

Short Path Distillation - En ny metode for analyse av flyktige forbindelser i marine oljer

Hannah Andal

Industriell kjemi og bioteknologi

Oppgaven levert: Juni 2011

Hovedveileder: Marit Aursand, IBT

Biveileder(e): Ivar Storrø, SINTEF Fiskeri og havbruk
Revilija Mozuraityte, SINTEF Fiskeri og havbruk
Ana Karina Carvajal, SINTEF Fiskeri og havbruk

Erklæring

Det erklæres med dette at arbeidet presentert i denne oppgaven er utført selvstendig og i samsvar med Reglement for sivilarkitekt- og sivilingeniøreksamen ved Norges tekniske og naturvitenskapelige universitet.

Trondheim, 27. juni 2011

Hannah Andal

Forord

Denne oppgaven ble utført på grunnlag av emnet TBT4900 Bioteknologi, masteroppgave, vår 2011, ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven er gitt av SINTEF Fiskeri og havbruk og er en del av MARTEC, ”Teknologi for fremstilling av marine oljer”. Dette er et samarbeidsprosjekt mellom SINTEF Fiskeri og havbruk og bedriftene Marin Harvest Ingredients, Tine, Maritex AS og Denomega Nutritional Oils. Det praktiske arbeidet er utført ved laboratoriene til SINTEF fiskeri og havbruk og NTNU Senter for fiskeri og havbruk (Sealab.)

Jeg vil gjerne takke mine veiledere ved SINTEF fiskeri og havbruk, Revilija Mozuraityte, Ivar Storrø, Ana Karina Carvajal og faglærer Marit Aursand for god hjelp både til det praktiske arbeidet på lab og informative diskusjoner. En spesiell takk rettes til Revilija Mozuraityte som alltid stiller opp og som alltid er blid og interessert. Ivar Storrø, du vet å stille de riktige spørsmålene og du er en utrolig kilde til kunnskap. Jeg er takknemlig for deres innspill og forslag underveis i arbeidet.

I tillegg vil jeg takke Egidijus Dauksas, og Marte Schei også ved SINTEF fiskeri og havbruk for hjelp til praktisk utførelse på lab og god innsikt. Ved NTNU Senter for fiskeri og havbruk, vil jeg takke Tora Bardal for opplæring på lab og for at hun alltid er behjelpelig. Ragne Marie Skarra, takk for korrekturlesing og for at du alltid stiller opp for meg. Takk også til Kolbjørn Zahlsen og Torunn Holten ved SINTEF Materialer og kjemi for GC-MS analyser.

Jeg er takknemlig ovenfor både studenter og ansatte ved Sealab for et trivelig miljø det siste året av mitt studie. Sist, men ikke minst vil jeg takke min familie som alltid har tro på meg. Min kjære Heljar, Ragne, Ingrid og Anette, lange dager på lesesalen har ikke vært så verst, fordi dere var der.

Sammendrag

Dette prosjektet ble satt i gang på grunnlag av et ønske om en ny metode for analyse av flyktige forbindelser i marine oljer. En ønsker å se på hvilke flyktige forbindelser som finnes i oljen under normale forhold. Det er da viktig at det ikke dannes degraderingsprodukter som følge av metoden. Ved Short-Path Distillation, SPD, opereres det med lavt trykk, helt ned til 0,001 mbar. Dette gir en lavere fordampningstemperatur slik at flere, og tyngre forbindelser kan destilleres av oljen ved en lavere temperatur.

Muligheten for å separere oksidasjonsprodukter fra marine oljer ved SPD og innvirkning av fødehastighet og oppholdstid på mengde forbindelser som destilleres av oljen er studert. Som råstoff ble sildolje produsert ved ulik prosess (termisk behandlet og hydrolysert) benyttet, i tillegg til en fiskeolje bestående av 12 til 15 % sild. I forprosjektet til denne oppgaven ble antioksidanten BHT identifisert i sildoljen produsert ved hydrolyseprosess. Sildoljen var ikke tilsatt antioksidanter. Det er derfor lagt vekt på å studere hvordan denne forbindelsen er havnet i oljen og i hvilken konsentrasjon den er tilstede. Råoljen samt retentat, destillat og kondensat etter separasjon i SPD er analysert ved mengde konjugerte forbindelser, peroksidverdi, anisidinverdi og GC-MS.

Ut fra resultatene oppnådd i denne oppgaven kan det konkluderes med at Short-Path Distillation egner seg som metode for å separere de flyktige forbindelsene fra marine oljer. I tillegg til tyngre flyktige forbindelser kan muligens lettere forbindelser fanges ved å utstyre kolonnen med en mer effektiv kuldefelle og/eller en adsorbent før utgangen til vakuumpumpa. For kolonnen brukt i dette forsøket tyder resultatene på at oppholdstiden bør holdes mellom 16 og 22 sekunder. Dette tilsvarer fødehastighet på mellom 7.1 ml/min og 2,8 ml/min.

De flyktige forbindelsene som er identifisert er hovedsakelig tyngre flyktige forbindelser (fra 9 til 27 karbon). Pristan utgjør den største toppen på GC-MS kromatogram i sildoljen. Denne forbindelsen samt fytol stammer mest sannsynlig fra degradering av α - tokoferol og karotenoider i fytoplankton og inkorporeres i lipidlaget til sild gjennom næringskjeden.

Kilden til BHT i oljen er ikke funnet. Det er imidlertid avkrefte av BHT kommer fra forhold under selve separasjonen eller enzymblanding tilsatt ved hydrolyse av oljen. Det er beregnet at sildolje produsert ved hydrolyseprosess inneholder minst 0,0017 mM BHT, dette tilsvarer 0,37 mg BHT/L olje. Mengden BHT i oljen er under den lovlige grensen for tilsetning av BHT i animalske oljer og fett.

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|------------|
| Erklæring | i |
| Forord | iii |
| Sammendrag | v |
| 1 Innledning | 1 |
| 2 Teori | 3 |
| 2.1: Bakgrunn..... | 3 |
| 2.2: Generelt om marine lipider..... | 5 |
| 2.3: Marine oljer og oksidativ harskning..... | 6 |
| 2.4: Antioksidanter..... | 11 |
| 2.4.1: Primære antioksidanter..... | 11 |
| 2.4.2: Sekundære antioksidanter..... | 13 |
| 2.4.3: Antioksidanter i marine oljer..... | 13 |
| 2.4.4: BHT..... | 15 |
| 2.5: Analyse av flyktige forbindelser i marine oljer..... | 16 |
| 3 Eksperimentelle teknikker | 18 |
| 3.1: Short-Path Distillation..... | 18 |
| 3.2: Spektrofotometrisk analyse og konjugerte forbindelser..... | 21 |
| 3.3: Gasskromatografi-massespektrometri..... | 23 |
| 3.4: Peroksidverdi..... | 24 |
| 3.5: Anisidinverdi..... | 25 |
| 4 Materialer og metoder | 26 |
| 4.1: Råstoff..... | 26 |
| 4.2: Kjemikalier..... | 27 |
| 4.3: Metoder..... | 28 |
| 4.3.1: Separasjon i SPD..... | 29 |
| 4.3.2: SPD, fødehastighet og oppholdstid..... | 30 |
| 4.3.3: BHT..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.4: Absorbans-scan | 32 |
| 4.3.5: Peroksidverdi..... | 33 |
| 4.3.6: Anisidinverdi..... | 33 |
| 4.3.7: Gasskromatografi-massespektrometri | 33 |
| 5 Resultater | 34 |
| 5.1: SPD, fødehastighet og oppholdstid..... | 34 |
| 5.2: SPD, oljer produsert ved forskjellig prosess og anlegg | 37 |
| 5.3: Sildolje tilsatt BHT | 40 |
| 5.4: GC-MS | 41 |
| 6 Diskusjon | 45 |
| 6.1: SPD, fødehastighet og oppholdstid..... | 45 |
| 6.2: SPD, oljer produsert ved forskjellig prosess og anlegg | 47 |
| 6.3: Olje tilsatt BHT | 49 |
| 6.4: GC-MS | 50 |
| 7 Konklusjon..... | 53 |
| Litteraturhenvisninger | 55 |
| Vedlegg A: Prosessering av olje | 60 |
| Vedlegg B: Konjugerte forbindelser | 64 |
| Vedlegg C: Peroksidverdi..... | 72 |
| Vedlegg D: Anisidinverdi | 74 |
| Vedlegg E: BHT | 1 |
| Vedlegg F: Usikkerhet | 5 |
| Litteraturliste vedlegg..... | 6 |

1 Innledning

Marine oljer har fått økende oppmerksomhet grunnet det naturlige høye innholdet av langekjedede, flerumettede fettsyrer. Spesielt omega-3 (også betegnet n-3) serien av fettsyrer er tildelt mye oppmerksomhet. Økende grad av dokumentasjon viser at disse fettsyrene har en gunstig effekt på en rekke aspekter innenfor helse. På grunnlag av dette er det anbefalt jevnt inntak av marine måltider eller oppkonsentrerte omega-3 kosttilskudd. Grunnet det høye innholdet av reaktive dobbeltbindinger er dessverre marine oljer svært utsatt for oksidativ harskning. Dette fører til dannelse av oksidasjonsprodukter som gir oljen uønsket lukt og smak, det er også mulig at enkelte oksidasjonsprodukter kan ha negativ helseeffekt.

For å oppnå marine oljer med trygg og naturlig smak, må de bearbeides og renses. I tillegg til å fjerne lukt- og smakskomponenter, er det ønskelig å fjerne pro-oksidanter samt miljøgifter. Forbindelser som medvirker til lukt og smak er ofte lavmolekylære flyktige forbindelser dannet under harskningsprosessen. Analyse av oljens flyktige forbindelser er et viktig ledd for å kunne forbedre prosesseringen og dermed kvaliteten på oljen.

Det er utviklet flere metoder for rensing og prosessering av marine oljer. ”Short Path Distillation” (SPD), også kaldt molekylærdestillering, er en separasjonsprosess som benyttes av industrien (Pronova, EPAX) til rensing av fiskeoljer. Dette er en væske-gass separasjon basert på forskjell i kokepunkt. Fordelen med SPD som metode er at destillasjonsprosessen opereres under tilnærmet vakuum. De flyktige forbindelsene kan dermed drives av ved en lavere temperatur slik at oljen ikke skal ta skade.

Dette prosjektet tar for seg muligheten for å fjerne oksidasjonsprodukter fra oljen ved bruk av SPD. Innvirkning av parametere som destillasjonstemperatur og fødehastighet vil bli studert.

Hovedmålsettingen for oppgaven er å øke kunnskapen innenfor analyse av oksidasjonsprodukter som dannes under oksidativ harskning av marine oljer. Oksidasjonsproduktene, som fjernes ved SPD, vil bli analysert ved ulike teknikker som spektrofotometrisk analyse av konjugerte forbindelser, peroksid- og anisidinverdi i tillegg til mer avanserte teknikker som GC-MS.

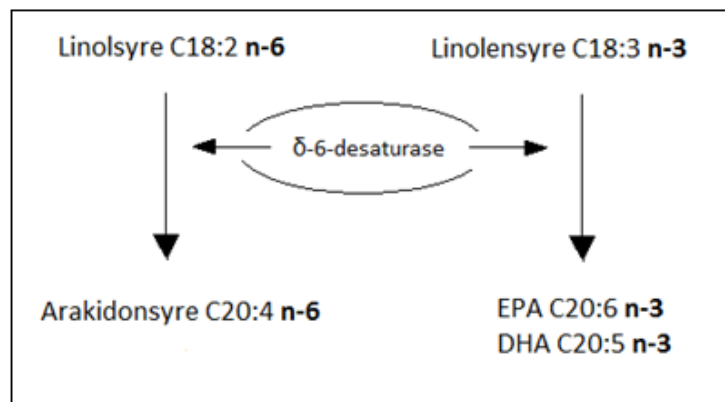
Under forprosjektet til denne oppgaven ble den syntetiske antioksidanten butylhydroxy-toluen (BHT) identifisert i både lakseolje og sildolje. Dette er interessant da oljene ikke var tilsatt BHT. Det er i denne oppgaven derfor spesielt satt fokus på å studere nærmere denne forbindelsens tilstedeværelse i oljen. Det er ønskelig å finne ut hvordan denne forbindelsen havner i oljen og i hvilken konsentrasjon den er tilstede.

2 Teori

2.1: Bakgrunn

Interessen for omega-3 fettsyrer startet på 1970 tallet da Bang, Dyerberg og Nielsen la frem en rapport om svært lave tall for hjerte- og karsykdommer - til tross for en tradisjonsrik kost rik på fett, mettede fettsyrer og kolesterol - hos eskimoer på Grønland. Dette ble forklart ved et høyt inntak av langkjedede omega-3 fettsyrer [1, 2]. Økende grad av dokumentasjon har siden dette vist til at langkjedede, flerumettede fettsyrer, spesielt omega-3 fettsyrene EPA og DHA, kan ha en gunstig effekt på en rekke aspekter innenfor helse. Det er spesielt vedkjent at inntak virker forebyggende mot hjerte- og karsykdommer, en tilstand som rammer stadig flere i vårt samfunn. Det er også indikasjoner på at inntak virker positivt inn på immunsystemet, mental helse, syn, ledd og utvikling av foster.[3] [4] [5]

Langkjedede fettsyrer kan ikke syntetiseres denovo i kroppen. Mennesket kan syntetisere fettsyrer med opp til 18 karbon, og dobbeltbindingene settes som regel inn mellom C9 og C10 fra karboksylenden. Langkjedede fettsyrer kan imidlertid syntetiseres fra de essensielle fettsyrene linolsyre C18:2 n-6 og linolensyre C18:3 n-3. Arakidonsyre, som er en ω -6 fettsyre syntetiseres fra linolsyre, mens ω -3 serien med EPA og DHA syntetiseres fra linolensyre (figur 2.1) [6] [7]



Figur 2.1: Synteseveien for langkjedede fettsyrer fra de essensielle fettsyrene linolsyre og linolensyre

Felles i disse to synteseveiene er enzymet δ -6-desaturase. I utgangspunktet er dette enzymet mest effektivt mot omega-3 serien [4]. Men inntaket, og derfor plasmakonsentrasjonen av omega-6 fettsyrer er hos de fleste betydelig høyere enn for omega-3 fettsyrer. I tillegg er konversjonsraten fra linolensyre til EPA og DHA lav [7-9]. Av denne grunn syntetiseres det ikke tilstrekkelig mengde omega-3 fettsyrer fra linolensyre.

På grunnlag av dette er det viktig at vi får i oss omega-3 fettsyrer, enten ved inntak av marine måltider eller i form av oppkonsentrerte kosttilskudd. Anbefalt inntak er 200 mg omega-3 fettsyrer per dag, eller to middager per uke bestående av fisk. I tillegg bør forholdet mellom omega-6 og omega-3 i dietten ligge på 4:1 [1, 10]. Dette er dessverre langt under det reelle inntaket i den vestlige verden. En måte å øke inntaket av langkjedede, flerumettede omega-3 fettsyrer er å berike produkter som forbrukes i stor grad. Det er ønsket at marine oljer skal tilsettes matvarer i større grad for å oppnå en forhøynet næringsverdi (betegnes funksjonell mat.) Det er satt strenge krav til kvalitet for oljer som skal inkorporeres i funksjonell mat slik at oljen ikke påvirker smak og holdbarhet i negativ retning. I den sammenheng er det viktig å forstå hvilke mekanismer som fører til kvalitetstap på oljen. Disse mekanismene, samt hvordan de ulike reaksjonsproduktene reagerer med andre forbindelser, både i maten og i kroppen, er per i dag ikke fullstendig forstått. Kvalitetstap av oljen gjør den mindre akseptabel eller uakseptabel for konsumenter og for industrien. Harsk olje gir ikke bare oljen uønsket lukt og smak, det er også mulig at oksidasjonsprodukter reduserer helsegevinsten ved inntak.

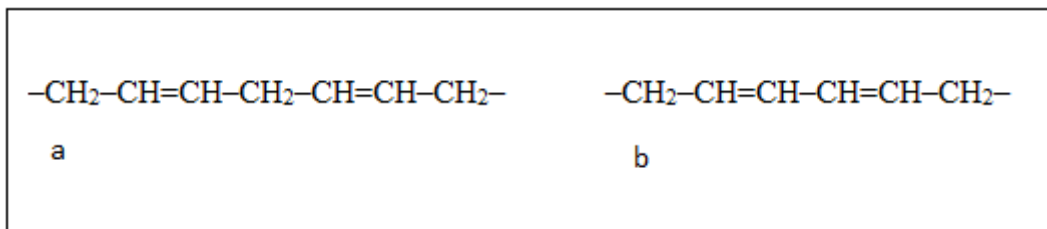
Ved å studere oksidasjonsproduktene som dannes er det mulig å oppnå bedre forståelse for reaksjonsmekanismer ved oksidativ harskning. Analyse av hvilke forbindelser som dannes gir også grunnlag for større innsikt for eventuelle reaksjoner mellom biomolekyler både i matvarer og i kroppen. Økt forståelse for oksidasjonsmekanismen gir grunnlag for optimalisering av betingelser ved prosessering og rensing. Slik kan vi oppnå marine oljer med trygg og naturlig smak.

2.2: Generelt om marine lipider

Fettsyrer er organiske forbindelser og syntetiseres med likt antall karbon i en uforgreinet kjede. Disse danner oftest mono-, di- og triglyserider der karboksylenden er bundet til glyserol. Fettsyrene forekommer også som frie fettsyrer, fosfolipider og voksester. Umettede fettsyrer har fra en til seks dobbeltbindinger, som regel i cis konformasjon. [11]

Fettsyrer er ofte navngitt med forkortelse. For linolsyre er denne forkortelsen C18:2 n-6 som betegner at fettsyren har 18 karbon, to dobbeltbindinger der den lengst fra karboksylenden er plassert mellom C6 og C7, herav n-6 (eller ω-6) fettsyre.

Dersom fettsyrene har en eller flere separate dobbeltbindinger kalles de metylen avbrutte. Konjugerte fettsyrer har vekselvis enkel og dobbeltbindinger, se figur 2.2 [6]

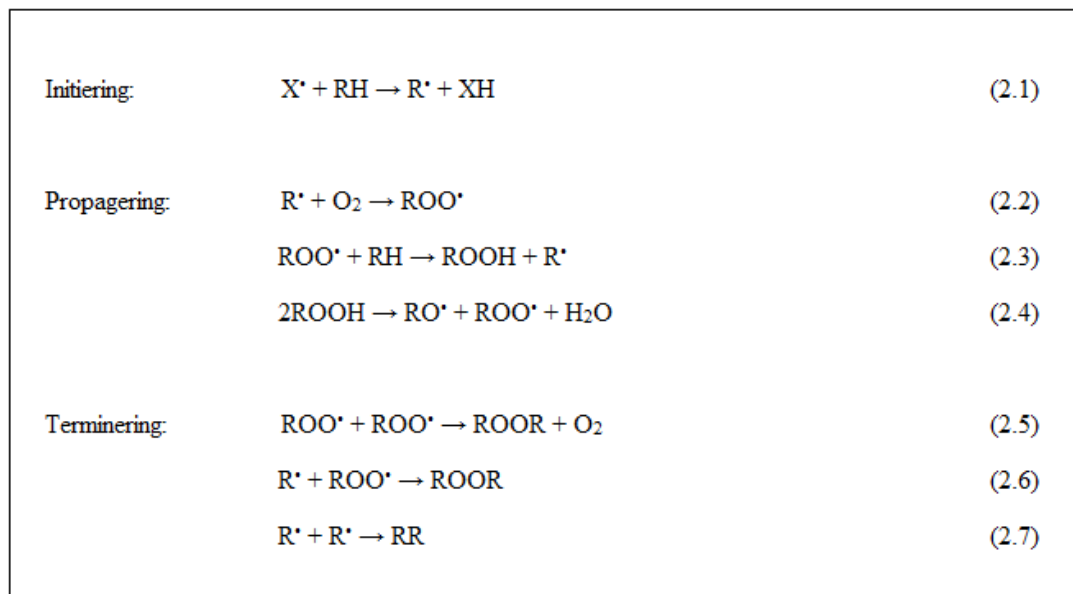


Figur 2.2: Umettede fettsyrer. a: metylen avbrutte fettsyrer. b: konjugerte fettsyrer.

Marine oljer har en kompleks sammensetning og inneholder kolesterol, kolesterol-estere, frie fettsyrer, mono-, di- og triglyserider, fosfolipider, voksester, pigmenter, antioksidanter og oksidasjonsprodukter [12] Forholdet mellom disse varierer fra kilde til kilde. Størsteparten av fettsyrene forekommer som triglyserider. Fettsyrer som er unike for marine oljer er ω-3 fettsyrene 18:4, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5 og 22:6 [13]. Disse langkjedede, flerumettede fettsyrene er oftest plassert i midten (sn-2 posisjon) på triglyseridet, antagelig for beskyttelse mot oksidasjon. [11, 14, 15]

2.3: Marine oljer og oksidativ harskning

Nettopp fordi marine oljer har et høyt innhold av umettede fettsyrer er de spesielt utsatt for oksidativ harskning. Lipider kan utsettes for autooksidasjon, fotooksidasjon, termisk oksidasjon og/eller enzymatisk oksidasjon [16]. Mest relevant i denne oppgaven er autooksidasjon og termisk oksidasjon som skjer gjennom en rekke trinn, der det i den initiale fasen dannes frie radikaler. Disse reagerer videre med oksygen til hydroperoksider og flere frie radikaler i en kjedereaksjon, kalt propageringsfasen. Reaksjonen holdes i gang til det i termineringsfasen dannes stabile, ikke-radikale produkter. [17]. Den overordnede reaksjonsmekanismen for oksidativ harskning, delt inn i de tre fasene initiering, propagering og terminering er gitt i ligningene 2.1 til 2.7 i figur 2.3.



Figur 2.3: Forenklet mekanisme for autooksidasjon. [6] [18]

Hvordan oksidasjonsprosessen starter er per i dag ikke fullstendig forstått. Oksygen i grunntilstand kan ikke reagere direkte med lipidenes dobbeltbindinger fordi disse har motsatt spinn, se ligning 2.8. Oksygen har to uparede elektroner med samme spinn og

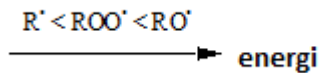
får med dette positiv netto vinkelmoment. Dobbelbindingen i lipidet har kun parede elektroner med motsatt spinn og dermed null netto vinkelmoment. Kvantemekanikken krever at vinkelmoment bevares i reaksjoner. Initieringen er derfor ingen spontan reaksjon. [19] [20]



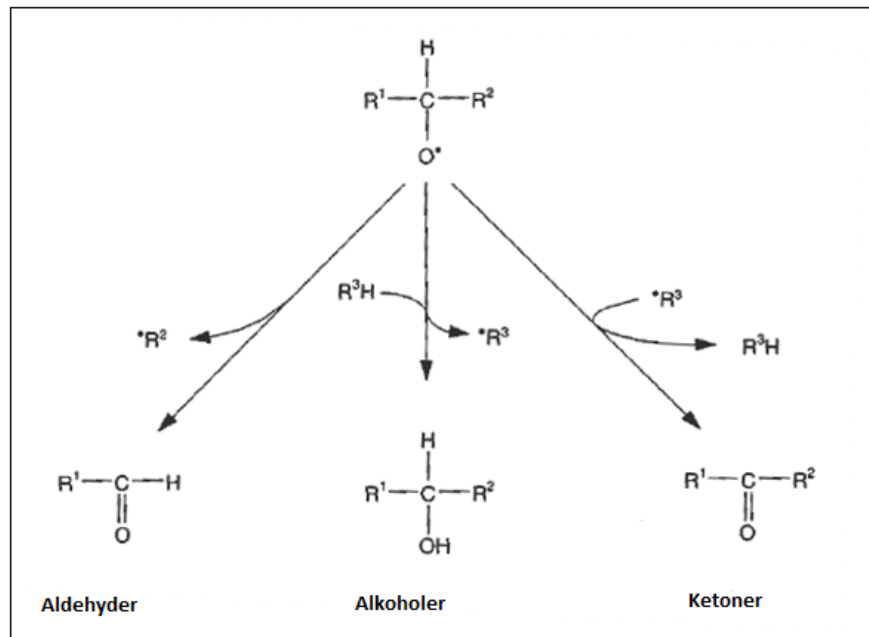
For at initieringen skal finne sted er tilstedeværelse av katalysatorer nødvendig. Disse kan fjerne et elektron fra lipidet eller oksygenet, eller forandre oksygenets spinn. Metaller, UV lys, høy temperatur og enzymer er eksempler på slike katalysatorer. [19]

Lipid oksidasjon er autokatalytisk, når reaksjonen er startet vil den fortsette som en selvakselererende propageringsreaksjon. Alkylradikal (R^\bullet) dannet i initieringen kan reagere med oksygen (ligning 2.2) og danne peroksyradikal (ROO^\bullet). Peroksyradikal har mer energi og vil reagere videre med en umettet fettsyre og danne et hydroperoksid (ROOH) i tillegg til et nytt alkylradikal (R^\bullet) (ligning 2.2 og 2.3) [18]. Dannelse av peroksid i umettede fettsyrer fører til et skift i posisjon for dobbeltbindingen slik at det dannes et konjugert hydroperoksid. [21].

Hydroperoksider (ROOH) dannes altså som primært oksidasjonsprodukt. Disse er relativt ustabile og vil brytes ned, via peroksy- og alkoksyradikal intermediatene, til sekundære oksidasjonsprodukter [22]. Fra ligning 2.7 kan det sees hvordan alkoksyradikal og peroksyradikal dannes fra to hydroperoksider. Alkoksyradikal (RO^\bullet) har høyere energi-tilstand enn både alkylradikal (R^\bullet) og peroksyradikal (ROO^\bullet) (ligning 2.9) og kan inntre i flere type reaksjoner. Alkoksyradikal kan blant annet angripe en umettet fettsyre, en pentadiengruppe i samme fettsyre eller de kovalente bindingene ved siden av alkoksyradikalet i en såkalt β -scission reaksjon [18]. Alkohol, ketoner, aldehyder, estere, flyktige organiske syrer, epoksyforbindelser og kortkjedede hydrokarboner er blant de sekundære oksidasjonsproduktene [20]. En skjematisk illustrasjon av hvordan aldehyder, alkohol og ketoner dannes fra alkoksyradikal er gitt i figur 2.4. I tillegg til de sekundære oksidasjonsproduktene dannes det også nye frie radikaler som er med på å holde kjedereaksjonen i gang.



