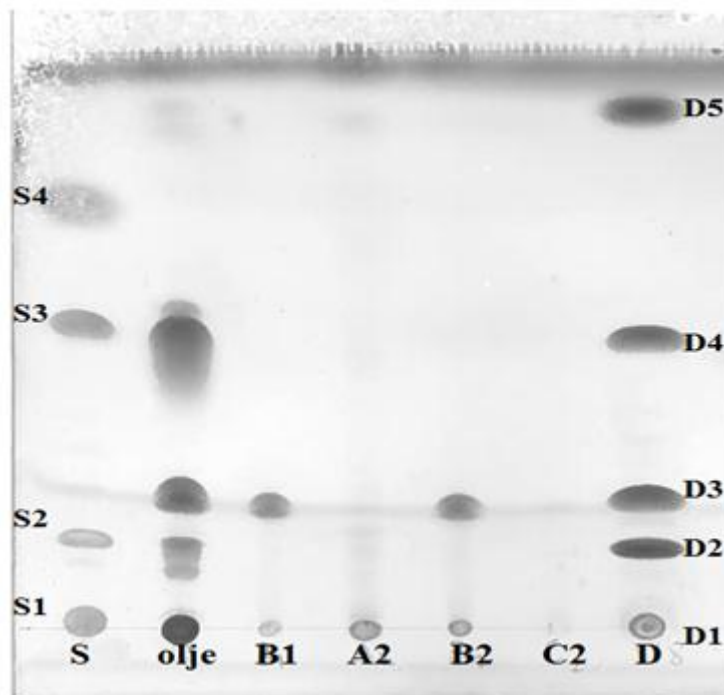


Figur 18 Tynnsjiktskromatografi av Complete krillolje etter fast fase ekstraksjon

Olje = Complete krillolje fortynnet til 25 mg/ml i DCM. S = Standard 16-0A inneholdt monopalmitin (S1), dipalmitin (S2), tripalmitin (S3) og metylpalmitat (S4). A = “nøytrale lipider”, B = frie fettsyrer, C = fosfolipider. D = Standard 18-5A bestod av lecithin (D1), kolesterol (D2), oljesyre (D3), triolein (D4) og kolesteryloleat (D5).

4.6 Reekstraksjon av B1 fraksjon i frie fettsyrer

Fraksjon B1 ble reekstrahert på nytt for å se om man kunne gjøre den renere og det ble brukt aminopropylsilylkolonne med de samme elueringsmiddel brukt for og eluere ut nøytrale lipider (A2), frie fettsyrer (B2) og fosfolipider (C2). Tynnsjiktplaten (figur 19) viser de ulike fraksjonene (NL, FFA og PL) etter reekstraksjon av B1. A2 fraksjonen ("nøytrale lipider") ser ut til å ha spor av polare lipider. B2 fraksjonen (frie fettsyrer) har ikke forandret seg mye. C2 fraksjonen (fosfolipider) er ikke vist på platen. Dette kan være pga. av at all fosfolipider ble rensset under den første SPE-rensingen (se figur 18).



Figur 19 Tynnsjikt-kromatografi av fraksjon B1 etter fast fase ekstraksjon

Olje = Complete krillolje fortynnet til 25 mg/ml i DCM. S = Standard 16-0A inneholdt monopalmitin (S1), dipalmitin (S2), tripalmitin (S3) og metylpalmitat (S4). A2 = "nøytrale lipider", B2 = frie fettsyrer, C2= fosfolipider. D = Standard 18-5A bestod av lecithin (D1), kolesterol (D2), oljesyre (D3), triolein (D4) og kolesteryloleat (D5).

4.7 Fettsyresammensetning av utvalgte fraksjoner etter SPE rensing

Det ble analysert fettsyresammensetning av utvalgte fraksjoner etter fast fase ekstraksjon av Complete krillolje (se tabell 6). Fraksjonene ble sammenliknet med fettsyresammensetningen i total krillolje. Fosfolipider (C1 fraksjon) er den viktigste lipidklassen i krillolje som inneholder mest langkjedede flerumettede n-3 fettsyrer (LC-n-3) på henholdsvis 49,2 %.

Tabell 6: Fettsyresammensetning i arealprosent av Complete krillolje og utvalgte fraksjoner etter rensing med SPE som inneholdt nøytrale lipider (NL), frie fettsyrer (FFA) og polare lipider (PL).

Fettsyrer	Trivialnavn	Complete	A1	A2*	B1	B2	C1	C2**
Mettede								
14:0	Myristinsyre	9,6 ± 0,7	14,0 ± 0,7		2,0 ± 0,9	3,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3	
16:0	Palmitinsyre	21,5 ± 0,6	21,9 ± 0,1		14,5 ± 1,1	17,3 ± 0,9	26,3 ± 0,8	
18:0	Stearinsyre	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,02		4,3 ± 0,5	8,9 ± 0,2	2,2 ± 0,02	
Σ SAT		32,6	37,8		20,8	29,8	30,3	
Enumettede								
16:1 n-7	Palmitolsyre	6,2 ± 0,2	9,3 ± 0,1		2,9 ± 0,4	3,0 ± 0,3	1,5 ± 0,1	
18:1 n-9	Oljesyre	11,6 ± 0,3	15,9 ± 0,3		7,9 ± 0,1	8,1 ± 0,8	6,1 ± 0,1	
18:1 n-7	<i>Cis</i> -Vaccensyre	8,0 ± 0,2	9,1 ± 0,4		7,5 ± 0,1	7,3 ± 0,4	5,3 ± 0,1	
20:1 n-9	Gondoinsyre	4,3 ± 0,1	5,6 ± 0,1		3,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	2,9 ± 0,05	
Σ MUFA		30,1	39,9		22,1	21,8,4	15,8	
Flerumettede								
16:2 n-4		0,8 ± 0,02	1,2 ± 0,01			0,7 ± 0,04		
18:2 n-6	Linolsyre	1,7 ± 0,03	1,9 ± 0,03		1,8 ± 0,01	1,7 ± 0,04	1,6 ± 0,02	
16:3 n-4			0,6 ± 0,01					
18:3 n-3	α -linolensyre	1,2 ± 0,02	1,2 ± 0,01		1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,01	1,3 ± 0,02	
20:4 n-3					1,0 ± 0,2		1,1 ± 0,1	
20:4 n-6	Arakidonsyre	0,5 ± 0,01			1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,01	0,7 ± 0,01	
20:5 n-3	EPA	16,7 ± 0,3	7,6 ± 0,1		29,8 ± 1,0	24,6 ± 0,7	31,5 ± 0,9	
22:5 n-3	DPA				1,0 ± 0,5	2,3 ± 1,4	0,9 ± 0,03	
22:6 n-3	DHA	8,8 ± 0,2	3,0 ± 0,1		19,1 ± 1,0	16,0 ± 1,1	15,0 ± 0,6	
Σ PUFA		29,7	15,5		55,3	47,5	52,1	
n-3		26,7	11,8		52,4	43,9	49,8	
n-6		2,2	1,9		2,9	2,7	2,3	
LC-n-3		26,0	10,6		52,0	43,9	49,2	

