



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Bacheloroppgave

MB301612 Bacheloroppgave

Optimalisering av metode for bestemmelse av fettsyrer i blodplasma ved hjelp av gasskromatografi.

Kandidatnummer: 10010 og 10014

Totalt antall sider inkludert forsiden: 57

Innlevert Ålesund, 5.juni 2017

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none">• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å betrakte som fusk og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 22,5

Veileder: Kristine Kvangarsnes

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13/Fvl. §13](#))

Dato: 03.06.2017.

Antall ord: 10703

Forord

Arbeidet med dette prosjektet har foregått ved NTNU Ålesund fra februar til juni 2017. Den praktiske delen av oppgaven ble utført i perioden 15.februar til 25.april. Oppgaven tar i hovedsak for seg optimalisering av metode. Prosjektet er finansiert av Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet ved Campus Ålesund. En stor takk rettes til Kristine Kvangarsnes, PhD-stipendiat ved NTNU, for god veiledning og tett oppfølging underveis.

Ålesund, juni 2017

Sammendrag

Målet med denne oppgaven har vært å optimalisere en metode for å kunne bestemme fettsyrer i blodplasma ved hjelp av gasskromatografi. Fettsyrene ble omdannet til fettsyremetylestere før separering og kvantifisering på gasskromatograf. I forsøkene er det brukt blodplasma fra to individer. I prosjektet er det benyttet HCl-katalysert metylering, og oppgaven har hovedsakelig tatt for seg optimalisering av denne metoden. Optimalisering ble gjort ved ulike tilnærminger i form av mengde katalysator, tid og temperatur i varmebad. Holdbarhet på blodprøver og ferdig opparbeidede prøver ble testet ved ulike lagrings og fryseforsøk. Resultatene viser at metoden hvor det ble benyttet 2 ml HCl/metanol som katalysator ga størst utbytte av fettsyrer. Tiden i varmebad (1,5 time) var 90 °C. Ved lagring av opparbeidede prøver ser man også at sammensetningen av fettsyrer er mer stabil ved bruk av 2 ml HCl/metanol. Blodprøvene ser ikke ut til å ta skade ved en fryse- og tineprosess, mens dobbeltfrysing påvirker fettsyresammensetningen i form av nedbryting.

Terminologi

ALA	α -Linolensyre (18:3n-3)
ARA/AA	Arakidonsyre (20:4n-6)
BF ₃	Boron trifluoride
DHA	Dokosaheksaensyre (22:6n-3)
DPA	Dokosapentaensyre (22:5n-3)
EPA	Eikosapentaensyre (20:5n-3)
FA	Fatty Acid (Fettsyre)
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (Fettsyre metyl ester)
F _{CEA}	Konversjonsfaktor
FFA	Free Fatty Acid (Fri fettsyr)
GC	Gas Chromatography (Gasskromatografi)
GC-FID	GC- Flammeioniseringsdetektor
HCl	Hydrogen Chloride (Saltsyre)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoprotein med høy tetthet)
IS	Intern Standard
KCl	Kaliumklorid
LA	Linolensyre (18:2n-6)
LC-PUFA	Long Chained Poly Unsaturatet Fatty Acid (Langkjedede flerumettede fettsyre)
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein med lav tetthet)
MeOH	Methanol (Metanol)
NaOH	Natriumhydroksid
n-3	Omega-3 (ω 3)
n-6	Omega-6 (ω 6)
PEG	Polyethylene Glycol (Polyetylen glykol)
PL	Phospho Lipid (Fosfolipid)
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid (Flerumettet fettsyre)
RPM	Rounds Per Minute (Omdreiningstall)
RSD	Relative Standard Deviation (Relativt standardavvik)
TAG	Triacylglycerol
TG	Triglyserid
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Lipoprotein med svært lav tetthet)

Innhold

Forord	4
Sammendrag	5
Terminologi	6
1. Innledning	9
1.1. Hensikt/Mål.....	9
1.2. Valg av metode og gjennomføring	9
1.3. Oppgavens oppbygning	10
1.4. Avgrensninger for oppgaven.....	11
2. Teori	12
2.1. Lipider.....	12
2.1.2. Fettsyrer	12
2.1.3. Triacylglyceroler, fosfolipider og lipoproteiner	14
2.2. Blod.....	14
2.2.1. Blodprøver	15
2.2.2. Fettsyrekomposisjon i blod.....	16
2.2.3. Hydrolyse og metylering av fettsyrer	19
2.3. Gasskromatografi.....	20
2.3.1. Injektor.....	21
2.3.2. Kolonnen og separasjonsprinsipp	21
2.3.3. Flammeionisasjonsdetektor.....	22
2.4. Kromatogram	23
2.5. Validering av metoder.....	24
3. Material og metode	26
3.1. Prøveinnsamling	26
3.2. Prøveopparbeiding	26
3.3. Hovedmetodene benyttet i prosjektet.....	27
3.3.1. Metode 1) HCl/MeOH	28
3.3.2. Metode 2) NaOH + BF ₃	28
3.3.3. Variasjoner i metoden	29
3.3.4. Andre metoder benyttet i prosjektet.....	30
3.4. GC apparat og temperaturprogram benyttet/Instrument	30
3.5. Kalkulasjoner og statistiske beregninger	31
4. Resultater	33
4.1. Validering av instrument, repeterbarhet	33
4.2. Variasjoner i metode 1, mengde katalysator og tid.....	33
4.3. Temperatur	36
4.4. Lagring av blod	36
4.5. Lagring av vialer/ferdig opparbeidet prøve	37
4.6. Sammenligning av HCl metode og BF ₃ metode	40
5. Diskusjon	41
5.1. Metodeoptimalisering	42
5.2. Metode Instrument	45
5.2 utfordringer i prosjektet	49
6. Konklusjon	50
7. Videre arbeid	50
8. Referanser	51
9. Vedlegg	54
9.1. Regneark med rådata.....	54

9.2 Blankt regneark for rådata	54
9.3 Oversikt over forsøk	54
9.4 Datablader	55

1. Innledning

1.1. Hensikt/Mål

Gasskromatografi er et instrument som er mye brukt innen analytisk kjemi, det har høy reproduserbarhet og kan benyttes i deteksjon og analyse av en rekke substanser. Eksempler kan være pesticider i matvarer, medikamenter i blod og urin, fettsyre-sammensetninger i mat eller blod, med mer. Optimalisering før implementering av en metode er nødvendig for å komme frem til den varianten som gir høyest grad av reliabilitet. Målet med denne oppgaven har vært å optimalisere en metode for å kunne bestemme fettsyrer i blodplasma ved hjelp av gasskromatografi. For å kunne bestemme mengder av de ulike fettsyrene har vi benyttet oss av internstandard, og vi har utarbeidet et regneark for enkel beregning av de ulike fettsyrenes respektive mengder.

Vi ser for oss at en fordypning innenfor et så sentralt område innen analytisk laboratorieteknikk kan komme godt med i framtidig arbeid. En annen grunn for valget av denne oppgaven er den økende interessen for studier på metabolske produkter, omsetningen av disse og innvirkninger relatert til sykdom og helse. Det er kjent at fettsyresammensetningen i blod kan være et bilde på et individs helsetilstand. Målinger av fettsyresammensetning i blod kan benyttes for å undersøke effekten av ulike typer livsstilsendringer, noe som er et svært spennende og ikke minst dagsaktuelt med tanke på den økende graden av livsstilsrelaterte sykdommer.

1.2. Valg av metode og gjennomføring

Det finnes en rekke metoder for å ekstrahere lipider fra biologisk materiale (1). I prosjektet baserte vi oss på to metoder som bruker syre som katalysator for metyleringsreaksjonene. Dette fordi syrekatalysatorer har evne til å metylere frie fettsyrer og fordi syrererterte metoder egner seg bedre for prøver som inneholder vann, noe blodplasmaet har mye av (2). Metodene som ble benyttet er metylering med HCl/metanol og metylering med Boron trifluoride/metanol (AOCS-metode som benyttes for fettsyrer i olje). Begge ble utført med ulike tilnærminger i forhold til mengde katalysator, temperatur

og tid. Grunnen til at det ble valgt å fokusere på disse metodene er at HCl-metylering og AOCS-metoden er blant de mest benyttede for direkte metylering av fettsyrer til FAME. Det er gjennomført mye forskning på fettsyreanalyse av ulikt biologisk materiale med utgangspunkt i metodene. Siden vi hadde et ønske om å komme frem til en effektiv, men samtidig tids- arbeids- og kostnadsbesparende metode, falt valget naturlig på disse. En stor del av grunnen til at det ble valgt *to* hovedmetoder og ikke *en*, er at det var et behov for en referanse å validere resultatene opp mot.

Fra hver prøve ble det utført parallelle analyser for å øke reliabiliteten på resultatet. Ved å se på de ulike parallellene kan man vurdere om metoden det blir testet for gir pålitelige svar. Ved å benytte seg av paralleller reduserer man faren for at feil ved apparatet fører til feilaktige resultater i den endelige vurderingen. Sammenligning av prøveresultater fra samme blod, men utført med ulike prosedyrer, kan gi et innblikk i eventuelle justeringer som trenger å bli gjort på faktorer i framgangsmåten. Nevnte faktorer kan være mengde kjemiske komponenter, temperatur, mengde av blodplasma, prøvens ferskhet og oppbevaringsforhold. De kromatografiske profilene fra prøvene ble sammenlignet med kromatogram fra USP FAME mixture, som inneholder kjente mengder av 25 ulike fettsyremetylestere (3).

1.3. Oppgavens oppbygning

Kapittel 1 viser til hensikt/mål med prosjektet samt valg av metode, opparbeiding og avgrensing. Kapittel 2 starter med å ta for seg relevant teori om lipider, blod og blodets fettsyresammensetning. De kjemiske reaksjonene i metodene og prinsippene for gasskromatografisk analyse blir forklart. Videre i kapittel 3 forklares metodene og de matematiske beregningene som blir benyttet i regnearket for beregning av mengde og %vis fordeling av fettsyrene. I kapittel 4 presenteres resultatene. Kapittel 5 tar for seg diskusjon rundt tallenes betydning, hvor resultatene fra de ulike metodene og variasjonene gjort innad i de ulike metodene vurderes. utfordringer i prosjektet er omtalt i kapittel 6. Konklusjonen i kapittel 7 sammenfatter funnene fra prosjektet og det blir nevnt noen forslag til videre arbeid.

1.4. Avgrensninger for oppgaven

Tiden vi hadde til rådighet i prosjektet var 5 måneder, hvorav tiden til praktisk gjennomføring på laboratoriet var kortere. Dette begrenset naturligvis antallet analyser som ble gjennomført og dermed også vurderingsgrunnlaget i form av data. Blod vil endre seg som følge av f.eks. hva man spiser, og dermed vil det kunne være variasjoner fra dag til dag, selv med blod fra en og samme person. I tillegg inneholder blod lave konsentrasjoner av plasma. En av utfordringene i prosjektet har vært at vi ikke har hatt mulighet til å kunne analysere blod med lik sammensetning gjennom prosjektperioden, og vi har i hovedsak valgt å utføre analysene våre på blod tappet samme dag. Dette har gitt begrensninger i form av antall/ulike metodevarianter man kan gjennomføre per dag. En kort tidsramme og budsjett gjorde at det ikke ble sendt prøver til eksterne analyser. Fordi de ulike metodene som skal sammenlignes må være utført på samme blodprøve, gir det følgelig en begrensning i vurderingsgrunnlaget at kun et fåtall prøver er opparbeidet.

2. Teori

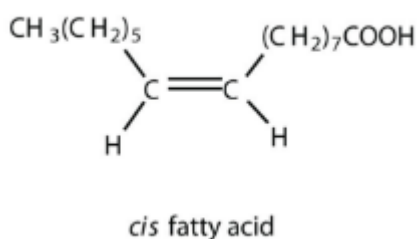
2.1. Lipider

Lipider er en samlebetegnelse for en bred gruppe biomolekyler med stor funksjonsvariasjon. De kan lagres i vev og fungere som opplagsnæring. I celler fungerer flere ulike typer lipider som strukturelle komponenter i membraner. Noen lipider er pigmenter, et eksempel er melanin i huden. Andre er vitaminer, eksempelvis vitamin-A som er svært viktig for blant annet syn og fosterutvikling. En tredje kategori er lipider med signalfunksjoner (4). På grunn av den store diversiteten i både fysisk utforming og kjemisk funksjon er det vanlig å dele lipidene i underklassene: fettsyrer, voksesterer, fosfolipider, sphingolipider og isoprenoider. I blodet finner vi lipidklassene triacylglyseroler, fosfolipider og lipoproteiner. Noen fettsyrer sirkulerer også fritt i blodbanen (5).

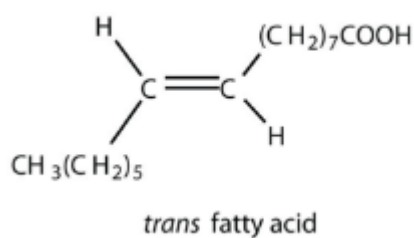
2.1.2. Fettsyrer

En fettsyre er en monokarboksylyse. Den består av en karbonkjede av varierende lengde, med en karboksylgruppe (COOH) kovalent bundet til den ene enden og en metylgruppe i den andre (figur nr. 2.1.2.3).

Mettede fettsyrer har ingen dobbeltbindinger i kjeden, mens en umettet fettsyre har en eller flere. En umettet fettsyre har derfor færre hydrogenatomer i molekylet enn en mettet fettsyre med likt antall karbonatomer. Umettede fettsyrer har enten cis eller trans konfigurasjon. Strukturen avstivet i senteret av en dobbeltbinding som hindrer rotasjon rundt dobbeltbindingen. Det som skiller cis- og transfettsyrer fra hverandre er at hydrogenatomene ved cisform er festet på samme side av dobbeltbindingen (figur nr. 2.1.2.1.), mens en struktur av transform er festet på hver sin side (figur nr. 2.1.2.2.). Naturlig forekommende fettsyrer har vanligvis cis-konfigurasjon.



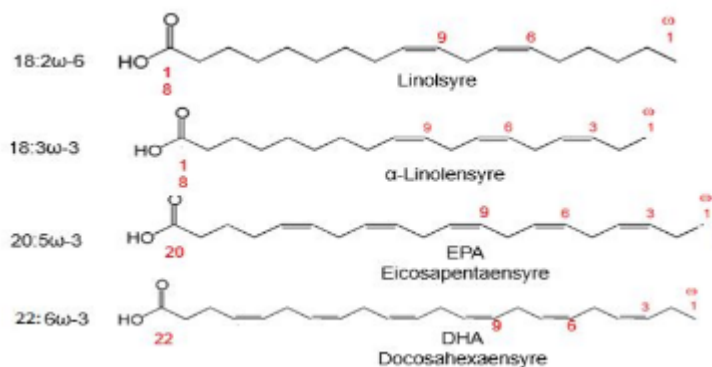
Figur nr. 2.1.2.1. Cis fettsyre, her er R-gruppene plassert på samme side (6).