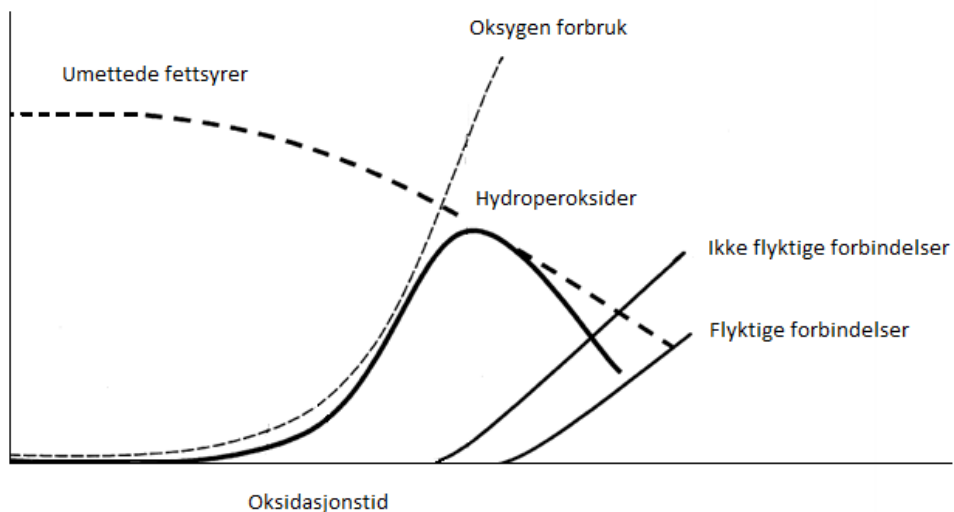
(2.9)



Figur 2.4: Dannelse av stabile sluttprodukter fra alkoksyradikaler. [6]

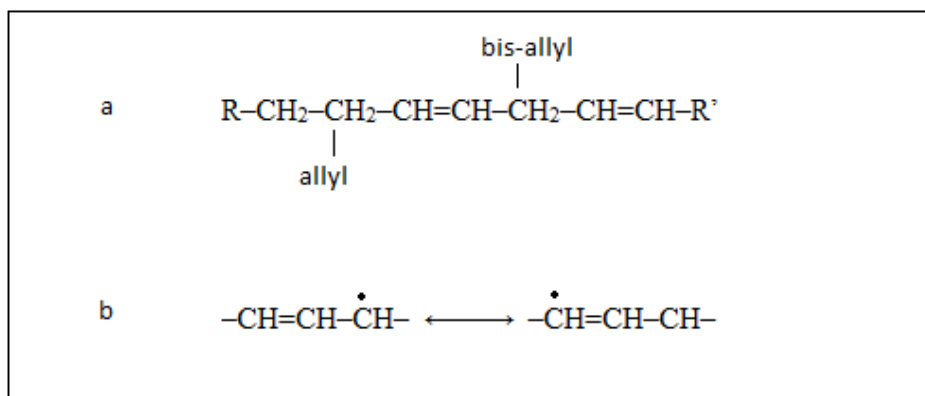
Det er de sekundære oksidasjonsproduktene som forbindes med harsk lukt og smak. Mange av disse har lave terskelverdier slik at deres tilstedeværelse vil påvirke oljens kvalitet selv i lave konsentrasjoner.

Figur 2.5 gir en generell fremstilling av hvordan autooksidasjon utarter seg over tid. Vanligvis vil det initialt være en lag-fase der det er lite forandring i lipidsammensetningen. Denne følges av en ofte eksponentiell kurve som tilsvarer propageringsfasen. Her vil hydroperoksider akkumuleres før de sekundære forbindelsene dannes. I figuren er det skilt mellom flyktige og ikke flyktige forbindelser. Her utgjør lavmolekylære forbindelser som aldehyder de flyktige, mens de ikke flyktige forbindelsene er oksiderte fettsyrerester som sitter fast i triglyseridet (ofte kalt core-aldehyder) [23]



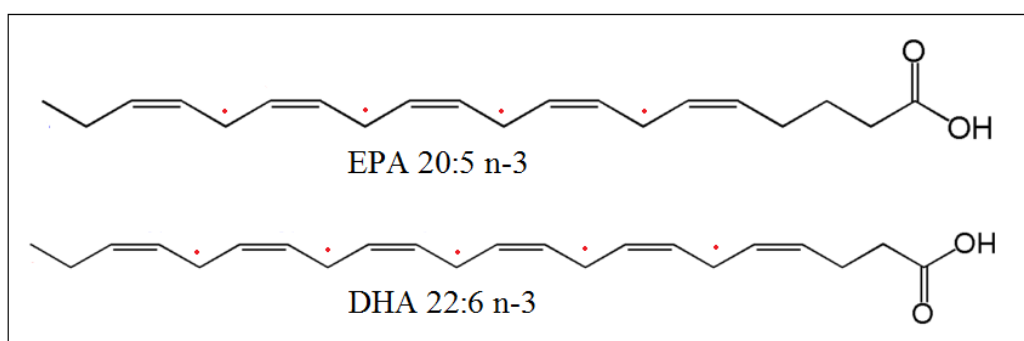
Figur 2.5: Sammenheng mellom kinetikk og autooksidasjon av flerumettede fettsyrer. [24]

Marine oljer er spesielt utsatt for kvalitetstap ved lagring. Grunnen til dette er som nevnt deres høye grad av umettede fettsyrer. Umettede fettsyrer er spesielt utsatt for angrep på grunn av lavere bindingsenergi for hydrogen i bis-allyl og allyl posisjon sammenlignet med hydrogen i metylen posisjon (se figur 2.6.) I tillegg vil radikal intermedietet stabiliseres av resonans [25].



Figur 2.6: a: Hydrogen i allyl og bis-allyl posisjon. b: Resonansstabilisering

Autooksidasjonsraten av flerumettede, langkjedede lipider øker omtrent to ganger for hver aktive bis allyl- metylen gruppe på molekylet [12, 26]. Av figur 2.7 kan det sees at EPA har fire slike grupper mens DHA har fem. Radikaldannelse kan skje i alle disse posisjonene og oksygen kan reagere på begge sider av radikalet. Det kan slik dannes henholdsvis åtte og ti forskjellige isomere av hydroperoksid for EPA og DHA. Dette gir utspring for et komplekst bilde av oksidasjonsprodukter.



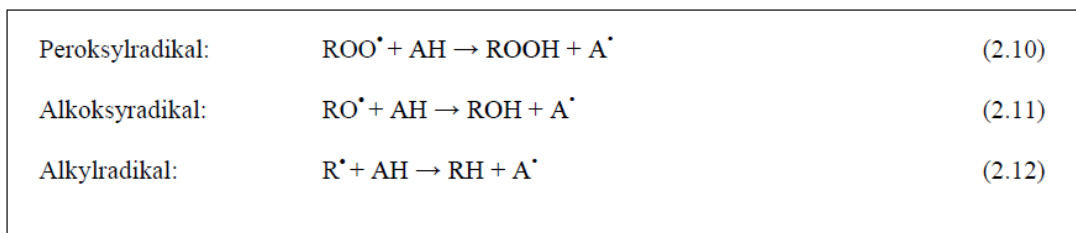
Figur 2.7: Strukturformel for EPA og DHA der bis allyl metylen grupper er merket

2.4: Antioksidanter

Antioksidanter i mat er forbindelser som kan forsinke, bremse eller forhindre harskning som resultat av oksidasjon [27]. Dersom antioksidanter skal tilsettes mat, må det være forbindelser som er rimelige, effektive ved lave konsentrasjoner og ikke ha skadelige (toksiske) virkninger. De tilsettes ikke for å fremme eller forbedre, men for å bevare kvalitet og for å forlenge holdbarhet. [28]

2.4.1: Primære antioksidanter

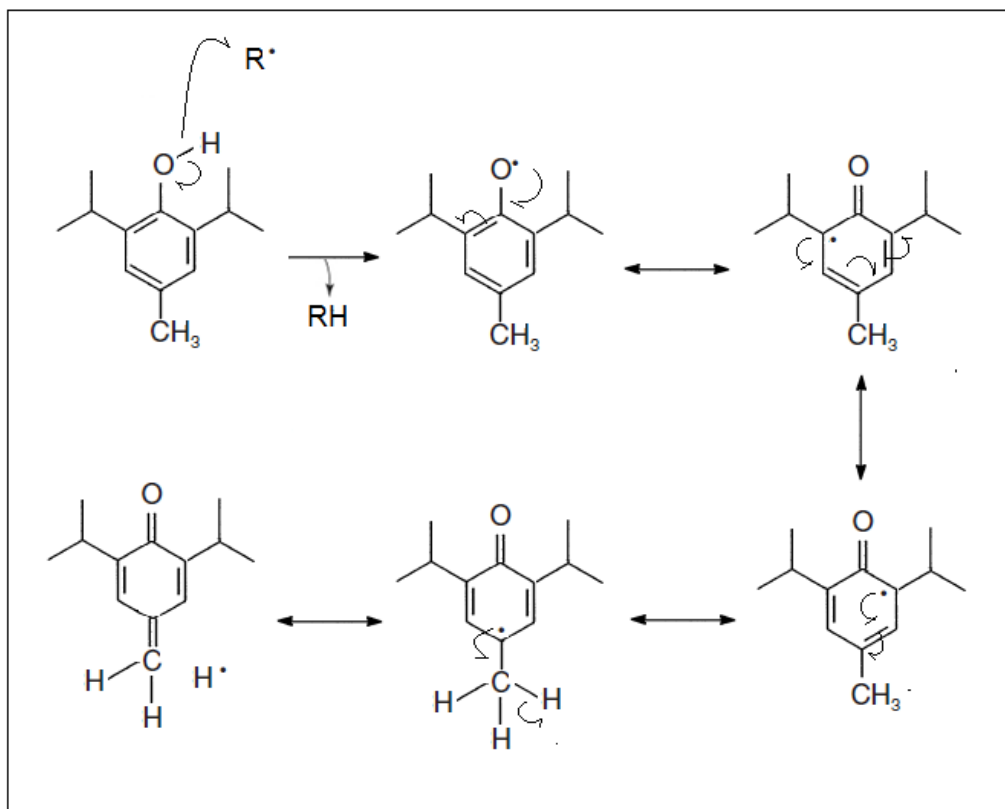
Antioksidanter deles inn i to kategorier (primære og sekundære) etter virkemekanisme. De primære antioksidantene hindrer dannelse av nye hydroperoksider ved å stoppe frie radikaler. En forenklet forklaring av reaksjonsmekanisme er gitt i figur 2.8. En primær antioksidant (AH) fungerer som hydrogenonor. Reaksjon med radikaler danner stabile, ikke-radikale produkter (ROOH, ROH og RH) i tillegg til et antioksidantradikal (A^{\bullet})



Figur 2.8: Forenklet mekanisme for virkning av primære antioksidanter [28].

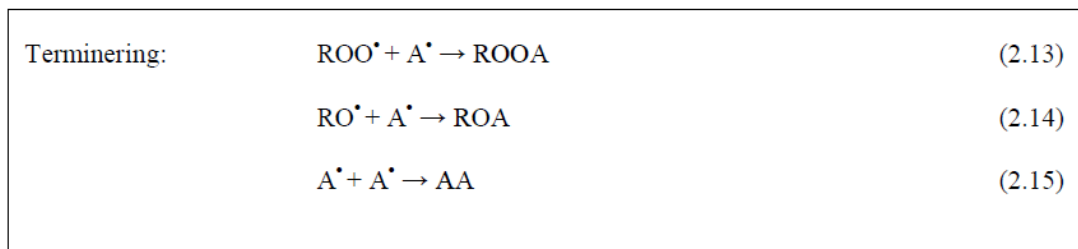
Primære antioksidanter er ofte fenolforbindelser. Tokoferol, flavenoider og syrer av fenoler tilhører gruppen av vanligst forekommende naturlige antioksidanter [25]. Hydroksylgruppen er ofte sterisk hindret av substituerte grupper i orto og/eller para posisjon. Dette gir høyere elektrontetthet rundt hydroksylgruppen og reduserer bindingsenergien mellom hydrogen og oksygen [25, 29]. For slike forbindelser vil også antioksidantradikalet som dannes stabiliseres ved resonans (delokalisering av det uparede elektronet.) Stabilisering av antioksidantradikalet fører til lav reaktivitet mot

oksygen og lipider slik at propageringsfasen bremses. [28] Et eksempel på resonansstabilisering av antioksidanten BHT er gitt i figur 2.9.



Figur 2.9: Resonansstabilisering av antioksidanten BHT

En antioksidant kan stoppe to frie radikaler. Det første ved å donere hydrogen som vist i figur 2.8. Det andre nøytraliseres i en termineringsreaksjon der antioksidant-radikalet reagerer med enten et peroksyradikal, et alkoksyradikal eller et andre antioksidantradikal (danner dimer, AA) [28]. Forenklet reaksjonemekanisme er gitt i figur 2.10.



Figur 2.10: Termineringsreaksjoner for antioksidant radikal, forenklet reaksjonsmekanisme. [28]

2.4.2: Sekundære antioksidanter

Sekundære antioksidanter er forbindelser som ved ulike mekanismer forhindrer initiering og dekomponering av hydroperoksider. Sekundære antioksidanter virker ved å binde opp metallioner, forbruke oksygen, regenerere primære antioksidant-radikaler, omdanne hydroperoksider til ikke radikale forbindelser, absorbere UV stråling eller deaktivere singlet oksygen [27]

Mange forbindelser oppfyller ett eller flere av disse kravene. Eksempler på sekundære antioksidanter er askorbinsyre, sitronsyre og etylendiamintetraeddiksyre (EDTA.) Inhibering av oksidasjonsprosessen kan optimaliseres i større grad dersom flere av disse forbindelsene er tilstede samtidig. Askorbinsyre har for eksempel multieffekt som antioksidant, den binder metallioner og fjerner oksygen. Askorbat regenererer også radikalformen av α -tokoferol, disse to brukes derfor ofte i kombinasjon [30]

2.4.3: Antioksidanter i marine oljer

Alle levende organismer har behov for å beskytte sine celler mot oksidasjonsskader. Naturlige antioksidanter forekommer derfor i alle levende organismer. Marine oljer inneholder som regel naturlige antioksidanter, som tokoferol og astaxanthin. Disse syntetiseres i planter og lavtstående organismer og tas opp i fisken gjennom kosten. I tillegg tilsettes det gjerne syntetiske antioksidanter som butyl-hydroxy-anisol (BHA), butyl-hydroxy-toluen (BHT) t-butylhydroquinone (TBHQ), propyl-gallate (PG) og

ethoxyquin (EQ) for å stabilisere oljene etter prosessering [28]. For å øke løseligheten i marine oljer er syntetiske fenolforbindelser alltid substituert med alkylgrupper [25, 31].

Tokoferoler er den viktigste gruppen av lipidløselige naturlig antioksidanter. Disse er primære antioksidanter og forekommer i fire forskjellige isomerer (α , β , γ og δ), avhengig av mengde og posisjon av metylering på ringstrukturen [30]. α -tokoferol kalles også vitamin E. Gjennom kommersiell raffinering og deodorisering av fiskeoljer tapes en del av det naturlige innholdet av tokoferol [12].

Antioksidanter som tilsetningsstoffer klassifiseres gjerne i to grupper. Den ene gruppen tilsettes for å bevare lukt mens den andre gruppen tilsettes for å bevare/forbedre farge [32]. Karotenoidet astaxanthin er for eksempel et pigment som er ansvarlig for den røde fargen i laks. Astaxanthin tilsettes i fôret til oppdrettslaks, slik at den røde fargen fremmes [33]. Antioksidanter tilsatt i fôret til fisk vil finnes igjen i muskelvevet. Disse antioksidantene vil slik fremme stabilitet både i filet, fiskemel og fiskeolje.

For å oppnå en optimal effekt av en antioksidant, bør den tilsettes i initieringsfasen. Dersom antioksidant tilsettes når oksidasjonsprosessen har nådd propageringsfasen vil effekten være liten. Konsentrasjonen av frie radikaler er på dette punktet så høy at antioksidanten raskt vil forbrukes (antioksidantfunksjon tapes.) [28]. Fenol-forbindelser, tokoferoler og askorbinsyre har en tendens til å utøve prooksidativ aktivitet dersom de er tilstede i høy konsentrasjon og/eller høy temperatur [30]. Antioksidanter er altså effektive ved lav konsentrasjon og blir ofte brukt i konsentrasjoner under 0,01 % [28].

På grunn av økende bevissthet blant forbrukere rundt tilsetning av syntetiske forbindelser i mat, er det stor interesse i å erstatte syntetiske antioksidanter med naturlige [30]. Selv om syntetiske antioksidanter som tilsettes mat er testet toksikologisk, finnes det økende bekymring for syntetiske antioksidanter og deres mulige helserisiko [34]. Selv om naturlige antioksidanter potensielt kan ha samme negative effekt, blir det blant konsumenter lettere å akseptere forbindelser som er naturlige. Det er identifisert mange naturlige fenolforbindelser med antioksidantegenskaper i plantekilder og vegetabiliske ekstrakter [28]. For at næringsmiddelindustrien skal kunne ta i bruk disse må de som nevnt innledningsvis være effektive i lave konsentrasjoner. Dersom syntetiske antioksidanter som brukes i dag skal byttes ut med naturlige varianter må det kunne forsvares økonomisk.

2.4.4: BHT

BHT tilsettes som antioksidant i spiselige oljer og andre matvarer med høyt fettinnhold samt til produkter som gummi, petroleums produkter, plast og kosmetikk. BHT er forholdsvis varmestabil og har en høy "carry-through" effekt, det vil si at den ikke degraderes i stor grad under prosessering av oljen. Men forbindelsen er flyktig og kan derfor mistes under destillasjon. Høyere beskyttelse mot oksidasjon, såkalt synergisk effekt kan oppnås dersom både BHA og BHT er tilstede samtidig. [28]. Strukturformel og antioksidantmekanisme for BHT er gitt i figur 2.9.

Det er sporet to kilder i litteraturen som hevder å ha funnet naturlige varianter av BHT. Babu et al (2008) har identifisert fire typer fytoplankton i ferskvann som produserer en naturlig variant av BHT [35], mens Bouftira et al 2007 har identifisert en naturlig variant av BHT i ekstrakter av bladene til en halofil plante (*Mesembryanthemum crystallinum*) [36]. Naturlige antioksidanter er som nevnt av stor interesse for industrien.

Tilsetning av BHT og andre syntetiske antioksidanter i næringsmidler er regulert. For BHT er det i Norge lovlig å tilsette opp til 100 mg/kg i animalske oljer og fett [37]. For å kunne kontrollere dette er det utviklet flere metoder for kvantifisering. I litteraturen er det funnet flere vellykkede metoder til dette formålet. Blant annet HPLC (high-performance liquid chromatography) [38], forskjellige GC teknikker (gas chromatography) [39] [40], GPC (Gel permeation chromatography) [41] og spektrofotometriske metoder basert på kobling av BHT til et farget produkt [42] [43]. Det er også funnet en metode for bestemmelse basert på et skift i absorbansmaksimum fra 278 til 306 nm for BHT. Dette skjer ved ionisering i sterk alkalisk løsning. BHT må isoleres fra oljen først [44]. I løsninger der både BHT og BHA er tilstede kan summen av BHT og BHA finnes ved reaksjon mot jernklorid-2,2-bipyridine. Konsentrasjonen av BHA blir bestemt ut fra reaksjon mot 2,6-dikloroquinonekloroimid reagens. Konsentrasjonen av BHT kan så bli bestemt ved forskjell. [45, 46]

2.5: Analyse av flyktige forbindelser i marine oljer

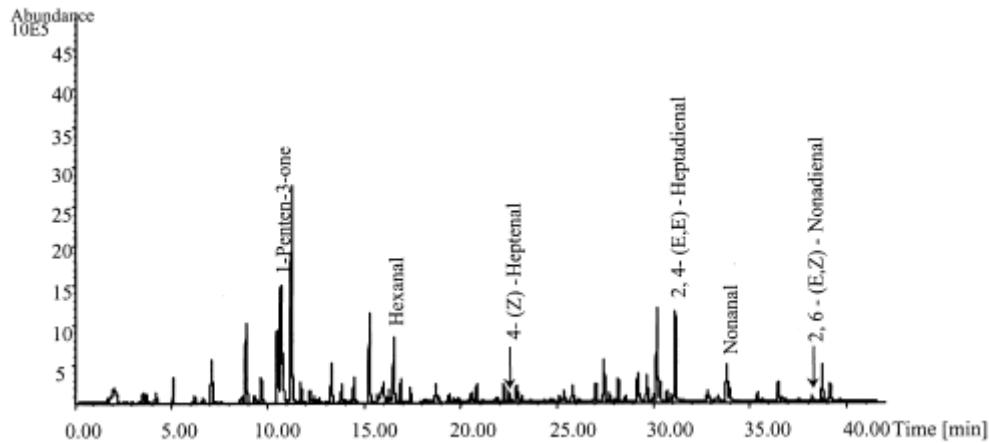
Flyktige forbindelser er som nevnt hovedkomponentene til lukt og smak i marine oljer. For å få en bedre forståelse av den uønskede harskningsprosessen og mekanismen bak denne er det derfor viktig å danne en korrekt oversikt over hvilke slike forbindelser oljen inneholder og i hvor stor grad. For å kunne gjøre dette må forbindelsene separeres fra oljen.

Det eksisterer mange ulike separasjonsmetoder som egnes for å fange flyktige forbindelser. Utfordringene i å skille de flyktige forbindelsene fra olje ligger i at disse forbindelsene ofte er tilstede i svært lave konsentrasjoner. I tillegg har de flyktige forbindelsene nesten identisk polaritet som triglyserider, som utgjør størstedelen av lipidene i fet fisk [47]. Kombinasjonen av lav konsentrasjon og lik polaritet som lipidmatriksen utelukker mange separasjonsmetoder.

Den vanligste metoden for å skille flyktige forbindelser fra marine oljer er dynamisk headspace koblet til GC-MS [48] Headspace er gasslaget som dannes over oljen i en lukket beholder og det finnes flere metoder for å analysere og kvantifisere hvilke type komponenter som finnes her [49]. I ”purge and trap” (rens og fang) dynamisk headspace stripes oljen med en bæregass som nitrogen eller helium. De flyktige forbindelsene i gasstrømmen bindes så til en adsorbent. Prøven kan desorberes og overføres til GC-MS analyse. Metoden er sensitiv og reproducerbar. [50]

Dynamisk headspace kjøres som regel under atmosfære trykk mens parametere som temperatur og gasstrøm varieres. Temperatur kan holdes mellom 40 og 180 °C, men ved temperaturer over 150 °C vil hydroperoksider være ustabile. Delvis dekomponering av hydroperoksider vil forekomme før prøven har nådd likevekt selv ved 90 °C. [51]. Rørbækk (1997) [48] oppgir 75 °C som optimal prosessstemperatur og at degradering av oljen finner sted mellom 75 °C og 90 °C. Andre kjente metoder som brukes til å fange flyktige forbindelser i marine oljer er, statisk headspace, headspace SPME (Solid-Phase Microextraction) og damp-destillasjon [52] [22]

Felles for disse metodene er at de detekterer lavmolekylære flyktige forbindelser. Hovedsakelig er forbindelsene fra 2 til 10 karbon, men det er også identifisert forbindelser med opp til 17 karbon [53] Flyktige forbindelser som er spesielt forbundet med harsk aroma er identifisert ved dynamisk headspace - GC-MS av Adios et al (2002) [54] Disse er gjengitt i figur 2.11.



Figur 2.11: Flyktige forbindelser identifisert i sildeolje ved dynamisk headspace GC-MS av Aidos et al 2002. [54]

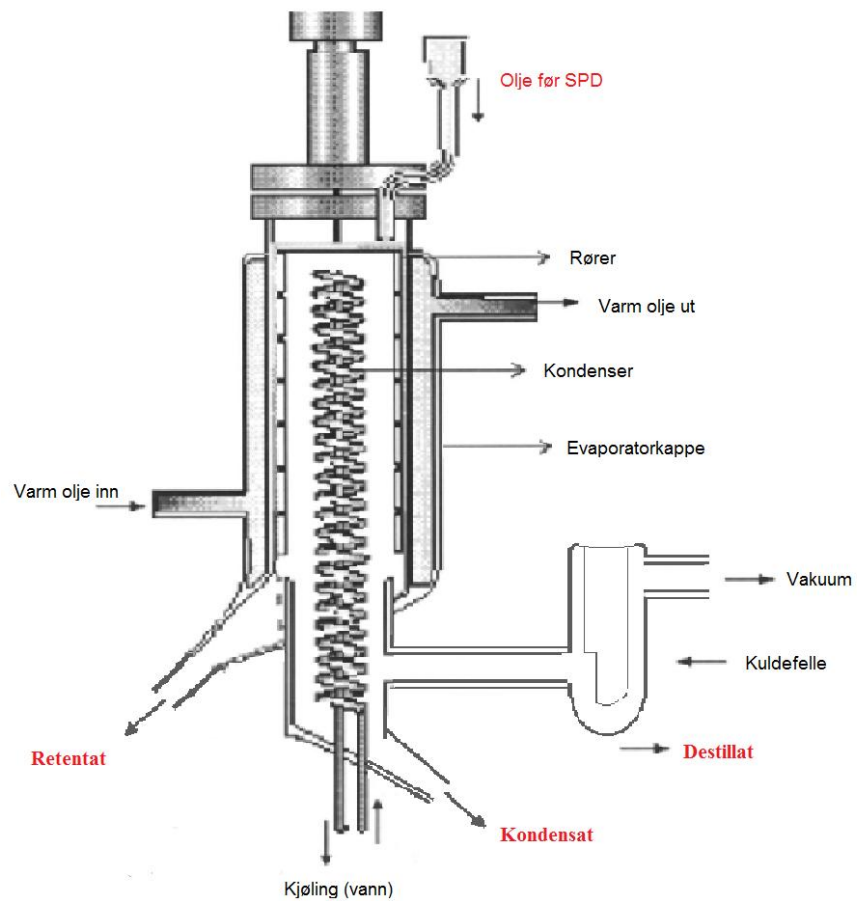
Ifølge Refsgaard et al (1998) [55] er harsk aroma i laks spesielt forbundet med en økning i (E,Z)-2,6-nonadienal, (Z)-3-heksenal og (Z,Z)-3,6-nonadienal. I tillegg er (E)-2-heksanal, 1,5-oktadien-3-one, 2,4-dekadienal, (E,Z,Z)- og (E,E,Z)-2,4,7 dekatrienal assosiert med harsk aroma i marine oljer generelt [52, 56].