* ingen utslag

** C2 fraksjonen ble ikke vist på TLC platen og ga dermed ingen utslag på kromatogrammet

Analysene etter SPE-rensing viser at det høyeste innholdet av EPA (20:5 n-3) var i C1 fraksjonen (fosfolipider) som utgjorde 31,5 % av lipidene og 29,8 % i B1 fraksjon (frie fettsyrer), mens det bare bestod av 7,6 % i A1 fraksjon (“nøytrale lipider”). Innholdet av DHA (22:6 n-3) i FFA-fraksjonen var 19,1 %, 15 % i fosfolipid fraksjonen og mye lavere i den nøytrale fraksjonen med kun 3,0 %. Analysen viste at innholdet av mettede fettsyrer var høyest i den fraksjonen som inneholdt “nøytrale lipider” som utgjorde 37,8 % og disse fettsyrene var hovedsakelig myristinsyre (14:0) med 14,0 % og palmitinsyre (16:0) med 21,9%. De mettede fettsyrene i B1 fraksjonen var palmitinsyre med 14,5 % og 4,3 % på stearinsyre (18:0). Andre dominerende fettsyrer i den polare fraksjonen (C1) er palmitinsyre med 26,3 %. I tillegg inneholdt den nøytrale lipidfraksjonen et høyt innhold av enumettede fettsyrer på 39,9 % (palmitolsyre (16:1 n-7) med 9,3 % og oljesyre (18:1 n-9) med 15,9 %). Den nøytrale lipidfraksjonen inneholdt minst langkjedede flerumettede n-3 fettsyrer (7,6 % EPA og 3,0 % DHA) sammenlignet FFA- og PL-fraksjonen. Fettsyresammensetningen i FFA- og PL fraksjonen var svært lik. I FFA- og PL fraksjonen var 16:0, 20:5 n-3 og 22:6 n-3 de dominerende fettsyrene (Appendiks 8.2 viser GC-kromatogrammene av de utvalgte fraksjonene).

5. Diskusjon

Krillolje er særlig interessant på grunn av sitt høye innhold av langkjedede omega-3 fettsyrer som har dokumenterte positive helseeffekter (EPA og DHA), spesielt med hensyn på hjertekarsykdommer (sammenfattet av Psota et al. 2006; Deckelbaum et al, 2008). Antarktisk krill inneholder mer enn 30 % EPA (20:5 n-3) og DHA (22:6 n-3), samt astaxanthin (provitamin-E) i konsentrasjoner på 200-400 ppm (Kolakowska et al, 1994). Antioksidant nivåer i krill er høyere enn i fisk som gjør at det blir mindre utsatt for oksidering. (Tou et al, 2007). Mye av de flerumettede fettsyrene er forestret i fosfolipider i krillolje. Flere mener at dette forbedrer biotilgjengeligheten sammenliknet med når fettsyrene er forestret i triacylglycerol (Bunea et al, 2004; Werner, Havinga et al, 2004).

Analysen av fettclassesammensetningen viste at leveroljen fra torsk (Lofottran) som forventet hadde et høyt innhold av triacylglycerol (se figur 16). Fettklasseanalyse av omega-3 trippel viste at det inneholdt store mengder etylester istedenfor triglyserider som stemmer med det som er deklart på pakningen. Det kommer også fram at fettsyreetylester synes å danne to grupper med litt forskjellig polaritet. Den som har beveget seg lengst inneholder mer mettede fettsyrer. Andre fettklasser som ble funnet i mindre mengder var polare lipider, kolesterol, diacylglycerol og frie fettsyrer. Complete- og Nordic light krillolje hadde veldig like fettsyreklasser. Fettklasser som ble identifisert i Complete krillolje var polare lipider, frie fettsyrer og nøytrale lipider og i tillegg ble det funnet kolesterol, DAG og voksester. Tynnsjiktanalyse av Nordic light krillolje viste at det hadde store mengder triacylglycerol og på platen ble det påvist tre ulike triacylglycerolgrupper. På tynnsjiktplaten var flekkene som indikerer fosfolipider og frie fettsyrer markant tydelig for Complete- og Nordic light krillolje. Complete krillolje skilte seg ut fra de andre, siden det inneholdt mer fosfolipider og flekken som indikerte frie fettsyrer var mye kraftigere enn de andre omega-3 produktene. Krillolje har blitt analysert for både lipidinnhold og fettsyresammensetning av flere og det ble funnet at fettclassene i krill er hovedsakelig fosfolipider, triacylglycerol og frie fettsyrer (Clarke 1980; Fricke et al, 1984; Pond et al, 1995; Cripps et al, 1999). Fettsyresammensetning og lipidinnhold i krill er avhengig av arter, alder, og tiden mellom fangst og frysing (Kolakowska, 1991).

Det ble målt frie fettsyrer av krillolje- og andre omega-3 produkter. Målinger av Complete krillolje viste at det hadde et høyt innhold av frie fettsyrer sammenliknet med andre kommersielle omega-3 produkter (se tabell 3 og 4). Den første analysen av Complete krillolje ble målt til 19,8 % FFA, mens den andre målingen som ble utført på nytt i januar viste en svak

økning (22,5 % FFA). Grunnen til en svak økning i % frie fettsyrer kan skyldes tilfeldige feil. En feilkilde kan være at det ikke ble brukt analysevekt til å veie oljene, noe som gjør veiingen unøyaktig. NaOH som ble brukt var laget fra pellets. Pellets inneholder forurensninger ettersom NaOH reagerer med luft. De 3 andre krilloljeproduktene inneholdt ca. 8 % frie fettsyrer. Disse produktene er fra en norsk produsent, Aker Biomarin, mens Complete krillolje er fra et kanadisk firma. I blandingsproduktet som bestod av både krill- og fiskeolje ble frie fettsyrer målt til 6,4 %, mens andre omega-3 produkter i triglyseridform hadde mye betydelig lavere FFA verdi. Dette stemmer med det man ser ut fra tynnsjiktplaten på figur 16, der flekken på Complete krillolje var mer kraftigere enn de andre omega-3 produktene. For oljer som benyttes til fôr er øvre grense for innhold av frie fettsyrer satt til 5 % i følge fiskefôrprodusenter. Grenseverdi for oljer til humant konsum er satt til 2 % (European Pharmacopoeia, 2005). Vitenskapskomiteen for mattrygghet (norsk arbeidsgruppe) arbeider for å få etablert Codex standard for marine oljer til humant konsum basert på Global Organization for EPA and DHA (GOEDs) anbefalte verdier. Her er syreverdi for frie fettsyrer i fiskeoljer satt til 3 mg KOH/g (1,5 %) og for krillolje med høyt innhold av fosfolipider er syreverdi 20 mg KOH/g (10 %). Dette betyr at det ene krilloljeproduktet ikke vil kunne bli godkjent dersom de foreslåtte verdiene blir etablert som grenseverdier for FFA. Frie fettsyrer kan fjernes ved raffinering gjennom nøytralisering med kaustisk soda (NaOH). FFA dannes normalt på grunn av enzymatisk aktivitet. Antarktisk krill inneholder aktive hydrolytiske enzymer inkludert lipaser og fosfolipaser som gjør at fett brytes ned raskt (Ellingsen, T. E. and V. Mohr, 1987). Dette er en stor utfordring ved kommersiell prosessering og utvikling av nye krill-baserte matvarer. Krill-lipaser/fosfolipaser er veldig aktive og selv om krill fryses direkte om bord kan dannelsen av FFA ha skjedd. Et høyt innhold av frie fettsyrer kan antagelig være skadelig på flere måter. De kan felle ut som såpe (Na^+/K^+ -salt av fettsyrene) i tarmen. Dette reduserer opptak av fettsyrene. En annen fare er at såper fungerer som detergent og løser opp biologisk membraner, dvs. kan skade tarmceller.

Analyse av fettsyresammensetningen i de fire krilloljeproduktene viste at de var ganske like. Innholdet av EPA og DHA var til sammen 25-28 % (se tabell 5). Dersom man sier 25 % så vil 2 kapsler (å 500 mg) gi 0,25 gram EPA + DHA, det vil si det som ofte er anbefalt dagligdose (Kris-Etherton et al, 2009).

Fettklasser av de ulike krilloljeproduktene ble analysert ved bruk av tynnsjiktskromatografi (figur 17). Analysene viser klart alle fire produktene inneholder de samme fettklassene og at hovedinnholdet var polare lipider, frie fettsyrer og nøytrale lipider. I

tillegg inneholdt de kolesterol, DAG og voksestergrupper. Det viste seg også at Complete krillolje hadde et høyere innhold av FFA enn de 3 andre produktene.