Figur nr. 2.1.2.2. Transfettsyre, her er R-gruppene er plassert i et diagonalt plan, på hver side av dobbeltbindingen (6)

PUFA er en forkortelse for Polyunsaturated Fatty Acids, eller flerumettede fettsyrer. Det er fettsyrer med 2 eller flere dobbeltbindinger. Karbonene i kjeden nummereres fra karboksylenden. $\omega 3$ (omega 3) og $\omega 6$ (omega 6) er eksempler på flerumettede fettsyrer: α -linolensyre (forkortet ALA) har første dobbeltbinding på det tredje karbonatomet i kjeden fra metylenenden og er derfor en $\omega 3$ fettsyre. α -linolsyre (forkortet LA) har første dobbeltbinding på det sjette karbonatomet i kjeden fra metylenenden og er en $\omega 6$ fettsyre. $\omega 3$ og $\omega 6$ -fettsyrer finnes i kilder fra plante- og dyreriket. Linolsyre og alfa-linolensyre er to essensielle fettsyrer som kroppen trenger å få tilført gjennom kosten. De har viktige fysiologiske egenskaper ettersom de er nødvendige for normal vekst og utvikling. De inngår i cellemembraner og omdannes i kroppen til eikosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA). EPA og DHA er lange flerumettede omega-3 fettsyrer som blant annet finnes i fiskeoljer. De utgjør forstadier for eikosanoidene som spiller en sentral rolle som signalmolekyler på en rekke forskjellige celletyper.

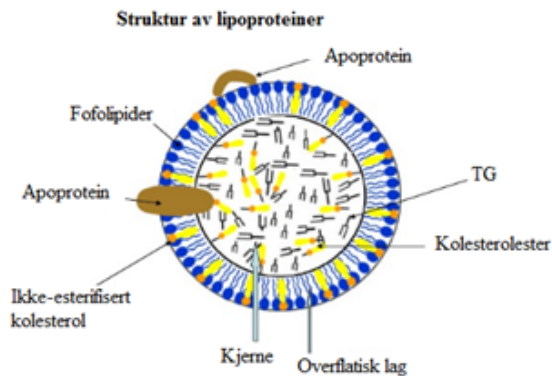
Figur 2.1.2.3 viser oppbyggingen av de umettede fettsyrene som omtales i dette avsnittet og deres posisjon av dobbeltbindinger.



Figur nr. 2.1.2.3. Omega-6 og omega-3 fettsyrer (7).

2.1.3. Triacylglyceroler, fosfolipider og lipoproteiner

Triacylglyceroler (TG) er sammensatt av glycerol esterifisert til tre fettsyrer. Er det kun en fettsyre kalles den monoglyserid, er det to kalles den diglyserid. TG er uten ladning og kalles derfor ofte for nøytralt fett. I adipocytene (de fettlagrende cellene) lagres fett i form av triglyserider. De spiller også en viktig rolle i transport av fettsyrer. Fosfolipider er amfipatiske molekyler. De har en polar gruppe av fosfat og to hydrofobe hydrokarbonkjeder fra fettsyrer. De spiller en viktig rolle i cellestrukturen siden de utgjør en stor bestanddel i membraner. Lipoproteiner er komplekser av fett og proteiner (figur nr. 2.1.3.1). I sentrum av et lipoprotein kan man finne triglyseridene, på overflaten fosfolipidene, mens kolesterol finnes både i sentrum og på overflaten. Lipoproteiner varierer i molekylstørrelse, proteinstruktur, fettsammensetning og densitet (8).



Figur nr. 2.1.3.1 – Lipoproteiner (9)

2.2. Blod

I et voksent menneske sirkulerer det omtrent 5 liter blod. Det er vanlig å dele blodet inn i to hovedgrupper, blodplasma (ca. 55%) og blodlegemer (ca. 45%). Blodplasma utgjør den vannløselige delen og består av vann, proteiner, sukker, fettstoffer og salter (elektrolytter). Siden vannet i blodplasmaet fungerer som et løsemiddel vil det også transportere med seg andre stoffer som næringsmidler, vitaminer, enzymer og avfallsprodukter. Fettstoffer er hydrofobe, så de er avhengige av å fraktes rundt i lipoproteiner (4).

Man kan separere blodceller fra plasma ved å sentrifugere blodprøven. Grunnet ulik vekt på de forskjellige komponentene i blodet vil det oppstå tydelige lagskiller (se figur nr.

2.2.1). Blodplasma er den gulaktige øverste fasen etter sentrifugering, den består av omlag 92% vann, 7% lipoproteiner og 1% organiske og uorganiske vannløselige substanser. I laget under finner vi de mononukleære cellene (monocytter og lymfocytter) og disse kan ses som et tynt, grått lag. Helt i bunnen av prøveglasset samles røde blodceller og granulocytter fordi de har størst massetetthet og følgelig vil synke til bunnen (10).



Figur nr. 2.2.1 viser sjiktene som dannes ved sentrifugering av en blodprøve (11).

2.2.1. Blodprøver

Ideelt sett bør blodprøvetaking skje fastende. Forklaringen ligger i opptaket og omsetningen av næringsstoffer. Fettrik næring vil gi økt lipidinnhold i blodet. Likeledes vil fettfattig næring gi betydelig lavere lipidinnhold. Derfor er det ønskelig å utføre en blodprøvetaking fastende for å eliminere faktorer som kan påvirke resultatet og gi et galt blodbilde. Det er også anbefalt å ikke drive med fysisk tung aktivitet 12 timer i forveien (8). Konsentrasjonen av fettsyrer i en prøve kan endres, f.eks. under påvirkning av temperatursvingninger og naturlig degradering over tid. Stabilitet er viktig, spesielt ved oppbevaring av prøvemateriale under definerte betingelser. En prøve bør beholde den opprinnelige verdien av en målt mengde, for en gitt tidsperiode. I følge Guder et.al. (2001) (12) kan både usentrifugert og sentrifugert blodprøve i gel-rør oppbevares ved 4-25°C i inntil 7 dager, uten at det påvirker prøvens stabilitet. Metabolitter i plasma er funnet å holde seg stabile i opptil 7 dager ved -20 °C, mens det for lengre lagring er anbefalt -80°C. Når det kommer til frysing og tining er det ikke anbefalt mer enn 3 fryse/tine-sykluser (12-14).

2.2.2. Fettsyrekomposisjon i blod

Plasma og røde blodlegemer benyttes ofte til å vurdere sirkulerende nivåer av fettsyrer. Studier viser at målinger av FA-nivå i erythrocytter reflekterer inntaket de siste månedene, FA-nivå i plasma stammer fra inntak de siste ukene, mens fettsyrekomposisjonen i fettvev reflekterer kosthold over flere år (15).

Fettsyrekomposisjon i blodet vil variere fra et individ til et annet som følge av faktorer som kjønn, alder, arv, kosthold, fysisk aktivitet og andre livsstilsfaktorer (8). Lipolyse (nedbrytning av fett) og endogen lipogenese (lagring av fett) skjer vekselvis, reguleres etter kroppens fysiologiske behov og vil virke inn på blodets sammensetning.

I en artikkel av Patricia Aspichueta (2015), vises det til en studie som observerte ulikheter i plasmakonsentrasjon av enkelte fettsyrer mellom kjønn. Deltakerne i undersøkelsen var en etnisk variert gruppe av friske kanadiske menn og kvinner. Det fremkommer at den mannlige gruppen har betydelig høyere andel av γ -linolensyre (GLA), og n-3 DHA og lavere konsentrasjon av palmitolsyre, LA og DHA enn den kvinnelige gruppen. Ved sammenligning med andre studier fremkommer det også at geografisk tilhørighet har mye å si for den gjennomsnittlige konsentrasjonen av enkelte fettsyrer (16).

Flere studier er gjort på hvordan fettsyresammensetningen i kosten påvirker nivåer av spesifikke fettsyrer i plasma. En studie av Susan K. Raatz et al. (2001) (17) tar for seg hvordan fettsyrekomposisjonen i plasma er et bilde på det totale fettinntaket gjennom kostholdet. De fleste studier av kostholdets sammenheng med lipidnivå i blod fokuserer på fettsyresammensetningen i prøvedeltakernes kosthold fremfor deres totale fettinntak. Studiet har sammenlignet effekten av en fettfattig diett mot fettrik diett med hensyn på effekten på fettsyreinhold i de ulike lipidkomponentene i plasma. Fettrik diett ga stor økning i nivåene av de flerumettede fettsyrene n-6 og 18:2 n6 nivåer i PP og CE, med en lavere prosentvis mengde mettede fettsyrer. Fettfattig diett ble koblet til høyere mengder n-3 fettsyrer, 20:5n3 og 22:6n3 i PP og CE. Fettfattig diett påvirker fettsyremønsteret ved at det i større grad er n-3 fettsyrene som benyttes i fettsyresyntesen, noe som trolig skyldes mindre konkurranse om enzymene på grunn av redusert inntak av 18:2 n6.

Det er en nær sammenheng mellom fettsyreinholdet i plasma fosfolipider og fettsyreinholdet i membranfosfolipider i røde blodceller og trombocytter. Det kan derfor tenkes at fettsyreinhold i plasmafosfolipider kan benyttes som mål på flere typer celler

membranlipider (18). Om dette er tilfelle vil fettsyreanalyse av blodplasma bidra til effektivisering av analyse på fettsyrer i blod, gjennom tids- og kostnadsreduksjon.

En studie undersøkte risiko for utvikling av diabetes gjennom måling av fettsyrenivåer i plasma og i erythrocytter versus tradisjonelle kostholdsundersøkelser. Den konkluderte med at det er en klarere sammenheng mellom fettsyrenivåer i plasma og diabetesforekomst enn det man oppnår gjennom de to andre metodene (19).

De fettsyrene det finnes mest av i blod er presentert nedenfor (20, 21).

C16:0

Palmitinsyre er en mettet fettsyre. Den finnes i fett og voks, olivenolje, palmeolje og kroppslipider. Fettsyrer som stammer fra fettceller (adipocyt), og er enten bundet til serumalbumin eller forblir uesterifisert i blodet. Øker serum-kolesterol (LDL). Nivåer av palmitinsyre er forbundet med iskemisk slag og insulinresistens.

C16:1

Palmitoelinsyre, en enumettet $\omega-7$ fettsyre. Fettsyren finnes i forskjellige dyre- og plantefett. Fettsyrer fra fettceller, er enten bundet til serumalbumin eller forblir uesterifisert i blodet.

C18:0

Stearinsyre mettet fettsyre. Finnes i mange animalske og vegetabiliske fettstoffer, og oljer. Ofte benyttet i fremstillingen av oleater og hudkremer, og som et farmasøytisk løsningsmiddel. Fettsyrer fra depotfettceller, er enten bundet til serumalbumin eller forblir uesterifisert i blodet.

C18:1n9

Oljesyre, en enumettet $\omega-9$ fettsyre. Fettsyren finnes i lipider i cellemembraner. Har en kolesterolsenkende effekt, siden LDL minker og HDL øker. Oljesyre transporteres primært via lymfesystemet.

C18:1n7

Cis-vaccenic acid, en enumettet $\omega-7$ fettsyre. Fettsyren finnes i små mengder i alle lipidklasser, med andre ord er den også tilstede i liten grad i alle kroppens vev.

C18:2n6

Linolsyre, en flerumettet $\omega-6$ fettsyre. En essensiell fettsyre med flere viktige funksjoner. Den er strukturell komponent i cellemembraner, omdannes til prostaglandiner og

eikosanoider, og forløper til andre ω -3 og ω -6 fettsyrer. Senker LDL-kolesterolet, og gir svak økning i HDL. Trombosehemmende egenskaper.

C18:3n3

Alfa-Linolensyre, er en flerumettet ω -3 fettsyre, som kommer fra planter. Den essensielle fettsyren har flere viktige funksjoner; fungerer som strukturell komponent i cellemembraner, være forløper til andre ω -3 og ω -6 fettsyrer og omdannes til prostaglandiner og eikosanoider. VLDL og LDL senkes samtidig som HDL økes.

C20:4n6

Arakidonsyre, en ω -6 flerumettet fettsyre. Finnes i for eksempel peanøtter og rapsolje. Har viktig funksjon i pattedyr hvor det inngår i membraner, er utgangsmateriale for prostaglandiner og som sekundært signalstoff. Regulerer blant annet blodtrykk, koagulering, og immunreaksjoner.

C20:5n3

EPA (eicosapentaensyre) er en ω -3 flerumettet fettsyre. Senker triglyserid-nivået i blodet. Det er også hevdet at et høyt omega-3 inntak fører til lavere blodplateaggregering og senket blodtrykk.

Ved inntak av store doser vil EPA senke VLDL og HDL, mens LDL øker dersom LDL er høyt i utgangspunktet.

C22:5n3

Docosapentaensyre (DPA). Finnes i fet fisk, lever av hvit fisk, selolje og alger.

C24:0

Lignosersyre, en mettet fettsyre.. Den forekommer naturlig i treets tjære, og finnes i liten grad i de fleste naturlige fettstoffer.

C22:6n3

DHA (Docosahexenoic) er en ω -3 flerumettet fettsyre. Finnes i feit fisk, lever av hvit fisk. I store doser vil DHA senke VLDL og HDL, mens LDL øker dersom LDL er høyt i utgangspunktet.

C24:1

Nevronsyre er en umettet fettsyre som har stor betydning for nervesystemet. Viktig i biosyntese av glycosphingolipider og gangliosider, blant annet for å hindre apoptose (celledød) (22).

2.2.3. Hydrolyse og metylering av fettsyrer

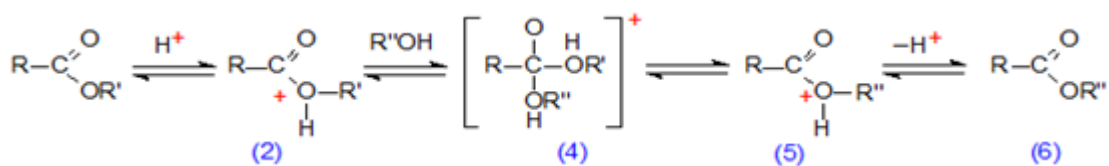
For at fettsyrer skal kunne separeres og detekteres, er det nødvendig at de er flyktige.

Dette blir gjort ved å frigjøre fettsyrene fra molekyler de er bundet i, og omdanne dem til metylestere. Dette kan gjøres ved bruk av base- og/eller syrekatalysatorer (23).

Metylering

Metylering vil si å få overført en metylgruppe fra en kjemisk forbindelse til en annen.

Før fettsyreanalyse med GC må fettsyren frigjøres fra lipidmolekylet (f.eks. TG) og omgjøres til dens korresponderende fettsyremetylester (FAME). Dette gjøres ved bruk av syre- eller basekatalysatorer. Metylgruppen av metanol erstattes med en glyserolgruppe fra et esterband (se figur nr. 2.2.3.1). Syrekatalysatorer har evnen til å metylere frie fettsyrer som basekatalysatoren ikke kan. Fordelen med basekatalyserte reaksjoner er at de ofte er både enklere og raskere enn syrekatalyserte (24).