I denne oppgaven er SPD brukt som metode for å fange flyktige forbindelser fra oljen. Fordelen med dette er at oljen destilleres under vakuum. Lav fordampnings-temperatur gjør at flere forbindelser kan drives av oljen. Metoden er beskrevet nærmere i neste avsnitt.

3 Eksperimentelle teknikker

3.1: Short-Path Distillation

Short-Path Distillation (SPD), også kjent under navnet molekylærdetillasjon, er en kontinuerlig ett trinns væske-gass separasjon. Prinsippkisse er gitt i figur 3.1.



Figur 3.1: Prinsippkisse for Short-Path Distillation. [57]

Separasjonen i SPD er basert på forskjell i damptrykk og kokepunkt. Separasjons-effektiviteten avhenger av forskjell i damptrykk mellom komponentene som skal separeres ved en gitt temperatur. En større forskjell i damptrykk gir en bedre separasjon. Forbindelser i oljen som har høyt damptrykk og lavt kokepunkt (flyktige forbindelser) vil destilleres av oljen. [58]

Oljen pumpes inn øverst på kolonnen mellom rører og den oppvarmede evapororkappen (figur 3.1). Fødestrømmen spres så som en tynn film som raskt forflyttes langs evapororkappen. Filmen holdes uniform ved mekanisk røring. Rører sørger også for at hele overflaten utnyttes. Oppholdstiden er definert som tiden fra oljen går inn på evapororkappen til den går av i underkant. Høy temperatur i evapororkappen og vakuüm driver de flyktige forbindelsene (destillatet) mot kondenseroverflaten, mens den rensede oljen (retentat) fortsetter ned evapororkappen og samles som vist i figur 3.1.

I kolonnen er det kort avstand mellom evaporator og kondenser, bare noen få centimeter. Den korte avstanden mellom evaporator og kondenser (short path) gjør sannsynligheten for at et fordampet molekyl skal kolliderer med andre molekyler er mindre enn sannsynligheten for at molekylet treffer kondenseroverflaten uten kollisjon. Når evaporator og kondenser er plassert i samme apparatur som i SPD vil trykktapet over kolonnen blir minimalt. Separasjonen kan slik kjøres under svært lavt trykk, ofte helt ned til noen få millibar, som praktisk talt er vakuüm. [57]

Kombinasjonen av lavt trykk og lav fordampningstemperatur gjør at oppholdstiden i kolonnen blir kort slik at oljen ikke tar skade. Det lave trykket gjør at flere forbindelser vil drives av ved gitt temperatur sammenlignet med lik temperatur ved atmosfære trykk. Slik er det er mulig å studere tyngre flyktige forbindelser uten at oljen degraderes. Kolonnen er utstyrt med en kulefelle (figur 3.1). Denne fylles med flytende nitrogen under hele prosessen. Dersom det ikke blir satt kjøling i kondensoren vil de flyktige forbindelsene drive ut mot fellen og fanges på den avkjølte overflaten.

Kondensatet (figur 3.1) består av forbindelser som destilleres av oljen, men som ikke er flyktige nok til å drive ut til kuldefellen, for eksempel lettere forbindelser som enkelte frie fettsyrer, mono- og diglyserider, kort-kjedede, mettede fettsyrer estere fra steroler, pigmenter og antioksidanter som tokoferol. [57] [19] [59]

Mest kritisk for separasjonsprosessens effektivitet er trykket i kolonnen. Andre viktige parametere er evaporatortemperatur, fødehastighet og røring. En høyere fødehastighet

vil gi en kortere oppholdstid i kolonnen men vil også påvirke separasjonseffektiviteten. Det er viktig å velge en førehastighet som gir så høy oppholdstid at ønskede komponenter separeres av samtidig en må tenke på at desto lenger oljen er i kontakt med den oppvarmede evaporatorkappen, desto større er muligheten for at oljen tar skade. Hastigheten på rører påvirker tykkelsen og spredningen av filmen. [57] En uniform film er viktig for optimal varmetransport. Separasjonseffektiviteten kan økes ved å separere i flere trinn.

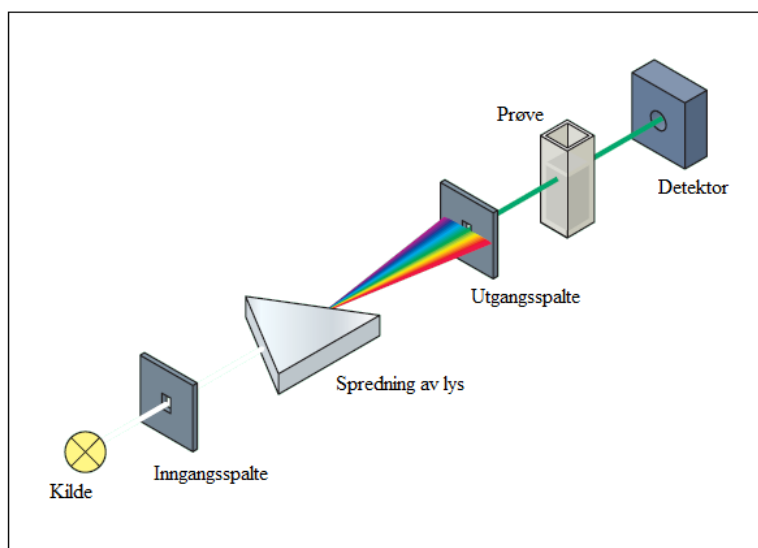
SPD brukes som metode i industrien til rensing og desodorifisering av marine oljer, samt oppkonsentrering av langkjedede, flerumettede fettsyrer. Kommersielle anlegg finnes med evaporatorareal opp til 50 m², disse kan ta opp til flere tonn føde per time [60]. SPD reduserer peroksidverdien samt innholdet av frie fettsyrer og forbedrer oljens aroma uten å påvirke innholdet av de gunstige fettsyrene EPA og DHA. [61]

I denne oppgaven er målet å studere oksidasjonsprodukter som finnes i oljen. Den mest interessante fasen er derfor destillatet. De flyktige forbindelsene som festes på kuldefellen samles ved å kjøre etanol gjennom kolonnen etter endt separasjon av oljen. Temperaturen justeres til 72 °C (kokepunkt for etanol) og trykket heves til rundt 800 mbar. Slik vil etanolen fordampes i kolonnen og drives ut mot kuldefellen som fremdeles er fylt med flytende nitrogen. Ved endt kjøring kan så pumpen slås av og de flyktige forbindelsene vil løses i etanolen ettersom kuldefellen smelter.

3.2: Spektrofotometrisk analyse og konjugerte forbindelser

Når et molekyl utsettes for elektromagnetisk stråling kan det absorbere et foton (energi) ved en spesifikk frekvens som avhenger av molekylets struktur [62]. Absorbansen forteller hvor mye lys/energi som blir tatt opp ved en gitt bølgelengde. Absorpsjon av lys skjer som oftest i π -bindinger (dobbelbindinger) og konjugering av bindinger øker både intensiteten og bølgelengden for maks absorbans. [63]. Konjugerte diener og konjugerte triener har for eksempel absorbansmaksimum ved henholdsvis 234 og 268 nm. Ved dannelse av hydroperoksider fra umettede fettsyrer produseres konjugerte forbindelser. Disse er derfor et mål på primær oksidasjon. Tilstedeværelse av konjugerte forbindelser i destillatet fra SPD kan kvalitativt og kvantitativt bestemmes ved spektrofotometrisk analyse.

Et spektrofotometer måler transmittert lys eller absorbansen i en prøve som funksjon av bølgelengde, λ . De sentrale komponentene i et spektrofotometer er gitt i figur 3.2. En kilde genererer elektromagnetisk stråling som sendes gjennom en spalte for spredning av lyset. En spalte slipper en bestemt bølgelengde av lyset igjennom. Monokromatisk lys (lys av en bølgelengde) sendes så gjennom prøven som er tilført en kyvette før det når detektoren. Spektrofotometeret nullstilles først mot en blank prøve.



Figur 3.2: Prinsippskisse for spektrofotometer. [63]

Konfigurasjonen vist i figur 3.2 er egnet dersom det skal måles absorbans ved en spesifikk bølgelengde. Dersom en ønsker å måle absorbans over et område, slik at en får et absorbansspekter, er oppsettet noe forskjellig. Det finnes oppsett som kan måle absorbans fra 190 til 800 nm. Ultrafiolett lys (UV-lys) er i området fra 200 til 400 nm mens området for synlig lys er fra 400 til 800 nm. I disse intervallene tar en rekke molekyler opp fotoner. Mengde lys som absorberes av prøven er proporsjonal med antall absorberende molekyler. For monokromatisk lys er sammenhengen mellom målt absorbans og konsentrasjon av det absorberende stoff i løsningen gitt av Lambert-Beers lov:

$$A = \log(I_0 / I) = \epsilon bc \quad (3.1)$$

I ligning 3.1 er A den målte absorbansen, I_0 er innfallende intensitet, I er transmittert intensitet, ϵ er den molare ekstinksjonskoeffisienten (molar absorpsjonskoeffisient) [$\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$], b er optisk veilengde bestemt av kyvettens størrelse og form [cm] og c er konsentrasjonen av det absorberende stoff [molL^{-1}]. Ekstinksjonskoeffisienten er karakteristisk for et stoff ved gitt bølgelengde, løsningsmiddel og temperatur. [63]

Løsningen fortynnes som regel slik at absorbansen ikke overstiger 1. Dette gjøres fordi Beers lov ikke er gyldig i konsentrerte systemer. I konsentrerte systemer vil de absorberende partiklene komme nær hverandre slik at ladningsfordelingen påvirkes.

3.3: Gasskromatografi-massespektrometri

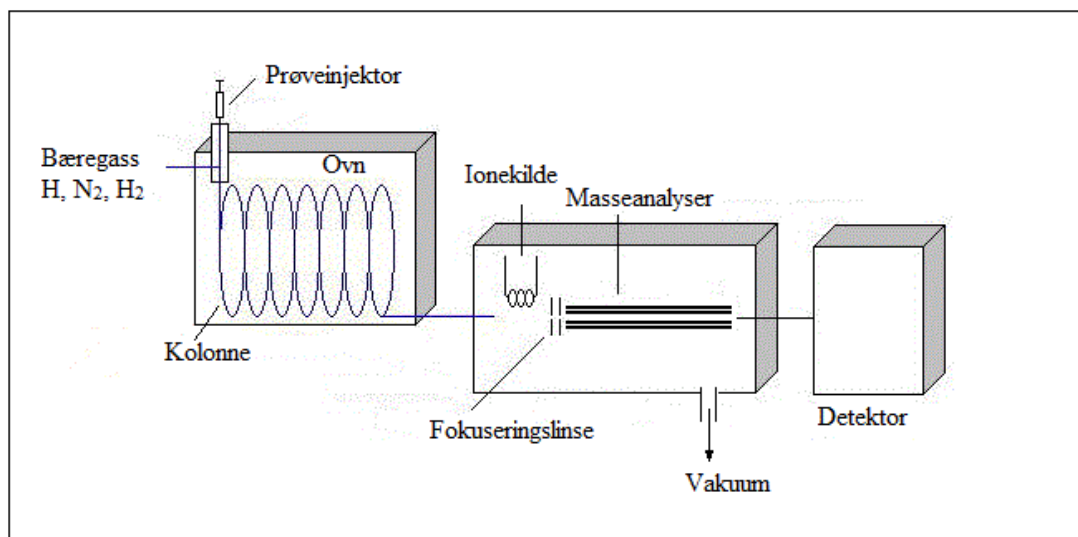
De flyktige forbindelsene isolert fra oljen i destillatet fra SPD kan identifiseres ved gasskromatografi-massespektrometri, GC-MS.

GC-MS kombinerer gasskromatografi der forbindelsene separeres, med massespektrometri der komponentene identifiseres basert på molekylvekt og struktur. [64]

Løsningen som skal analyseres injiseres til et oppvarmet kammer (ovn) der den går over i gassfase. En inert bæregass fører så gasstrømmen inn på en pakket kolonne. Interaksjoner mellom komponenter i gasstrømmen og pakkematerialet fører til en differensiert separasjon av forbindelsene. Stoffene vil vandre gjennom kolonnen med en hastighet som er bestemt av deres flyktighet, løselighet i stasjonær fase og temperaturen i kolonnen. [65]

Forbindelsene kan ut fra GC identifiseres basert på retensjonstid og retensjonsvolum i kolonnen. Disse er karakteristiske for stoffene og den stasjonære fasen. En detektor kan kobles til GC. I detektoren genereres det et elektrisk signal som skrives ut som et kromatogram. Signalet som dannes i detektoren, avhengig av hvilken type detektor som brukes, er enten proporsjonalt med konsentrasjonen eller massen av stoff i bæregassen. Identifikasjonen må basere seg på sammenligning med et kjent stoff analysert under identiske betingelser. Ved identifikasjon av prøver med ukjente forbindelser bør derfor andre teknikker benyttes i tillegg til gasskromatografi. [65]

Massespektrometeret kobles til gasskromatografen via en splittkobling. Denne kompensere for trykkforskjellen mellom GC og MS. I GC ioniseres komponentene under høyt vakuum. Vanligst gjøres dette via elektronionisering. Elektroner dannes i en glødetråd og sendes i form av en elektronstråle gjennom ionekilden der molekylene ioniseres. De ioniserte molekylene nedbrytes (fragmenteres) i mindre deler. Ionene fokuseres så gjennom en magnetisk masseanalyse der massespekter måles hvert millisekund. Et molekyls fragmentering er strukturavhengig og massespekteret som dannes er reproducerbart. Slik kan forbindelsene i prøven identifiseres ved sammenligning mot referansespektra i et databibliotek. Prinsippskisse for GC-MS er gitt i figur 3.3. GC-MS er en svært nøyaktig metode for identifikasjon. [65] [62]



Figur 3.3: Prinsippskisse for GC-MS.

3.4: Peroksidverdi

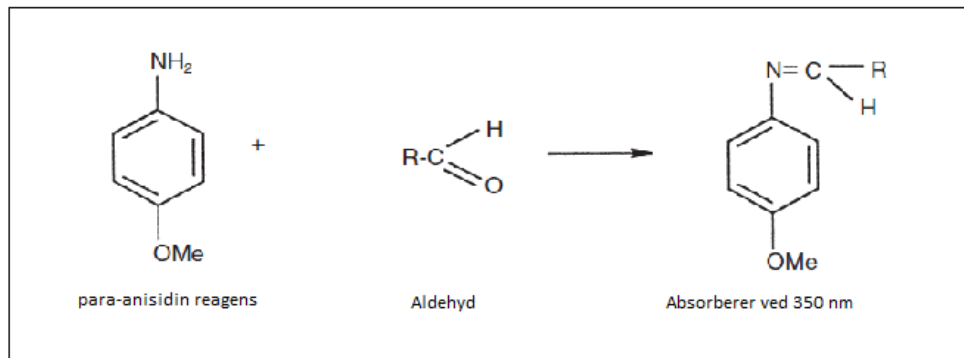
Hydroperoksider dannes som primære oksidasjonsprodukter i marine oljer som beskrevet i avsnitt 2.3. Peroksidverdi er et mål på det totale nivået av disse i oljen og er en av de mest vanlige brukte indikatorene til oljens status gjennom produksjon og lagring [16, 66, 67]. Det finnes flere metoder for bestemmelse av peroksidverdi. I denne oppgaven er peroksidverdien bestemt ved ferrothiocyanatmetoden.

Ferrothiocyanatmetoden er basert på oksidasjon av toverdige jern, Fe^{2+} til treverdige jern, Fe^{3+} i løsning med hydroperoksider. Fe^{3+} reagerer med ammoniumthiocyanat og det dannes et rødt kompleks med absorpsjonsmaksimum ved 500 nm. Lambert-Beers lov (gitt i ligning 3.1) er gyldig og konsentrasjon av hydroperoksider vil være proporsjonal med absorbans. Denne metoden er enkel, reproduserbar og sensitiv [16].

Oljens peroksidverdi, PV er et mål på primære oksidasjonsprodukter og gir dermed ikke et fullstendig bilde av oljens oksidasjonsstatus. Peroksidverdi kombineres derfor ofte med en metode som måler sekundære oksidasjonsprodukter, for eksempel anisidinverdi, AV. Oljens oksidasjonsstatus er ofte angitt ved totoxverdien ($\text{to tox} = 2\text{PV} + \text{AV}$) [51].

3.5: Anisidinverdi

Anisidinverdien måler mengde aldehyder i oljen og er derfor et mål på sekundær oksidasjon. Verdien er definert som absorbansen av 1 g olje løst i iso-oktan (100 ml) i reaksjon med para-anisidin (0,25 % i 100 % eddiksyre) [51] Anisidinverdien baserer seg på dannelsen av et farget produkt ved reaksjon mellom reagensen para-anisidin og aldehyder i oljen under sure betingelser (figur 4.1.) Mengden produkt bestemmes spektrofotometrisk ved 350 nm. [16] [23]



Figur 4.1: Reaksjon mellom p-anisidin og aldehyd. [51]

Testen er mer sensitiv mot umettede aldehyder i forhold til mettede aldehyder [16]. Som forklart i avsnitt 3.2 skjer absorpsjon av lys (fotoner) oftest i dobbeltbindinger slik at umettede aldehyder absorberer sterkere ved 350 nm.

4 Materialer og metoder

4.1: Råstoff

Det ble benyttet sildolje og kommersiell fiskeolje i forsøkene. Produksjonssted og fremstillingsprosess er gitt i tabell 4.1. Flytskjema og nærmere beskrivelse for prosesseringen av alle oljene er gitt i vedlegg A.

Tabell 4.1: Marine oljer brukt i forsøkene, fremstillingsprosess og produksjonssted.

| Olje | Prosess | Produksjonssted |
|--|-------------------|--------------------------|
| Sildolje | Hydrolysert | Træna |
| Sildolje | Hydrolysert | Brekstad |
| Sildolje | Termisk behandlet | Træna |
| Sildolje | Termisk behandlet | Brekstad |
| Kommersiell fiskeolje: - NVG sild (12-15 %) - Lodde - Brisling - Øyepål - Kolmule | Termisk behandlet | Egersund sildoljefabrikk |

Oljene ble overført fra 30 liters fat til mindre flasker for å redusere tiningstid. Nitrogengass ble boblet gjennom oljen ved overførsel for å unngå oksygentilgang og flaskene ble fylt helt opp for å unngå headspace. Flaskene ble oppbevart mørkt ved -80 °C.

4.2: Kjemikalier

Alle kjemikalier benyttet i separasjon i SPD, analyser og til vask av utstyr er listet i tabell 4.2.

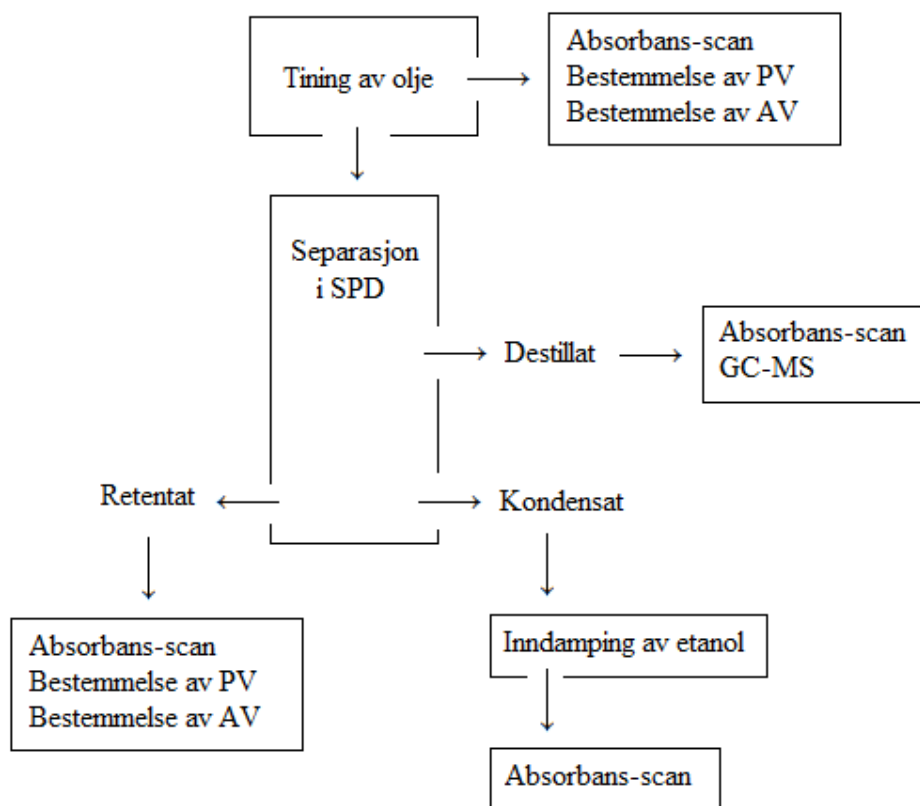
Tabell 4.2: Kjemikalier brukt i analyser og deres produsent.

| Kjemikalie | Produsent | Analyser |
|-------------------------------------|-----------------------|---|
| Ammoniumthiocyanat | Merck | Bestemmelse av peroksidverdi |
| Butyl-hydroxy-toluen (BHT) | SIGMA | SPD Spektrofotometrisk analyse |
| Eddiksyre 100 % | Merck | Bestemmelse av anisidin verdi |
| Etanol 96 % | NTNU, Arcus kjemi* | SPD Konjugerte forbindelser i destillat Bestemmelse av peroksidverdi GC-MS |
| Fe(II)kloridtetrahydrat | Merck | Bestemmelse av peroksidverdi |
| Fe(III) (Titrisol prod nr. 1.09972) | Merck | Bestemmelse av peroksidverdi |
| Iso-heksan | Merck Acros | Bestemmelse av peroksidverdi |
| Iso-oktan | Merck | Konjugerte diener i retentat og kondensat Bestemmelse av anisidinverdi |
| Kloroform | Merck | Vask av SPD |
| p-anisidin | SIGMA | Bestemmelse av anisidinverdi |
| Saltsyre (HCl) 3.5 % | Merck | Bestemmelse av peroksidverdi |
| Flytende nitrogen | AGA | SPD |

* Det ble i begynnelsen benyttet etanol fra Arcus kjemi, denne ble erstattet med etanol produsert ved NTNU etter det ble oppdaget forurensninger i førstnevnte ved GC-MS.

4.3: Metoder

En skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet er gitt i figur 4.1. Forsøksbetingelser og analyser er nærmere beskrevet i avsnitt 4.3.1 til 4.3.7.



Figur 4.1: Skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet.

4.3.1: Separasjon i SPD

I denne oppgaven ble en short path distillation kolonne i glass (laboratorieskala) benyttet (plant VKL 70-4-SKR-T.) 200 ml olje ble destillert i hvert forsøk. Førehastigheten ble regulert ved en pumpe. Temperaturen i evapororkappen ble stilt inn på 150 °C, det ble ikke satt på kjøling i kondensatoren. Trykket ble satt til 0,005 mbar og det ble brukt røring på 450 rpm. De flyktige forbindelsene ble fanget på kuldefellen som beskrevet i avsnitt 3.1. Kuldefellen var under hele destillasjonsprosessen fylt med flytende nitrogen.

Etter endt destillering av oljen ble 25 ml etanol kjørt gjennom kolonnen. Temperaturen på evapororkappen ble her satt til 72 °C, trykket ble justert til 800 mbar og kuldefellen var fortsatt fylt med flytende nitrogen. Vakuumpumpen ble slått av etter endt destillering av etanol.

De flyktige forbindelsene på kuldefella (destillatet) ble samlet etter destillering av etanol ved å fjerne det flytende nitrogenet fra kuldefellen. Tiden for å fordampe det flytende nitrogenet ble redusert ved å tilføre en svak strøm av nitrogengass. Når kuldefellen var tom ble prøven smeltet, en fønner ble benyttet til dette (kun kaldluft for å unngå stor temperaturforskjell mellom glasset og luften). Etter endt smelting kunne destillatet samles. Volumet av flyktige forbindelser løst i etanol ble målt. Dersom noe av etanolen var gått tapt under SPD, ble etanol etterfylt slik at alle prøvene hadde sluttvolum på 25 ml.

Fraksjonene som ble samlet etter endt SPD ble lagret i mørke forseglede flasker på frys (-80 °C) før videre analyse. Headspace ble fylt med nitrogen for å beskytte mot oksidasjon.

Kolonnen ble fylt med nitrogengass mellom hver separasjon og kuldefellen ble vasket etter endt separasjon med etanol. Kolonnen ble vasket mellom hver tredje kjøring med kloroform.

4.3.2: SPD, fødehastighet og oppholdstid

Innvirkning av fødehastighet og oppholdstid på separasjonen ble undersøkt. Hydrolysert sildeolje fra Træna ble brukt i dette forsøket. Fødehastigheten ble regulert ved pumpe mens andre prosessbetingelser ble holdt konstant. Fødepumpen ble på forhånd kalibrert ved å sende 100 ml olje gjennom mens tiden ble målt. Oppholdstiden ble funnet ved å måle tiden fra oljen gikk inn på evaporatorkappen til den gikk ut. For å redusere effekten av en redusert oppholdstid over tørr evaporatorkappe, ble det først kjørt olje over kappen. Sammenhengen mellom innstillinger på pumpen (frekvens og stroke), oljens fødehastighet og oppholdstiden i kolonnen er gitt i tabell 4.3.