Videre ble Complete krillolje analysert nærmere og lipidklassene i Complete krillolje ble separert ved bruk av fast fase ekstraksjon (figur 18). Her var hovedfokuset å samle opp nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider. Fraksjonen som inneholdt fosfolipider (C1) etter den første ekstraksjonen var ganske ren. TLC-analyse etter første SPE trinn viste at A1 (“nøytrale lipider”) og B1 (frie fettsyrer) fortsatt inneholdt spor av polare lipider, derfor ble fraksjon B1 reekstrahert på nytt for å se om man kunne gjøre den renere. Det ble brukt de samme elueringsmiddel som beskrevet i den første ekstraksjonen. I figur 19 kommer det fram at fraksjon B1 inneholder frie fettsyrer og spor av polare lipider. Derimot kan det også synes at polare lipider er tilstede i spor A2 og tilsvarende for B2. I C2 er det ikke en flekk for polare lipider. Dette tyder på at flekkene i B1 og A2 som indikerer polare lipider (i påsetningspunktet) ikke er polare lipider (fosfolipider), men kanskje en forurensning (en falsk positiv) eller noe forurensning som har kommet på tynnsjiktplaten. En mulig løsning en kunne ha gjort var å ta A1 fraksjon (nøytrale lipider) etter første SPE og reekstrahert det på nytt for å se om det kommer noe spor av fosfolipider i C2 fraksjonen.

Fettsyresammensetningen ble analysert i utvalgte fraksjoner (NL, PL og FFA) fra fast fase ekstraksjon (se tabell 6). Resultatet viste at sammensetningen var svært forskjellig. Fosfolipider (fraksjon C1) og de frie fettsyrene (B1 og B2) inneholdt mye EPA og DHA sammenliknet med de nøytrale lipidene (fraksjon A1). Dette viser ganske tydelig at de frie fettsyrene spaltes fra fosfolipidene og ikke fra triacylglyserol. Det er derfor antakelig fosfolipaser og ikke lipaser som er skyld i det høye innholdet av FFA i krilloljer.

GC-analyser av fraksjon A2 og C2 gav ingen topper i kromatogrammet. Dette indikerer at A2 fraksjonene mest sannsynlig ikke inneholdt lipider, og at den observerte flekken på TLC-platen må skyldes andre forbindelser. TLC-analyse av C2 viste ingen flekker på platen. Dette sammen med GC-analyser viser at vi har fått en effektiv isolering av fosfolipider allerede etter den første SPE-rensingen.

Polare lipider var vanskelig å få rensert med den vanlige metoden som ble brukt av avdelingen (modifisert variant av Vaghela og Kilara, 1995). I tillegg var det vanskelig å få ren fraksjon av fosfolipider. Ved starten ble det brukt dietyleter: eddiksyre (98:2) for å eluere ut frie fettsyrer. Resultatet var at fosfolipider kom ut med de frie fettsyrene på TLC-platen. Det ble dermed endret elueringsmiddel og brukt en syrestyrke på 5 % for å separere de frie fettsyrene fra fosfolipidene. Grunnen var at det måtte være en lav nok pH til å bryte de ioniske interaksjonene med aminogruppene på kolonnen. Det var viktig å få en ren fraksjon av

fosfolipider, siden dette utgjorde en del av det totale lipidinnholdet i krillolje. Resultatet viste at dette var en god løsning. Fosfolipidfraksjonen var tilfredsstillende ren. En annen metode som kunne vært brukt er HPLC, siden bruk av fast fase ekstraksjon med aminopropylkolonne kom det ut andre fraksjoner (i dette tilfelle polare lipider) i tillegg til den fraksjonen man skulle samle opp. På TLC-platen kunne man se spor av polare lipider i de fraksjonene som inneholdt "nøytrale lipider" og frie fettsyrer. Dette kan unngås ved å bruke HPLC og samle opp fettklassene i en fraksjonssamler. Dersom det hadde vært mer tid tilgjengelig kunne HPLC metoden vært veldig nyttig å bruke for å få rene fraksjoner. I tillegg kunne det vært spennende å undersøke oksidasjon på de ulike krilloljeprodukter for å få testet om de holder kvalitet.

6. Konklusjon

Krillolje fra en kanadisk produsent inneholdt ganske mye frie fettsyrer ca. 20 % antakeligvis fordi den inneholder aktive hydrolytiske enzymer (fosfolipaser) som bryter ned fosfolipidene veldig raskt. Krillolje er relativt en god kilde til omega-3 fettsyrer med 16,7 % EPA (20:5 n-3) og 8,8 % DHA (22:6 n-3). De dominerende fettclassene var fosfolipider, frie fettsyrer og nøytrale lipider. Fettsammensetningen i frie fettsyrer fraksjonen ligner på sammensetningen i fraksjonen med fosfolipider. Resultatet viste at metoden for separasjon av fettclassene kunne forbedres. Ved bruk av fast fase ekstraksjon med aminopropylkonne fikk man andre fraksjoner i tillegg til den fraksjonen som i utgangspunktet skulle samles opp. En mulig løsning kunne vært å bruke HPLC.

7. Referanser:

- Bottino, N. R. (1975). "Lipid composition of two species of Antarctic krill: *Euphausia superba* and *E. crystallorophias*." *Comp Biochem Physiol B* **50**(3): 479-484.
- Breslow, J. L. (2006). "n-3 fatty acids and cardiovascular disease." *Am J Clin Nutr* **83**(6 Suppl): 1477S-1482S.
- Bunea, R., K. El Farrah, et al. (2004). "Evaluation of the effects of Neptune Krill Oil on the clinical course of hyperlipidemia." *Altern Med Rev* **9**(4): 420-428.
- Clarke, A. (1980). "The biochemical composition of krill, *Euphausia superba* Dana, from South Georgia." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **43**(3): 221-236.
- Clarke, A. (1984). "Lipid content and composition of Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana." *Journal of Crustacean Biology*: 285-294.
- Cripps, G., J. Watkins, et al. (1999). "Fatty acid content of Antarctic krill *Euphausia superba* at South Georgia related to regional populations and variations in diet." *Marine Ecology Progress Series* **181**: 177-188.
- De Caterina, R., A. Zampolli, et al. (2006). "Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease." *Am J Clin Nutr* **83**(2): 421S-426S.
- Deckelbaum, R. J., A. Leaf, et al. (2008). "Conclusions and recommendations from the symposium, Beyond Cholesterol: Prevention and Treatment of Coronary Heart Disease with n-3 Fatty Acids." *The American journal of clinical nutrition***87**(6): 2010S-2012S.
- Deutsch, L. (2007). "Evaluation of the effect of Neptune Krill Oil on chronic inflammation and arthritic symptoms." *Journal of the American College of Nutrition* **26**(1): 39-48.
- Ellingsen, T. E. and V. Mohr (1987). "Biochemistry of the autolytic processes in Antarctic krill post mortem. Autoproteolysis." *Biochem J* **246**(2): 295-305.
- European Pharmacopoeia. (2005). "European Pharmacopoeia, Directorate for Quality of Medicines of the Council of Europe. ISBN: 978-92-871-5843-6."
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). from <http://www.fao.org/fishery/species/3393/en>
- Falk-Petersen, S., W. Hagen, et al. (2000). "Lipids, trophic relationships, and biodiversity in Arctic and Antarctic krill." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**(S3): 178-191.