Figur nr. 2.2.3.1 Basekatalysert metylering

Syrekatalysert metylering

Esterifisering skjer når alkoholen gir fra seg et hydrogenatom fra OH-gruppen og syren gir fra seg OH fra COOH gruppen. Dette gir H_2O som biprodukt. Det første som skjer er at karboksylsyren protoneres og det blir dannet et oxoniumion (oksygen kation med tre bindinger). Oxoniumionet undergår en utbyttesreaksjon med alkoholen og det dannes et mellomprodukt. Dette mellomproduktet kan tape et proton og bli til en ester. Det er viktig å merke seg at alle trinnene er reversible, men med et stort overskudd av alkohol vil likevektspunktet forskyves så mye mot høyre (se illustrasjon i figur 2.2.3.1) at esterifiseringen blir tilnærmet komplett. Dersom vann er tilstede vil dannelse av mellomprodukt ikke skje i like stor grad som i et vannfritt miljø, fordi vann er en sterkere elektron-donor enn alifatiske alkoholer. Derfor benyttes vannfri $HCl/MeOH$.

Basekatalysert metylering

I den ene metoden (Metode 1) benyttes det NaOH til å transmetylere fettsyrene, det vil si frigjøre de fra molekylet de er bundet til før videre metylering med syre eller basekatalysator og alkohol (2, 25). Transesterifisering er kombinasjonen av en alkohol med en ester. Den organiske gruppen av esteren byttes ut med den organiske gruppen av en alkohol. Det første som skjer er at esteren protoneres, deretter tilføres alkoholgruppen og det dannes et mellomprodukt som kan tape et proton og bli til en ester. Også her vil et overskudd av alkohol gi en tilnærmet fullstendig transesterifisering (26).

Syrekatalysatorer

HCl i metanol er mye brukt som katalysator i metylering av fettsyrer. Det benyttes vannfri HCl fordi tilstedeværelse av vann vil hindre fullføring av reaksjonen. Det er en forholdsvis mild reagent, men den er ustabil og mengde HCl vil synke ved lagring ettersom den reagerer med metanol og danner vann og klorometan. Esterifisering av de ulike lipidene skjer i omtrent samme hastighet, noe som reduserer sannsynligheten for tap av spesifikke fettsyrer. BF_3 er en kraftig syrekatalysator som gir rask metylering. Dersom det benyttes høye konsentrasjoner av BF_3 kan det dannes biprodukter. Det samme er observert ved bruk av gammel BF_3 . For maksimal holdbarhet bør lagring skje kaldt og mørkt. Fordi stoffet er svært skadelig og har begrenset lagringstid foretrekkes ofte andre katalysatorer. Frie fettsyrer esterifiseres i løpet av få minutter, mens lengre tid kreves for de resterende lipidklassene (27). Det er også noen ulemper forbundet med metylering med BF_3 . Dannelse av biprodukter kan forverres ved tilstedeværelse av oksiderte lipider. Det har blitt rapportert om betydelige tap av prøvemateriale i tilfeller der analysen har blitt utført på små prøvevolum (<200 mg.). Biprodukt dannes også ved tilsetning av noen antioksidanter i lipidekstrakter (26).

2.3. Gasskromatografi

Gasskromatografi er en metode som kan brukes for å separere og detektere flyktige komponenter i en prøve. Instrumentet består av en injeksjonsport, kolonne og en detektor. Bæregassen, som har som oppgave å frakte med seg komponentene i prøven, må være inert, og ikke reagere med prøvekomponentene eller stasjonærfasen. De vanligste bæregassene er nitrogen, helium og hydrogen. Bæregassen går inn i injektoren og tar med seg prøvekomponentene gjennom kolonnen til detektoren.

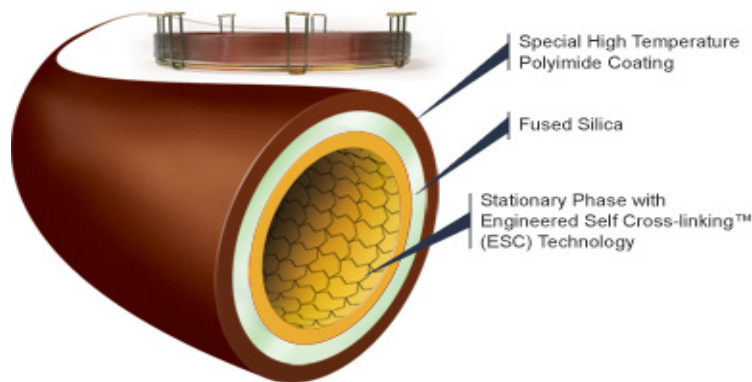
2.3.1. Injektor

Det finnes tre måter å injisere prøvemateriale til en kapillærkolonne. Splitless, direkte på kolonnen og ved split injeksjon. I dette forsøket er det benyttet split injektor, som er den vanligste å bruke med kapillærkolonner. De resulterer i rask injeksjon og smale kromatografiske topper fordi den kan injisere en svært liten mengde av prøven. Ved bruk av split injektor kan man regulere bæregassens flyt og på den måten regulere mengden prøve til kolonnen. Injektoren holder en langt høyere temperatur enn kolonnen fordi komponentene i prøven raskt skal gå over i mobil fase (28).

2.3.2. Kolonnen og separasjonsprinsipp

Kapillærkolonner er de vanligste å bruke ved separasjon av metylestere. Den er sammensatt av tre deler (figur nr. 2.3.2.1). Den midterste delen er av smeltet silika. Den ytterste delen er et dekke av polyimid. Dette dekket gir styrke til kolonnen og hindrer at den bryter. Den danner en vanntett ytre barriere samtidig som den omslutter røret av silika og fyller eventuelle ujevnheter det måtte ha. Den innerste delen er stasjonærfasen, det er denne som har mest å si for separasjonen av prøvestoffer. Stasjonærfasen kan bestå av forskjellige stoffer, to svært vanlige er silikonpolymerer og polyetylenglykol (PEG). PEG gir kolonnen høy polaritet og svært gode separasjonsegenskaper. Problemet med PEG er at den tar skade av oksygen ved lavere oksygenmengder og lavere temperaturnivåer enn mange andre stasjonærphaser (29). Kolonnens polaritet er en av flere faktorer som spiller inn på separasjon av prøvekomponenter. Selv om polariteten ikke er direkte relatert til selektivitet, har den likevel en uttalt påvirkning på sammensatt retensjon og dermed separasjon. Selektivitet bestemmes av de fysiske-kjemiske interaksjonene mellom molekylene i prøven og den stasjonære fasen (30).

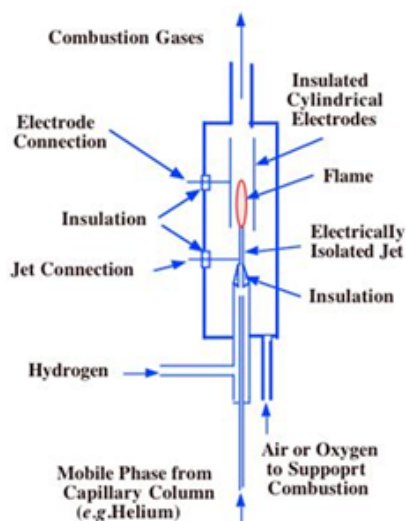
På grunn av stoffenes ulike kjemiske og fysiske egenskaper vil de reise med ulik hastighet gjennom kolonnen. Man kan derfor på bakgrunn av retensjonstiden identifisere de ulike fettsyrene som er til stede i prøven. Kortere FAMES og umettede FAMES er mer flyktige enn de lengre og mettede. Fordi dobbeltbåndet i en umettet fettsyre gir den en grad av polaritet, vil den i en polar kolonne interagere med stasjonærfasen og gjøre at den holdes igjen lengre enn FAMES med samme lengde på karbonkjeden (2, 30).



Figur nr. 2.3.2.1 Illustrasjon av en kapilærkolonne (31)

2.3.3. Flammeionisasjonsdetektor

Flammeionisasjonsdetektor (FID) er en sensitiv detektor som benyttes for deteksjon av hydrokarboner eller organiske substanser som inneholder hydrokarboner (se figur 2.3.3.1). Bæregassen blandes med hydrogen i bunnen av detektoren og blandes deretter med et overskudd av luft. Det skjer en eksoterm reaksjon med hydrogenet og oksygenet og flammen kalles derfor en hydrogenflamme (32). Detektoren er upåvirket av strømningshastighet, ikke-brennbare gasser og vann. Når ioner og frie elektroner dannes i kjernen av flammen, vil de samles av en oppsamlingselektrode over flammen og signalet amplifiseres. Strømmen, som er proporsjonal med mengden av den respektive analytten i prøven, måles av et elektrometer som omgjør signalet til digital form (33).



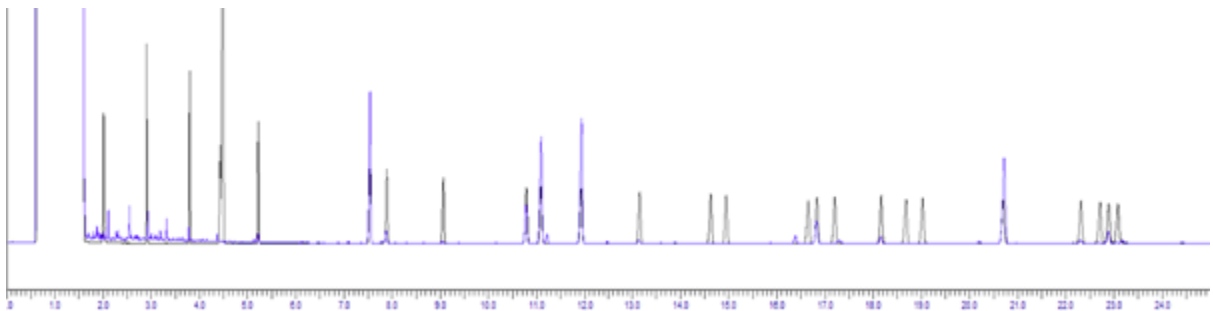
Figur 2.3.3.1 Flammeioniseringsdetektor (34)

Intern standard

Fordi hver injeksjon i maskinen ikke nødvendigvis er helt identiske i volum, benytter man seg av en intern standard (IS). En slik forskjell ville uten IS gitt utslag i form av forskjellig areal av toppene. IS vil eliminere denne eventuelle feilkilden ved at arealet av analyttens topp sammenlignes med arealet fra internstandardens topp. Bruk av kjent mengde IS gjør det mulig å regne ut vekten av den enkelte fettsyre i prøven. Gjennom dette prosjektet ble C23:0 benyttet som IS. Denne fettsyren finnes ikke i blod.

Deteksjon av fettsyrer

Detektoren vil ikke i seg selv gi svar på hvilke komponenter som forbrennes, kun registrere det elektriske signalet fra komponentene. For å finne ut hvilken fettsyre en kromatografisk topp representerer, må man benytte seg av en standardmiks med kjent innhold. Identifisering skjer ved å sammenligne retensjonstid og de kromatografiske profilene i prøven med kromatogrammet fra den kjente standardmiksen (31), slik man kan se av figur 2.3.3.2.



Figur 2.3.3.2 Kromatogram USP (svart) og overliggende kromatogram av prøve (blått).

2.4. Kromatogram

Et kromatogram er en grafisk fremstilling av innholdet i den analyserte prøven. X-aksen representerer retensjonstiden, som angir hvor lang tid et stoff bruker på å bevege seg fra injektor til det brennes i FID. Y-aksen i et kromatogram representerer det elektriske signalet som registreres av flammeioniseringsdetektoren når et stoff eluerer ut av kolonnen og brennes i flammen. Dette elektriske signalet oppgis ofte i kromatogrammet som mV (milliVolt). Høyden av en topp sier noe om mengden av analytt som eluerer fra kolonnen et gitt tidspunkt, men det er arealet under en topp som forteller oss hvor stor mengde analytt som finnes i prøven.

2.5. Validering av metoder

Å validere en metode går ut på å undersøke og fastlegge metodens parametre. Omfanget av valideringen vil bestemmes av hva metoden skal brukes til. Det er nødvendig å gjennomføre valideringsforsøk hver gang en metode skal implementeres i et laboratorie. Det gjøres for å forsikre seg om at resultatene man oppnår gjennom analysen er presise, pålitelige og konsistente. Fordi forhold ved analyseapparat og annet materiell kan variere mellom ulike laboratorier og instrumenter, må alle metoder tilpasses disse forholdene. Denne tilpasningen skjer gjennom validering. Valideringsforsøk kan gi informasjon om hvorvidt gasskromatografen trenger tilpasning av temperaturprogram, injeksjonsvolum, trykk, kolonnevalg etc. for å kunne gi analyserbar informasjon om prøvens innhold.

Etter ISO-standard for kjemiske analyselaboratorier (ISO 17025) anbefales det at man for validering av metoder tilpasset eller utviklet ved laboratoriet, skal vurdere følgende faktorer: deteksjons og kvantifiseringsgrense, selektivitet, linearitet, repeterbarhet og reproduserbarhet.

ICH betegner **deteksjonsgrense** som den laveste mengden av en analytt som kan detekteres, men ikke nødvendigvis eksakt kvantifiseres.

Kvantifiseringsgrense betegnes som den laveste mengden analytt som kan bestemmes kvantitativt, med en tilstrekkelig presisjon og sikkerhet (35). Fremgangsmåten for å bestemme denne grensen vil være å gjennomføre en analysesyklus av en fettsyre av kjent mengde og for hver analyse redusere mengden av fettsyren til den ikke lenger detekteres. Hovedsakelig tid, men også begrensninger i økonomiske midler, var årsak til at det ikke ble fastsatt deteksjonsgrenser for hver fettsyre i den gasskromatografiske analysen.

Analytisk selektivitet sier noe om evnen analysemetoden har til å skille mellom stoffene i prøven. Høy analytisk selektivitet vil ha liten interferens. Interferens er en systematisk målefeil som skyldes at det kommer med en eller flere komponenter som analysen ikke har til hensikt å måle. I en gasskromatografisk analyse vil dette resultere i at det eluerer ut flere komponenter på samme tid, noe som innebærer at arealet under den kromatografiske toppen blir feilaktig stort (36).

Linearitet av kalibreringskurven forteller oss hvilken evne instrumentet har til å produsere resultater som er direkte proporsjonale med faktisk mengde av analytt i prøven. Kalibrering ble ikke utført av oss i dette prosjektet og blir derfor ikke omtalt mer i oppgaven.

ICH (International Council for Harmonisation) definerer **repeterbarhet** som presisjonen til metoden dersom alle opparbeidings- og analyseforhold er de samme og metoden utføres i løpet av et kort tidsintervall. presisjon er avhengig av tilfeldige feil i analysen, og uttrykkes vanligvis som analyseresultatenes standardavvik (37).