Tabell 4.3: Sammenheng mellom innstilling på fødepumpe, fødehastighet og oppholdstid.

| Frekvens [mA] | Stroke | Hastighet [ml/min] | Oppholdstid [s] |
|---------------|--------|--------------------|-----------------|
| 5 | 0,5 | 1,4 | 36 |
| 5 | 0,75 | 1,9 | 29 |
| 10 | 0,2 | 2,8 | 22 |
| 10 | 0,3 | 4,9 | 18 |
| 10 | 0,4 | 6,8 | 16 |
| 15 | 0,3 | 9,5 | 14 |
| 15 | 0,4 | 12,9 | 12 |

Temperaturen i evaporatorkappen ble satt til 150 °C, trykket til 0,005 mbar og røring ble holdt omtrent på 450 rpm. For dette forsøket ble også temperaturen på kondenser stilt inn på 30 °C for bedre kontroll. På grunn av dette ble etanol kjørt gjennom to ganger som beskrevet i avsnitt 4.3.1. Første gang med kondenser temperatur på 30 °C (der etanolen havnet i kondensatet) og andre gang med kondensor temperatur på 72 °C (der etanolen ble fanget på kuldefellen.)

4.3.3: BHT

I forprosjektet til denne oppgaven ble BHT identifisert i destillatet fra SPD (kjørt ved oppholdstid 16 s) ved GC-MS. Tilstedeværelsen av BHT i denne prøven ble nærmere undersøkt ved å spike prøven med BHT og foreta ny GC-MS analyse. 0,04 mM BHT ble løst i destillat.

Kolonnen ble som nevnt vasket med kloroform. For å forsikre at dette eller andre vaskemidler brukt til å vaske utstyr med (zalo og oppvaskmiddel brukt til maskinvask av kolber) ikke var kilden til BHT ble etanol kjørt gjennom kolonnen etter vask. Evaporatortemperaturen ble satt til 72 °C og trykket til omtrent 800 mbar, kuldefellen ble fylt med flytende nitrogen. Det ble kjørt 25 ml etanol gjennom kolonnen ved disse betingelsene, etanolen ble etter endt destillasjon samlet. Dette ble gjentatt i en omgang til slik at totalt 2*25 ml etanol ble destillert etter hverandre. Destillatet ble sendt til GC-MS analyse og analysert ved å måle absorpsjons fra 200 til 800 nm.

Oljen BHT ble identifisert i var produsert ved hydrolyseprosess på Træna. Beskrivelse av oljens prosessering er gitt i vedlegg A. Enzymblandingen som ble tilsatt før hydrolysing besto av papain-bromelain (1:1 forhold). Det ble undersøkt om denne enzymblandingen eller eventuelt annet utstyr i prosesslinjen (som lagringstanker eller belegg i utstyr) kunne være kilden til BHT i oljen. Dette ble gjort ved å analysere oljer produsert ved hydrolyseprosess med tilsetning av ulik enzymblending (alcalase) og olje produsert kun ved termisk behandling. Oljene ble produsert av råmateriale fra forskjellige anlegg (Træna og Brekstad) i SINTTEF sin mobile SeaLab. I tillegg ble en kommersiell olje (produsert ved Egersund sildoljefabrikk) undersøkt. Det var ønskelig å analysere en kommersiell sildolje, men da dette var utilgjengelig grunnet sesong, ble en kommersiell fiskeolje som inneholde 12 til 15 % sild undersøkt.

Oljene (hydrolysert og termisk behandlet fra Træna, hydrolysert og termisk behandlet fra Brekstad og kommersiell fiskeolje fra Egersund) ble analysert for innhold av BHT og andre flyktige forbindelser ved å sende de gjennom SPD, destillatet ble så sendt til GC-MS for analyse av forbindelser. Separasjon i SPD ble utført på tre paralleller av hver olje. Oppholdstiden i kolonnen ble satt til 16 sekunder og resterende betingelser (temperatur i evaporatorkappe, temperatur i kondenser, trykk og hastighet på rører) ble holdt identiske som beskrevet i avsnitt 4.3.2.

Tilstedeværelse av BHT i oljen ble også undersøkt ved å løse BHT i forskjellige konsentrasjoner i oljen før SPD. 0,02 mM, 0,04 mM og 0,06 mM BHT ble løst i den hydrolyserte sildoljen fra Træna. Dette ble gjort ved først å løse en høyere konsentrasjon av BHT i oljen (0,6 mM) for deretter å fortynne med olje til de ønskede konsentrasjonene. Oljen ble etter tilsats av BHT og ved hver fortynning med olje gjort homogen ved røring på magnetrører i omtrent en time. To paralleller av hver konsentrasjon ble kjørt gjennom SPD ved identiske betingelser som gitt ovenfor. Destillatet ble sendt til GC-MS for analyse. Målet med dette var å lage en lineær kurve for å kunne kvantifisere BHT i destillatet. Det var også ønskelig å finne ut hvor mye BHT som destilleres av oljen under SPD for å kunne finne konsentrasjonen av BHT i oljen.

BHT absorberer i UV-området. Det ble derfor målt absorbans fra 200 til 400 nm på alle fraksjonene fra SPD (olje før SPD, retentat, kondensat og destillat). Metode beskrevet i avsnitt 4.3.4.

4.3.4: Absorbans-scan

Som analysemetode ble absorbans målt i kvartskyvetter fra 200-800 nm ved et Cary WinUV spektrofotometer fra Varian (Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer) koblet til datamaskin. Absorbans ble målt på alle prøver fra SPD (råolje, retentat, kondensat og destillat). Destillatet ble målt mot etanol mens oljen (råolje, retentat og kondensat) ble løst i iso-oktan. Etanolen i kondensatet ble først dampet av på rotorvapor. Temperaturen i vannbadet ble satt til 50 °C og etanolen ble dampet av ved et trykk på omtrent 180 mbar. Alle prøvene ble fortynnet slik at absorbansspekteret ikke kom utenfor Beers lineære område. Det ble analysert tre eller fire paralleller av hver prøve.

Ulike kilder i litteraturen oppgir noe forskjellige verdier for absorbans maksimum for BHT. For å finne absorbansspekteret til BHT ble 0,04 mM BHT løst i etanol. Absorbans ble målt fra 200 til 400 nm.

Mengde konjugerte diener og triener ble beregnet fra absorbans ved henholdsvis 234 nm og 268 nm etter AOCS offisielle metode Ti 1a-64 [68] Beregningseksempel er gitt i vedlegg B.

4.3.5: Peroksidverdi

Peroksidverdi ble målt på olje før SPD og olje etter SPD (retentat) for sildolje fra Træna kjørt gjennom SPD ved ulike oppholdstider for å undersøke hvordan fødehastighet og oppholdstid påvirker oljen.

Bestemmelse av peroksidverdi ble gjort ved ferrothiocyanatmetoden (beskrevet i avsnitt 3.4). Analysen ble utført som beskrevet av Ueda et al (1986) [69] og IDF-standard 174A: 1991.

4.3.6: Anisidinverdi

Som beskrevet i avsnitt 3.5 er anisidinverdien sammen med peroksidverdien et mål på oljens oksidasjonsstatus. Anisidinverdi ble bestemt for sildeolje før og sildeolje etter SPD (retentat) for sildolje kjørt gjennom SPD ved ulik oppholdstid. AOCS offisielle metode Cd 18-90 ble benyttet for bestemmelse av anisidinverdi [70].

4.3.7: Gasskromatografi-massespektrometri

Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av flyktige forbindelser fra oljen (samlet i destillatet fra SPD) ble analysert ved gasskromatografi-massespektrometri, GC-MS.

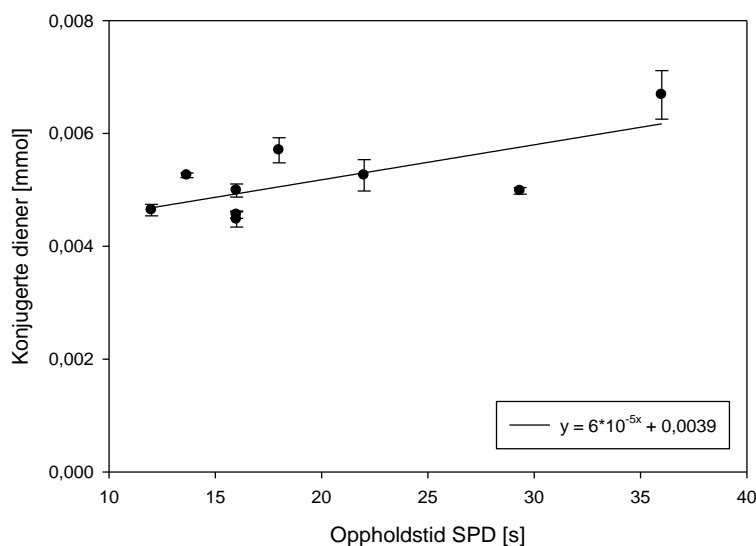
GC-MS analysene for flyktig prøve etter SPD ble utført av Kolbjørn Zahlsen og Torunn Holten ved SINTEF Materialer og kjemi. Kolonnen som ble brukt var av type Agilent CP19091J-413 (HP-5:30 cm, 320 µm, 0,25 µm.) Det ble injisert 1µl ved 250 °C.

5 Resultater

5.1: SPD, fødehastighet og oppholdstid

Ved analyse av flyktige forbindelser i oljen er det viktig at den valgte metoden for å fange de flyktige forbindelsene ikke påvirker oljens kvalitet. Innvirkning av fødehastighet og oppholdstid på separasjonsprosessen i SPD ble undersøkt ved å kjøre hydrolysert sildolje fra Træna gjennom SPD ved forskjellig oppholdstid. Oppholdstidens påvirkning på separasjonsprosessen og kvaliteten på olje er undersøkt ved konsentrasjon av konjugerte forbindelser, peroksid og aldehyder.

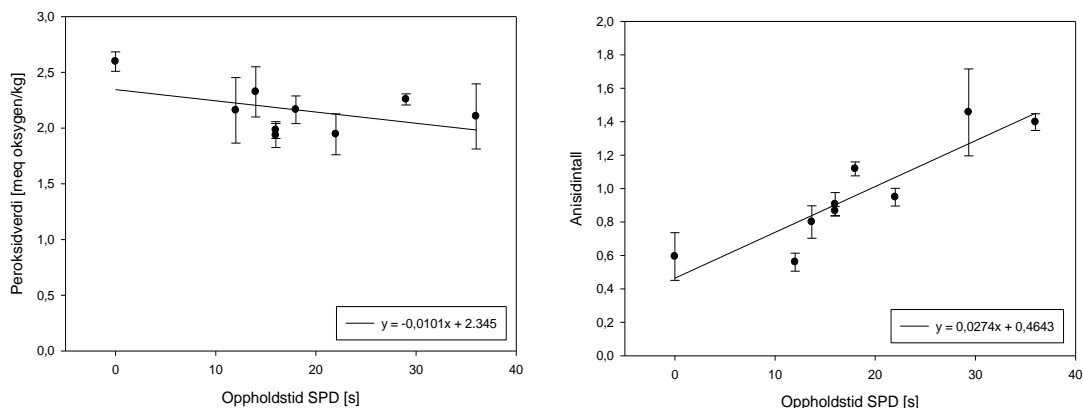
I figur 5.1 er beregnet mengde i mmol av konjugerte diener i destillatet etter SPD med standardavvik plottet mot oppholdstiden i kolonnen. Det ble kjørt tre separasjoner i SPD ved en av oppholdstidene (16 s). Mengde konjugerte diener er beregnet fra absorbans ved 234 nm. Lineær regresjonslinje er lagt til. Ligning for beregning av konjugerte diener samt rådata er gitt i vedlegg B. Formler for beregning av standardavvik er gitt i vedlegg F.



Figur 5.1: Konsentrasjon av konjugerte diener i destillat fra SPD som funksjon av oppholdstid.

Tilstedeværelse av primære (peroksider) og sekundære (aldehyder) oksidasjonsprodukter i oljen ble undersøkt ved å måle peroksidverdi og anisidinverdi.

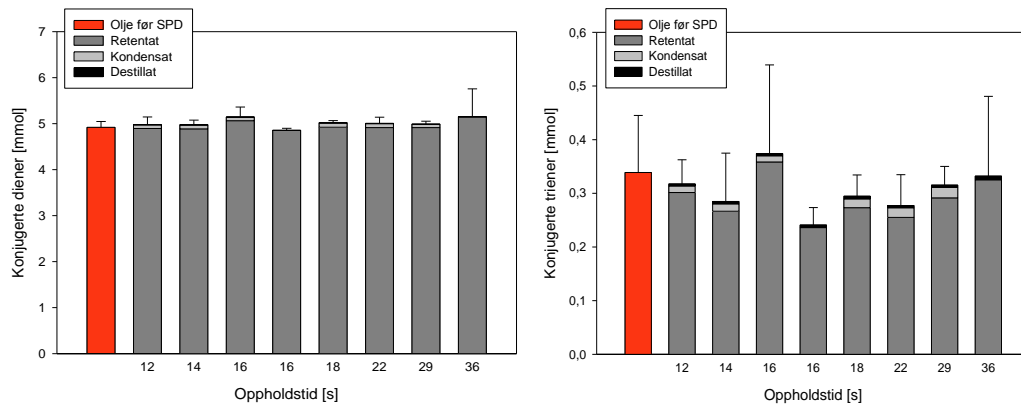
Peroksidverdi og anisidinverdi ble målt på oljen før SPD (råoljen) og oljen etter SPD (retentat) for olje kjørt gjennom SPD ved ulik oppholdstid. Figur 5.2 gir peroksidverdien og anisidinverdien som funksjon av oppholdstid med tilhørende standardavvik. Verdien for AV og PV ved oppholdstid null angir råoljen. Lineær regresjonslinje er lagt til. Rådata, formler for beregning og standardkurve er gitt i vedlegg C og D.



Figur 5.2: Peroksidverdi (til venstre) og anisidinverdi (til høyre) som funksjon av oppholdstid i SPD.

For å studere om det dannes konjugerte forbindelser under destilleringen i SPD er det satt opp en massebalanse over systemet. Massebalanse for konjugerte diener (til venstre) og konjugerte triener (til høyre) med tilhørende standardavvik er presentert i figur 5.3. Den første stolpen (rød) gir mengde konjugerte forbindelser i oljen før SPD (råoljen). De resterende stolpene gir samlet mengde konjugerte forbindelser etter SPD (i retentat, kondensat og destillat) ved bruk av forskjellig oppholdstid i kolonnen. Samlet standardavvik er angitt. Dersom det ikke dannes konjugerte forbindelser som følge av

separasjonsprosessen i SPD bør inn være lik ut, det vil si at det bør være lik høyde på alle stolpene. Rådata er gitt i vedlegg B.

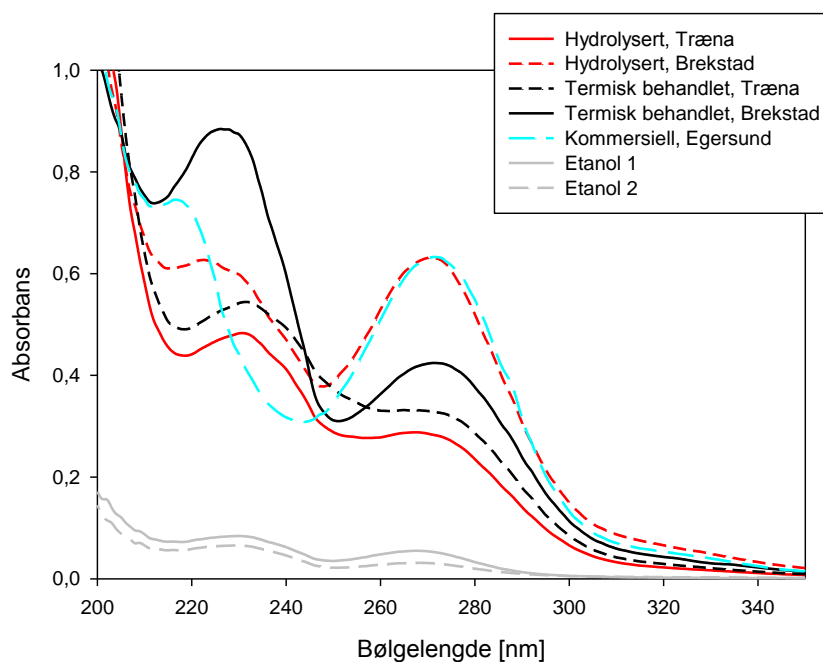


Figur 5.3: Massebalanse med hensyn på konjugerte diener (til venstre) og konjugerte triener over SPD. Rød stolpe angir konjugerte forbindelser inn på SPD (råolje) mens resterende stolper gir konjugerte forbindelser ut av SPD (retentat + kondensat + destillat) ved forskjellig oppholdstid.

5.2: SPD, oljer produsert ved forskjellig prosess og anlegg

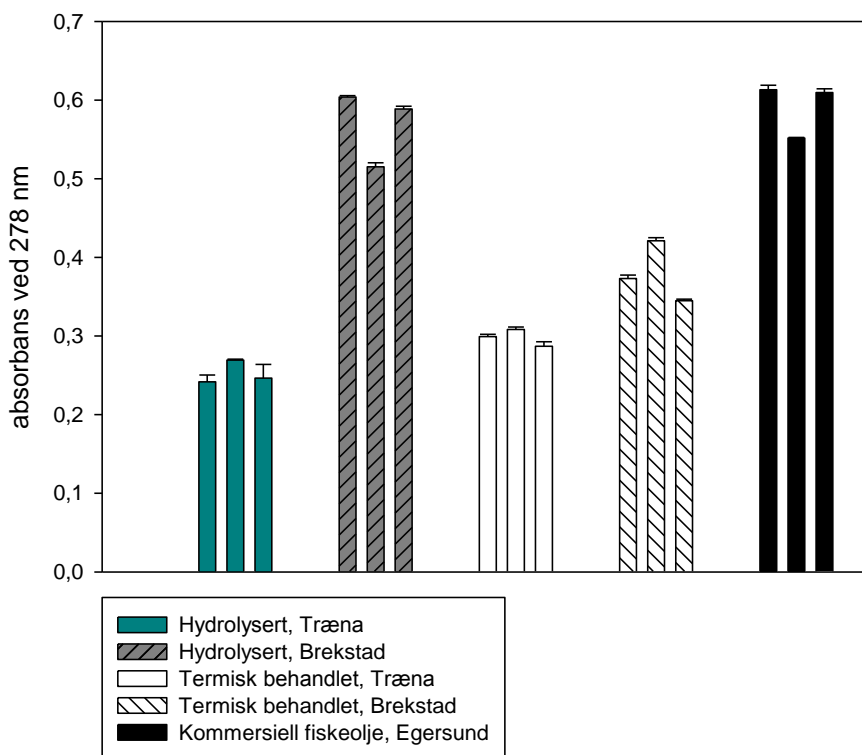
For å undersøke om kilden til BHT i sildoljen kunne være enzymblanding tilsatt ved hydrolyseprosess eller prosessutstyr ble forskjellige oljer sendt gjennom SPD. Oljer produsert ved ulik hydrolyseprosess (forskjellige type enzymer) og forskjellig type prosess (hydrolyseprosess og termisk behandling) ble kjørt gjennom SPD. Disse oljene ble produsert av SINTEF i en mobil lab. En kommersiell fiskeolje bestående av 12-15 % sild produsert ved et annet anlegg (Egersund sildoljefabrikk) ble også analysert. Det ble også undersøkt om kloroform eller andre vaskemidler brukt på utstyr kunne tilføre BHT til destillatet ved å sende etanol gjennom kolonnen i to omganger etter at kolonnen var vasket med kloroform som beskrevet i avsnitt 4.3.3.

Det ble kjørt tre paralleller av hver olje gjennom SPD. Absorbans ble målt fra 200 til 800 nm på destillatet etter SPD og på etanolen etter vask av kolonnen. Resulterende absorbanskurve basert på gjennomsnittlig verdi av de tre parallellene er presentert i figur 5.4.



Figur 5.4: Absorbanskurve av destillat etter SPD for sildolje fra Træna (hydrolysert og termisk behandlet), sildolje fra Brekstad (hydrolysert og termisk behandlet), kommersiell fiskeolje fra Egersund og etanol kjørt gjennom kolonnen etter vask med kloroform.

BHT absorberer i UV-området med absorpsjonsmaksimum ved 278 nm. Figur 5.5 gir absorpsjon av destillatet etter SPD for de forskjellige oljene ved 278 nm. Rådata er gitt i vedlegg E.

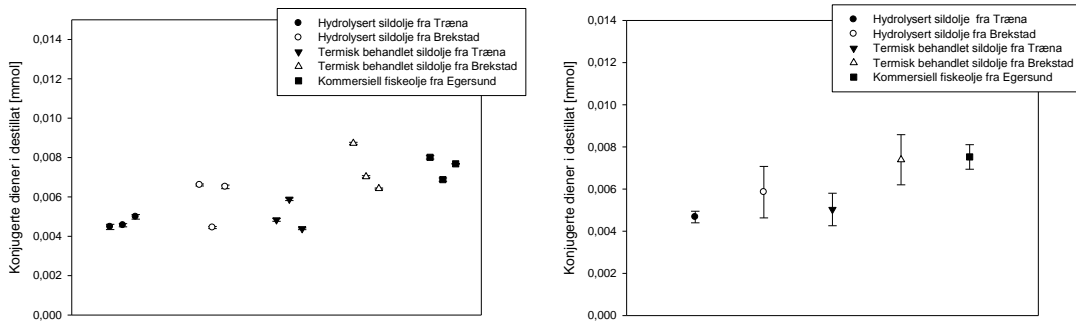


Figur 5.5: Absorbans ved 278 nm med tilhørende standardavvik i destillat etter SPD for sildolje fra Træna (hydrolysert og termisk behandlet), sildolje fra Brekstad (hydrolysert og termisk behandlet) og kommersiell fiskeolje fra Egersund.

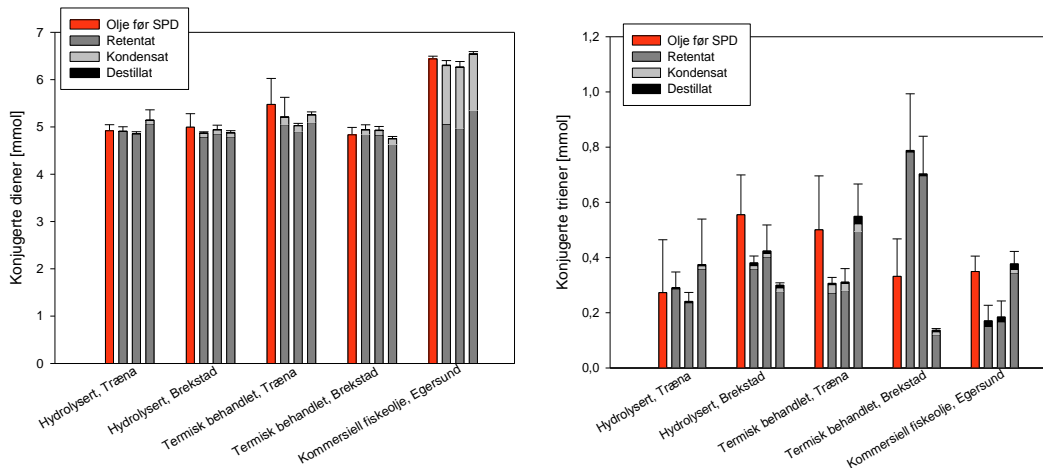
Standardavvikene presentert i resultatene gir bare usikkerheten i målingen av absorpsjon. For å få et mål på usikkerheten i metoden (SPD) ble mengde konjugerte diener i destillatet etter SPD for de forskjellige oljene beregnet. Det ble kjørt tre paralleller på hver olje. Resultatet med standardavvik er presentert i figur 5.6.

Massebalanse for konjugerte forbindelser over systemet (som beskrevet i avsnitt 5.1) ble satt opp for alle oljene (hydrolysert og termisk behandlet sildolje fra Træna, hydrolysert og termisk behandlet sildolje fra Brekstad og kommersiell fiskeolje fra Egersund). Figur

5.7 gir massebalansen for konjugerte diener (til venstre) og konjugerte triener (til høyre). Tre paralleller er vist for hver olje. Rådata for konjugerte forbindelser er gitt i vedlegg B.



Figur 5.6: Mengde konjugerte diener i destillat etter SPD forsild olje fra Træna (hydrolysert og termisk behandlet), sildolje fra Brekstad (hydrolysert og termisk behandlet) og kommersiell fiskeolje fra Egersund. Til venstre er alle paralleller vist mens til høyre er gjennomsnittlig verdi av konjugerte diener i destillat med tilhørende standardavvik gitt

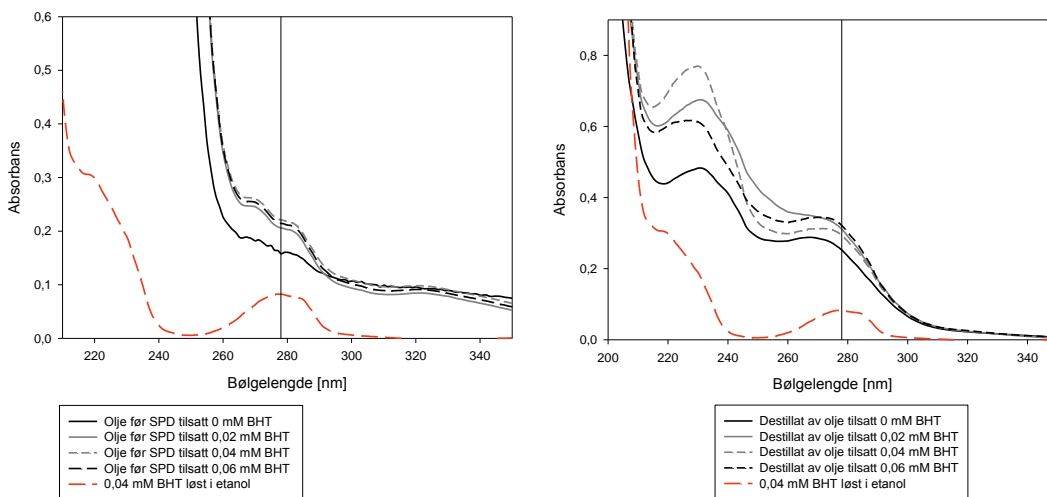


Figur 5.7: Massebalanse med hensyn på konjugerte diener (til venstre) og konjugerte triener over SPD. Rød stolpe angir konjugerte forbindelser inn på SPD (råolje) mens resterende stolper gir konjugerte forbindelser ut av SPD (retentat + kondensat + destillat).