- Fricke, H., G. Gercken, et al. (1984). "Lipid, sterol and fatty acid composition of Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana)." *Lipids* **19**(11): 821-827.
- Gigliotti, J. C., M. P. Davenport, et al. (2011). "Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*)." *Food Chemistry* **125**(3): 1028-1036.
- Hagen, W., G. Kattner, et al. (2001). "Lipid metabolism of the Antarctic krill *Euphausia superba* and its ecological implications." *Marine Biology* **139**(1): 95-104.
- Hedelin, M., E. T. Chang, et al. (2007). "Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism." *International journal of cancer* **120**(2): 398-405.
- Hibbeln, J. R., L. R. G. Nieminen, et al. (2006). "Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity." *The American journal of clinical nutrition* **83**(6): S1483-1493S.
- Hooper, L., R. L. Thompson, et al. (2006). "Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review." *bmj* **332**(7544): 752-760.
- Jensen, C. L. (2006). "Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation." *The American journal of clinical nutrition* **83**(6): S1452-1457S.
- Jung, U. J., C. Torrejon, et al. (2008). "n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: mechanisms underlying beneficial effects." *Am J Clin Nutr* **87**(6): 2003S-2009S.
- Kaluzny, M., L. Duncan, et al. (1985). "Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns." *Journal of Lipid Research* **26**(1): 135-140.
- Kawamura, Y., K. Nishimura, et al. (1981). "Characteristics of autolysis of Antarctic krill." *Agricultural and biological chemistry* **45**(1): 93.
- Ke and Woyewoda, A.D (1978). "Titrimetric Method for Determination of Free Fatty Acids in Tissues and Lipids with Ternary Solvent and m-Cresol Purple Indicator." *Anal Chim Acta.* **99**: 387-391.
- Kolakowska, A. (1988). "Changes in lipids during the storage of krill (*Euphausia superba* Dana) at 3 degrees C." *Z Lebensm Unters Forsch* **186**(6): 519-523.
- Kolakowska, A. (1991). "The influence of sex and maturity stage of krill (*Euphausia superba* Dana) upon the content and composition of its lipids " *Polish Polar Research* **12**: 73-78.

- Kolakowska, A., E. Kolakowski, et al. (1994). "Winter season krill (*Euphausia superba* D.) as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids." *Food/Nahrung* **38**(2): 128-134.
- Kris-Etherton, P. M., J. A. Grieger, et al. (2009). "Dietary reference intakes for DHA and EPA." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **81**(2): 99-104.
- Lunn, J. and H. Theobald (2006). "The health effects of dietary unsaturated fatty acids." *Nutrition Bulletin* **31**(3): 178-224.
- Massrieh, W. (2008). "Health benefits of omega-3 fatty acids from Neptune krill oil." *Lipid Technology* **20**(5): 108-111.
- Nelson, D. L. C., M.M (4th ed. 2005). "Lehninger, Principles of Biochemistry "
- Nicol, S., Endo, Y. 1997. Krill fisheries of the world. FAO fisheries technical paper. No. 367. FaO, Rome.
- Olsen, R. L. (2007). "Lipidkjemi med vekt på fisk. Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø ".
- Pond, D., J. Watkins, et al. (1995). "Variation in the lipid content and composition of Antarctic krill *Euphausia superba* at South Georgia." *Marine ecology progress series. Oldendorf* **117**(1): 49-57.
- Psota, T. L., S. K. Gebauer, et al. (2006). "Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk." *The American journal of cardiology* **98**(4): 3-18.
- Ruxton, C. (2007). "Commentary on Ruxton, CHS, Reed, SC, Simpson, MJA & Millington, KJ (2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*; 17, 449–459." *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **20**(3): 286-287.
- Sampalis, F., R. Bunea, et al. (2003). "Evaluation of the effects of Neptune Krill Oil™ on the management of premenstrual syndrome and dysmenorrhea." *Alternative Medicine Review* **8**(2): 171-179.
- Sidhu, G. S., W. A. Montgomery, et al. (1970). "Biochemical composition and nutritive value of krill (*Euphausia superba* Dana)." *J Sci Food Agric* **21**(6): 293-296.
- Stig Pedersen-Bjergaard, K. E. R. (2. utgave 2010). "Legemiddelanalyse ".
- Tou, J. C., J. Jaczynski, et al. (2007). "Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits." *Nutr Rev* **65**(2): 63-77.

- Vaghela, M. and A. Kilara (1995). "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 **72**(10): 1117-1121.
- Vitenskapskomiteen for mattrygghet. (2011). "Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils ", from <http://www.vkm.no/dav/4be9bee090.pdf>.
- Vitenskapskomitten for mattrygghet. (2011). "Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified foods ", from <http://www.vkm.no/dav/c7a41adb79>.
- Wang, C., W. S. Harris, et al. (2006). "n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary-and secondary-prevention studies: a systematic review." *The American journal of clinical nutrition* **84**(1): 5-17.
- "World Wide Fund for Nature (WWF)." from http://www.wwf.no/bibliotek/wwf_naturfakta/hav/krill/.
- Werner, A., R. Havinga, et al. (2004). "Treatment of EFA deficiency with dietary triglycerides or phospholipids in a murine model of extrahepatic cholestasis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**(5): G822-832.

8. Appendiks

8.1 Beregning av prosent frie fettsyrer:

	Vekt av prøve (gram)	Titret NaOH (ml)	% FFA	Gjennomsnitt (%)	Beregnet syreverdi (mg KOH/g)
1. Ishavskrill	0,13	0,86	7,12	8,6 ± 1,0	17,2
2. Ishavskrill	0,13	1,07	9,4		
3. Ishavskrill	0,16	1,25	9,22		
1. OmegaRed	0,12	0,9	8,19	7,6 ± 0,5	15,2
2. OmegaRed	0,12	0,79	6,89		
3. OmegaRed	0,12	0,85	7,60		
1. Life krillolje	0,24	1,55	7,91	8,5 ± 0,7	17,0
2. Life krillolje	0,15	1,01	9,49		
3. Life krillolje	0,17	1,16	7,93		
1. Complete	0,15	2,65	23,0	22,5 ± 0,4	45,0
2. Complete	0,12	2,12	22,52		
3. Complete	0,16	2,68	21,83		
1. Blank		0,23		0,2	
2. Blank		0,18			
3. Blank		0,2			

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

pr = titreringsvolum av prøve (ml)

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml)

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

282 = molekylvekt oljesyre (g/mol)