Reproduserbarhet uttrykker i hvor stor grad forhold som f.eks. analyse utført på ulike dager, utstyr, laboranter osv. har å si for resultatene. Man får på denne måten validert at det i det samme laboratoriet vil bli gitt samme svar på en prøve opparbeidet med den aktuelle metoden, til tross for variasjoner i slike forhold. Reproduserbarhet uttrykker nøyaktigheten på prøveresultater mellom ulike laboratorier (35).

3. Material og metode

3.1. Prøveinnsamling

Gjennom prosjektet ble det brukt blod fra to individer, A og B. A er en kvinne på 33 år, B er en kvinne på 25 år. Ingen av blodprøvene ble tatt fastende. Det ble i alle forsøk benyttet venøst blod fra underarm, De fleste forsøkene ble utført på ferske prøver, noen ble utført på lagret blod.

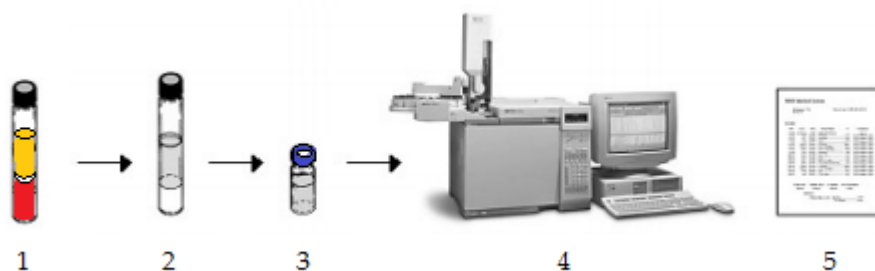
3.2. Prøveopparbeiding

Etter blodprøvetaking stod prøven i 25 minutter i romtemperatur. Dette for å senke temperatur i prøven, og samtidig la prøven få tid til å koagulere før sentrifugering. Blodprøven ble sentrifugerert (Jouran CR4i) i 10 minutter ved 3000 rpm i gelglass.

I forkant av analysene ble rør med 0,25 mg internstandard (C23:0) ble tillaget ved å tilsette i isooktan til forholdet 1mg/ml. 250 mikroliter av løsningen ble dampet inn med nitrogen. Rør med IS ble lagret i fryser frem til analyse.

Som innledende forsøk ble det forsøkt ulike mengder plasma for å komme frem til den mengden som ga kromatografiske signaler i ønsket signalområde. Vi startet med 0,25 gram og kom etter hvert frem til at 0,5 gram var en passende mengde.

3.3. Hovedmetodene benyttet i prosjektet



- 1 Sentrifugert blodprøve
- 2 Syrekatalysert reaksjon, fettsyrer har blitt forestret til fettsyre metylestere.
- 3 Prøve og isooktan, klargjort i vial
- 4 GC Analyse. Kromatogramtopp avlesning og profil sammenligning til database
- 5 Identifikasjon av fettsyrer

Figur 3.3.1 Flytskjema for hovedmetodene.

På grunn av potensielle skadevirkninger av løsemidlene som benyttes, foregår all opparbeiding i avtrekksskap. I prosjektet tok vi utgangspunkt i en artikkel av Marangoni et.al. (38), hvor fettsyrer ble bestemt i plasma ved bruk av HCl som syrekatalysator. Heksan ble byttet ut til isooktan.

3.3.1. Metode 1) HCl/MeOH

Det ble veid inn 0,5 gram til reagensrør med 0,25 mg IS (T9900 SIGMA), tilsatt 1,5 ml 3N HCl i Metanol (Supelco), vortexet og satt i 90°C varmebad i 1 time, og deretter avkjølt til romtemperatur. 1 ml isooktan (Merck) ble tilsatt og løsningen vortexet i 30 sekunder. 4 ml mettet KCl (Merck) ble tilsatt, løsningen vortexet. Etter separasjon av løsningen ble supernatant overført til nytt plastrør, tilsatt 1 ml isooktan og vortexet i 5 sek. Etter separasjon ble supernatant på nytt overført til plastrør, og tilsatt natriumsulfat (Merck). 100 mikroliter prøve ble overført til GC vial (Thermo Fisher) og tilsatt 1,5 ml isooktan.

3.3.2. Metode 2) NaOH + BF₃

Fettsyrer ble opparbeidet etter offisiell AOCS-metode Ce 1b-89 (2005). 0,5 gram plasma prøve ble veid inn til reagensrør med 0,25 mg IS, tilsatt 1,5 ml NaOH (Merck) vortexet i 5 sekunder. Røret ble satt i 90°C varmebad i 5 minutter og avkjølt til romtemperatur. Deretter ble 2 ml BF₃ (14% Sigma-Aldrich) tilsatt og løsningen vortexet i 5 sek før det ble satt i 90°C varmebad i 30 min. Løsningen ble avkjølt til 30-40°C, tilsatt 1 ml isooktan (Merck) og vortexet i 30 sekunder. 4 ml mettet NaCl (Merck) ble tilsatt, vortexet i 15 sekunder. Etter separasjon av løsningen ble supernatant overført til nytt plastrør, tilsatt 1 ml isooktan og vortexet i 5 sek. Etter separasjon ble supernatant på nytt overført til plastrør, og tilsatt natriumsulfat (Merck). 100 mikroliter prøve ble overført til GC vial (Thermo Fisher) og tilsatt 1,5 ml isooktan.

Isooktan er et løsemiddel som benyttes til ekstraksjon av de metylerte fettsyrene i løsningen. De upolare fettsyremetylerne vil trekkes over i det upolare organiske laget (isooktanen). Mettet saltløsning brukes for å trekke vann fra det organiske laget. Slik sitter vi igjen med prøvematerialet i en vannfri organisk fase. Natriumsulfat blir også benyttet for å fjerne eventuelle vannmolekyler som måtte være igjen i løsningen.

3.3.3. Variasjoner i metoden

I metode: Type og mengde av syrekatalysator, og temperatur/ tid i varmebad.

Annet: Lagringstid/lagringstype på blod og lagringstid/lagringstype på vialer,

Tabell 3.3.3.1 Oversikt over de ulike variasjonene av metode 1 i prosjektet.

	Mengde HCl	Temperatur	Tid i varmebad
Variasjon 1	1 ml	90°C	30 min
Variasjon 2	1 ml	90°C	1 time
Variasjon 3	1,5 ml	90°C	30 min
Variasjon 4	1,5 ml	90°C	1 time
Variasjon 5	1,5 ml	90°C	1,5 time
Variasjon 6	1,5 ml	90°C	2 timer
Variasjon 7	2 ml	90°C	1,5 time
Variasjon 8	2 ml	90°C	2 timer
Variasjon 9	1 ml	50°C	1,5 time
Variasjon 10	1,5 ml	50°C	1,5 time

Tabell 3.3.3.2. Oversikt over de ulike variasjonene av metode 2 i prosjektet.

	Mengde BF ₃	Mengde NaOH	Temperatur	Tid i varmebad
Variasjon 1	1 ml	1,5 ml	90°C	30 min
Variasjon 2	2 ml	1,5 ml	90°C	30 min
Variasjon 3	2 ml	1,5 ml	90°C	2 timer

3.3.4. Andre metoder benyttet i prosjektet.

Ekstraksjon av lipid fra plasma.

Underveis i prosjektet ble det utført ett forsøk hvor lipid ble ekstrahert fra plasma før opparbeiding til bestemmelse av fettsyrer. Hensikten med prosjektet har vært å optimalisere en metode for direkte metylering av plasma, og ekstraksjon av lipid ble derfor kun utført en gang.

Ekstraksjon etter Bligh and dyer (39, 40).

4,4444 gram plasma prøve ble veid inn i begerglass og tilsatt 15 ml kloroform/metanol (forhold 1:2). Blandingen ble homogenisert i 2 min med ultraturax (IKA, 18 mm munnstykke), tilsatt 5 ml kloroform og blandet 30 sek med ultraturax, tilsatt 5 ml vann og blandet 30 sek med ultraturax. Videre ble prøven filtrert under vakuum og overført til sentrifugerør. Filter (Aldrich) og kolbe ble dryppet med 5 ml kloroform (Merck), som etterpå ble overført til sentrifugerøret med det ekstraherte prøvematerialet. Etter oppnådd faseskille ble kloroformlaget overført til 3 nye reagensrør med 1 ml til hvert rør. Innholdet i rørene dampes inn. Forholdet mellom vann, kloroform og metanol var 0,8:2:1. Plasma prøvene har høyt vanninnhold, dette ble korrigert for under ekstraksjonen etter metoden av Bligh and Dyer (39). Etter ekstraksjonen blir prøven opparbeidet med samme fremgangsmåte som metode 1.

3.4. GC apparat og temperaturprogram benyttet/Instrument

I dette prosjektet ble det benyttet gasskromatograf Perkin Elmer GC Autosystem XL Gas Chromatograph med kapillærkolonnen CP-Wax 52 CB fra Agilent Technologies (25 meter lengde, 0,25mm intern diameter og 0,2 µm filmtykkelse). Gasskromatografen var koblet til FID-detektor (41).

GC-instrumentet er blitt brukt til å bestemme fettsyrer i oljer, og har et temperaturprogram tilpasset dette. Da flere av de samme fettsyrene finnes i blod, ble det samme programmet benyttet for denne analysen.

I dette prosjektet ble det ikke gjort tilpasninger av hverken kolonne, eller andre forhold. Programmet hadde følgende innstillinger: analysetid: 23,50 min, injektor temperatur: 220 °C, detektor temperatur: 270 °C. Tabell 3.4. viser temperaturprogram.

Tabell 3.4.1. Temperaturprogram

Program	Ramp Rate (°C/min)	Setpoint (°C)	Hold time (min)
Initial		90	1,5
Steg 1	45	150	0
Steg 2	4,50	225	4

3.5. Kalkulasjoner og statistiske beregninger

I prosjektet ble det utarbeidet et regneark for beregning av mengde (mg/g) og prosent % av de ulike fettsyrene i plasma, samt standardavvik og RSD. Flere fettsyrer kan enkelt legges til ved behov.

Utrekningene baserer seg på responsfaktor og konversjonsfaktor.

F_{CT} Responsfaktor

Konsentrasjonen av hver enkelt fettsyre kan regnes ut ved å benytte seg av en internstandard, som er en kjent konsentrasjon, og man kan regne ut de ukjente fettsyrene på bakgrunn av en responsfaktor.

Man kan bruke både empiriske og teoretiske responsfaktorer. I vår oppgave har vi valgt å bruke teoretiske responsfaktorer. Den største årsaken til dette er tiden det ville krevd å lage et regneark basert på empiriske data, ettersom det krever et mer avansert regneark.

Tallverdiene fra vårt regneark ble sammenlignet med et regneark basert på empiriske faktorer - men dette inneholder ikke alle fettsyrene vi finner igjen i blod.

Sammenligningen viste samsvar mellom resultatene fra de to ulike regnearkene.

F_{CEA} Konversjonsfaktor for FAME til fettsyre

Denne faktoren benyttes når FAME skal regnes om til vekt av fettsyre. Den korrigerer for vektforskjell mellom fettsyre og den korresponderende FAME. FAME veier mer på grunn

av den påsatte metylgruppen. Man kommer frem til F_{CEA} ved å dele molekylmassen til fettsyremetylestere med molekylmassen til dens korresponderende fettsyre.

$$F_{CEA} = \text{MM av FAME} / \text{MM av korresponderende fettsyre}$$

Responsfaktorer og korreksjonsfaktorer benyttet i prosjektet for er hentet fra Danish Food Information (42).

Formelen for å regne ut vekt av den enkelte fettsyren i prøven.

$$MX = MP \times AX \times F_{CT} / AX \times MA \times F_{CEA}$$

MX = massen av fettsyren angitt i mg fettsyre/g plasma.

MP =massen av internstandard i mg.

AX =fettsyremetylestens areal,

F_{CT} = teoretisk korreksjonsfaktor,

AP = internstandardens areal.

MA = vekt av prøve i gram

F_{CEA} = konversjonsfaktor for FAME til fettsyre (43).

T-test og variansanalyse (ANOVA) ble brukt for finne signifikante forskjeller i fettsyrer mellom ulike opparbeidingsvariasjoner. Bonferroni ble brukt som post-hoc test for å hvilke av gruppene som var signifikant ulike hverandre. Et signifikansnivå på 95% ble valgt i alle de statistiske analysene.

Microsoft Excel (versjon 15.33) og stata 13 (statacorp) ble brukt i alle beregninger og statistiske tester. Statistiske analyser er gjort i samarbeid med veileder.

4. Resultater

4.1. Validering av instrument, repeterbarhet

Underveis i prosjektet ble det gjennomført analyser hvor repeterbarheten til instrumentet ble undersøkt. En prøve ble analysert 10 ganger etter hverandre på GC. Begge valideringsforsøk av metode 1 ble utført på prøver behandlet med 1,5ml HCl i 1 time. Validering utført 28.februar, ga høye RSD på fettsyrene C16:1, C20:5n3 og C22:5n3 som det finnes små mengder av i blodet. RSD var jevnt over høyere enn valideringsforsøket utført 6.mars. Valideringsforsøket utført 6.mars ga i likhet med 28.februar høye RSD på C16:1 og C20:5n3. Valideringsforsøk av metode 2 (2ml BF₃, 30 minutter) utført den 27.februar ga høye RSD på C20:5n3 og C24:1 og viste ingen tilstedeværelse av C24:0. Ellers viste det lave RSD.

4.2. Variasjoner i metode 1, mengde katalysator og tid

Det ble gjennomført forsøk ved å variere mengde katalysator og tid. (1 ml i 30 min, 1,5 ml i 30 min, 1 ml i 1 time, 1,5 ml i 1 time) (se tabell nr. 4.2.1). De to variasjonene med 1 time varmebad har jevnt over høyeste verdier av de fire. Prøven behandlet med 1,5ml og 1 time varmebad ga det høyeste gjennomsnittlig totale utbyttet (1,596 mg/g), og gjennomsnittlig lavest RSD av alle tilnærmingene. RSD på prøven behandlet med 1,5 ml i 30 min varmebad er jevnt over høyt, så variasjonene innad i analysen er store. Den viser signifikant lavere verdier ($p < 0.05$) av fettsyrene C24:0 og C24:1, sammenlignet med prøvene som har stått 1 time i varmebad (1 ml og 1,5 ml), og signifikant lavere verdier på C18:0 i forhold til prøven behandlet med 1,5 ml i 1 time. Prøven behandlet med kortest tid i varmebad og minst syre (1 ml i 30 minutter) viste signifikante avvik ($p < 0,05$) på alle fettsyrer sammenlignet med begge prøvene behandlet med 1,5 ml HCl (30 minutter og 1 time). Prøven behandlet med 1 ml og 1 time varmebad hadde signifikant høyere verdier av C16:1, C20:5n3 og C24:0 sammenlignet med samme mengde syre, men 30 minutter kortere varmebad. Det totale utbyttet av de ulike metodevariasjonen hadde ikke signifikante avvik, bortsett prøven behandlet med minst syre og kortest tid i varmebad (1 ml i 30 min) som hadde signifikant lavere verdier sammenlignet med de 3 andre.