5.3: Sildolje tilsatt BHT

Sildolje fra Træna produsert ved hydrolyseprosess ble tilsatt BHT i tre forskjellige konsentrasjoner (0,02 mM, 0,04 mM og 0,06 mM) før separasjon i SPD.

Absorbans ble målt på oljen uten tilsetning av BHT og oljen tilsatt BHT (råoljen) samt destillatet etter separasjon i SPD for disse oljene fra 200 til 400 nm. Figur 5.8 gir de resulterende absorbanskurvene. Kurven til venstre gir absorbansen for oljen mens kurven til høyre er for destillatet. Det er også lagt til absorbanskurven for BHT løst i etanol for sammenligning. Fra denne kurven ble absorbansmaksimum for BHT funnet ved 278 nm, denne bølgelengden er markert med loddrett linje i absorbanskurvene.



Figur 5.8: Absorbanskurve til venstre: olje før SPD tilsatt BHT i angitt konsentrasjon. Absorbanskurve til høyre: destillat etter SPD av olje tilsatt BHT i angitt konsentrasjon. Absorbanskurven for 0,04 mM BHT løst i etanol er gitt i rødt for sammenligning og absorbansmaksimum for BHT ved 278 nm er angitt ved loddrett linje.

5.4: GC-MS

Destillat etter SPD ble sendt til analyse ved GC-MS. På grunn av tid og økonomi er ikke alle prøvene analysert. Det er analysert flyktige forbindelser i to prøver fra sildolje produsert ved hydrolyseprosess på Træna, en prøve fra sildolje produsert ved termisk prosess på Brekstad, og en prøve fra kommersiell fiskeolje produsert ved Egersund. Tabell 5.1 oppsummerer alle forbindelser identifisert ved GC-MS. Forbindelser funnet i lakseoljen under forprosjektet til denne oppgaven er også inkludert for å kunne sammenligne. BHT er markert med rødt.

Det ble også utført GC-MS analyse med fokus på BHT på en prøve av etanol etter vask av kolonnen, destillatet fra sildoljen produsert ved hydrolyseprosess på Træna spiket med 0,04 mM BHT, og prøvene av destillatet fra oljen tilsatt 0,02 mM BHT og 0,06 mM BHT.

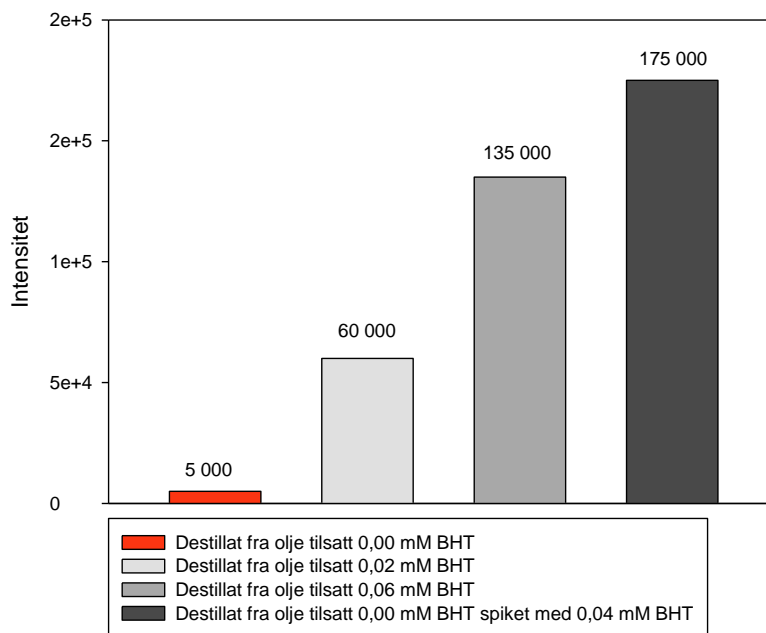
Etanolen etter vask av kolonnen inneholdt 2,6-dimetyl, men ikke BHT.

I destillatet fra den hydrolyserte sildoljen fra Træna ble det foretatt et søk mot forbindelser som vanligvis er forbundet med aroma i fiskeolje (se avsnitt 2.5). Det ble søkt etter heksanal, 4-heptenal, 2,4-dekadienal, (E,E)-2,4-heptadienal, (E,E)-2,6-nonadienal, 2nonenal og 1-penten-3-one. Ingen av disse forbindelsene ble funnet i destillatet.

Tabell 5.1: Forbindelser identifisert ved GC-MS i sildolje (HT = hydrolysert fra Træna, TB = Termisk behandlet fra Brekstad, K = kommersiell fiskeolje fra Egersund) og lakseolje.

| Forbindelse | Antall karbon | HT | HT | TB | K | Laks |
|--|---------------|----------|----------|----------|---|----------|
| Glyserin | 3 | x | | | | |
| 1-Heksadeken | 10 | | x | | | |
| Tetradekan | 14 | | x | x | | |
| Pentadekan | 15 | x | | | | x |
| Dodekan-2,6,10 trimetyl | 15 | | | x | | |
| Docosan | 22 | | x | | | |
| Tridekan | 13 | | | x | x | |
| Syklopentadekan | 15 | | x | x | x | |
| 1-Heksadekanol | 16 | | x | x | x | |
| Pentadekan | 15 | | x | x | x | |
| Nonansyre (pelargonsyre) | 9 | x | | | | |
| Butyl-hydroxy-toluen (BHT) | 15 | x | x | x | | x |
| Tetradekan-3-metyl | 15 | | x | | | |
| Heptacosan | 27 | | | x | | |
| Heksadekan | 16 | | x | x | x | |
| 8-Heptadeken | 17 | | x | x | x | |
| Heptadekan | 17 | x | x | x | x | x |
| Pentadekan 2,6,10,14 tetrametyl (pristan) | 19 | x | x | x | x | |
| 1-Nonanol 4,8 dimetyl | 11 | x | | | | |
| Tetradekansyre (myristinsyre) | 14 | x | | | | x |
| Dekansyre etyl ester | 12 | x | | | | |
| 1 nonadeken | 19 | x | x | | x | |
| 5 nonadeken | 19 | | x | | x | |
| 9 nonadeken | 19 | | x | x | | |
| Heptadekan-2-metyl | 18 | | x | x | | |
| Heptadekan-8-metyl | 18 | | x | | | |
| Oktadekan | 18 | | | x | | |
| 3,7,11,15-Tetrametyl 2-heksadeken 1-ol (fytol) | 20 | x | | | | |
| Heksadekensyre Z-11 | 16 | x | | | | |
| 1,16-Eicosadien | 20 | | | | x | |
| Heksadekansyre (Palmitinsyre) | 16 | x | | | | x |
| Oktadekansyre (oleinsyre) | 18 | x | | | | x |

For å kunne gi et anslag på konsentrasjonen av BHT i destillat og olje, og dermed finne hvor effektivt BHT blir destillert av oljen er intensitet av BHT fra GC-MS kromatogram benyttet. GC-MS analyse ble utført på destillatet fra sildoljen tilsatt BHT i to forskjellige konsentrasjoner (0,02 mM og 0,06 mM), destillatet fra oljen uten tilsetning av BHT (råoljen) og på destillatet fra oljen uten tilsetning av BHT spiket med 0,04 mM BHT. Resulterende intensitet fra GC-MS kromatogram er gitt i figur 5.9.



Figur 5.9: Intensitet av BHT fra GC-MS kromatogram for destillat fra SPD.

Intensiteten er presentert uten usikkerhet da det bare ble analysert en prøve av hver ved GC-MS. De beregnede konsentrasjonene av BHT i destillat og olje er gitt i tabell 5.2. Tabellen angir også i hvor stor grad tilsatt BHT i oljen destilleres av. Nærmere beskrivelse og beregninger er gitt i E.

Tabell 5.2: Sammenheng mellom intensitet fra GC-MS og konsentrasjon av BHT i destillat og olje.

| Prøve | Tilsatt BHT i olje [mM] | Intensitet | x BHT i destillat [mM] | x-0,00118 [mM] | Tilsatt mengde BHT destillert av oljen [%] |
|-------|-------------------------|------------|---------------------------|----------------|--|
| 1 | 0 | 5000 | 0,00118 | - | - |
| 2 | 0,02 | 60000 | 0,0141 | 0,01292 | 64,6 |
| 3 | 0,06 | 135000 | 0,0318 | 0,03062 | 51,0 |
| 4 | - | 175000 | 0,4118 | - | - |

Dersom mellom 51 og 65 % av BHT i oljen destilleres av under SPD betyr det at sildoljen fra Træna inneholder mellom 0,0017 mM og 0,0022 mM BHT.

6 Diskusjon

6.1: SPD, fødehastighet og oppholdstid

Separeringsprosessen kan betegnes som optimal dersom en får med flest mulig forbindelser uten at degradering er skjedd. Det er da viktig at det velges prosessbetingelser som ikke påvirker oljens kvalitet. Ved økt oppholdstid i kolonnen øker tiden oljen er i kontakt med evaporatorkappen og derfor også risikoen for degraderingsreaksjoner. Ved for lav oppholdstid vil ikke steady state oppnås og mengde forbindelser som destillerer av reduseres. Mengde konjugerte diener i destillat som funksjon av oppholdstid er gitt i figur 5.1. Ut fra denne kan det se ut som om det er en lineær sammenheng der mengden konjugerte diener i destillatet øker med økende oppholdstid. Forskjellen er imidlertid liten. Hvis en tar utgangspunkt i regresjonslinjen øker mengde konjugerte diener $5 \cdot 10^{-5}$ mmol per økning i sekund for oppholdstiden.

Dette forsøket ble utført med sildeolje produsert ved hydrolyseprosess. Denne oljen har høy kvalitet, noe som tilsier lite oksidasjonsprodukter. Det kan være at en kort oppholdstid er tilstrekkelig til å fjerne opp mot grensen av den konsentrasjonen som er mulig å oppnå ved satt temperatur (her 150 °C.) Og at det derfor ikke vil bli en spesielt stor økning i konsentrasjon av forbindelser i destillatet ved en økning i oppholdstid. En kan dermed ikke konkludere med at oppholdstiden har liten innvirkning på mengden flyktige forbindelser som destillerer av oljen. Det ville vært interessant å gjøre det samme forsøket med en olje som inneholder en høyere konsentrasjon av oksidasjonsprodukter. Dersom forholdet mellom konjugerte diener og oppholdstid ikke endres, kan det konkluderes med at oppholdstiden har noe, men ikke spesielt mye innvirkning på effektiviteten. Dersom forholdet endres, vil effekten av endret oppholdstid på mengde forbindelser som destillerer av oljen være avhengig av konsentrasjonen av disse.

Av massebalansen for konjugerte forbindelser over systemet (figur 5.3) ser det ut som den totale mengden konjugerte diener holder seg relativt stabilt over separeringsprosessen. Dette kan også sees fra massebalansen for de forskjellige oljene presentert i

figur 5.7. Når det gjelder konjugerte triener kan det ikke sees noen trend av massebalansen og usikkerheten er stor. De konjugerte forbindelsene befinner seg hovedsakelig i oljen (retentatet) for både konjugerte diener og triener. Disse forbindelsene destillerer altså i liten grad av oljen. Dette kan tyde på at de konjugerte forbindelsene sitter igjen på triglyseridet. I absorbanuskurven for destillatet fra olje produsert ved hydrolyseprosess på Træna presentert i figur 5.4 kan det sees at absorbanstoppene samsvarer godt med absorbanmaksimum for konjugerte diener og konjugerte triener ved henholdsvis 234 og 268 nm.

Det ble observert at det ved de laveste oppholdstidene (12 s og 14 s) oppsto problemer med å opprettholde lavt og stabilt trykk i kolonnen. Det viktig for separasjonen at trykket holdes konstant, dette vil ha større påvirkning på resultatet enn en endring i oppholdstid.

Peroksidverdi og anisidinverdi gir til sammen et bilde av oljens oksidasjonsstatus. Det er derfor målt peroksidverdi og anisidinverdi på oljen før SPD og oljen etter SPD ved destillering på de ulike oppholdstidene. Av figur 5.1 kan det se ut som om det er en nedgang i peroksidverdi og økning i anisidinverdi ved økende oppholdstid. Dette kan tyde på at noe spaltning av peroksider forekommer. Av ligningene for trendlinjene i figur 5.1 kan det sees at stigningstall for PV er omtrent 2.7 ganger stigningstallet for anisidinverdi. Med gitte usikkerheter i målingene stemmer dette ganske godt overens med totoxverdien beskrevet i avsnitt 3.4.

Ved dannelse av peroksid konjugeres en binding. Forholdet mellom peroksid og konjugerte forbindelser bør derfor være 1:1. Dette vil være sant i den initiale delen av oksidasjonsprosessen. Etter hvert som peroksider spaltes vil dette forholdet forskyves, mengde peroksider reduseres men forbindelsen vil fortsatt være konjugert. Fra figur 5.2 og 5.3 kan det sees at mengde konjugerte forbindelser i oljen er høyere enn mengde peroksider (1 mmol = 2 meq). Dette tyder på at det er forekommet nedbrytning av peroksider i oljen og oljen er derfor forbi den initiale oksidasjonsfasen.

Resultatene presentert i figur 5.1 til 5.3 tyder altså på at det forekommer en liten økning av konjugerte diener i destillatet ved høy oppholdstid, men at den totale mengden konjugerte diener er stabil. Det dannes altså ikke konjugerte forbindelser over prosessen men en høyere oppholdstid gjør at disse forbindelsene destillerer av oljen i en noe høyere grad. Dessverre ser det ut som det forekommer noe spaltning av peroksider til sekundære oksidasjonsprodukter ved økende oppholdstid Det bør på grunn av dette ikke

velges for høy oppholdstid. Oppholdstiden bør heller ikke settes så lav at det går ut over trykket i kolonnen og at det ikke oppnås stabile forhold (steady state.) Det kan ut ifra dette antas at det for denne kolonnen bør brukes oppholdstid mellom 16 og 22 sekunder. Dette tilsvarer fødehastighet mellom 7.1 ml/min og 2,8 ml/min.

Eventuell degradering av oljen kan studeres nærmere ved å utføre GC-MS analyse på flyktige prøver tatt ut ved forskjellig oppholdstid. Dersom flere lavmolekylære forbindelser dukker opp på bekostning av høymolekylære kan dette tyde på at det er skjedd en degradering av oljen.

6.2: SPD, oljer produsert ved forskjellig prosess og anlegg

Av absorbanskurven til etanolen som ble destillert i kolonnen etter vask med kloroform kan det sees at denne er vesentlig lavere enn absorbanskurven til destillatene fra de forskjellige oljene (figur 5.4). BHT absorberer i UV området med absorbansmaksimum ved 278 nm. Dersom kloroform eller andre vaskemidler brukt på utstyr var kilden til BHT burde absorbansspekteret for etanolen vært sammenlignbar med de andre kurvene. Dette bekreftes også av GC-MS analysen gjort av etanolen, der BHT ikke ble påvist. Det er altså ikke forhold under selve separasjonen (rester av vaskemidler på utstyr, slangen fra fødepumpen, pakninger eller andre deler i kolonnen) i SPD som tilfører oljen BHT.

Det ble spekulert i om enzymblandingen tilsatt ved hydrolyseprosessen på Træna kunne være tilsatt BHT. GC-MS analyse på destillat fra olje produsert ved termisk behandling på Brekstad viste i midlertidig funn av BHT også i denne oljen. Dette avkrefter at det var enzymblandingen som var kilden til BHT. Begge disse oljene (hydrolysert fra Træna og termisk behandlet fra Brekstad) ble produsert i SINTEF sin mobile SeaLab. Deler av prosesslinjen var derfor felles for produksjon av begge oljene (beskrevet i vedlegg A). Det ble ikke identifisert BHT i den kommersielle fiskeoljen produsert ved Egersund sildoljefabrikk. Det kan derfor ikke utelukkes at noe av prosessutstyret på SeaLab er kilden til BHT.

Sildoljene som ble analysert ble lagret på 30 liters fat. For å redusere tiningstid ble olje overført til mindre flasker av plast. Den kommersielle fiskeoljen som det ikke ble påvist BHT i ble mottatt på en halvlitersflaske og ble derfor ikke overført til samme type

plastflasker som de andre oljene ble oppbevart i. Det bør derfor undersøkes om disse plastflaskene inneholder BHT som kan ha migrert over i oljen

BHT er en syntetisk antioksidant. Det er i midlertidig funnet flere kilder i litteraturen som hevder å ha funnet naturlige varianter av BHT, i ferskvannsalger og i ekstrakter fra bladene til den halofile planten *Mesembryanthemum crystallinum* (som nevnt i avsnitt 2.4.4). Selv om produksjon av naturlig BHT bare er påvist i ferskvannsalger, er det mye mulig at også saltvannsalger har utviklet evnen til å syntetisere denne antioksidanten som en forsvarsmekanisme mot fotooksidasjon. Dersom dette er tilfelle vil BHT kunne følges opp gjennom matkjeden og slik havne i sildeoljen. Dersom BHT funnet i sildoljen er en naturlig variant bør den i midlertidig ha vært tilstede i den kommersielle fiskeoljen også. Denne inneholdt 12 til 15 % sild. Innhold av antioksidanter kan variere med årstider, fiskeoljen fra Egersund ble produsert ved en annen sesong (vår) enn sildoljene produsert på ved Træna og Brekstad (høst). En kommersiell sildolje bør derfor analyseres.

Figur 5.5 gir absorpsjon ved 278 nm for destillatet av de forskjellige oljene kjørt gjennom SPD. Tanken var å beregne konsentrasjon av BHT i oljene ut fra ekstinksjonskoeffisienten, ϵ . Av figur 5.5 kan det i midlertidig sees at absorpsjonen ved 278 nm er høyest i destillatet fra den hydrolyserte oljen fra Brekstad og den kommersielle fiskeoljen. I og med at den kommersielle fiskeoljen ikke inneholdt BHT kan det konkluderes med at absorpsjon ved 278 nm ikke er en god metode for å kvantifisere BHT. Det er i tillegg til BHT også andre forbindelser som absorberer i dette området (konjugerte forbindelser og karotenoider).

Tre paralleller ble kjørt gjennom SPD for hver av oljene. Figur 5.6 gir mengde konjugerte diener i destillat for alle parallellene samt gjennomsnittelig verdi med tilhørende standardavvik. Resultatet tyder på at det er noe forskjell i hvor mye konjugerte forbindelser som destilleres av i SPD. Tre paralleller er i midlertidig lite for å kunne si noe sikkert om usikkerheten i metoden. For å få et sikkert mål på usikkerheten i metoden (SPD) burde en av oljene vært kjørt for eksempel 12 ganger.

6.3: Olje tilsatt BHT

Av figur 5.8 er absorbansspekteret for hydrolysert sildolje fra Træna tilsatt BHT, og absorbanksurve for det resulterende destillatet etter separasjon i SPD gitt. Av absorbansspekteret til BHT løst i etanol kan det sees at maks absorbans er ved 278 nm. Dette samsvarer godt med verdier gitt i litteraturen. Sammenlignet med hydrolysert sildolje fra Træna som ikke var tilsatt BHT (i samme figur) har oljen og destillatet tilsatt BHT en høyere verdi ved 278 nm. Forskjellen mellom de tre oljene tilsatt BHT er imidlertid liten. Dette kan tyde på at konsentrasjonen av BHT i råoljen er vesentlig lavere enn tilsatt mengde BHT, altså lavere enn 0,02 mM.

BHT ble løst i oljen i tre forskjellige konsentrasjoner (0,02 mM, 0,04 mM og 0,06 mM). Det ble først løst en høyere konsentrasjon BHT i oljen (0,6 mM) for deretter å fortenne med olje til de ønskede konsentrasjonene. Oljene ble rørt med magnetrører for å oppnå homogen blanding. Allikevel er det en veldig liten mengde stoff løst i stor mengde olje slik at det er vanskelig å oppnå homogen blanding. Det er derfor stor usikkerhet i den faktiske konsentrasjonen av BHT i oljen før SPD. Som diskutert ovenfor er absorbans ved 278 en utilstrekkelig metode for å kvantifisere BHT i de forskjellige oljene (hydrolysert og termisk behandlet fra Træna, hydrolysert og termisk behandlet fra Brekstad og kommersiell olje fra Egersund). I figur 5.8 er det i midlertidig samme olje som er analysert (hydrolysert fra Træna) bare med forskjellig tilsetning av BHT. Absorbanskurvene bør derfor være identiske bare med forskjellig respons i det området BHT absorberer. Absorbansspekteret til BHT løst i etanol er gitt i samme figur. Fra dette kan det sees at BHT ikke absorberer ved 250 nm. Allikevel er det nivårespons ved 250 nm mellom destillatet fra oljen som ikke er tilsatt BHT og destillatet fra oljen som er tilsatt BHT. Grunnen til dette kan være at SPD ikke er reproducerbar. Absorbans ved 278 nm er høyere for oljen tilsatt 0,04 mM enn for oljen tilsatt 0,06 mM. I destillatet er i midlertidig absorbansen ved 278 nm lavere for destillatet fra oljen tilsatt 0,04 mM enn for både destillatet fra oljen tilsatt 0,02 mM og 0,06 mM. Dette tyder på at konsentrasjonen av faktisk løst BHT er usikker og at effektiviteten BHT destilleres av i SPD varierer.

Selv om det er stor usikkerhet av faktisk mengde løst BHT i oljen og bare en prøve av destillatet for hver SPD kjøring er analysert ved GC-MS (for destillat fra olje tilsatt 0,02 mM BHT og destillat fra olje tilsatt 0,06 mM BHT) kan resultatene fra dette forsøket gi en indikasjon på konsentrasjonen av BHT i råoljen (hydrolysert sildolje uten tilsetning

av BHT) og hvor effektivt BHT destilleres av oljen. Responsen på BHT i prøvene i form av intensitet fra GC-MS analyser er gitt i figur 5.9. Konsentrasjonen av BHT i den spikedede prøven har mye mindre usikkerhet enn destillat fra olje tilsatt BHT fordi BHT ble løst i destillatet og ikke i oljen. Konsentrasjonen av BHT i destillat fra råoljen (olje uten tilsatt BHT) ble derfor beregnet fra den spikedede prøven. Videre er det beregnet at mellom 51 og 65 % av BHT i oljen destilleres av under SPD, slik at sildoljen produsert ved hydrolyseprosess inneholder mellom 0,0017 og 0,0022 mM BHT. Dette er som nevnt, på grunn av stor usikkerhet, bare en indikasjon på konsentrasjon av BHT i oljen. Men da det ikke kan dannes BHT under prosessen kan det sies at den beregnede konsentrasjonen av BHT i oljen er den minimale mengden BHT i oljen. Oljen inneholder derfor minst 0,0017 mM BHT, dette tilsvarer 0,37 mg BHT/L olje. Mengden BHT i oljen er derfor under den lovlige grensen for tilsetning av BHT i animalske oljer og fett (avsnitt 2.4.4).

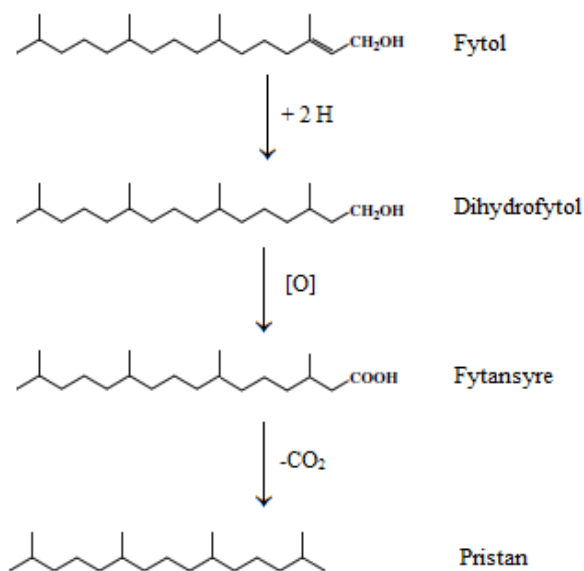
6.4: GC-MS

GC-MS analysen viser til et høyt innhold av relativt tunge forbindelser (opp til 20 karbon.) (tabell 5.1). Dette tyder på at metoden kan detektere tyngre flyktige forbindelser enn det som er vanlig ved andre metoder. Det ble i GC-MS analysen søkt spesielt etter lavmolekylære forbindelser som har kjent tilknytning til lukt og smak i fiskeolje. Ingen av disse ble funnet. Det var merkbart forskjell på oljens lukt før og etter SPD. Dette betyr at disse forbindelsene er fjernet fra oljen men av en eller annen grunn ikke kommer med i destillatet. Mest sannsynlig skyldes det at kuldefellen ikke er effektiv nok, slik at disse lettere forbindelsene forsvinner ut i vakuumpumpa. En mer effektiv kuldefelle kan muligens løse dette problemet. En annen mulighet kunne vært å plassere en adsorbent før inngangen til vakuumpumpa. Slik vil de lettere forbindelsene som unnslipper kuldefella bindes til adsorbenten. Forbindelsene kan så desorberes og overføres til GC-MS slik som beskrevet for purge and trap dynamisk headspace i avsnitt 2.5. Dette må vurderes opp mot effektivitet, nødvendighet og kostnader.