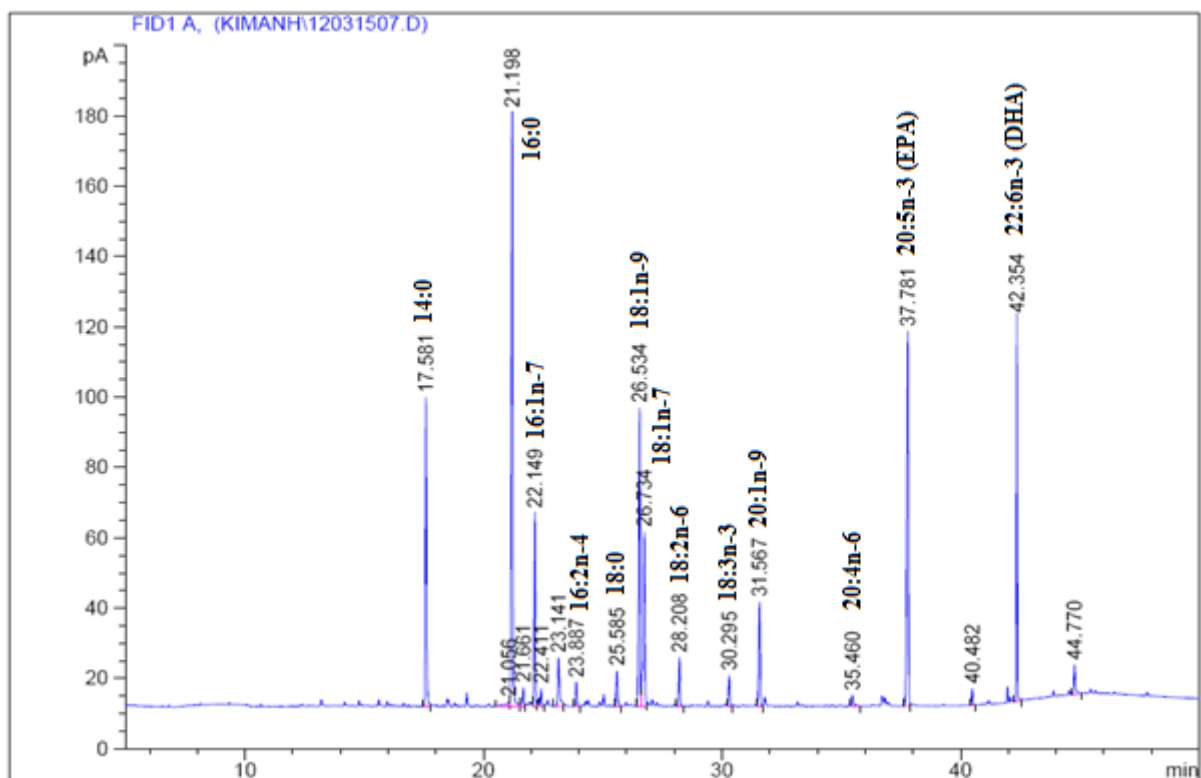
m = vekt av prøve

Eksempel.

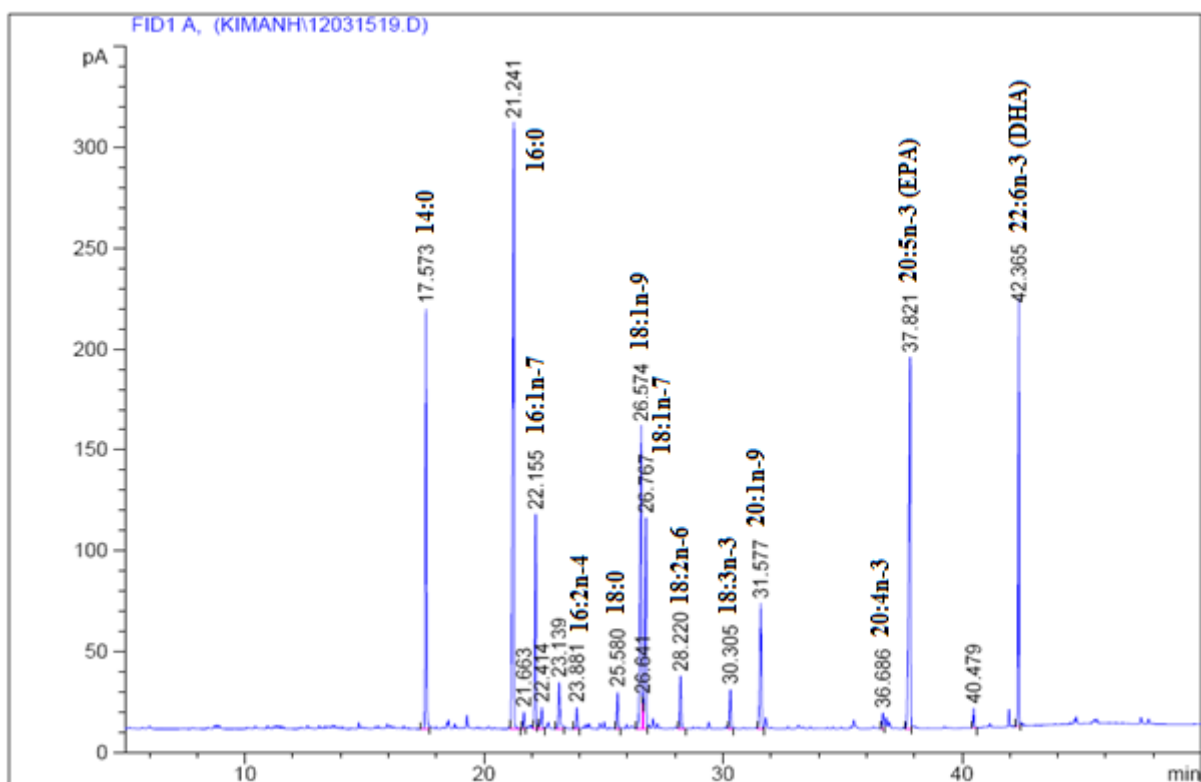
$$\text{Frie fettsyrer (\%)} = \frac{(0,86 \text{ ml} - 0,2 \text{ ml}) \times 0,05 \text{ mol/l} \times 282 \text{ g/mol} \times 100 \%}{0,13 \text{ g} \times 1000 \text{ (ml/l)}} = 7,12 \%$$

	Vekt av prøve (gram)	Titrert NaOH (ml)	% FFA	Gjennomsnitt (%)	Beregnet syreverdi (mg KOH/g)
1. Lofottran	1	0,34	0,07	0,1 ± 0,01	0,2
2. Lofottran	0,95	0,34	0,07		
3. Lofottran	0,99	0,35	0,09		
1. Omega-3 trippel	0,35	0,33	0,16	0,1 ± 0,02	0,2
2. Omega-3 trippel	0,43	0,33	0,13		
3. Omega-3 trippel	0,39	0,32	0,11		
1. Nordic light	0,27	1,36	5,59	6,4 ± 0,7	12,8
2. Nordic light	0,35	1,84	6,24		
3. Nordic light	0,38	2,31	7,50		
1. Complete krillolje	0,1	1,69	19,74	19,8 ± 0,4	39,6
2. Complete krillolje	0,1	1,69	19,74		
3. Complete krillolje	0,1	1,70	19,88		
1. Blank	0,33			0,3	
2. Blank	0,33				
3. Blank 3	0,27				

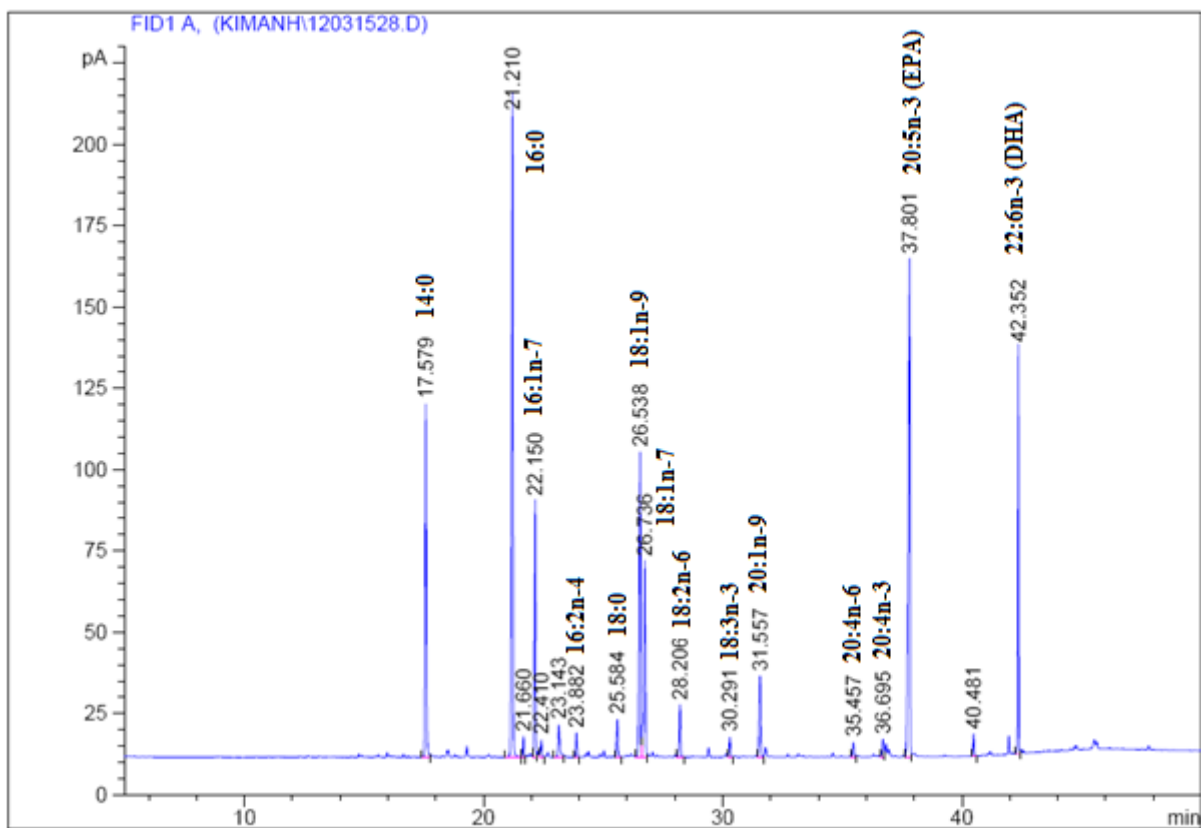
8.2 GC-kromatogram av kommersielle omega-3 produkter