Tabell 4.2.1

Variasjon i mengde katalysator (1 ml/1.5ml HCl) og tid i varmebad (30 min og 60 min).

Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=9)

	08.mar Person B			08.mar Person B			08.mar Person B			08.mar Person B		
	1ml HCl	90°C	30 min	1,5ml HCl	90°C	30 min	1ml HCl	90°C	1 time	1,5ml HCl	90°C	1 time
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %
C16:0	0,289	25,443	9,879	0,418	24,645	13,575	0,351	24,76	7,581	0,431	24,144	3,258
C16:1	0,011	0,948	9,227	0,014	0,85	14,377	0,012	0,868	5,659	0,014	0,799	4,571
C18:0	0,134	12,008	9,841	0,215	12,867	13,399	0,17	12,152	10,394	0,225	12,767	1,99
C18:1n9	0,172	15,496	9,497	0,254	15,299	14,027	0,207	14,875	8,235	0,255	14,617	2,625
C18:1n7	0,021	1,845	9,917	0,031	1,847	13,739	0,025	1,786	7,625	0,031	1,764	3,73
C18:2n6	0,221	20,029	10,249	0,312	18,977	13,135	0,259	18,889	6,151	0,315	18,171	3,969
C20:4n6	0,09	8,338	10,356	0,131	8,147	12,944	0,108	8,052	6,16	0,133	7,819	4,072
C20:5n3	0,018	1,692	10,776	0,025	1,552	13,564	0,021	1,577	4,951	0,025	1,482	19,713
C22:5n3	0,012	1,121	11,273	0,018	1,117	13,802	0,015	1,094	11,332	0,018	1,061	5,465
C24:0	0	0	0	0,009	0,61	60,272	0,002	0,098	282,843	0,022	1,34	9,75
C22:6n3	0,058	5,366	10,656	0,084	5,154	12,838	0,07	5,162	6,269	0,084	4,919	5,187
C24:1	0	0	0	0,019	1,239	6,356	0,014	1,032	17,743	0,034	2,042	2,955
SUM	1,032	92,806		1,54	92,788		1,259	90,767		1,596	91,316	

Sammenligning av 1 ml mot 1,5 ml i analysene utført den 16. mars, (Se tabell nr. 4.2.2.) viser i likhet med analysen fra 8. mars at det totale utbyttet blir høyere ved 1,5 ml (1,200 mg/g) enn ved 1 ml (1,060 mg/g) når begge stod 1 time i varmebad. Analysen av prøven som var behandlet med 1 ml HCl hadde store RSD på fettsyrene C24:1 (88,8 RSD) og C24:0 (173,2 rsd) på grunn av en eller flere manglende verdier i en eller flere av parallellene. Sett bort fra disse to hadde de andre fettsyrene jevnt over lavere RSD ved 1ml kontra 1,5 ml. Fordi det kun ble analysert 3 paralleller og ikke 9 ble det ikke gjennomført statistiske beregninger.

Tabell nr. 4.2.2

(Fra 16.mars). Variasjon i katalysator (1 ml/1.5ml HCl). Lik tid i varmebad (60 min).

Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=3 for 1,5 ml HCl) (n=9 for 1 ml HCl).

	16.mar Person B			16.mar Person B		
	1,5ml HCl	90°C	1 time	1ml HCl	90°C	1 time
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %
C16:0	0,367	23,33425	4,422	0,338	28,096	1,789
C16:1	0,011	0,798933	4,337	0,009	0,73	3,265
C18:0	0,149	12,77308	3,495	0,133	11,191	1,956
C18:1n9	0,164	14,15959	3,93	0,141	11,982	2,634
C18:1n7	0,02	1,709278	7,535	0,018	1,522	4,773
C18:2n6	0,267	17,21756	4,138	0,24	20,525	1,753
C20:4n6	0,088	7,418447	3,732	0,081	7,08	3,133
C20:5n3	0,025	1,391489	3,648	0,023	2,051	1,488
C22:5n3	0,016	1,021224	4,373	0,014	1,246	1,05
C24:0	0,014	1,142785	4,228	0,003	0,288	173,21
C22:6n3	0,052	4,650851	3,829	0,048	4,196	1,28
C24:1	0,022	2,412796	1,487	0,009	0,844	88,759
SUM	1,2	88,53283		1,06	89,879	

Den 7.april ble det gjort forsøk med 1,5 ml katalysator i 1,5 og 2 timer i tillegg til 2 ml katalysator i 1,5 og 2 timer. Det laveste totale utbyttet av fettsyrer ble sett på prøven behandlet med 1,5 ml HCl i 1,5 time (1,387 mg/g). De tre andre prøvene hadde nokså likt totalt utbytte, og det høyeste ble sett ved 2 ml HCl, 1,5 time (1,590 mg/g). Det var også prøven med lavest relativt standardavvik (Se tabell nr. 4.2.3).

Tabell nr. 4.2.3

7.april - Variasjon i mengde katalysator (1,5 ml/2 ml HCl) og tid i varmebad (60 min og 90 min). Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=9)

	07.apr Person B			07.apr Person B			07.apr Person B			07.apr Person B		
	1,5ml HCl	90°C	1,5 time	1,5ml HCl	90°C	2 timer	2ml HCl	90°C	1,5 time	2ml HCl	90°C	2 timer
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %
C16:0	0,42	24,995	2,047	0,452	24,673	2,153	0,438	22,087	3,621	0,433	23,818	1,064
C16:1	0,011	0,656	7,104	0,014	0,737	4,491	0,021	1,032	7,552	0,012	0,672	10,957
C18:0	0,17	10,274	2,917	0,173	9,594	2,971	0,17	8,692	2,479	0,174	9,716	2,406
C18:1n9	0,186	11,302	2,324	0,213	11,856	3,693	0,261	13,434	5,611	0,196	11,01	5,283
C18:1n7	0,021	1,285	2,37	0,023	1,299	3,054	0,025	1,272	4,275	0,022	1,247	3,106
C18:2n6	0,301	18,417	1,791	0,338	18,996	2,171	0,382	19,817	4,914	0,315	17,846	3,392
C20:4n6	0,124	7,738	2,247	0,132	7,602	1,682	0,127	6,742	2,973	0,126	7,321	0,779
C20:5n3	0,034	2,162	2,839	0,037	2,152	1,31	0,038	2,048	3,879	0,035	2,047	2,575
C22:5n3	0,013	0,778	6,372	0,012	0,653	37,592	0,012	0,649	1,813	0,013	0,739	1,39
C24:0	0,015	0,94	5,49	0,015	0,872	8,346	0,017	0,898	1,263	0,017	1,028	4,951
C22:6n3	0,062	3,876	2,658	0,066	3,778	2,082	0,062	3,243	1,941	0,065	3,744	0,505
C24:1	0,028	1,771	4,964	0,028	1,635	3,758	0,031	1,664	1,381	0,032	1,88	4,515
SUM	1,387	84,253		1,503	83,887		1,59	82,005		1,446	81,32	

4.3. Temperatur

Generelt gir metodene med 50°C varmebad langt lavere verdier på alle fettsyrer enn samme forhold ved 90°C (opp mot 1/3) (se tabell 4.2.4 og tabell 4.2.1). Det er store mangler på fettsyrene som det finnes små mengder av i blodet (C22:5n3, C24:0 og C24:1 har kun 0 verdier). Det ble ved 50°C gjort forsøk med 1 ml og 1,5 ml HCl. Vi kan ved sammenligning av det totale fettsyreinholdet i prøven behandlet med 1 ml (0,351 mg/g) og 1,5 ml (0,707 mg/g) se at den nesten doubles.

Tabell nr. 4.2.4

Begge prøver stått 90 min varmebad ved 50°C. Variasjon i mengde katalysator (1 ml/1,5 ml HCl). Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=9)

	08.mar		Person B		08.mar		Person B	
	1ml HCl	50°C	1,5 time		1,5ml HCl	50°C	1,5 time	
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Std.av mg	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Std.av	Rsd %
C16:0	0,102	24,716	0,005	4,6	0,211	26,94	0,01	6,088
C16:1	0,008	1,831	0,001	7,5	0,01	1,31	0	6,231
C18:0	0,04	9,788	0,002	4,7	0,096	12,41	0,01	6,346
C18:1n9	0,089	22,151	0,003	3,9	0,149	19,44	0,01	4,378
C18:1n7	0,008	1,926	0	5,4	0,015	1,956	0	5,497
C18:2n6	0,066	16,457	0,017	25	0,136	17,94	0,01	6,189
C20:4n6	0,023	5,811	0,001	3,7	0,047	6,353	0	6,585
C20:5n3	0,001	0,189	0,002	300	0,009	1,277	0	7,76
C22:5n3	0	0	0	0	0	0	0	0
C24:0	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:6n3	0,015	3,692	0,001	3,7	0,03	4,031	0	7,282
C24:1	0	0	0	0	0	0	0	0
SUM	0,351	86,724			0,707	91,9		

4.4. Lagring av blod

Flere forhold vil påvirke prøvens sammensetning. Derfor ble blod/serum lagret, enten i romtemperatur, kjøleskap eller i fryser.

Frysing og tining

Prøven er opparbeidet med 1,5 ml HCl og 1 time varmebad.

Ved sammenligning av fersk prøve med prøve som er fryst ett døgn og tint, og prøve som er fryst 2 døgn og tint to ganger (tabell nr. 4.4.1) kommer det frem at totalt fettsyreinhold går ned (dag 1: 1,025 mg/g, dag 3: 0,734 mg/g) og standardavvik øker jevnt over. Spesielt høyt standardavvik kan sees på C24:0, C22:5n3, 20:5n3 og C16:1, som alle er fettsyrer som er tilstede i blodet i små mengder. Prøven som er fryst i to døgn har signifikant lavere

verdier på alle fettsyrer med unntak av C16:1, C18:3n3, C24:0, som alle hadde forholdsvis like verdier etter to døgns frysing og to oppstillinger som fersk prøve.

Tabell 4.4.1

Fersk, fryst- og tint prøve, 1- og 2 døgn. Prøve opparbeidet med 1.5 ml HCl 60 min varmebad. Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=9)

	FERSK BLODPRØVE			BLOD FRYST 1 DØGN, TINT 1 GANG			BLOD FRYST 2 DØGN, TINT 2 GANGER		
	06.mar Person B			07.mar Person B			08.mar Person B		
	1,5ml HCl	90°C	1 time	1,5ml HCl	90°C	1 time	1,5ml HCl	90°C	1 time
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %
C16:0	0,316	26,017	4,198	0,305	27,544	3,915	0,228	27,346	16,363
C16:1	0,006	0,468	9,964	0,005	0,464	57,73	0,004	0,498	40,239
C18:0	0,126	10,485	7,214	0,122	11,169	4,36	0,098	11,892	14,831
C18:1n9	0,12	10,035	7,141	0,119	10,929	3,52	0,092	11,27	14,516
C18:1n7	0,018	1,497	4,254	0,017	1,602	3,105	0,013	1,62	14,871
C18:2n6	0,213	18,011	4,871	0,211	19,633	3,654	0,151	18,605	15,457
C20:4n6	0,106	9,222	3,378	0,106	10,055	4,196	0,074	9,286	16,724
C20:5n3	0,014	1,218	23,082	0,013	1,188	35,497	0,01	1,227	13,262
C22:5n3	0,012	1,016	4,624	0,009	0,845	58,357	0,006	0,647	76,651
C24:0	0,012	1,003	45,234	0,008	0,765	75,732	0,006	0,74	97,036
C22:6n3	0,057	4,895	3,474	0,056	5,238	6,461	0,038	4,689	18,799
C24:1	0,024	2,134	17,928	0,022	2,112	3,789	0,016	2,063	15,331
SUM	1,025	86,026		0,994	91,544		0,734	89,883	

4.5. Lagring av vialer/ferdig opparbeidet prøve

For å undersøke om opparbeidete prøver kan lagres over tid, ble det gjennomført forsøk på lagrede vialer.

I GC maskin (ca. 30°C) over 4 dager

Totalt fettsyreinhold har blitt redusert på alle dagene sammenlignet med dag 1, men i svært liten grad (0,074 mg på det meste, 0,021mg på det minste). Også i dette lagringsforsøket ser vi at RSD øker. Resultatene fra 11.april (tabell 4.5.) viser at prøvene som hadde stått i 4 dager, har samme tendens til avvik mellom metodene som den 7.april (tabell 4.2.3.) bortsett fra C24:1 som ikke lenger viser signifikante avvik mellom noen av metodevariasjonene. Av de fire variasjonene har kun prøven opparbeidet med minst syre og kortest tid i varmebad (1,5 ml i 1,5 time) en signifikant reduksjon i det totale utbyttet sammenlignet med 7.april.

Metode 1 (HCl)

Resultater fra 7.april i [tabell 4.2.3](#) sammenlignes med resultater fra 11.april i [tabell 4.5.1](#). Prøve opparbeidet med 1,5ml HCl og i 1,5 time i varmebad hadde signifikant nedgang i følgende fettsyrer, C18:2n6, C20:4n6, C20:5n3, og C22:6n3. Prøven opparbeidet med 1,5 ml HCl i 2 timer varmebad hadde nedgang i C16:0, C16:1, C18:1n7, C18:2n6, C20:4n6, C20:5n3, og C22:6n3. Prøven opparbeidet med 2ml HCl 1,5 time varmebad hadde kun nedgang i C22:6n3. Prøven opparbeidet med 2ml og 2 timer varmebad hadde signifikant nedgang i C18:1n7. Prøven opparbeidet med 1,5 ml og 2 timer i varmebad var den eneste metoden som hadde en signifikant nedgang i totalt utbytte.

Tabell nr. 4.5.1

11.april – Resultat av prøver lagret i 4 dager. Opparbeidet med variasjon i mengde katalysator (1,5 ml/2ml HCl) og tid i varmebad (90 min og 120 min).

Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=9)

	Prøve stått i gc fra 7.apr			Prøve stått i gc fra 7.apr			Prøve stått i gc fra 7.apr			Prøve stått i gc fra 7.apr		
	11.apr Person B			11.apr Person B			11.apr Person B			11.apr Person B		
	1,5ml HCl	90°C	1,5 time	1,5ml HCl	90°C	2 timer	2ml HCl	90°C	1,5 time	2ml HCl	90°C	2 timer
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %
C16:0	0,41	23,647	3,24	0,432	23,006	2,37	0,43	21,603	3,109	0,426	23,575	2,493
C16:1	0,01	0,612	6,432	0,013	0,686	3,624	0,02	1,005	7,159	0,012	0,662	11,66
C18:0	0,167	9,751	4,294	0,166	8,949	2,432	0,166	8,482	2,118	0,171	9,064	0,747
C18:1n9	0,185	10,893	2,136	0,209	11,378	2,803	0,256	13,139	5,47	0,194	10,934	5,988
C18:1n7	0,021	1,216	2,965	0,022	1,198	2,211	0,024	1,226	3,54	0,021	1,208	3,07
C18:2n6	0,292	17,346	2,444	0,322	17,685	1,836	0,373	19,271	4,679	0,309	17,582	4,471
C20:4n6	0,12	7,267	2,987	0,126	7,05	4,642	0,124	6,586	3,064	0,125	7,299	2,805
C20:5n3	0,033	2,019	4,262	0,036	2,017	2,406	0,037	1,976	3,96	0,034	1,996	3,638
C22:5n3	0,012	0,737	8,688	0,012	0,683	4,555	0,012	0,627	5,314	0,013	0,713	4,206
C24:0	0,015	0,907	2,93	0,014	0,827	5,616	0,017	0,897	1,285	0,018	1,056	2,976
C22:6n3	0,06	3,612	2,615	0,064	3,534	2,345	0,06	3,136	2,247	0,064	3,684	3,051
C24:1	0,028	1,707	4,799	0,028	1,581	3,757	0,031	1,657	1,948	0,032	1,906	2,452
SUM	1,357	79,933		1,449	78,774		1,557	80,027		1,425	80,556	

Metode 2 (BF₃)

Prøve opparbeidet med 2 ml BF₃ og 2 timer varmebad hadde signifikant nedgang i følgende fettsyrer, C16:0, C18:0, C18:1n9, C20:4n6, C20:5n3, og C22:5n3 (tabell 4.5.2)

Tabell nr. 4.5.2

Resultat av prøver lagret i 4 dager. Prøver opparbeidet med 2ml BF₃ og 180 min varmebad
Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=9)

	07.apr Person B					11.apr Person B			
	2ml BF ₃	90°C	2 timer			2ml BF ₃	90°C	2 timer	
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Std.av mg/g	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Std.av mg/g	Rsd %	
C16:0	0,545	22,135	0,017	3,168	C16:0	0,503	18,93	0,023	4,475
C16:1	0,036	1,447	0,001	4,146	C16:1	0,033	1,241	0,002	5,178
C18:0	0,208	8,583	0,002	0,909	C18:0	0,192	7,306	0,006	3,218
C18:1n9	0,48	19,93	0,024	4,913	C18:1n9	0,443	17,027	0,024	5,426
C18:1n7	0,037	1,554	0,002	4,323	C18:1n7	0,034	1,322	0,002	4,692
C18:2n6	0,548	22,911	0,035	6,301	C18:2n6	0,506	19,618	0,035	6,915
C20:4n6	0,156	6,681	0,006	4,085	C20:4n6	0,147	5,813	0,005	3,39
C20:5n3	0,049	2,112	0,001	1,809	C20:5n3	0,045	1,806	0,001	2,191
C22:5n3	0,015	0,619	0	1,825	C22:5n3	0,014	0,537	0	2,597
C24:0	0	0	0	0	C24:0	0	0	0	0
C22:6n3	0,072	3,039	0,001	1,739	C22:6n3	0,068	2,659	0,001	1,436
C24:1	0,046	1,994	0,013	29,641	C24:1	0,044	1,794	0,042	93,678
SUM	2,204	91,572			SUM	2,042	78,538		

Stabilitet

Stabilitet av opparbeidet prøve lagret i kjøleskap ble testet over 4 dager. (Se tabell 4.5.2 fra den 18-22.april.) Det gjennomsnittlige totale utbyttet reduseres noe fra dag 0

(1,917 mg/g) til dag 3 (1,699 mg/g). Ingen nedgang fra dag 3 til dag 4 (1,715 mg/g).

C24:1 har den største reduksjonen på nesten 50% (fra 0,060 dag 0 til 0,032 dag 4).

Alle fettsyrene har små reduksjoner, med unntak av C16:1, C22:5n3 og C24:0 som holder seg stabile. I motsetning til de andre lagringsforsøkene er det ingen nedgang i RSD,

snarere tvert imot - dag 1 har det høyeste relative standardavviket. Det er naturlig å tro at

dette kan skyldes tilfeldige feil ved analysen, ettersom det ikke virker naturlig at prøven

skal bli mer stabil jo lenger den står. Dag 2 derimot har jevnt over lavest RSD, med unntak

fra på C24:1 (17.726%). Ved lagring over 4 dager var det ingen signifikant nedgang for

C24:0. Fettsyrene C16:0, C20:4n6, C22:5n3, og C24:1 hadde signifikant lavere verdier på

dag 3, sammenlignet med dag 0. Det ble observert nedgang i alle andre fettsyrer fra og

med dag 2. Forskjell i total mengde fettsyrer var signifikant mellom dag 1 og alle andre dager. Verdiene på dag 2 var også signifikant høyere, enn dag 3 og 4.

Tabell nr. 4.5.3

18-22.april – Prøve ble opparbeidet med 1.5ml HCl og 90 min varmebad og lagret 4 dager i kjøleskap. Gjennomsnittlig mengde (mg/g), prosent (%) og RSD (%) er vist. (n=9)

	18.apr Person B DAG 1			19.apr Person B DAG 2			20.apr Person B DAG 3			21.apr Person B DAG 4			22.apr Person B DAG 5		
	1,5ml HCl	90°C	1,5 time	1,5ml HCl	90°C	1,5 time	1,5ml HCl	90°C	1,5 time	1,5ml HCl	90°C	1,5 time	1,5ml HCl	90°C	1,5 time
	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %	gj.sn mg/g	gj.sn %	Rsd %
C16:0	0,531	22,488	3,357	0,51	22,346	1,502	0,487	21,47	3,413	0,472	21,101	3,439	0,483	21,307	1,881
C16:1	0,015	0,622	14,584	0,015	0,636	3,483	0,014	0,607	2,665	0,013	0,596	5,835	0,014	0,614	1,513
C18:0	0,219	9,379	2,983	0,209	9,282	1,231	0,201	8,983	2,835	0,195	8,843	2,737	0,198	8,875	1,495
C18:1n9	0,279	12,066	2,657	0,266	11,877	1,197	0,255	11,475	2,333	0,25	11,408	2,534	0,255	11,462	1,465
C18:1n7	0,028	1,195	3,923	0,026	1,155	1,827	0,025	1,111	3,3	0,025	1,119	2,888	0,025	1,12	1,844
C18:2n6	0,471	20,504	2,615	0,45	20,309	1,232	0,433	19,666	2,979	0,418	19,219	3,023	0,425	19,275	1,584
C20:4n6	0,157	6,986	3,379	0,151	6,975	1,655	0,146	6,758	2,884	0,14	6,606	2,89	0,141	6,536	2,187
C20:5n3	0,039	1,737	4,066	0,037	1,723	1,255	0,036	1,674	1,93	0,034	1,633	2,982	0,034	1,594	1,779
C22:5n3	0,017	0,769	3,933	0,017	0,778	2,329	0,016	0,75	2,688	0,016	0,738	2,75	0,016	0,732	3,147
C24:0	0,014	0,649	5,933	0,014	0,677	3,575	0,014	0,678	4,322	0,015	0,697	5,034	0,015	0,697	3,788
C22:6n3	0,079	3,474	2,138	0,076	3,468	1,295	0,074	2,285	1,825	0,071	3,325	2,319	0,07	3,234	2,053
C24:1	0,06	2,739	8,728	0,056	2,653	17,726	0,037	1,1777	42,491	0,042	2,031	43,1	0,032	1,506	2,174
SUM	1,917	82,973		1,836	82,249		1,746	78,68		1,699	77,66		1,715	77,297	

4.6. Sammenligning av HCl metode og BF₃ metode

Resultatene på totalt fettsyreinnhold viste at metode 2 ga omlag 0,5mg/g mer enn metode 1. Metoden resulterte i større utbytte av alle fettsyrer med unntak av C24:0, Forholdsvist likt på 22:6n3 og 22:5n3. Metode 2 resulterer i spesielt høye verdier for de enumettede fettsyrene C16:1 og 18:1n9 i forhold til metode 1.

5. Diskusjon

Valideringsforsøk, reproducerbarhet

Ved start av prosjektet ble det gjennomført et forsøk for å undersøke repeterbarheten til instrumentet ved å analysere en prøve ti ganger. Årsaken til at RSD i metode 1, variasjon 4 (1,5 ml og 1 time varmebad) jevnt over var høyere for de fleste fettsyrer den 28.februar sammenlignet med 6.mars, kan ha sammenheng med at blodet som ble benyttet denne dagen hadde stått i kjøleskap i nesten ett døgn og at den etter blodprøvetaking og sentrifugering hadde blitt stående i romtemperatur rundt 3 timer. Dette kan medføre degradering av prøvekomponenter og et lavere nivåer av de ulike fettsyrene kan gjøre at deteksjonen ikke blir like nøyaktig. Grunnen til stort RSD på C16:1, C20:5n3 og C22:5n3 skyldes nok at de i flere av analysene havner under deteksjonsgrense, mens de i noen analyser detekteres.

Repeterbarhetsforsøkene av både metode 1 og metode 2 ga utover dette lave standardavvik, noe som tyder på at instrumentets analyser er presise.

En sammenligning av ulike analyselaboratorier gjennomført av NIST i 2013 (44) gikk ut på å la uavhengige laboratorier analysere fettsyreinholdet i samme plasmaprøver. Alle laboratoriene benyttet ulike metoder i analysene og hadde ulike forhold ved den gaskromatografiske analysen (som detektor og kolonnetype/lengde). Ved å se på RSD i NIST-studien og sammenligne med RSD-verdiene registrert i dette prosjektet, ser vi at de jevnt over er like og i enkelte tilfeller høyere i NIST-studien. At analysene våre resulterer i lave RSD tyder på at instrumentets presisjon er god. Når man ser på hvor stor variasjon det er mellom resultatene til de ulike laboratoriene i undersøkelsen, fremgår det hvor mye opparbeidingsmetode og laboratorietekniske forhold kan virke inn på sluttresultatet og hvorfor det blir svært vanskelig å sammenligne resultatene fra dette prosjektet opp mot andre forskningsresultater som ikke bare er utført med varierende metoder, men i tillegg også på andre individers blod.

5.1. Metodeoptimalisering

Variasjoner i metode 1 (HCl som syrekatalysator)

Ut fra resultatene av analysen gjort den 8.mars, ser man at det ikke overraskende ble dannet minst mengde fettsyremetylestere ved bruk av metoden som hadde *lavest* mengde katalysator og *kortest* tid i varmebad, størst dannelse sees ved metoden med *mest* katalysator og *lengst* tid i varmebad. Variasjon 3 (1,5 ml i 30 minutter) ga et langt høyere gjennomsnittlig totalt utbytte enn variasjon 1 (1 ml i 30 minutter). På grunnlag av disse resultatene ser det ut til at mengde katalysator er en mer kritisk faktor enn tid. Dette bekreftes ved å sammenligne variasjon 2 med 4 (1,5 ml i 1 time) som har lik tid i varmebad men er behandlet med ulik mengde HCl. Resultatene for variasjon 2 (1 ml i 1 time) sammenlignet med variasjon 3, viser at de høyeste verdiene kommer fra prøven opparbeidet med 0,5 ml mer katalysator men som har stått 30 minutter kortere i varmebad.

Av resultatene fra 16.mars kan det også se ut til at mengde syre spiller en svært viktig rolle da det kan sees store forskjeller i mengde av flere fettsyrer mellom variasjon 2 og 4, spesielt C24:0 og C24:1.

Den 7.april observeres det i variasjon 7 (2 ml i 1,5 time) og variasjon 8 (2 ml i 2 timer) signifikant høyere verdier på alle fettsyrer med unntak av C18:2n6 og C22:5n3, som ikke hadde signifikante forskjeller mellom de fire metodene. Dette bekrefter observasjonene fra både 8. og 16.mars om at mengde syre spiller en mer sentral rolle enn tiden i varmebad. Signifikant lavest verdier ser man på variasjon 5 (1,5 ml i 1,5 time), som har betydelig mindre totalt utbytte sammenlignet med variasjon 7.

Det som ikke var forventet den 7.april var at av de to prøvene som begge hadde stått to timer i varmebad, var det høyeste totale utbyttet fra prøven behandlet med 1,5 ml HCl og ikke den behandlet med 2 ml. Prøven behandlet med 2 ml ga likevel større utbytte på de to fettsyrene c24:1 og c24:0.

Temperatur

Forsøk ved 50°C utføres ofte med lengre tid i varmebad enn det som ble gjort i dette forsøket (24), så de lave/manglende resultatene var ikke overraskende. Dette ble ikke gjort fordi vi i prosjektet har hatt fokus på å optimalisere en metode som kan benyttes av

studenter og lærere ved NTNU Ålesund. Det har derfor vært ønskelig å komme frem til mindre tidkrevende metoder.

Sammenligning av metodene

BF₃ metoden ga manglende utbytte på to fettsyrer, noe ikke HCl metoden gjorde, samtidig som verdiene utover dette var forholdsvis like. På bakgrunn av dette kan det se ut som HCl metoden som er benyttet egner seg bedre enn BF₃ metoden til analyse av fettsyrer i blodplasma.

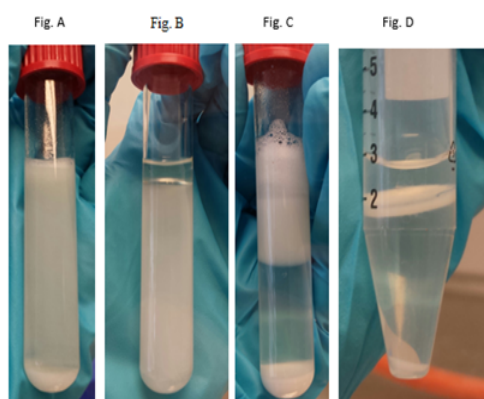
Variasjoner i metode 2

16.mars ble det analysert prøve opparbeidet med variasjon 1 (1 ml BF₃ i 30 min) og variasjon 2 (2ml BF₃ i 30 min). Variasjonene ga svært like resultater uten noen åpenbar forskjell mellom mengde av de ulike fettsyrene og tilnærmet likt totalt utbytte. Disse likhetene kan tyde på at 1 ml BF₃ er tilstrekkelig for å metylere fettsyrene i ca. 0,5 gram plasma, og at en større mengde katalysator utover dette ikke vil ha noen nevneverdig effekt. Det krever flere forsøk for å få bekreftet denne antagelsen, men dersom det stemmer, vil det på bakgrunn av de helse- og miljømessige ulempene forbundet med BF₃ tilrådes å kun benytte 1 ml til et prøvevolum av denne størrelsen.