I tabell 5.1 er også forbindelser funnet i destillatet fra lakseolje analysert i forprosjektet til denne oppgaven tatt med. Det er identifisert dobbelt så mange forbindelser i sildeoljen som i lakseoljen. Lakseoljen var av dårligere kvalitet enn sildoljen (oksidasjonsstatus). En skulle derfor kunne forvente at konsentrasjonen av oksidasjonsprodukter var høyere i lakseoljen sammenliknet med sildeoljen, og at flest

forbindelser var å finne i lakseoljen. Grunnen til dette kan være at prøven fra sildeoljen ble oppkonsentrert 75 ganger før GC-MS analysen. Det kan også tenkes at flere av oksidasjonsproduktene i lakseoljen er blitt brutt ned til lettere forbindelser grunnet høy oksidasjonsstatus. Dersom dette er tilfelle kan en stor del av oksidasjonsproduktene i lakseoljen gått tapt til vakuumpumpa. De tyngste identifiserte forbindelsene (fra 19 til 20 karbon) er funnet i sildeolja.

Pristan (pentadekan 2,6,10,14-tetrametyl) og fytol (3,7,11,15-tetrametyl 2-heksan 1-ol) ble identifisert i destillatet fra hydrolysert olje fra Træna, termisk behandlet olje fra Brekstad og den kommersielle fiskeoljen fra Egersund. Denne forbindelsen representerte den største toppen på GC-MS kromatogram. Degradering av α -tokoferol og/eller klorofyll resulterer i dannelsen av pristan [71] [72] Pristan kan forekomme i konsentrasjoner opp til 3 % av lipidene i enkelte kopopoder [73]. Kilden til pristan i oljen kan derfor være α -tokoferol eller klorofyll i fytoplankton. Et forslag til dannelsen av pristan ved degradering av fytol-sidekjeden på klorofyll er gitt i figur 6.1. Degraderingen skjer over tre trinn. Først dannes dihydrofytol fra fytol ved hydrogenering av dobbeltbindingen. Oksidasjon av alkoholen dihydrofytol gir fytansyre som ved dekarboksylering gir pristan.



Figur 6.1: Degradering av fytol (del av klorofyll i fytoplankton) til pristan. [73]

Pristan er forholdsvis stabil mot videre degradering [74] Dette kan være en viktig grunn til at denne forbindelsen utgjør den største toppen ved GC-MS analyse. Kopopoder utgjør en stor del av næringsinntaket til sild. Pristan er imidlertid ikke identifisert i lakseoljen, dette er interessant da laksen blir foret.

To prøver av destillat fra sildolje produsert ved hydrolyseprosess ved Træna er analysert ved GC-MS. Av tabell 5.1 kan det sees at disse to prøvene inneholder forholdsvis få felles forbindelser. Den første prøven ble analysert på høsten mens den andre ble analysert på våren. Dette kan tyde på at enten SPD ikke er reproduserbar eller at oljen har forandret karakter under lagring. Det er vanskelig å si noe om reproduserbarhet for forbindelser destillert av oljen ved SPD da bare to prøver av samme olje er analysert ved GC-MS. Reproduserbarheten i mengde konjugerte diener i destillatet i midlertidig, som diskutert ovenfor, ganske god. For å måle reproduserbarhet i avdestillerte forbindelser ved SPD bør flere prøver analyseres ved GC-MS. Separasjonsprosessen og analyse bør da utføres i samme tidsperiode slik at verken oljen eller destillatet må lagres i ulike tidsperioder.

Av tabell 5.1 kan det også sees at prøvene inneholder forbindelser med ulikt antall karbon. Vanligvis syntetiseres fettsyrer med et likt antall karbon. Disse forbindelsene stammer derfor mest sannsynlig fra forbindelser som er blitt brutt ned. Dette tyder på at oljen er degradert.

Det er ikke funnet andre antioksidanter enn BHT i oljen. Det forventes at sildoljen skal inneholde noe α -tokoferol. Denne forbindelsen er imidlertid varmesensitiv. Det kan derfor være at den er for lite stabil til å klare seg gjennom SPD.

7 Konklusjon

Analyse av flyktige oksidasjonsprodukter som dannes under oksidativ harskning i marine oljer er et viktig ledd for å kunne forbedre prosesseringen og dermed kvaliteten på oljen. Ut fra resultatene oppnådd i denne oppgaven kan det konkluderes med at Short-Path Distillation egner seg som metode for å separere de flyktige forbindelsene fra marine oljer. Separeringsprosessen kan betegnes som optimal dersom en får med flest mulig forbindelser uten at degradering er skjedd som følge av metoden.

Innvirkning av fødehastighet og oppholdstid på mengde forbindelser som destilleres av oljen er studert. Ut fra analysene som er utført kan det konkluderes med at mengden konjugerte diener som destilleres av oljen øker ved økende oppholdstid, men den totale mengden konjugerte forbindelser er stabil over SPD. Det dannes altså ikke konjugerte forbindelser som et resultat av separasjonen men en høyere oppholdstid gjør at disse forbindelsene destilleres av oljen i større grad. Fra anisidin- og peroksidmålinger ser det dessverre ut som det forekommer noe spaltning av peroksider til sekundære oksidasjonsprodukter ved økende oppholdstid. Av denne grunn bør det ikke velges for høy oppholdstid. Oppholdstiden bør heller ikke settes så lav at det går ut over trykket i kolonnen eller mulighet for å oppnå stabile forhold (steady state) for separasjonen. For kolonnen brukt i dette forsøket tyder resultatene på at oppholdstiden bør holdes mellom 16 og 22 sekunder. Dette tilsvarer fødehastighet på mellom 7.1 ml/min og 2,8 ml/min.

De flyktige forbindelsene som er identifisert er hovedsakelig tyngre flyktige forbindelser (fra 9 til 27 karbon). Lavmolekylære flyktige forbindelser som vanligvis er forbundet med dårlig lukt i fiskeoljer er ikke funnet. Det antas at kuldefellen på kolonnen ikke er effektiv nok slik at disse lettere forbindelsene forsvinner ut i vakuumpumpa.

Pristan utgjør største toppen på GC-MS kromatogram i sildoljen. Denne forbindelsen samt fytol stammer mest sannsynlig fra degradering av α - tokoferol og karotenoider i fytoplankton og inkorporeres i lipidlaget til sild gjennom næringskjeden.

Kilden til BHT i oljen er ikke funnet. Det er imidlertid avkreftet av BHT kommer fra forhold under selve separasjonen (rester av vaskemidler på utstyr, slangen fra fødepumpen, pakninger eller andre deler i kolonnen). Heller ikke enzymblandingen tilsatt ved hydrolyse av oljen kan være kilden da BHT ble påvist i sildolje produsert

uten hydrolyse. Deler av prosesslinjen for produksjon av disse oljene (ved SINTEF sin mobile SeaLab) var felles. Fiskeolje produsert ved et annet anlegg inneholdt ikke BHT. Det kan derfor ikke utelukkes at noe av prosessutstyret ved SeaLab er kilden til BHT. Andre kilder til BHT kan være plastflasker brukt til lagring av olje eller det kan være en naturlig variant som er funnet, en kommersiell sildolje bør derfor analyseres.

Det er beregnet at mellom 51 og 65 % av BHT i oljen destilleres av under SPD, slik at sildoljen produsert ved hydrolyseprosess inneholder mellom 0,0017 og 0,0022 mM BHT. Dette er på grunn av stor usikkerhet, bare en indikasjon på konsentrasjon av BHT i oljen. Siden det ikke kan dannes BHT under prosessen kan det sies at den beregnede konsentrasjonen er den minimale mengden av BHT i oljen. Oljen inneholder derfor minst 0,0017 mM BHT, dette tilsvarer 0,37 mg BHT/L olje. Mengden BHT i oljen er under den lovlige grensen for tilsetning av BHT i animalske oljer og fett.

Det er vanskelig å si noe om reproduserbarheten til metoden (SPD). For mengde konjugerte diener er mengden som destilleres av relativt stabil. Men GC-MS analyse gir få felles forbindelser i destillat fra samme olje. Dette tyder på enten dårlig reproduserbarhet i SPD eller at destillat og eller olje har forandret karakter under lagring. For å måle reproduserbarhet i avdestillerte forbindelser ved SPD bør flere prøver analyseres ved GC-MS. Separasjonsprosessen og analyse bør da utføres i samme tidsperiode slik at verken oljen eller destillatet må lagres i ulike tidsperioder.

For videre arbeid ville det vært interessant å sende flere prøver til GC-MS analyse. Både prøver kjørt ved samme betingelser for å se på reproduserbarhet og prøver kjørt ved ulike betingelser for å se nærmere på hvordan disse virker inn på de identifiserte forbindelsene. Videre forsøk bør utføres for å kunne sette optimale prosessbetingelser for metoden. Eventuell degradering av oljen som følge av metoden kan studeres nærmere dersom det i GC-MS analysen dukker opp lavmolekylære forbindelser på bekostning av tyngre forbindelser. Dersom metoden skal brukes til å fange og analysere flyktige forbindelser i marine oljer er det viktig at det ikke dannes produkter ved degradering som følge av prosessen. Dette bør derfor studeres nærmere.

Litteraturhenvisninger

1. Kolanowski, W. and G. Laufenberg, *Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition*. European Food Research and Technology, 2006. 222(3): p. 472-477.
2. Bang Ho, Dyerberg J., Nielsen Ab. *Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-Coast Eskimos*. *Lancet* 1971; i: 1143-1146.
3. Saravanan, P., et al., *Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids*. The Lancet, 2010. 376(9740): p. 540-550.
4. Ruxton, C.H.S., et al., *The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence*. Journal of Human Nutrition and Dietetics, 2004. 17(5): p. 449-459.
5. Skjævestad, B., Vogt, G., *Omega-3 oljer fra ferskt marint råstoff. En mulig konkurransestrategi for den norske omega-3 industrien*. Rapport/Report. 2009.
6. Coultate, T.P., *Food: the chemistry of its components*. 2009, Cambridge: Royal Society of Chemistry. XIX, 501 s.
7. *Council for Responsible Nutrition. White Paper: Long chain omega-3 fatty acids in human health*, Washington DC, 2005:1-6. 2005.
8. Pawlosky, R.J., et al., *Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans*. Journal of lipid research, 2001. 42(8): p. 1257-65.
9. Emken, E.A., R.O. Adlof, and R.M. Gulley, *Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1994. 1213(3): p. 277-288.
10. Simopoulos AP, Leaf A, Salem N Jr: *Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids*. *Ann Nutr Metab* 1999;43:127-130.
11. Rubio-Rodríguez, N., et al., *Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010. 11(1): p. 1-12.
12. Kulås, E., E. Olsen, and R. Ackman, *Oxidation of fish lipids and its inhibition with tocopherols*, in *Lipid Oxidation Pathways*. 2003, AOCS Publishing.
13. Spinelli, J., Stout, VF., Nilsson, WB., *PURIFICATION OF FISH OILS*. 1987: US. Patent no. 4,692,280.
14. Ando, Y., et al., *Stereospecific analysis of fish oil triacyl-*sn*-glycerols*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1992. 69(5): p. 417-424.
15. Wijesundera, C., et al., *Docosahexaenoic acid is more stable to oxidation when located at the-2 position of triacylglycerol compared to -1(3)*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008. 85(6): p. 543-548.

16. Shahidi, F., *Bailey's industrial oil and fat products, volumes 1-6 (6th Edition)*, John Wiley & Sons. p. 357-380.
17. Bruheim, I., *Solid-phase microextraction (SPME) in the fish oil industry*. *Lc Gc Europe*, 2009. 22(3): p. 126-+.
18. Chaiyasit, W., et al., *role of physical structures in bulk oils on lipid Oxidation*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007. 47(3): p. 299 - 317.
19. Shahidi, F., *Bailey's industrial oil and fat products, Volumes 1-6 (6th Edition)*, John Wiley & Sons. p. 269-343.
20. Choe, E. and D.B. Min, *Mechanisms and factors for edible oil oxidation*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006. 5(4): p. 169-186.
21. Kulås, E. and R.G. Ackman, *Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. 49(4): p. 1724-1729.
22. Kataoka, H., H.L. Lord, and J. Pawliszyn, *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. *Journal of Chromatography A*, 2000. 880(1-2): p. 35-62.
23. Ruyter, B., Grimmer, S., Thorkildsen, T., Todorčević, M., Lalic, M., Vogt, G. , *Lite oksiderte omega-3 oljer og potensielle helsefordeler. En screening av omega-3-oljer med hensyn til variasjon i oksidasjonsgrad, innhold av oksidasjonsprodukter og effekt på markørsystemer. Rapport/Report*. 31/2010.
24. Mäkinen, M. and A.-M. Lampi, *The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism, in lipid oxidation pathways*. 2003, AOCS Publishing.
25. Pokorny, J., N. Yanishlieva, and M. Gordon, *antioxidants in food - practical applications*. 2001, Woodhead Publishing. p. 22-57.
26. Frankel, E.N., *Lipid oxidation*. 1998, Dundee: Oily Press. 303 s.
27. Pokorny, J., N. Yanishlieva, and M. Gordon, *Antioxidants in food - practical applications*. 2001, Woodhead Publishing. p. 7-21.
28. Akoh, C.C. and D.B. Min, *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 2008, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group. xiii, 914 s.
29. Barclay, L.R.C., et al., *Chain-breaking phenolic antioxidants: steric and electronic effects in polyalkylchromanols, tocopherol analogs, hydroquinones, and superior antioxidants of the polyalkylbenzochromanol and naphthofuran class*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1993. 58(26): p. 7416-7420.
30. *Long-chain omega-3 specialty oils*. 2007, Bridgwater: Oily Press. xiv, 299 s.
31. Hudson, B.J.F., *Food antioxidants*. 1990, London: Elsevier Applied Science. XII, 317 s.
32. NIFES., *Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (2011) Antioksidanter i fiskefôr [Online] Tilgjengelig fra: http://www.nifes.no/index.php?page_id=319*

33. Foss, P., et al., *Carotenoids in diets for salmonids: I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin*. *Aquaculture*, 1984. 41(3): p. 213-226.
34. Frankel, E.N., *In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids*. *Trends in Food Science & Technology*, 1993. 4(7): p. 220-225.
35. Babu, B., J. T. Wu., *Production of natural butylated hydroxytoluene as an antioxidant by fresh water phytoplankton*. *Journal of Phycology*, 2008. 44(6): p. 1447-1454.
36. Bouftira I., Abdelly C., Sfar S., *Identification of a naturally occurring 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol from purple leaves of the halophyte plant Mesembryanthemum crystallinum*. *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, no. 9, pp1136-1139 (2007).
37. Mattilsynet., *Tilsetningsstofforskriften med vedlegg (positivlisten) (2006)* [Online] Tilgjengelig fra: http://www.mattilsynet.no/regelverk/forskrifter/tilsetningsstofforskriften_med_vedlegg__positivlisten__6966.
38. Pedjie, N., PerkinElmer, Inc. (2010) *Rapid UHPLC determination of common antioxidants in edible oils*. [Online] Tilgjengelig fra: http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74034APP_AntioxidantsinEdibleOilbyUHPLC.pdf.
39. Yang, M.-H., H.-J. Lin, and Y.-M. Choong, *A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats*. *Food Research International*, 2002. 35(7): p. 627-633.
40. Sin, D.W.M., et al., *Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006. 19(8): p. 784-791.
41. Doeden, W., R. Bowers, and A. Ingala, *determination of BHA, BHT and TBHQ in edible fats and oils*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1979. 56(1): p. 12-14.
42. Prasad, U.V., et al., *Spectrophotometric determination of some antioxidants in oils and fats*. *Food Chemistry*, 1987. 25(2): p. 159-164.
43. Szalkowski, C.R. and J.B. Garber, *Antioxidant measurement, determination of 2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT): Application to edible fats and oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1962. 10(6): p. 490-495.
44. Berger, K.G., Sylvester, N.D., Haines, D.M., *The determination of chemical antioxidants in fats after separation by partition chromatography*. *Analyst* 1960 Vol. 85 pp. 341-345.
45. Anglin, C., J.H. Mahon, and R.A. Chapman, *Antioxidant Analysis, Determination of Antioxidants in Edible Fats*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1956. 4(12): p. 1018-1022.

46. Phipps, A., *Liquid-liquid extraction of BHT from vegetable oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1973. 50(1): p. 21-23.
47. Refsgaard, H.H.F., A.M. Haahr, and B. Jensen, *Isolation and quantification of volatiles in fish by dynamic headspace sampling and mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. 47(3): p. 1114-1118.
48. Rorbaek, K. and B. Jensen, *Optimizing headspace sampling temperature and time for analysis of volatile oxidation products in fish oil*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1997. 74(12): p. 1607-1609.
49. Kolb, B. and L.S. Ettre, *Static headspace-gas chromatography: theory and practice*. 1997, New York: Wiley-VCH. XX, 298 s.
50. Bjelanovic, M., Volden, J. , *Markørkomponenter fra marine fettsyrer*. UMB, 2010.
51. Pokorny, J., N. Yanishlieva, and M. Gordon, *Antioxidants in Food - Practical Applications*. 2001, Woodhead Publishing. p. 71-84.
52. Lee, H., et al., *Analysis of headspace volatile and oxidized volatile compounds in DHA-enriched fish oil on accelerated oxidative storage*. Journal of Food Science, 2003. 68(7): p. 2169-2177.
53. Hsleh, T., et al., *Characterization of volatile components of menhaden fish (brevoortia tyrannus) oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1989. 66(1): p. 114-117.
54. Aidos, I., et al., *Volatile oxidation products formed in crude herring oil under accelerated oxidative conditions*. European journal of lipid science and technology, 2002. 104(12): p. 808-818.
55. Refsgaard, H.H.F., P.B. Brockhoff, and B. Jensen, *Sensory and chemical changes in farmed Atlantic salmon (Salmo salar) during frozen storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. 46(9): p. 3473-3479.
56. Karahadian, C., R.C. Lindsay, *Evaluation of compounds contributing characterizing fishy flavors in fish oils*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1989. 66(7): p. 953-960.
57. Xu, X., *Short-Path Distillation for Lipid Processing*, in *Healthful Lipids*. 2005, AOCS Publishing.
58. Fellows, P.J., *Food processing technology - principles and practice (3rd Edition)*, Woodhead Publishing. p. 430-453.
59. Marttinello, M.A., Leone, I., Pramparo, M., *Simulation of deacidification process by molecular distillation of deodorizer distillate*. *Lat. Am. appl. res.* [online]. 2008, vol.38, n.4, pp. 299-304. ISSN 0327-0793. .
60. Albers, M., Graverholt, J.P., UIC GmbH (2006) *Short path distillation in the fish oil industry*. [Online] Tilgjengelig fra: http://www.uic-gmbh.de/index.php?lang=en&goto=06_druckschriften&sel=druckschriften&type=file.

61. Dinamarca, E., F. Garrido, and A. Valenzuela, *Simple high vacuum distillation equipment for deodorizing fish oil for human consumption*. *Lipids*, 1990. 25(3): p. 170-171.
62. Carey, F.A., *Organic chemistry*. 2008, Boston: McGraw-Hill. XXXII, 1229, [50] s.
63. Owen, T., Agilent Technologies (2000) *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. [Online] Tilgjengelig fra: http://www.chem.agilent.com/en-US/Search/Library/_layouts/Agilent/PublicationSummary.aspx?whid=16907&lid=7.
64. McMaster, M.C., *GC/MS: a practical user's guide*. 2008, Hoboken, N.J.: Wiley. XII, 180 s.
65. Greibrokk, T., et al., *Kromatografi: separasjon og deteksjon*. 2005, Oslo: Pensumtjeneste. 300 s.
66. Antolovich, M., et al., *Methods for testing antioxidant activity*. *Analyst*, 2002. 127(1): p. 183-198.
67. Ruiz, A., M.J.A. Canada, and B. Lendl, *A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection*. *Analyst*, 2001. 126(2): p. 242-246.
68. AOCS Method Ti 1a-64. *Spectrophotometric determination of conjugated dienoic acid*. In *official methods and recommended practices of the American Oil chemists'society*; AOCS Press: Champaign, I., 1993.
69. Ueda, S., Hayashi, Y., Namiki, M. 1986. *Effect of ascorbic acid on lipid autoxidation in a model food system*. *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 50(1), 1–7.
70. AOCS Official Method Cd 18-90. *p-Anisidine Value*. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists'Society*: AOCS Press: Champaign, I., 1993.
71. Rontani, J.-F., et al., *Formation of pristane from [alpha]-tocopherol under simulated anoxic sedimentary conditions: A combination of biotic and abiotic degradative processes*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010. 74(1): p. 252-263.
72. Li, M., et al., *Biomarkers or not biomarkers? A new hypothesis for the origin of pristane involving derivation from methyltrimethyltridecylchromans (MTTCs) formed during diagenesis from chlorophyll and alkylphenols*. *Organic Geochemistry*, 1995. 23(2): p. 159-167.
73. Rontani, J.-F. and P. Bonin, *Production of pristane and phytane in the marine environment: role of prokaryotes*. *Research in Microbiology*. In Press, Corrected Proof.
74. Nhi-Cong, L.T., et al., *Degradation of the multiple branched alkane 2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane (pristane) in Rhodococcus ruber and Mycobacterium neoaurum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009. 63(2): p. 201-207.

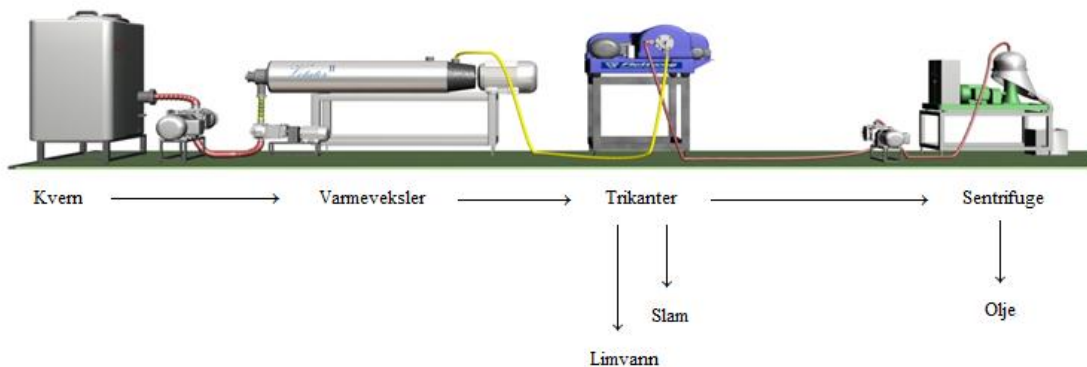
Vedlegg A: Prosessering av olje

I denne oppgave er det benyttet sildolje produsert ved to forskjellige prosesser, termisk behandling og enzymatisk hydrolyse, fra Træna (Modolv Sjøset pelagic) og Brekstad (Grøntvedt Pelagic.) Det ble også benyttet en fiskeolje produsert ved Egersund sildoljefabrikk. Oljenes prosessering er nærmere beskrevet under.

A.1: Sildolje

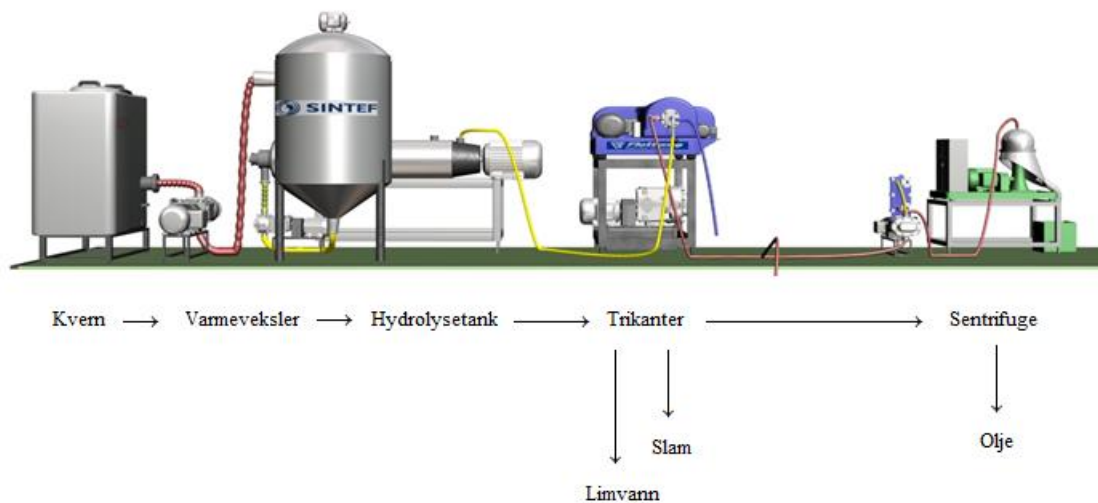
Sildolje ble produsert av SINTEF på en mobil ”SeaLab”, med råstoff fra Træna og Brekstad. Oljen fra Træna ble produsert i september 2009 mens oljen fra Brekstad ble produsert i februar 2010.[1]. En enkel skjematisk presentasjon av prosessen for termisk behandling og enzymatisk hydrolyse er gitt i henholdsvis figur A.1 og A.2.