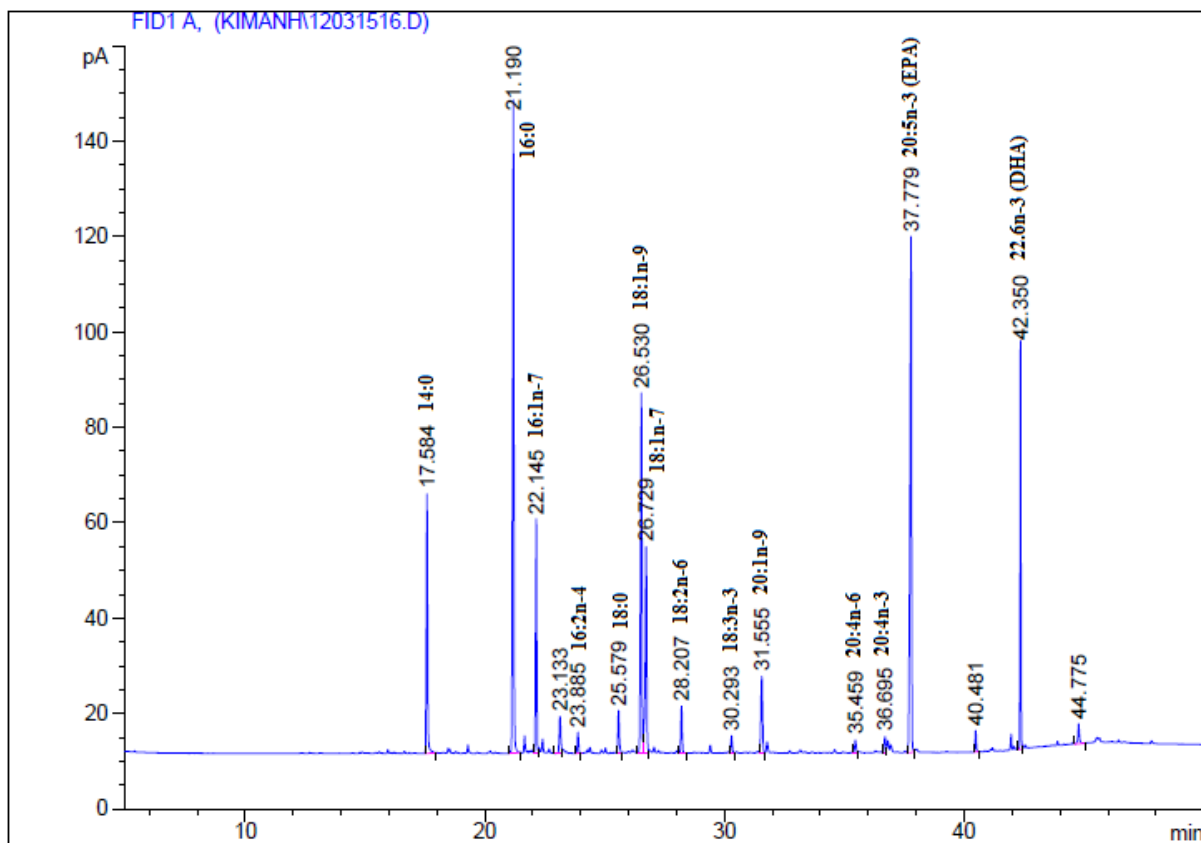
Figur 20: GC-analyse av Complete krillolje



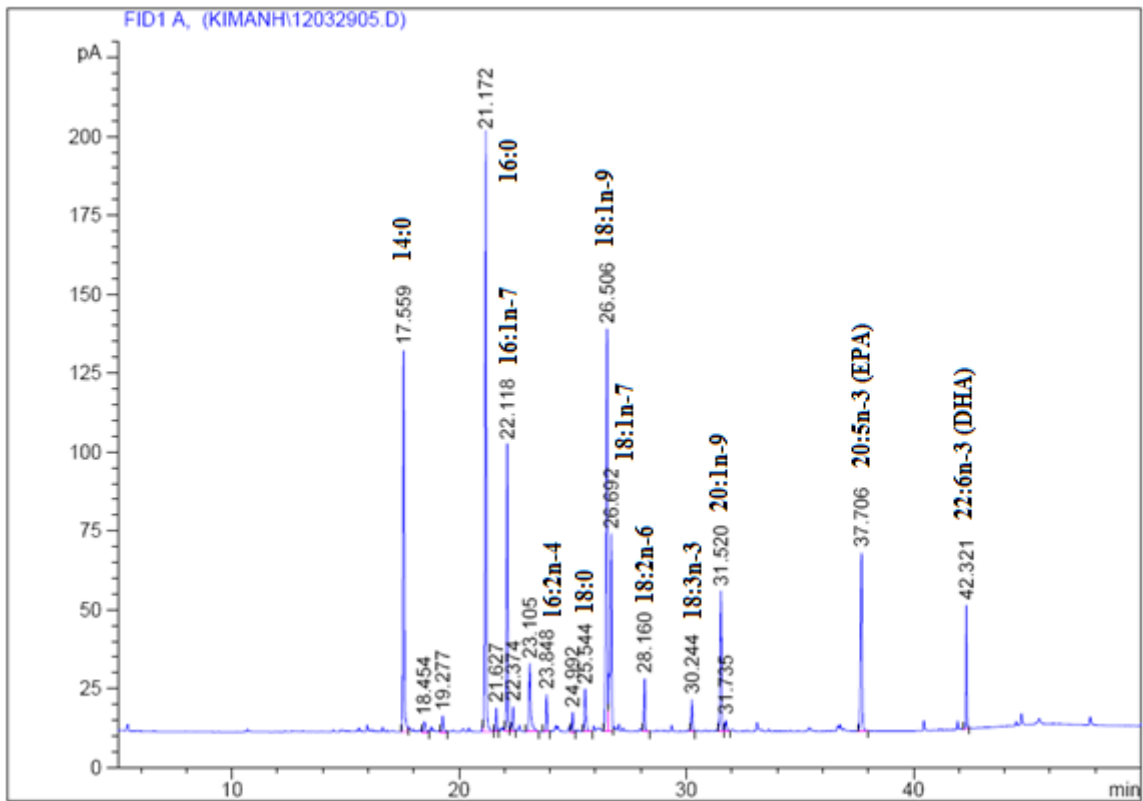
Figur 21: GC-analyse av OmegaRed krillolje