Fettsyrer som det finnes lite av i blod, f.eks. C16:1, C20:5n og C22:5 n3, ser vi at ikke alltid blir detektert. I teorien skal alle vialer tillaget fra samme prøve inneholde like mengder av de ulike fettsyrene, men dette er ikke alltid resultatet som kommer frem av den kromatografiske analysen. En fettsyre som i en prøve detekteres i *første* GC analyse, detekteres kanskje ikke i neste. Dette har sannsynligvis sammenheng med at mengden havner under mengden som instrumentet er i stand til å måle. Det kan også skyldes forhold ved vialen som ble benyttet, eller tilfeldige feil ved apparatet under analysen, for eksempel ved injeksjon. En slik variasjon vil naturligvis ha en stor innvirkning på standardavviket. Ved å ta bort 0-verdier i utregning kan man likevel få sammenlignbare resultater, men da er spørsmålet hvorvidt disse er pålitelige ettersom de nevnte fettsyrene fortsatt kan være under verdi som instrument er i stand til å måle. Vi har i dette forsøket valgt å ikke ta bort 0-verdier, og man kan av resultatene se innvirkningen de har på standardavvik og RSD. Men for C18:3n3 skjedde dette så ofte at den ble ekskludert fra de endelige resultattabellene fordi verdiene ikke utgjorde et pålitelig sammenligningsgrunnlag.

Nurses' Health Study er en organisasjon som studerer risikofaktorer for kronisk sykdom hos kvinner. I 1990 ble det utført en omfattende studie som undersøkte hvordan fettsammensetningen i kosthold påvirker sammensetning i plasma og røde blodlegemer. Forsøket er gjort på prøver fra 306 kvinner i alderen 30-55 år. Prøveopparbeidingen er gjort med svovelsyre i metanol som metyleringsmetode. Ved å sammenligne resultatene fra vårt forsøk opp mot denne undersøkelsen, finner vi at den prosentvise fordelingen av de ulike fettsyrene er svært lik, til tross for at den amerikanske studien er gjort med en annen opparbeidingsmetode, på prøvedeltakere av en annen geografisk tilhørighet og utført for 27 år siden. Sammenlignet med hovedmetodene benyttet i vårt prosjekt viser det seg at det største samsvaret er med metode 2. Den store forskjellen er at omega-3 nivåene er over dobbelt så høye i blodet brukt i vårt forsøk. Forklaringen kan til dels ligge i at forsøkspersonen blodet tilhører inntar fisk jevnlig, samtidig som vedkommende tar omega-3 tilskudd. Prøvene i dette prosjektet er ikke tatt fastende, og vi antar at dette også kan ha bidratt til avvik. Resultatsammenligningen må sees i sammenheng med alle de avvikende faktorene nevnt tidligere og derfor kun brukes som en *mulig* pekepinn på at metodene i vårt prosjekt har resultert i gjennomsnittlige verdier av de ulike fettsyrene (45).

I de tilfeller hvor sjiktdannelse uteblir etter tilsetning av isooktan (figur 5.1. - C), kan man benytte sentrifuge for å skille komponenter. 5 minutter ved 3000 rpm var i dette tilfellet tilstrekkelig for å oppnå et tydelig lagskille (figur 5.1.1 A-D).



Figur 5.1.1 A-D, er i fra ordinær HCl metode:

Figur A – viser prøve før tilsetning av isooktan

Figur B – viser prøve, etter tilsetning av isooktan (ønskelig sjiktdannelse)

Figur C - Viser prøve og isooktan uten tydelig sjikt

Figur D – viser prøve og isooktan etter sentrifugering

Instrumentvalideringen ble gjort ved analyse av USP-fame miksen som inneholder alle fettsyrene det ble sett etter i blodplasma. USP-fame ble analysert i forkant av hver analyserunde og viste tilstedeværelse av alle fettsyrene, samt god separasjon mellom deres kromatografiske topper. Dette validerte at instrumentet fungerte slik det skulle, før videre validering av metode.

5.2. Metode Instrument

Alle analyser kan være påvirket av tilfeldige og systematiske feil. De systematiske feilene kan reduseres ved å forbedre metoden. De tilfeldige feilene kan reduseres ved å ha mange paralleller. En rekke forhold ved gasskromatografen kan påvirke det kromatografiske resultatet (29). Dette kan gjenkjennes ved forandringer i symmetri, form, høyde av toppene og støy i kromatogrammet. Fukt, oksygen og urenheter vil føre til støy og derfor påvirke instrumentets deteksjonsgrense. Det er derfor viktig at urenheter reduseres til et minimum. Nedsatt renhet på bæregass, forurensing eller skade på stasjonær fase eller injektor er alle forhold som kan bidra til feilaktige resultater. Flere vanlige problemer ved gasskromatografen og/eller prøven kan komme til uttrykk gjennom kromatogrammet. Forhøyet bunnlinje, overdrevet brede topper, topper med hale og støy er eksempler på dette. Gasskromatografen som er benyttet i dette forsøket har tidligere vært brukt i en annen bedrift og kolonnen er ikke blitt byttet siden instrumentet ble flyttet til NTNU. Det er derfor usikkert hvor gammel kolonnen er og hvordan den har vært behandlet.

Reduksjon i størrelse av enkelttopper kan skyldes kolonne og/eller liner-aktivitet eller kontaminering. Det kan også skyldes feil i den enkelte prøve, lekkasje i injektor som fører til tap av flyktige komponenter eller for høy starttemperatur i kolonneovn. Man kan forsøke å løse problemet ved å rengjøre apparatets komponenter og/eller endre programinnstillingene. Dersom disse tiltakene ikke har noen effekt vil utskifting av en eller flere apparatdeler være nødvendig.

Før og etter hver prøveserie ble det analysert en blankprøve (isooktan). Ved å studere kromatogrammene fra isooktan legger vi merke til to ting. Det første er at analysen av isooktan som gjøres etter prøveanalysene viser tilstedeværelse av små mengder organisk materiale, noe som kan tyde på at det ligger igjen rester av prøve i kolonnen. Dette kan vi

se allerede fra de tidligste analysene. En for liten mengde isooktan til vask kan være en grunn til dette. En mulig årsak kunne vært forurensing av injektor/injektornål, men det kan ikke forklare den andre observasjonen, nemlig at signalene fra komponentene i isooktanen jevnt over blir sterkere jo lenger ut i prosjektet analysen er gjennomført. Dette kan tolkes som et tegn på en reduksjon i kolonnens kvalitet.

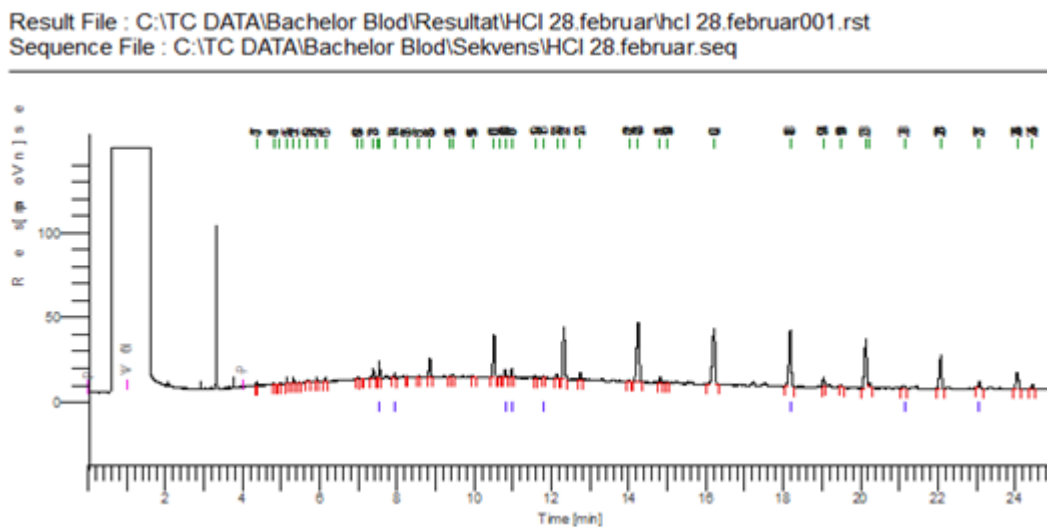
USP FAME ble som nevnt analysert etter isooktan i forkant av hver analysesekvens. USP FAME brukes som referanse for å bestemme hvilke fettsyrer de ulike signaltoppene i kromatogrammet kommer fra. Mot slutten av prosjektet kunne man se en tendens til at enkelte fettsyrer i USP standarden ikke lenger er like smale, og at arealet endres. Dette kan skyldes flere forhold, og vi tolker dette som at gasskromatografen trenger vedlikehold.

Fra og med 18.april ble det observert at den aller første analysen som gjøres på hver dato (det vil si analyse nr.1 i parallell nr.1) har et betydelig avvik fra de andre resultatene. Denne gjennomgående tendensen kan sees fra resultater tilbake til 7.april, men ble mer tydelig med tiden. Dette har bidratt til økning i standardavvik fra denne datoen og frem til den 18.april og gjør at RSD blir en mer usikker sammenligningsfaktor. Fordi dette skjer ved hver GC analyse gjort på ulike datoer og med ulike prøver, anser vi ikke selve prøven eller tilfeldige feil ved maskinen å være årsaken. Mest sannsynlig skyldes det feil ved injektornål eller kolonne. Sett i sammenheng med observasjonene gjort av USP-FAME ved hver kjøring i prosjektet og observasjonen av at isooktanen viser tilstedeværelse av komponenter etter hver analyse, i større grad enn den gjør før analyse, gjør at mistanken rettes mot mulige skader på kolonne.

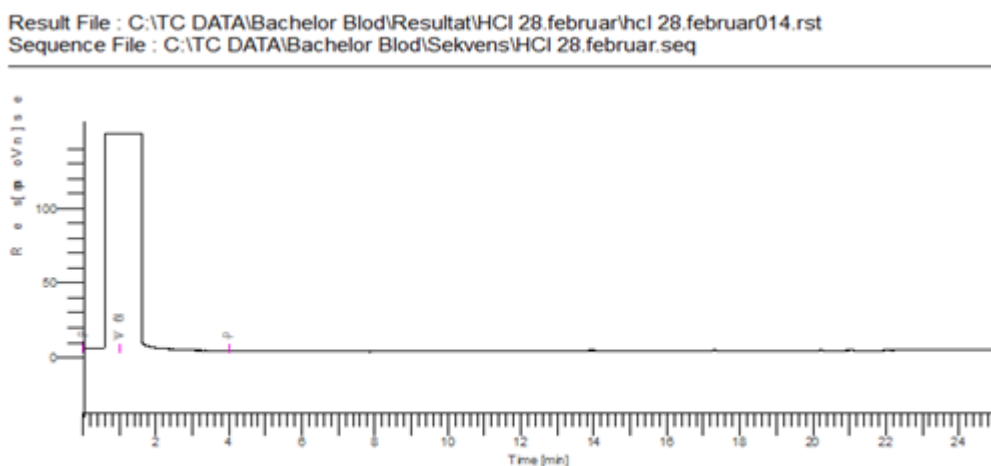
Hver prøve som opparbeides vil ikke nødvendigvis få eksakt samme behandling. For eksempel kan en prøve blitt vortexet noen sekunder lenger enn den andre eller fått noen dråper mindre HCl. Ved ekstraksjon av isooktanlaget kan det ha blitt med spor av den underliggende fasen. Menneskelige feil under opparbeiding av prøve, for eksempel forveksling av reagensglass, feilmerking, utsøling av prøve eller feil tilsatt mengde av en reaktant kan forekomme. Gode rutiner reduserer faren for at dette inntreffer, men man kan ikke være sikker på at det aldri vil forekomme menneskelige feil. Internstandard vil korrigere for eventuell utsøling av prøve ettersom mengde av fettsyre beregnes ut fra forholdet mellom den og internstandard. Dette forholdet vil være likt selv ved tap av prøve.

Kjemikalier:

Kjemikalier er en viktig feilkilde. Dersom de er for gamle, forurensede eller oppbevart uforsiktig vil det påvirke kvaliteten og medføre en risiko i forhold til feilaktige analysesvar. I dette prosjektet har vi benyttet kjemikalier fra skolens kjemikalielager. Vi kan ikke med sikkerhet si at flaskene vi har benyttet ikke har blitt kontaminerte i vår prosjektperiode. Isooktan blir benyttet både til ekstraksjon av metylerte fettsyrer og for å fortynne prøven før analyse i GC. Den benyttes også til å rense kolonnen før og etter analyse. Det er derfor nødvendig at isooktanen ikke er for gammel eller forurenset, da dette vil påvirke prøveresultatet. [Figur 5.2.1](#) og [5.2.2](#). viser eksempel på en utgått og en ny isooktan.



Figur nr. 5.2.1 Forurenset isooktan med en rekke kromatografiske topper



Fettsyresammensetning

No peaks available to report

Figur nr.5.2.2 Ren isooktan uten noen kromatografiske topper

Ekstraksjon

I vårt forsøk fikk vi ved ekstraksjon av lipider i forkant av metylering et langt høyere prosentvis utbytte av fettsyrene C16:1, C18:1n9, C18:2n6, C20:5n3, C22:5n3 og C24:1, og lavere utbytte av C16:0, C18:0, C20:4n6, C24:0, C22:6n3. sammenlignet med direkte metylering uten ekstraksjon i forkant. I studier som ser på sammensetning av fettsyrer i plasma har man ofte benyttet direktemetylering da metoden er ansett å fungere like godt, og i noen tilfeller bedre enn konvensjonelle metoder med ekstraksjonstrinn i forkant av metylering (46, 47). Det er kun blitt utført en ekstraksjon, og det vil være nødvendig å gjennomføre flere ekstraksjoner om vi skal kunne bestemme om denne forskjellen skyldes ekstraksjonen eller om den er tilfeldig.

Stabilitet av blodplasma

Den signifikante nedgangen i prøven som har vært dobbeltfryst tilsier at prøven holder seg stabil ved *ett* døgn frysing og *en* opptining, men at den ikke ser ut til å tåle 2x frysing og tining. Dette til tross for at det ansees trygt med 3 tine/fryse sykluser uten fare for degradering av prøvens metabolske komponenter.

Stabilitet av opparbeidet prøve ved lagring i romtemperatur

Prøver opparbeidet med ulike variasjoner av metode 1

Ut fra resultatene for prøvene som hadde stått 4 dager i GC-maskin, ser man at prøvene opparbeidet med variasjon 2 ml HCl kun hadde signifikant nedgang i *en* fettsyre. (C22:6n3 i variasjon prøven opparbeidet med 1,5 time i varmebad og C18:1n7 i prøven opparbeidet med 2 timer i varmebad). Prøvene som var behandlet med like lang tid i vambad, men med lavere mengde syrekatalysator (1,5 ml), hadde betydelig nedgang i flere fettsyrer. Det ser med andre ord ut til at en større mengde HCl gir en mer stabil prøve under lagring. Flere forsøk kreves for å bekrefte dette.

Prøve opparbeidet med ulike variasjoner av metode 2

Fordi det kun er sett på endringen av innholdet i *en* vial kan man ikke si med sikkerhet om den store graden av nedgang i enkelte fettsyrer skyldes metoden eller om det er tilfeldig.

Stabilitet av opparbeidet prøve ved lagring i kjøleskap.

Ved lagring i kjøleskap over 4 dager kan man se at en betydelig nedgang i mengde fettsyrer skjer mellom dag 2 og 3, hvorpå verdiene holder seg stabile fra dag 3 - 5.