Ved termisk behandling ble råmaterial kvernet før det ble varmet opp i en varmeveksler. Det ble benyttet temperatur på 85 °C ved forsøket på Træna, mens oljen på Brekstad ble kjørt på 70 °C. Oljen ble så separert ut gjennom to trinn, først en trikanter så en sentrifuge. I trikanteren separeres råstoffet i tre fraksjoner: limvann, slam og olje. Olje sendes så videre til en sentrifuge der oljen (fettet) skilles fra resten av væsken. [1]



Figur A.1: Enkelt flytskjema for produksjon av sildolje ved termisk behandling. [1]

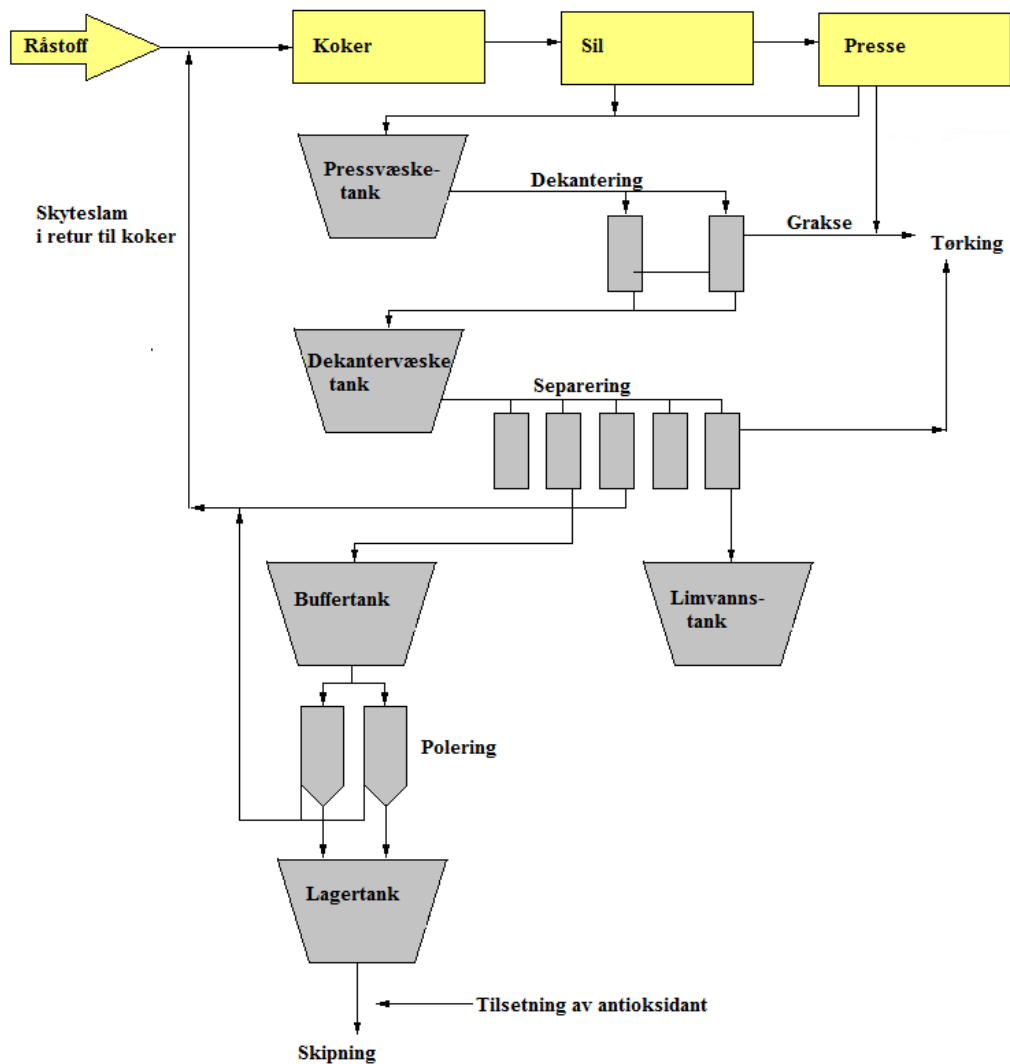
Den hydrolyserte oljen ble kvernet før den ble varmet opp til 55 °C i varmeveksleren. I hydrolysetanken ble det tilsatt vann (1:1 w/w forhold vann:råmaterial) og enzym (0,1 w% av råmaterial). Papain-Bromelain (1:1 forhold) ble benyttet som enzym i hydrolyseprosessen på Træna, mens alcalase ble brukt på Brekstad. Etter en times henstand ble innholdet i tanken varmet opp til 90 °C med holdetid på 10 minutter for å inaktivere enzym. Oljen ble etter hydrolyse separert ut ved lik prosess som ved termisk behandling.



Figur A.2: Enkelt flytskjema for produksjon av sildolje ved enzymatisk hydrolyse. [1]

A.2: Fiskeolje

Fiskeoljen benyttet i denne oppgaven produseres som biprodukt i fiskemelproduksjon ved Egersund sildoljefabrikk. Figur A.3 gir et forenklet flytskjema over prosessen, prosessbeskrivelse er gitt i figur A.1.



Figur A.3: Enkelt flytskjema for produksjon av kommersiell fiskeolje ved Egersund sildoljefabrikk.

Tabell A.1: Prosessbeskrivelse for produksjon av fiskeolje ved Egersund sildoljefabrikk. [2]

| Prosess | Beskrivelse |
|-------------|--|
| Koker | Råstoffet til oljen består av omtrent 12-15 % avskjær fra sild, resten utgjør øyepål, kolmule, brisling og lodde. Fisk og tørrstoff/fett varmes opp i koker ved indirekte damp til min. 80 °C. Under oppvarmingen sprenges fettcellene i fisken slik at fett frigjøres. Kokingen forhindrer også problemer med bakterier senere i prosessen. |
| Sil | Etter koking sendes fiskemassen til avsiling. Den frie væsken (vann og fett) pumpes til pressvæsketank mens fisk føres til presse. |
| Presse | Fisken presses for å få ut mest mulig av restvæsken. Pressvæsken pumpes til pressvæsketank mens presskaken transporteres videre til tørking. |
| Dekantering | Pressvæsken sentrifugeres i dekanter. Her skilles tørrstoffet (grakse) som fortsatt finnes i pressvæsken ut. Graksen føres til tørking sammen med presskaken mens dekantervæsken føres til dekantervæsketank der den varmes opp til 90-95 °C. |
| Separering | Dekantervæsken pumpes til en separator der fett skilles fra resten av væsken. Limvann (restvæsken) føres til limvannstank, skyteslam føres tilbake til koker og oljen pumpes til buffertank. |
| Polering | Finfordelt slam tas ut av oljen med vann under poleringen. Ferdig olje pumpes til lagringstank. |
| Skipning | Oljen varmes til flytende konsistens før den pumpes til transportmiddel. Tilsetning av antioksidant foretas under overføringen. Antioksidantpulver (BHT/Vitalox) er på forhånd løst i blandekar. |

Fiskeoljen som ble brukt i denne oppgaven ble hentet ut fra lagertanken (figur A.3) og var derfor ikke tilsatt antioksidanter.

Vedlegg B: Konjugerte forbindelser

Konjugerte forbindelser absorberer sterkt i UV området og mengden av disse er beregnet fra absorbansen. For konjugerte diener er absorpsjonsmaksimum 234 nm mens for konjugerte triener er den 268 nm. Det ble målt absorbans på alle prøvene fra 200 til 800 nm. Absorbans ved 234 nm og 268 nm samt alle nødvendige verdier for beregning av mengde konjugerte verdier med standardavvik er gitt i tabell B.1 til B.4.

For å kunne sette opp en massebalanse over systemet (SPD) ble den totale mengden konjugerte diener og triener i prøvene ble beregnet ut fra ligning B.1 (også gitt i avsnitt 3.2 i hovedrapporten) der A er absorbansen og ϵ er den molare ekstinksjonskoeffisienten.

$$c = \frac{A}{\epsilon b} \quad (\text{B.1})$$

Den optiske veilengden, b for kyvetten er 1 cm. For konjugerte diener er den molare ekstinksjonskoeffisienten lik 25 000 Lmol⁻¹cm⁻¹, mens for konjugerte triener er den 17 000 Lmol⁻¹cm⁻¹.

For olje før SPD, retentat og kondensat (etter inndampning av etanol) ble absorbansen målt ved å løse X mg olje i V₁ ml isooktan. V_{Tot} er totalvolumet inn (olje før SPD) eller ut (retentat, kondensat og destillat) fra separasjonsprosessen i SPD. For å få totalvolumet av konjugerte forbindelser i mmol er ligning B.2 benyttet. Det antatt at oljens tetthet er 0,92 kg/m³.

$$\frac{A}{\epsilon b} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \right] \frac{V_2}{X} \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg}} \right] \left[\frac{1000\text{mg}}{\text{g}} \right] \left[\frac{1000\text{g}}{\text{kg}} \right] 0,92 \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right] V_1 [\text{L}] * \text{Fortynning} \quad (\text{B.2})$$

Verdier for A, X, V₁ og V₂ samt fortynning er gitt i tabell B.1 til B.4

Absorbansen ble målt direkte på destillatet da de flyktige forbindelsene er løst i etanol etter SPD. Mengde konjugerte forbindelser i destillatet kan beregnes fra ligning B.3:

$$\frac{A}{\epsilon b} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \right] V_1 [\text{ml}] \cdot \text{fortynning} \quad (\text{B.3})$$

Tabell B.1: Rådata for beregning av konjugerte diener med tilhørende standardavvik for olje før SPD og i retentat, kondensat og destillat fra olje kjørt gjennom SPD ved ulike oppholdstider. (Oppholdstiden er oppgitt i sekunder i kolonne prøve)

| Prøve | V _{Tot} [ml] | X [mg olje] | | | | V _i [ml] | Fortynning | OD 234 | | | | CD [mmol] | σ _{CD} |
|--------------|--------------------------|-------------|-------|-------|-------|------------------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------------|-----------------|
| | | | | | | | | | | | | | |
| Olje før SPD | 200 | 128 | 132 | 128,5 | 128,5 | 25 | 10 | 0,3549 | 0,3524 | 0,3378 | 0,3369 | 4,92 | 0,13 |
| Retentat 12 | 199 | 128,6 | 128,6 | 144,7 | 144,7 | 25 | 10 | 0,3514 | 0,3460 | 0,3655 | 0,3892 | 4,89 | 0,17 |
| Retentat 14 | 199 | 126,9 | 126,9 | 128,2 | 128,2 | 25 | 10 | 0,3357 | 0,3288 | 0,3492 | 0,3414 | 4,89 | 0,10 |
| Retentat 16 | 200 | 128 | 128 | 126,8 | 126,8 | 25 | 10 | 0,3402 | 0,3397 | 0,3310 | 0,3329 | 4,85 | 0,04 |
| Retentat 16 | 199 | 130,6 | 130,6 | 141,9 | 141,9 | 25 | 10 | 0,3504 | 0,3466 | 0,3913 | 0,4139 | 5,1 | 0,2 |
| Retentat 16 | 200 | 47,7 | 67,3 | 50,1 | - | 10 | 10 | 0,3248 | 0,4422 | 0,3314 | - | 4,91 | 0,09 |
| Retentat 18 | 199 | 125 | 125 | 121,2 | 121,2 | 25 | 10 | 0,3333 | 0,3390 | 0,3217 | 0,3235 | 4,92 | 0,05 |
| Retentat 22 | 199 | 133,5 | 133,5 | 135,7 | 135,7 | 25 | 10 | 0,3675 | 0,3599 | 0,3604 | 0,3499 | 4,91 | 0,13 |
| Retentat 29 | 199 | 122,6 | 122,6 | 122,6 | 122,6 | 25 | 10 | 0,3229 | 0,3283 | 0,3312 | - | 4,91 | 0,06 |
| Retentat 36 | 200 | 130 | 125 | 134,3 | 134,3 | 25 | 10 | 0,3458 | 0,4108 | 0,3486 | 0,3549 | 5,1 | 0,6 |
| Kondensat 12 | 1 | 49,8 | 41,5 | 42,1 | - | 10 | 10 | 1,084 | 0,8868 | 0,9090 | - | 0,0794 | 0,0007 |
| Kondensat 14 | 1 | 47,9 | 45,1 | 50,8 | - | 10 | 10 | 1,085 | 1,028 | 1,159 | - | 0,0838 | 0,0003 |
| Kondensat 16 | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat 16 | 1 | 47,2 | 48,8 | 42,8 | - | 10 | 10 | 0,9398 | 0,9787 | 0,8767 | - | 0,0742 | 0,0011 |
| Kondensat 16 | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat 18 | 1 | 61,8 | 54 | 49,5 | - | 10 | 10 | 1,430 | 1,475 | 1,135 | - | 0,090 | 0,009 |
| Kondensat 22 | 1 | 47,5 | 59,1 | 59,3 | - | 10 | 10 | 1,047 | 1,411 | 1,430 | - | 0,086 | 0,004 |
| Kondensat 29 | 1 | 30,7 | 30,7 | 30,7 | - | 10 | 10 | 0,5694 | 0,5920 | 0,5925 | - | 0,0701 | 0,0016 |
| Kondensat 36 | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Destillat 12 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,4499 | 0,4700 | 0,4724 | - | 0,00464 | 0,0001 |
| Destillat 14 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,5295 | 0,5201 | 0,5277 | - | 0,0053 | 0,0004 |
| Destillat 16 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,4541 | 0,4491 | 0,4648 | - | 0,00456 | 7,0E-5 |
| Destillat 16 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,4904 | 0,4892 | 0,5014 | 0,5143 | 0,00499 | 1,2E-4 |
| Destillat 16 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,4324 | 0,4520 | 0,4582 | - | 0,00448 | 1,3E-4 |
| Destillat 18 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,5857 | 0,5922 | 0,5566 | 0,5461 | 0,00570 | 0,0002 |
| Destillat 22 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,5554 | 0,5420 | 0,5109 | 0,4947 | 0,0053 | 0,0003 |
| Destillat 29 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,5032 | 0,4900 | 0,5014 | - | 0,00498 | 6E-5 |
| Destillat 36 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,6671 | 0,6371 | 0,6399 | 0,7296 | 0,00668 | 0,0004 |

Tabell B.2: Rådata for beregning av konjugerte triener med tilhørende standardavvik for olje før SPD og i retentat, kondensat og destillat fra olje kjørt gjennom SPD ved ulike oppholdstider. (Oppholdstiden er oppgitt i sekunder i kolonne prøve)

| Prøve | V _{Tot} | X [mg olje] | | | | V _i | Fortynning | OD 268 | | | | CT | σ _{CT} |
|---------------------|------------------|-------------|-------|-------|-------|----------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------------|
| | [ml] | | | | | [ml] | | | | | | [mmol] | |
| Olje før SPD | 200 | 128 | 132 | 128,5 | 128,5 | 25 | 10 | 0,01561 | 0,02386 | 0,01154 | 0,01392 | 0,339 | 0,106 |
| Retentat 12 | 199 | 128,6 | 128,6 | 144,7 | 144,7 | 25 | 10 | 0,01657 | 0,01523 | 0,01576 | 0,01296 | 0,302 | 0,045 |
| Retentat 14 | 199 | 126,9 | 126,9 | 128,2 | 128,2 | 25 | 10 | 0,01022 | 0,01016 | 0,01902 | 0,01092 | 0,267 | 0,090 |
| Retentat 16 | 200 | 128 | 128 | 126,8 | 126,8 | 25 | 10 | 0,01213 | 0,01278 | 0,00946 | 0,01012 | 0,236 | 0,032 |
| Retentat 16 | 199 | 130,6 | 130,6 | 141,9 | 141,9 | 25 | 10 | 0,01782 | 0,01290 | 0,01106 | 0,03073 | 0,358 | 0,165 |
| Retentat 16 | 200 | 47,7 | 67,3 | 50,1 | - | 10 | 10 | 0,01515 | 0,01421 | 0,01327 | - | 0,286 | 0,058 |
| Retentat 18 | 199 | 125 | 125 | 121,2 | 121,2 | 25 | 10 | 0,01149 | 0,01268 | 0,01080 | 0,01472 | 0,273 | 0,040 |
| Retentat 22 | 199 | 133,5 | 133,5 | 135,7 | 135,7 | 25 | 10 | 0,01669 | 0,01204 | 0,01159 | 0,01039 | 0,255 | 0,057 |
| Retentat 29 | 199 | 122,6 | 122,6 | 122,6 | 122,6 | 25 | 10 | 0,01192 | 0,01498 | 0,01273 | - | 0,292 | 0,035 |
| Retentat 36 | 200 | 130 | 125 | 134,3 | 134,3 | 25 | 10 | 0,01431 | 0,02501 | 0,01033 | 0,01259 | 0,325 | 0,149 |
| Kondensat12 | 1 | 49,8 | 41,5 | 42,1 | - | 10 | 10 | 0,1102 | 0,09115 | 0,09798 | - | 0,0122 | 0,0004 |
| Kondensat 14 | 1 | 47,9 | 45,1 | 50,8 | - | 10 | 10 | 0,1203 | 0,1134 | 0,1300 | - | 0,0137 | 0,0001 |
| Kondensat 16 | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat 16 | 1 | 47,2 | 48,8 | 42,8 | - | 10 | 10 | 0,09318 | 0,1057 | 0,09735 | - | 0,0116 | 0,0008 |
| Kondensat 16 | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat18 | 1 | 61,8 | 54 | 49,5 | - | 10 | 10 | 0,1755 | 0,1838 | 0,1425 | - | 0,0165 | 0,0017 |
| Kondensat 22 | 1 | 47,5 | 59,1 | 59,3 | - | 10 | 10 | 0,1464 | 0,1992 | 0,2056 | - | 0,0179 | 0,0011 |
| Kondensat 29 | 1 | 30,7 | 30,7 | 30,7 | - | 10 | 10 | 0,1042 | 0,1109 | 0,1156 | - | 0,0194 | 0,0010 |
| Kondensat 36 | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Destillat 12 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,2767 | 0,2445 | 0,2244 | - | 0,00365 | 0,00039 |
| Destillat 14 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,3115 | 0,2919 | 0,3006 | - | 0,00443 | 0,00014 |
| Destillat 16 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,3209 | 0,3213 | 0,3228 | - | 0,00473 | 1,4E-05 |
| Destillat 16 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,2893 | 0,3071 | 0,2548 | 0,2530 | 0,00406 | 0,00039 |
| Destillat 16 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,2562 | 0,2766 | 0,2665 | - | 0,00392 | 0,00015 |
| Destillat 18 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,3450 | 0,3498 | 0,3210 | 0,3184 | 0,00490 | 0,00024 |
| Destillat 22 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,2980 | 0,2953 | 0,2781 | 0,2650 | 0,00418 | 0,00023 |
| Destillat 29 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,2757 | 0,2991 | 0,2894 | - | 0,00424 | 0,00017 |
| Destillat 36 | 25 | - | - | - | - | - | 10 | 0,4699 | 0,4436 | 0,5311 | 0,4025 | 0,00679 | 0,00079 |

Tabell B.3: Rådata for beregning av konjugerte diener med tilhørende standardavvik for olje før SPD og i retentat, kondensat og destillat fra olje kjørt gjennom SPD (HT = hydrolysert, Træna, TT = Termisk behandlet, Træna, HB = Hydrolysert, Brekstad, TB = Termisk behandlet, Brekstad, K = kommersiell fiskeolje, Egersund.)

| Prøve | V _{Tot} [ml] | X [mg olje] | | | V _I [ml] | Fortynning | OD 234 | | | CD [mmol] | σ _{CD} |
|-----------------|-----------------------|-------------|-------|-------|---------------------|------------|--------|--------|--------|-----------|-----------------|
| Olje før SPD HT | 200 | 128 | 132 | 128,5 | 25 | 10 | 0,3549 | 0,3524 | 0,3374 | 4,9 | 0,13 |
| Olje før SPD TT | 200 | 108,7 | 121,9 | 109,8 | 25/25/10 | 10 | 0,3485 | 0,3760 | 0,7244 | 5,5 | 0,5 |
| Olje før SPD HB | 200 | 124,1 | 126,4 | 122,4 | 25 | 10 | 0,3341 | 0,3248 | 0,3524 | 5,0 | 0,3 |
| Olje før SPD TB | 200 | 129,9 | 124,5 | 130,6 | 25 | 10 | 0,3519 | 0,3160 | 0,3438 | 4,8 | 0,16 |
| Olje før SPD K | 200 | 115,7 | 110,1 | 117,7 | 25 | 10 | 0,4008 | 0,3874 | 0,4137 | 6,44 | 0,06 |
| Retentat HT | 199 | 47,7 | 67,3 | 50,1 | 10 | 10 | 0,3248 | 0,4422 | 0,3314 | 4,91 | 0,09 |
| Retentat HT | 199 | 128 | 128 | 126,8 | 25 | 10 | 0,3402 | 0,3397 | 0,3319 | 4,85 | 0,04 |
| Retentat HT | 199 | 130,6 | 130,6 | 141,9 | 25 | 10 | 0,3504 | 0,3466 | 0,1956 | 5,1 | 0,2 |
| Retentat TT | 199 | 130,2 | 128,4 | 126,1 | 25 | 10 | 0,3909 | 0,3346 | 0,3303 | 5,0 | 0,4 |
| Retentat TT | 199 | 133,5 | 125,1 | 123,6 | 25 | 10 | 0,3551 | 0,3364 | 0,3265 | 4,90 | 0,04 |
| Retentat TT | 199 | 128,8 | 120,2 | 120,4 | 25 | 10 | 0,3610 | 0,3287 | 0,3324 | 5,09 | 0,06 |
| Retentat HB | 198 | 127 | 138,7 | 50,1 | 25/25/10 | 10 | 0,3313 | 0,3619 | 0,3238 | 4,79 | 0,03 |
| Retentat HB | 198 | 51,4 | 49,4 | 60,3 | 10 | 10 | 0,3466 | 0,3209 | 0,3949 | 4,9 | 0,10 |
| Retentat HB | 198 | 122,2 | 123,2 | 124,9 | 25 | 10 | 0,3200 | 0,3174 | 0,3267 | 4,79 | 0,04 |
| Retentat TB | 197 | 123,9 | 135,4 | 125 | 25 | 10 | 0,3219 | 0,3520 | 0,3369 | 4,8 | 0,10 |
| Retentat TB | 197 | 129,6 | 131,1 | 128,9 | 25 | 10 | 0,3377 | 0,3403 | 0,3447 | 4,83 | 0,08 |
| Retentat TB | 197 | 133,6 | 123,6 | 120,2 | 25 | 10 | 0,3402 | 0,3093 | 0,3011 | 4,63 | 0,05 |
| Retentat K | 194 | 100,4 | 94,7 | 102,8 | 25 | 10 | 0,2810 | 0,2549 | 0,2831 | 5,06 | 0,10 |
| Retentat K | 193 | 102,3 | 105,2 | 93,1 | 25 | 10 | 0,2812 | 0,2858 | 0,2448 | 4,96 | 0,11 |
| Retentat K | 194 | 114,2 | 107,2 | 116,3 | 25 | 10 | 0,3341 | 0,3127 | 0,3347 | 5,35 | 0,05 |
| Kondensat HT | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat HT | 1 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat HT | 1 | 47,2 | 48,8 | 42,8 | 10 | 10 | 0,9398 | 0,9787 | 0,8767 | 0,074 | 0,0011 |
| Kondensat TT | 1 | 48,1 | 45,6 | 50,1 | 10 | 10 | 1,015 | 1,011 | 1,105 | 0,160 | 0,004 |
| Kondensat TT | 1 | 48,8 | 54,8 | 65,3 | 10 | 10 | 0,8005 | 0,9284 | 1,088 | 0,123 | 0,002 |
| Kondensat TT | 1 | 129,5 | 130,6 | 118,3 | 25 | 10 | 1,136 | 1,144 | 1,043 | 0,1616 | 0,0006 |
| Kondensat HB | 2 | 122,5 | 130 | 132,6 | 25 | 10 | 0,5283 | 0,5480 | 0,5744 | 0,079 | 0,0012 |
| Kondensat HB | 2 | 130,4 | 125,7 | 159,1 | 25 | 10 | 0,5833 | 0,5568 | 0,7076 | 0,0819 | 0,0004 |
| Kondensat HB | 2 | 59,6 | 47,2 | 56,3 | 10 | 10 | 0,6270 | 0,5076 | 0,6088 | 0,079 | 0,0011 |

| Prøve | V _{Tot} [ml] | X [mg olje] | | | V _I [ml] | Fortynning | OD 234 | | | CD [mmol] | σ _{CD} |
|--------------|-----------------------|-------------|-------|-------|---------------------|------------|--------|--------|--------|------------|-----------------|
| Kondensat TB | 3 | 50,1 | 44,3 | 44,5 | 10 | 10 | 0,4254 | 0,3749 | 0,3753 | 0,0934 | 0,0003 |
| Kondensat TB | 3 | 49,6 | 50,1 | 46,3 | 10 | 10 | 0,4154 | 0,4276 | 0,3851 | 0,093 | 0,0012 |
| Kondensat TB | 3 | 52,3 | 47,1 | 46,8 | 10 | 10 | 0,5370 | 0,4894 | 0,4827 | 0,1140 | 0,0007 |
| Kondensat K | 6 | 124,7 | 127,9 | 120,7 | 25 | 50 | 0,5652 | 0,5717 | 0,5381 | 1,24 | 0,011 |
| Kondensat K | 7 | 124,8 | 127,7 | 127,8 | 25 | 50 | 0,5084 | 0,5009 | 0,5187 | 1,29 | 0,03 |
| Kondensat K | 6 | 129,5 | 120,2 | 121,8 | 25 | 50 | 0,5630 | 0,5143 | 0,5238 | 1,19 | 0,010 |
| Destillat HT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,4324 | 0,4520 | 0,4582 | 0,0045 | 0,00013 |
| Destillat HT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,4541 | 0,4491 | 0,4648 | 0,00455988 | 8E-05 |
| Destillat HT | 25 | - | - | - | - | 10 | 0,4904 | 0,4892 | 0,5078 | 0,0050 | 0,00012 |
| Destillat TT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,4809 | 0,4776 | 0,4907 | 0,00483 | 7E-05 |
| Destillat TT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,5932 | 0,5909 | 0,5807 | 0,00588 | 7E-05 |
| Destillat TT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,4379 | 0,4429 | 0,4342 | 0,00438 | 4E-05 |
| Destillat HB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,6555 | 0,6611 | 0,6653 | 0,00661 | 5E-05 |
| Destillat HB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,4434 | 0,4397 | 0,4500 | 0,00444 | 5E-05 |
| Destillat HB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,6406 | 0,6579 | 0,6550 | 0,00651 | 9E-05 |
| Destillat TB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,8781 | 0,8683 | 0,8701 | 0,00872 | 5E-05 |
| Destillat TB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,7081 | 0,6974 | 0,7027 | 0,00703 | 5E-05 |
| Destillat TB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,6394 | 0,6423 | 0,6456 | 0,00642 | 3E-05 |
| Destillat K | 50 | - | - | - | - | 10 | 0,4054 | 0,3990 | 0,3972 | 0,00801 | 9E-05 |
| Destillat K | 50 | - | - | - | - | 10 | 0,3395 | 0,3444 | 0,3480 | 0,00688 | 8E-5 |
| Destillat K | 50 | - | - | - | - | 10 | 0,3831 | 0,3843 | 0,3849 | 0,00768 | 1,9E-5 |