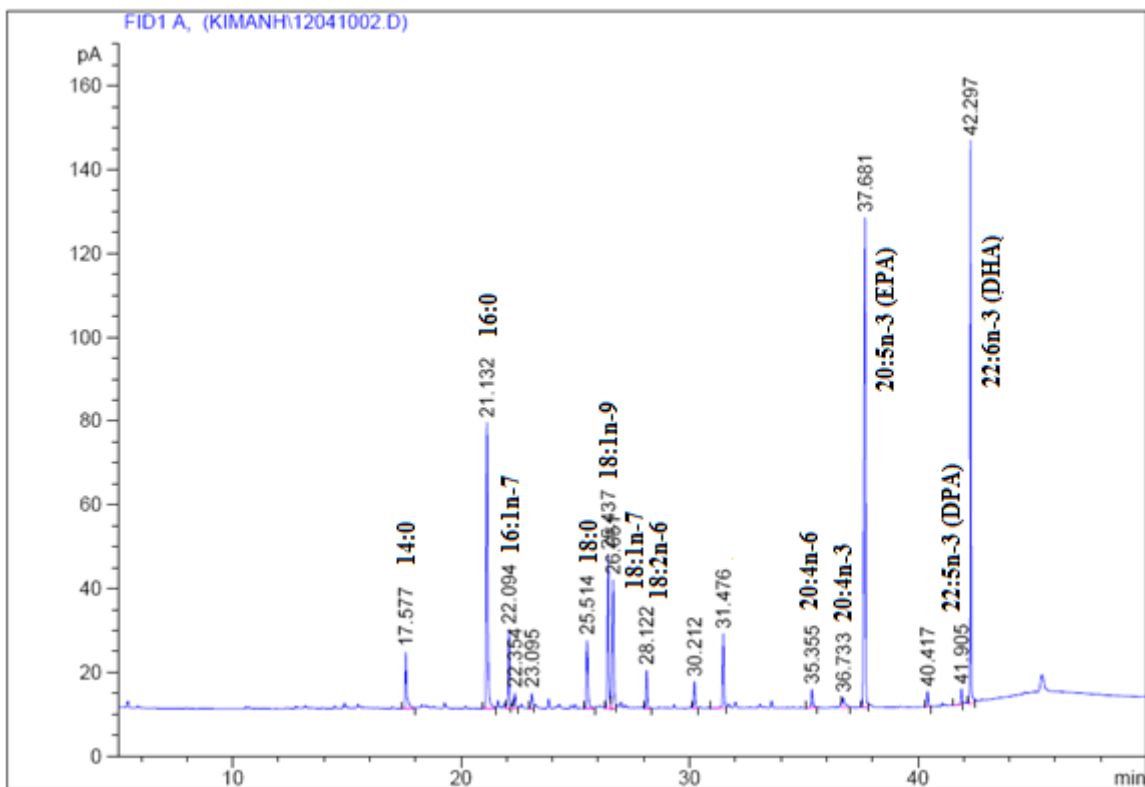
Figur 22: GC-analyse av Superba Ishavskrill



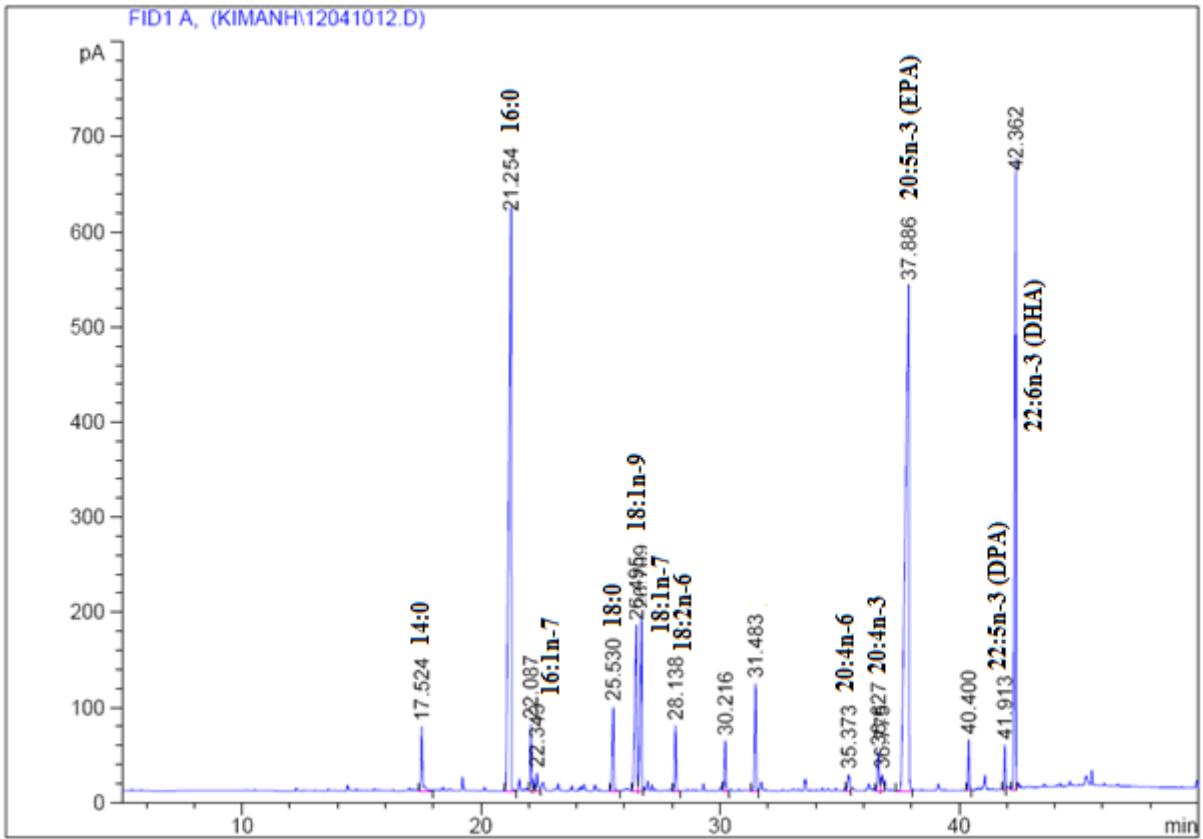
Figur 23: GC-analyse av Life krillolje



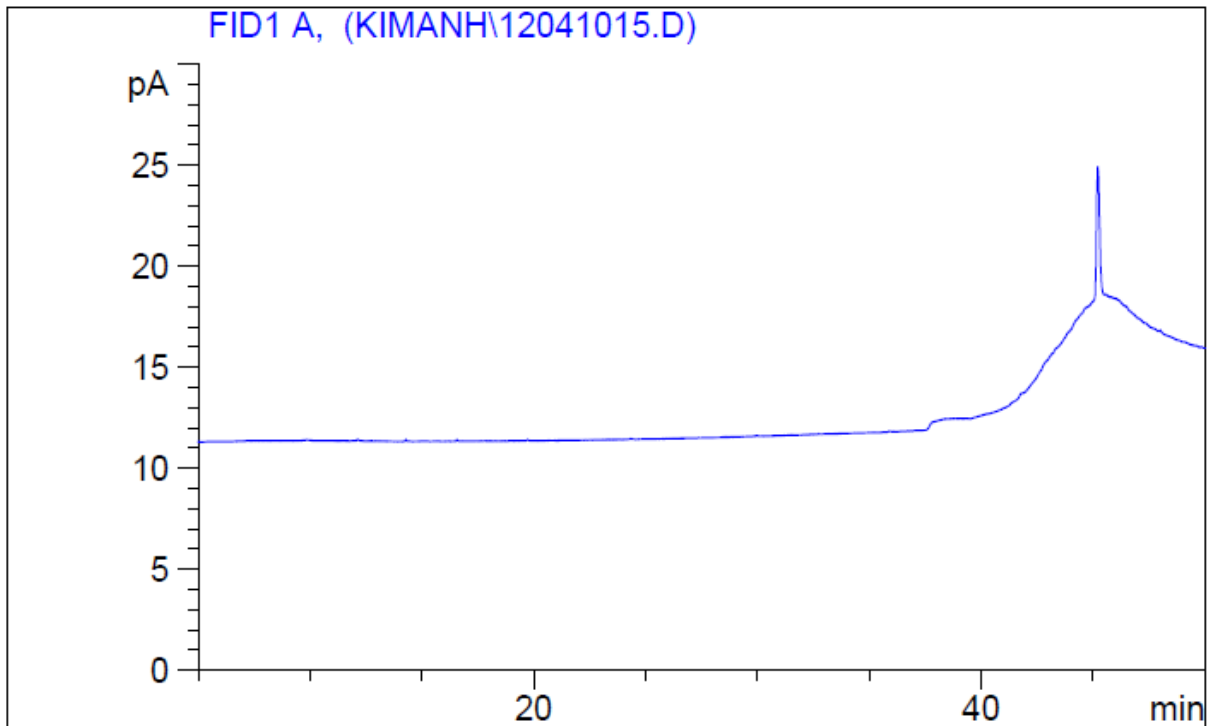
Figur 24: GC-analyse av "nøytrale lipider" (A1 fraksjon) etter første ekstraksjon