Hvorvidt de hadde fortsatt å holde seg stabile er ikke mulig å si uten et lengre lagringsforsøk, men det er grunn til å tro at det ville forekommet en viss grad av oksidasjon ettersom septum er stukket gjennom flere ganger. En mulig forklaring kan være at noe isooktan har dampet av og resultert i en mer konsentrert prøve, slik at *resultatet* tyder på jevne verdier selv om det *faktiske* innholdet er redusert.

5.2 utfordringer i prosjektet.

En stor utfordring i dette prosjektet er det faktum at blodets sammensetning stadig endres som følge av naturlige variasjoner som hormonell aktivitet, næringsinntak, fysisk og mentalt stress med mer. Dette gjør at resultatene fra en dag til den neste ikke med sikkerhet kan sammenlignes opp mot hverandre. Det ble på grunn av manglende økonomisk handlingsrom ikke sendt prøver til analyselaboratorier slik at resultatene fra eksterne analyser kunne sammenlignes med egne. Så langt vi kjenner til finnes det heller ikke referansemateriale for fettsyrer i plasma. Vi kan derfor ikke med sikkerhet si om våre resultater stemmer med faktisk fettsyreinhold. Dette er også årsaken til at det er benyttet to hovedmetoder slik at disse kan sammenlignes og vi med større sikkerhet kan anta at resultatene er i samsvar med virkelige verdier. En annen utfordring er at man trenger å tappe forholdsvis store mengder blod for å få nok plasma til å kunne gjennomføre et høyt antall parallelle analyser.

6. Konklusjon

Målet i dette prosjektet var å optimalisere en metode for å kunne bestemme fettsyrer i blod ved hjelp av gasskromatografi, noe som har blitt gjort ut fra de forutsetningene vi hadde og rammene som var satt rundt oppgaven. Den optimale metodevariasjonen av de som er testet ut i prosjektet, viser seg å være metylering med 2 ml HCl og 1,5 time varmebad. Resultatene ga jevne verdier og lave RSD i begge hovedmetodene som ble benyttet. Det er viktig for oss å presisere at det vil være vanskelig å konkludere tidlig i en metodeutviklingsprosess, og at dersom konklusjoner blir trukket på manglende eller sviktende grunnlag vil dette resultere i en feilaktig/lite optimal metode. Med ytterligere tid og ressurser til rådighet ville vi fortsatt arbeidet med optimalisering av metode. Vi kan videre ut fra resultatene konkludere med at mengde katalysator er en viktigere faktor enn tiden i varmebad når det kommer til mengde metylerte fettsyrer.

7. Videre arbeid

Som videre metodeutviklingsarbeid ville det vært interessant å utføre forsøk på 50°C der prøven kunne stått til metylering f.eks. over natten, og sammenligne resultatene med de vi har fått gjennom forsøkene med 90°C. Ellers vil det være hensiktsmessig å i større grad teste ut blodlagring i romtemperatur, kjøleskap og fryser.

Etter etablering av metoden kan den videre benyttes til å undersøke totale fettsyrenivåer i blodplasma. For eksempel se på graden av forskjeller i fettsyrenivåer mellom kjønn, ulike aldersgrupper, grupper med ulik livsstil og/eller sykdommer. Eller utføre forsøk på personer som har fulgt spesifikke dietter/oppgang med tilskudd/vektoppgang/vektnedgang.

8. Referanser

1. Overview and appraisal of lipid extraction methods [Available from: <https://www.biomedcentral.com/content/supplementary/2190-4715-24-13-S1.PDF>].
2. Teale MC. Omega 3 fatty acid research 2006. 103 p.
3. USP. Safety data sheet 2014 [6]. Available from: <http://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1269119.pdf>.
4. Menneskekroppen, Fysiologi og anatomi. Gyldendal 2. utgave.
5. McKee T, McKee JR. Biochemistry : the molecular basis of life. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2009. xxv, 777, A-41, G-15, C-3, I-15 p. p.
6. Lipids 2012 [Available from: <https://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s20-lipids.html>].
7. Ragnar L. Olsen. Lipidkjemi med vekt på fisk. Kompendium 3. utgave 2007 [
8. Gyldendal. Grunnleggende ernæringslære.
9. Biochemistry II [Schematic structure of lipoproteins]. Department of Biochemistry FM MU (E.T.) 2011 [Available from: <https://www.slideshare.net/MUBOSScz/1-lipoproteins>].
10. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Bjålie JG. Menneskekroppen : Fysiologi og anatomi. 2. utg. ed. Oslo: Gyldendal Akademisk; 2006. 543 sider p.
11. Sentrifugert blodprøve ndla [Available from: <http://ndla.no/nb/node/110165>].
12. al. WGe. Samples: From the patient to the laboratory. 2nd Edition 2001 [
13. Pinto J, Domingues MR, Galhano E, Pita C, Almeida Mdo C, Carreira IM, et al. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics 2014 [updated Mar 07. 2014/01/21:[1168-77]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443722>].
14. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2015;407(17):4879-92.
15. Baylin A, Campos H. The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake 2006 [updated Feb. 2006/01/13:[22-7].
16. Abdelmagid SA, Clarke SE, Nielsen DE, Badawi A, El-Sohemy A, Mutch DM, et al. Comprehensive Profiling of Plasma Fatty Acid Concentrations in Young Healthy Canadian Adults San Francisco, CA USA: Public Library of Science; 2015 [updated 02/12 07/16/received 12/05/accepted. e0116195]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326172/>.
17. Susan K. Ratz DB, William Thomas, and Penny Kris-Etherton. Total Fat Intake Modifies Plasma Fatty Acid Composition in Humans [The American Society for Nutritional Sciences]. 2001 [Available from: <http://jn.nutrition.org/content/131/2/231.full>].
18. Holman RT. Control of polyunsaturated acids in tissue lipids 2013 [Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.1986.10720125>].
19. Pinal S Patel SJS, Eugene Jansen, Robert N Luben, Kay-Tee Khaw, Nicholas J Wareham, and Nita G Forouhi. Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: a pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort 2010 [Available from: <http://ajcn.nutrition.org/content/92/5/1214.full>].
20. BioActive Foods AS 2017 [Available from: <http://www.1life63.com/no/kostholdsrad-kilder-til-fettsyrer-i-kosten/kilder-til-fettsyrer-i-kosten#C16:0> , page 35.
21. PubChem 2017 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>].
22. Nervonic Acid: PubChem; [Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nervonic_acid#section=Top].
23. Ichihara Ki, Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. Journal of lipid research. 2010;51(3):635-40.
24. Christie WW. Methylation of fatty acids a beginner's guide 2017 [Available from: <http://lipidlibrary.aocs.org/History/content.cfm?ItemNumber=40363>].

25. Christie WW. Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis: AOCS Lipid Library; 2011 [Available from: <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=40374>].
26. Christie. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis, *Advances in lipid methodology* 2, e111 1993 [
27. Christie WW. PREPARATION OF ESTER DERIVATIVES OF FATTY ACIDS FOR CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS 1993 [The Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland DD2 5DA; 27]. Available from: http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/Importedfiles/lipidlibrary/topics/ester_93/file.pdf.
28. Introduction to Capillary GC injection techniques Chromedia Analytical Sciences2017 [Available from: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=wlgdcDsHonOvmOIIcCvBC&subNav=rwhpbjDsHonOvmOIIcCvBCyC>].
29. kofel m. Gas Chromatography Troublesshoting and Reference Guide 2005 [32]. Available from: <http://www.chromacademy.com/troubleshooter-gc/resources/gc-msp-troubleshooting-1.pdf>.
30. Agilent. Agilent J&W GC Column Selection Guide Agilent Technologies [268]. Available from: http://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf.
31. Texts CL. Gas Chromatography Chemistry Libre Texts2015 [Available from: https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography].
32. Greibrokk L, Rasmussen, Rasmussen, Kromatografi, separasjon og deteksjon 1994 [
33. Hinshaw JV. The Flame Ionization Detector 2005 [Available from: <http://www.chromatographyonline.com/flame-ionization-detector>].
34. Harley and Pretorius MaD. The Flame Ionization Detector (FID) [Available from: <http://www.chromatography-online.org/Chrial-GC/The-Flame-Ionization-Detector-FID.php>].
35. Agilent. Validation of Analytical Methods Agilent Technologies [76]. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>.
36. Behdad S. NA Dok. nr. 48a Klinisk kjemi 2004 [30]. Available from: <http://docplayer.me/2424080-Na-dok-nr-48a-klinisk-kjemi.html>.
37. International Council for Harmonisation (ICH) 1994 [Available from: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf].
38. Marangoni F, Colombo C, Galli C. A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip in humans: applicability to nutritional and epidemiological studies 2004 [267-72].
39. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification 1959 [updated Aug. 911-7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13671378>.
40. W.J.Dyer EGBa. A rapid method of total lipid extraction and purification [THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA]. 1959 [7]. Available from: <http://www.ncrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/o59-099>.
41. Agilent Tecnology 2017 [Available from: <http://www.agilent.com/home/more-countries?currPageURL=http://www.agilent.com/en-us/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/cp-wax-52-cb>].
42. Møller A. FattyAcids Molecular Weights and Conversion Factors [Danish Food Information]. 2011 [7]. Available from: <http://toolbox.foodcomp.info/References/FattyAcids/Anders%20Møller%20-%20-%20FattyAcids%20Molecular%20Weights%20and%20Conversion%20Factors.pdf>.
43. Jesuí Vergilio Visentainer TC, Oscar Oliveira Santos Jr, Lucas Ulisses Rovigatti Chiavelli and Swami Arêa Maruyama. Analytical Aspects of the Flame Ionization Detection in Comparison with Mass Spectrometry with Emphasis on Fatty Acids and Their Esters 2014 [19]. Available from: <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/46047.pdf>.
44. Michele M. Schantz CDPaRLS. Interlaboratory Analytical Comparison Study of Total Fatty Acid Concentrations in Human Serum: Results for Exercise 01: QA12FASER01 2013 [82]. Available from: http://ws680.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=913735.

45. Qi Sun JM, Hannia Campos, Susan E Hankinson, and Frank B Hu. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women 2007 [8]. Available from: <http://ajcn.nutrition.org/content/86/1/74.full.pdf>.
46. Claudia Glaser HD, and Berthold Koletzko. High-Throughput Analysis of Total Plasma Fatty Acid Composition with Direct In Situ Transesterification 2010 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2918509/>].
47. Wang JXKaJ. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. 2005.

9. Vedlegg

9.1. Regneark med rådata

Vedlagt som Excel fil.

9.2 Blankt regneark for rådata

Vedlagt som Excel fil.

9.3 Oversikt over forsøk

Vedleggstabell 9.3.1

Oversikt over forsøk. Om ikke annet er presisert under lagring, er metoden utført med ferskt blod.

Dato	Metode	Variasjon	Lagring	I resultattabell
21.februar	Utprøving metode 1 Utprøving metode 2			NEI
22.februar	Utprøving metode 1 Utprøving metode 2			NEI
27.februar	Metode 1, validering Metode 2, validering	Variasjon 4 Variasjon 2	Stått 2 døgn i kjøleskap før GC analyse	JA
6.mars	Metode 1, validering Metode 1	Variasjon 4 Variasjon 4		JA
7.mars	Metode 1	Variasjon 4	Blod fra 6.mars fryst i ett døgn, tint en gang	JA
8.mars	Metode 1 Metode 1	Variasjon 4 Variasjon 1, 2, 3, 4, 9, 10	Blod fra 6.mars fryst i to døgn, tint to ganger	JA
16.mars	Metode 1 Metode 2	Variasjon 2, 4 Variasjon 1,2		JA
7.april	Metode 1 Metode 2	Variasjon 5, 6, 7, 8		JA

		Variasjon 3		
11.april			Vialer lagret i GC maskin fra 7. april analysert på nytt	JA
18.april	Metode 1	Variasjon 5	Lagring av vial, dag 0	JA
19.april			Lagring av vial, dag 1	JA
20.april			Lagring av vial, dag 2	JA
21.april			Lagring av vial dag 3	JA
22.april			Lagring av vial dag 4	JA
24.april	Test ekstraksjon			NEI
25.april	Metode 1 med ekstraksjon etter Bligh and Dyer i forkant	Variasjon 5		JA
	Metode 1	Variasjon 5		

9.4 Datablader

Isooktan

R-setninger

- R11 Brannfarlig
R38 Irriterer huden
R50/53 Meget giftig for vannlevende organismer (kan forårsaker uønskede langtidsvirkninger i vannmiljøet)
R65 Farlig (kan forårsake lungeskade ved svelging)
R67 Damp kan forårsake døsighet og svimmelhet

S-setninger

- S9 Oppbevares på et godt ventilert sted
S16 Holdes vekk fra antenneskilder - røyking forbudt
S29 Må ikke tømmes i kloakkavløp
S33 Ta forholdsregler mot statisk elektrisitet
S60 Dette kjemikaliet og dets emballasje skal behandles som farlig avfall
S61 Unngå utslipp til miljøet
S62 Ved svelging må ikke brekning fremkalles, kontakt lege omgående og vis etiketten

HCl (Saltsyre)

R-setninger

- R34 Etsende.
R37 Irriterer luftveiene

S-setninger

- S26 Får man stoffet i øynene; skyll straks grundig med store mengder vann og kontakt lege
S45 Ved uhell eller illebefinnende er omgående legebehandling nødvendig; vis etiketten om mulig

MeOH (Metanol)

R-setninger

- R11 Meget brannfarlig
R23/24/25 Giftig ved innånding, hudkontakt og svelging
R39/23/24/25 Giftig, fare for helseskade ved innånding, hudkontakt og svelging

S-setninger

- S7 Emballasje skal holdes tett/lukket
S16 Holdes vekk fra antenneskilder - røyking forbudt
S36/37 Bruk egnet verneutstyr og bekledning
S45 Ved uhell eller illebefinnende er omgående legebehandling nødvendig, vis etiketten om mulig

KCl (Kaliumklorid)

R-setninger

- R-22 Farlig ved svelgning

S-setninger Ikke oppgitt

BF₃ (Boron trifluoride)

R-setninger

- R26 Meget giftig ved innånding
R35 Sterkt etsende
R14 Reagerer voldsomt med vann

S-setninger Ikke oppgitt

NaOH (Natriumhydroksid)

R-setninger

- R-35 Sterkt etsende.

S-setninger

- S-26 Får man stoffet i øynene; skyll straks grundig med store mengder vann og kontakt lege.
S-37/39 Bruk egnede vernehansker og vernebriller/ansiktsskjerm.
S-45 Ved uhell eller illebefinnende er omgående legebehandling nødvendig; vis etiketten om mulig.

Kloroform (CHCl₃)

R-setninger

- R-22 Farlig ved svelging.
R-38 Irriterer huden.
R40 Mulig fare for kreft
R-48/20/22 Farlig: alvorlig helsefare ved lengre tids påvirkning ved innånding og svelging.

S-setninger

- S-2 Oppbevares utilgjengelig for barn.
S36/37 Bruk egnede verneklær og vernehansker.