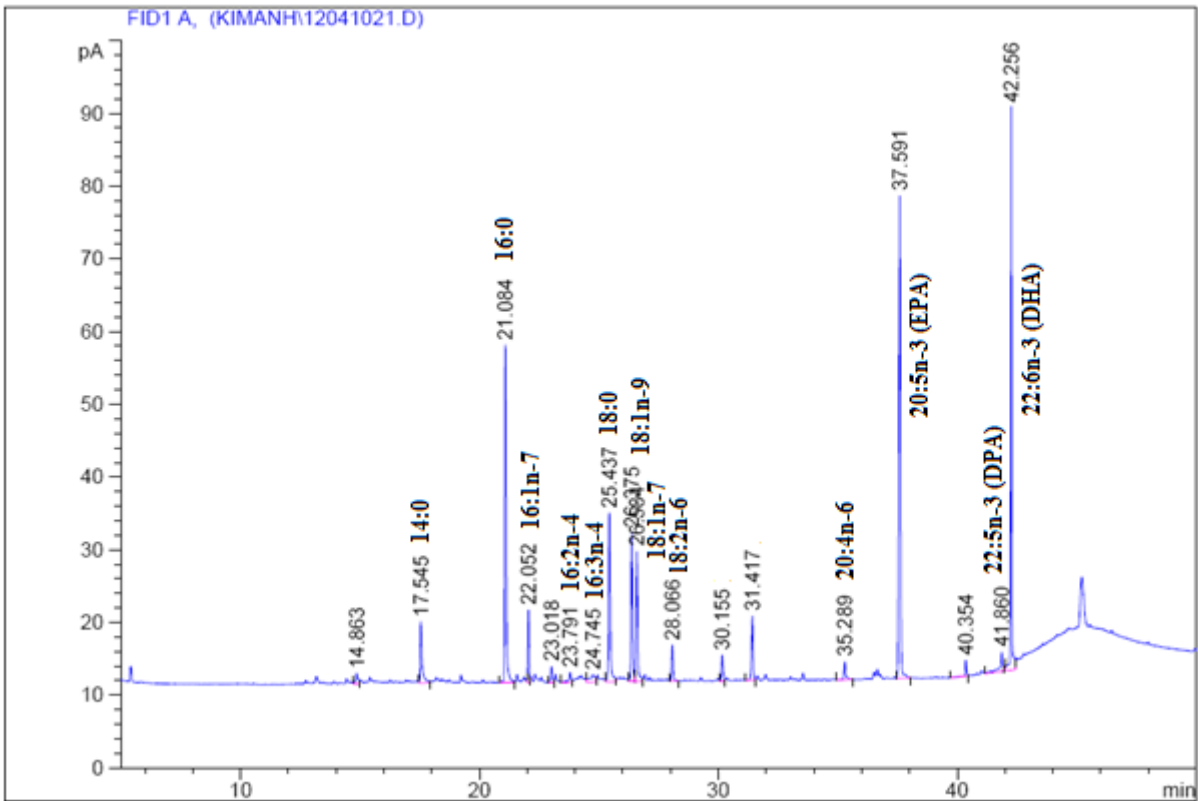
Figur 25: GC-analyse av frie fettsyrer (B1 fraksjon) etter første ekstraksjon



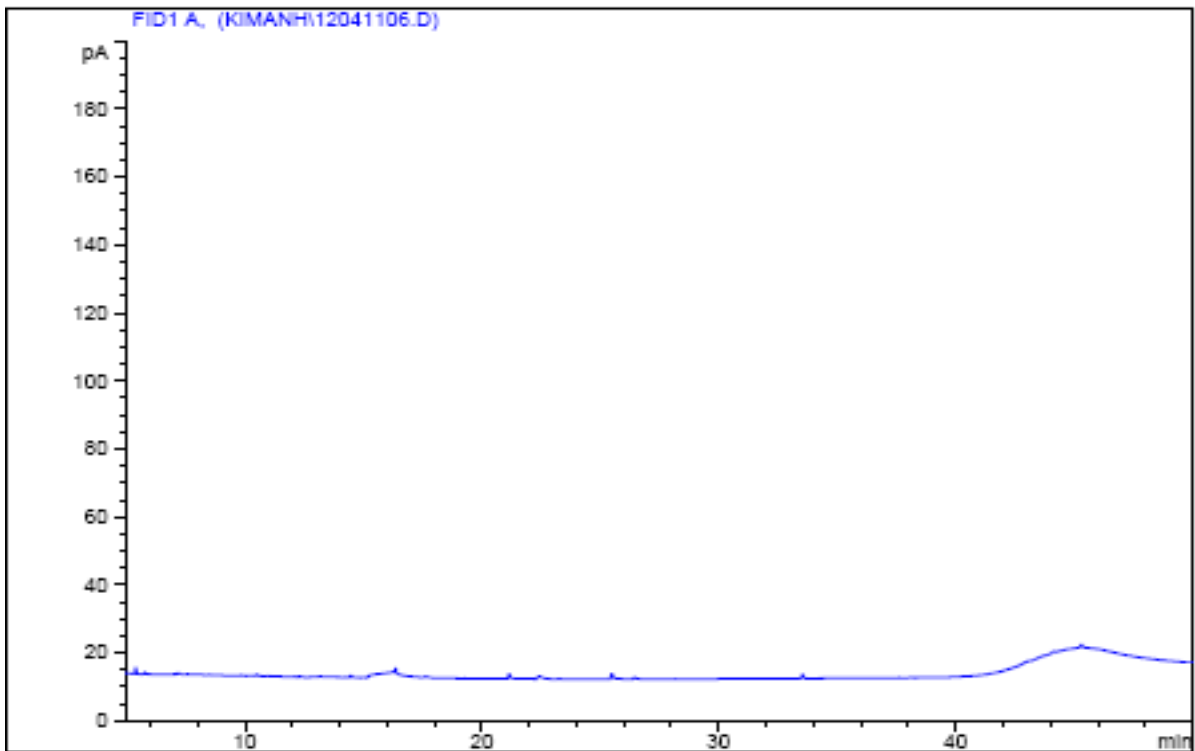
Figur 26: GC-analyse av polare lipider (C1 fraksjon) etter første ekstraksjon



Figur 27: GC-analyse av "nøytrale lipider" (A2 fraksjon) etter reekstraksjon av B1



Figur 28: GC-analyse av frie fettsyrer (B2) etter reekstraksjon av B1.



Figur 29: GC-analyse av polare lipider (C2 fraksjon) etter reekstraksjon av B1.