Tabell B.4: Rådata for beregning av konjugerte triener med tilhørende standardavvik for olje før SPD og i retentat, kondensat og destillat fra olje kjørt gjennom SPD (HT = hydrolysert, Træna, TT = Termisk behandlet, Træna, HB = Hydrolysert, Brekstad, TB = Termisk behandlet, Brekstad, K = kommersiell fiskeolje, Egersund.)

| Prøve | V _{Tot} [ml] | X [mg olje] | | | V _i [ml] | Fortynning | OD 268 | | | CT [mmol] | σ _{CT} |
|-----------------|-----------------------|-------------|-------|-------|---------------------|------------|--------|--------|--------|-----------|-----------------|
| Olje før SPD HT | 200 | 128 | 132 | 128,5 | 25 | 10 | 0,0156 | 0,0239 | 0,0127 | 0,3 | 0,19 |
| Olje før SPD TT | 200 | 108,7 | 121,9 | 109,8 | 25/25/10 | 10 | 0,0272 | 0,0240 | 0,0294 | 0,5 | 0,2 |
| Olje før SPD HB | 200 | 124,1 | 126,4 | 122,4 | 25 | 10 | 0,0292 | 0,0181 | 0,0290 | 0,6 | 0,14 |
| Olje før SPD TB | 200 | 129,9 | 124,5 | 130,6 | 25 | 10 | 0,0234 | 0,0107 | 0,0133 | 0,3 | 0,14 |
| Olje før SPD K | 200 | 115,7 | 110,1 | 117,7 | 25 | 10 | 0,0131 | 0,0168 | 0,0143 | 0,35 | 0,06 |
| Retentat HT | 199 | 47,7 | 67,3 | 50,1 | 10 | 10 | 0,0151 | 0,0142 | 0,0133 | 0,29 | 0,06 |
| Retentat HT | 199 | 128 | 128 | 126,8 | 25 | 10 | 0,0121 | 0,0128 | 0,0098 | 0,24 | 0,03 |
| Retentat HT | 199 | 130,6 | 130,6 | 141,9 | 25 | 10 | 0,0178 | 0,0129 | 0,0111 | 0,4 | 0,17 |
| Retentat TT | 199 | 130,2 | 128,4 | 126,1 | 25 | 10 | 0,0139 | 0,0117 | 0,0130 | 0,27 | 0,02 |
| Retentat TT | 199 | 133,5 | 125,1 | 123,6 | 25 | 10 | 0,0124 | 0,0156 | 0,0115 | 0,28 | 0,05 |
| Retentat TT | 199 | 128,8 | 120,2 | 120,4 | 25 | 10 | 0,0220 | 0,0262 | 0,0193 | 0,50 | 0,08 |
| Retentat HB | 198 | 127 | 138,7 | 50,1 | 25/25/10 | 10 | 0,0162 | 0,0199 | 0,0159 | 0,36 | 0,03 |
| Retentat HB | 198 | 51,4 | 49,4 | 60,3 | 10 | 10 | 0,0243 | 0,0159 | 0,0194 | 0,40 | 0,09 |
| Retentat HB | 198 | 122,2 | 123,2 | 124,9 | 25 | 10 | 0,0127 | 0,0121 | 0,0131 | 0,277 | 0,009 |
| Retentat TB | 197 | 123,9 | 135,4 | 125 | 25 | 10 | 0,0367 | 0,0284 | 0,0452 | 0,8 | 0,2 |
| Retentat TB | 197 | 129,6 | 131,1 | 128,9 | 25 | 10 | 0,0274 | 0,0326 | 0,0402 | 0,7 | 0,14 |
| Retentat TB | 197 | 133,6 | 123,6 | 120,2 | 25 | 10 | 0,0062 | 0,0056 | 0,0050 | 0,121 | 0,006 |
| Retentat K | 194 | 100,4 | 94,7 | 102,8 | 25 | 10 | 0,0079 | 0,0037 | 0,0051 | 0,15 | 0,06 |
| Retentat K | 193 | 102,3 | 105,2 | 93,1 | 25 | 10 | 0,0059 | 0,0089 | 0,0040 | 0,17 | 0,06 |
| Retentat K | 194 | 114,2 | 107,2 | 116,3 | 25 | 10 | 0,0163 | 0,0139 | 0,0127 | 0,34 | 0,05 |
| Kondensat HT | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat HT | 1 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Kondensat HT | 1 | 47,2 | 48,8 | 42,8 | 10 | 10 | 0,0932 | 0,1057 | 0,0974 | 0,0116 | 0,0008 |
| Kondensat TT | 1 | 48,1 | 45,6 | 50,1 | 10 | 10 | 0,1222 | 0,1337 | 0,1438 | 0,030 | 0,002 |
| Kondensat TT | 1 | 48,8 | 54,8 | 65,3 | 10 | 10 | 0,1122 | 0,1334 | 0,1546 | 0,0256 | 0,0007 |
| Kondensat TT | 1 | 129,5 | 130,6 | 118,3 | 25 | 10 | 0,1253 | 0,1277 | 0,1224 | 0,027 | 0,0010 |
| Kondensat HB | 2 | 122,5 | 130 | 132,6 | 25 | 10 | 0,0578 | 0,0539 | 0,0567 | 0,0118 | 0,0008 |
| Kondensat HB | 2 | 130,4 | 125,7 | 159,1 | 25 | 10 | 0,0676 | 0,0550 | 0,0715 | 0,013 | 0,0012 |
| Kondensat HB | 2 | 59,6 | 47,2 | 56,3 | 10 | 10 | 0,0699 | 0,0621 | 0,0731 | 0,0137 | 0,0008 |

| Prøve | V _{Tot} [ml] | X [mg olje] | | | V _I [ml] | Fortynning | OD 268 | | | CT [mmol] | σ _{CT} |
|--------------|-----------------------|-------------|-------|-------|---------------------|------------|--------|--------|---------|-----------|-----------------|
| Kondensat TB | 3 | 50,1 | 44,3 | 44,5 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kondensat TB | 3 | 49,6 | 50,1 | 46,3 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kondensat TB | 3 | 52,3 | 47,1 | 46,8 | 10 | 10 | 0,0351 | 0,0301 | 0,0292 | 0,0105 | 0,0004 |
| Kondensat K | 6 | 124,7 | 127,9 | 120,7 | 25 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kondensat K | 7 | 124,8 | 127,7 | 127,8 | 25 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kondensat K | 6 | 129,5 | 120,2 | 121,8 | 25 | 50 | 0,0244 | 0,0158 | 0,0215 | 0,013 | 0,002 |
| Destillat HT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,2562 | 0,2766 | 0,2665 | 0,0039 | 0,00015 |
| Destillat HT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,3209 | 0,3213 | 0,3228 | 0,00473 | 1,4E-05 |
| Destillat HT | 25 | - | - | - | - | 10 | 0,2893 | 0,3071 | 0,2539 | 0,0041 | 0,0004 |
| Destillat TT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,3213 | 0,3229 | 0,3272 | 0,00476 | 5E-05 |
| Destillat TT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,3412 | 0,3402 | 0,3357 | 0,00499 | 4E-05 |
| Destillat TT | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,3064 | 0,3118 | 0,3046 | 0,00452 | 6E-05 |
| Destillat HB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,6640 | 0,6691 | 0,6713 | 0,00983 | 6E-05 |
| Destillat HB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,5795 | 0,5738 | 0,5848 | 0,00852 | 8E-05 |
| Destillat HB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,6259 | 0,6258 | 0,6303 | 0,00923 | 4E-05 |
| Destillat TB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,3990 | 0,3901 | 0,3972 | 0,005815 | 7E-05 |
| Destillat TB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,4445 | 0,4365 | 0,4433 | 0,006492 | 6E-05 |
| Destillat TB | 50 | - | - | - | - | 5 | 0,3503 | 0,3555 | 0,3558 | 0,005204 | 5E-05 |
| Destillat K | 50 | - | - | - | - | 10 | 0,6593 | 0,6559 | 0,64445 | 0,0192 | 0,0002 |
| Destillat K | 50 | - | - | - | - | 10 | 0,5855 | 0,5857 | 0,5859 | 0,017226 | 6E-06 |
| Destillat K | 50 | - | - | - | - | 10 | 0,6503 | 0,6559 | 0,6623 | 0,0193 | 0,0002 |

Vedlegg C: Peroksidverdi

Peroksidverdien, PV for olje før SPD og olje etter SPD (retentat) ble beregnet ut fra formel C.1.

$$PV = \frac{(A_{prøve} - A_{blank})a}{2(55.84)m_0} \quad (C.1)$$

Rådata og utregnet gjennomsnittelig verdi for PV med tilhørende standardavvik er gitt i tabell C.1. Ligning C.1 gir peroksidverdien med benevning meq oksygen/kg olje. Molekylvekten til jern er $55,78 \text{ gmol}^{-1}$, a er gitt av stigningen til standardkurven basert på Fe(III) gitt i figur C.1.

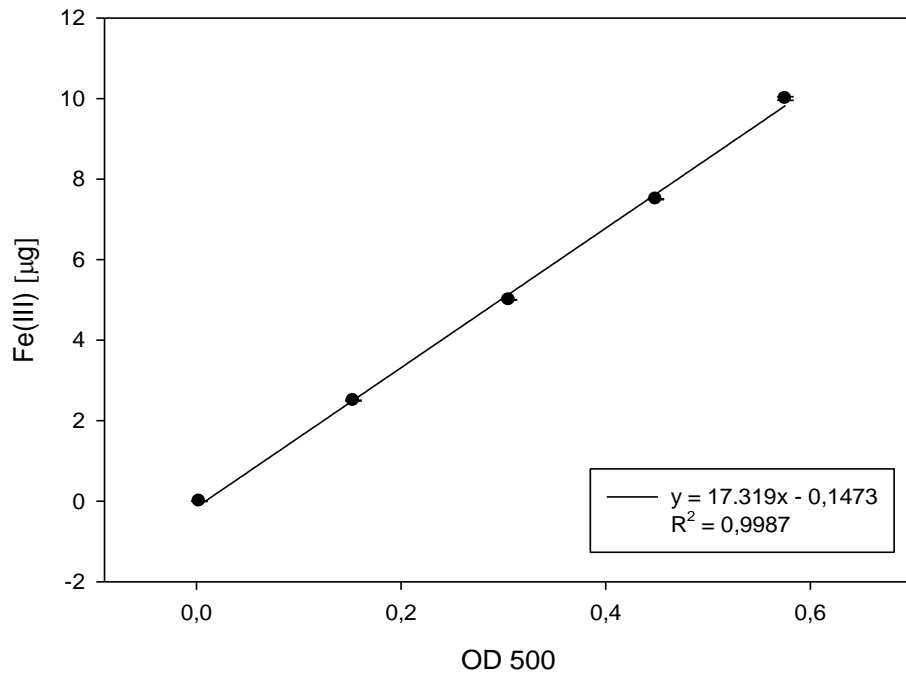
Tabell C.1: Rådata for beregning av peroksidverdi med standardavvik for olje før SPD og retentat fra olje kjørt gjennom SPD ved ulik oppholdstid, nummeret angir oppholdstiden gjennom SPD i sekunder.

| Prøve | Parallell 1 | | Parallell 2 | | Parallell 3 | | A_{blank} | PV | σ_{PV} |
|--------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|-------------|------|---------------|
| | m_0 [mg] | $A_{prøve}$ | m_0 [mg] | $A_{prøve}$ | m_0 [mg] | $A_{prøve}$ | | | |
| BLANK | | 0,071 | | 0,069 | | 0,067 | 0,069 | | |
| Olje før SPD | 16,1 | 0,125 | 16,4 | 0,123 | 17,1 | 0,125 | | 2,60 | 0,09 |
| Retentat 12 | 15,5 | 0,108 | 16,8 | 0,113 | 17,4 | 0,125 | | 2,10 | 0,3 |
| Retentat 14 | 17,4 | 0,127 | 15,1 | 0,112 | 16,7 | 0,116 | | 1,94 | 0,18 |
| Retentat 16 | 16,0 | 0,111 | 15,4 | 0,109 | 18,0 | 0,113 | | 2,16 | 0,12 |
| Retentat 16 | 15,0 | 0,114 | 16,0 | 0,110 | 17,8 | 0,115 | | 2,32 | 0,2 |
| Retentat 18 | 16,2 | 0,112 | 15,5 | 0,115 | 14,9 | 0,110 | | 1,98 | 0,08 |
| Retentat 22 | 15,0 | 0,103 | 14,6 | 0,109 | 15,5 | 0,108 | | 1,93 | 0,11 |
| Retentat 29 | 17,9 | 0,122 | 14,8 | 0,111 | 15,0 | 0,113 | | 2,16 | 0,3 |
| Retentat 36 | 15,5 | 0,115 | 15,9 | 0,115 | 14,9 | 0,103 | | 2,26 | 0,05 |

Standardkurven er basert på Fe(III) og gir absorbans ved 500 nm (OD 500) som funksjon av konsentrasjon Fe(III). Rådata for standardkurven er presentert i tabell C.2.

Tabell C.2: Rådata til standardkurve basert på Fe(III) for beregning av peroksidverdi.

| µl Fe(III) (100µg/ml) | OD 500 | | | Snitt OD 500 | Fe(III) [µg] |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|
| | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | | |
| 0 | 0,003 | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0 |
| 25 | 0,165 | 0,151 | 0,144 | 0,153 | 2,5 |
| 50 | 0,296 | 0,306 | 0,314 | 0,305 | 5 |
| 75 | 0,448 | 0,459 | 0,44 | 0,449 | 7,5 |
| 100 | 0,608 | 0,596 | 0,523 | 0,576 | 10 |



Figur C.1: Standardkurve basert på Fe(III) for beregning av peroksidverdi.

Vedlegg D: Anisidinverdi

Anisidinverdien, AV for olje før SPD og olje etter SPD (retentat) ble beregnet ut fra formel D.1.

$$AV = \frac{25[1, 2(A_{S2} - A_{B2}) - (A_{S1} - A_{B1})]}{m_0} \quad (\text{D.1})$$

I ligning D.1 er A_{B1} og A_{S1} absorbansen ved 350 nm av henholdsvis ren isooktan og olje løst i isooktan før tilsats av reagens (0,25 % p-anisidin). A_{B2} og A_{S2} er absorbansen ved 350 nm etter tilsats av reagens etter 10 minutters henstand i mørke. m_0 er mengde olje i g løst i 25 ml isooktan. Rådata for beregning av anisidinverdi er gitt i tabell D.1.

Tabell D.1 gir rådata samt beregnet verdi av AV med tilhørende standardavvik. AV er gitt som snitt av tre paralleller.

Tabell D.1: Rådata for beregning av anisidinverdi med standardavvik for olje før SPD og retentat fra olje kjørt gjennom SPD ved ulik oppholdstid. Oppholdstiden er oppgitt i sekunder i kolonne prøve

| Prøve | m ₀ [g] | A _{B1} | A _{B2} | A _{S1} | | | A _{S2} | | | AV | σ _{AV} |
|--------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|-----------------|
| | | | | P1 | P2 | P3 | P1 | P2 | P3 | | |
| Olje før SPD | 2,1164 | 0 | 0,020 | 0,219 | 0,231 | 0,244 | 0,255 | 0,245 | 0,264 | 0,594 | 0,14 |
| Retentat 12 | 2,1306 | 0 | 0,021 | 0,258 | 0,256 | 0,256 | 0,272 | 0,274 | 0,278 | 0,560 | 0,05 |
| Retentat 14 | 2,3246 | 0 | 0,006 | 0,278 | 0,265 | 0,273 | 0,297 | 0,283 | 0,304 | 0,800 | 0,10 |
| Retentat 16 | 2,2475 | 0 | 0,007 | 0,252 | 0,258 | 0,261 | 0,283 | 0,288 | 0,287 | 0,865 | 0,03 |
| Retentat 16 | 2,1743 | 0 | 0,015 | 0,259 | 0,245 | 0,240 | 0,296 | 0,280 | 0,286 | 0,906 | 0,07 |
| Retentat 18 | 2,3137 | 0 | 0,004 | 0,228 | 0,238 | 0,222 | 0,281 | 0,285 | 0,278 | 1,12 | 0,04 |
| Retentat 22 | 2,1295 | 0 | 0,011 | 0,234 | 0,242 | 0,238 | 0,271 | 0,278 | 0,281 | 0,949 | 0,05 |
| Retentat 29 | 2,2002 | 0 | 0,014 | 0,274 | 0,266 | 0,266 | 0,370 | 0,326 | 0,338 | 1,46 | 0,30 |
| Retentat 36 | 2,1023 | 0 | 0,001 | 0,228 | 0,233 | 0,228 | 0,286 | 0,297 | 0,288 | 1,40 | 0,05 |

Vedlegg E: BHT

E.1: Absorbans ved 278 nm

Det er målt absorbans på destillat etter SPD for sildolje fra Træna (produsert ved hydrolyseprosess og termisk behandling), sildolje fra Brekstad (produsert ved hydrolyseprosess og termisk behandling) og kommersiell fiskeolje fra Egersund. Tre paralleller av hver olje ble kjørt gjennom SPD. BHT absorberer i UV området med absorbansmaksimum ved 278 nm. Målt absorbans ved 278 nm for alle destillatene med tilhørende standardavvik er gitt i tabell E.1.

Tabell E.1: Målt absorbans ved 278 nm i destillat etter SPD for sildolje fra Træna (hydrolysert og termisk behandlet), sildolje fra Egersund (hydrolysert og termisk behandlet) og kommersiell fiskeolje. Gjennomsnittelig verdi og standardavvik er gitt.

| Destillat etter SPD | OD 278 | | | (OD 278) _{AV} | σ_1 |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|------------|
| | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | | |
| Hydrolysert, Træna | 0,2327 | 0,2499 | 0,2426 | 0,242 | 0,009 |
| Hydrolysert, Træna | 0,2688 | 0,2683 | 0,2709 | 0,269 | 0,001 |
| Hydrolysert, Træna | 0,2544 | 0,2672 | 0,2320 | 0,25 | 0,017 |
| Hydrolysert, Brekstad | 0,6016 | 0,6050 | 0,6048 | 0,604 | 0,002 |
| Hydrolysert, Brekstad | 0,5157 | 0,5095 | 0,5200 | 0,515 | 0,005 |
| Hydrolysert, Brekstad | 0,5854 | 0,5879 | 0,5926 | 0,589 | 0,004 |
| Termisk behandlet, Træna | 0,2971 | 0,2977 | 0,3027 | 0,299 | 0,003 |
| Termisk behandlet, Træna | 0,3105 | 0,3097 | 0,3048 | 0,308 | 0,003 |
| Termisk behandlet, Træna | 0,2843 | 0,2936 | 0,2828 | 0,287 | 0,006 |
| Termisk behandlet, Brekstad | 0,3762 | 0,3682 | 0,3748 | 0,373 | 0,004 |
| Termisk behandlet, Brekstad | 0,4242 | 0,4168 | 0,4226 | 0,421 | 0,004 |
| Termisk behandlet, Brekstad | 0,3425 | 0,3455 | 0,3464 | 0,345 | 0,002 |
| Kommersiell fiskeolje, Egersund | 0,6181 | 0,6144 | 0,6068 | 0,613 | 0,006 |
| Kommersiell fiskeolje, Egersund | 0,5508 | 0,5520 | 0,5524 | 0,552 | 0,001 |
| Kommersiell fiskeolje, Egersund | 0,6046 | 0,6098 | 0,6143 | 0,610 | 0,005 |

E.2: Konsentrasjon av BHT i hydrolysert sildolje fra Træna

Konsentrasjonen av BHT i den hydrolyserte sildoljen fra Træna er anslått ut fra intensitet i kromatogram fra GC-MS analyse. Intensiteten for BHT ble lest av kromatogram fra GC-MS analyse. Noen av prøvene ble oppkonsentrert før GC-MS, dette er tatt hensyn til. Resultat er gitt i figur 5.9 i hovedrapporten. Nedenfor er fremgangsmåten benyttet for å finne konsentrasjon av BHT i destillatet og i råoljen beskrevet.

Intensiteten for destillatet uten tilsetning av BHT (råoljen) ble på 5 000. Denne prøven ble spiket med 0,04 mM BHT og sendt til ny GC-MS analyse. Den resulterende intensiteten for BHT ble da på 175 000. Forskjellen mellom intensiteten til disse to prøvene (170 000) gir intensitet for en konsentrasjon av BHT på 0,04 mM i destillatet. Konsentrasjonen av BHT i destillatet fra råoljen kan beregnes fra ligning E.1 dersom det antas at konsentrasjonen av BHT er proporsjonal med intensiteten funnet ved GC-MS.

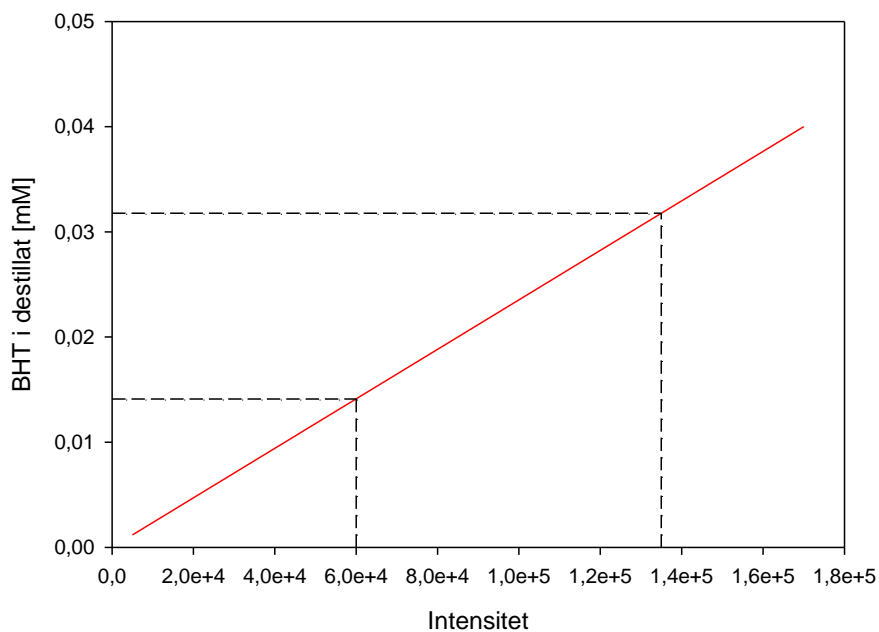
$$\frac{170000}{5000} = \frac{0,04mM}{x}$$

$$\Rightarrow x = 0,00118mM$$

(E.1)

Konsentrasjonen av BHT i destillatet fra råoljen er altså 0,00118 mM. Det er ønsket å finne konsentrasjonen av BHT i oljen før SPD. For å få et mål på hvor mye BHT som destilleres av oljen i SPD er konsentrasjonen av BHT i destillat fra den samme oljen tilsatt 0,02 mM og 0,06 mM BHT før SPD beregnet. Det kan da beregnes hvor mye av BHT tilsatt i oljen som finnes igjen i destillatet.

For å finne konsentrasjonen av BHT i destillatet for oljen tilsatt 0,02 mM og 0,06 mM BHT er det igjen antatt at sammenhengen mellom konsentrasjon og intensitet fra GC-MS er proporsjonal. Figur E.1 gir intensitet plottet mot konsentrasjon av BHT basert på de to kjente punktene gitt i ligning E.1. Konsentrasjonen av BHT i destillatet fra oljen tilsatt 0,02 mM BHT og 0,06 mM BHT ble ut fra dette beregnet til henholdsvis 0,0141 mM og 0,0318 mM.



Figur E.1: Intensitet fra GC-MS analyse som funksjon av konsentrasjon av BHT i destillat (rød linje). Konsentrasjonen ved intensitet 60 000 og 135 000 er merket.

Tabell E.2 gir sammenhengen mellom intensitet fra GC-MS og konsentrasjon av BHT i prøvene. Prøve 1,2,3 og 4 er henholdsvis destillat fra råoljen, destillat fra oljen tilsatt 0,02 mM og 0,06 mM BHT og destillat fra råoljen spiket med 0,04 mM BHT. Det er også beregnet hvor mye av BHT tilsatt i oljen som er funnet igjen i destillatet i prøve 2 og 3. Mengden BHT funnet i destillatet fra råoljen er trukket fra for å finne tilsatt mengde BHT destillert av oljen i prosent. Resultatet er vist i tabell E.2.

Tabell E.2: Sammenheng mellom intensitet fra GC-MS og konsentrasjon av BHT i destillat og olje.

| Prøve | Tilsatt BHT i olje [mM] | Intensitet | x BHT i destillat [mM] | x-0,00118 [mM] | Tilsatt mengde BHT destillert av oljen [%] |
|-------|-------------------------|------------|---------------------------|----------------|--|
| 1 | 0 | 5000 | 0,00118 | - | - |
| 2 | 0,02 | 60000 | 0,0141 | 0,01292 | 64,6 |
| 3 | 0,06 | 135000 | 0,0318 | 0,03062 | 51,0 |
| 4 | - | 175000 | 0,4118 | - | - |

Dersom mellom 51 og 64,6 % av BHT i oljen destilleres av under SPD betyr det at sildoljen fra Træna inneholder mellom 0,0017 mM og 0,0022 mM BHT.

Vedlegg F: Usikkerhet

F.1: Standardavvik

Standardavvik er beregnet fra ligning F.1 gitt under.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{F.1})$$

I massebalansen for konjugerte forbindelser gitt i figur 5.3 og 5.7 i hovedrapporten er det totale standardavviket beregnet fra summen av avvikene til komponent i retentat, kondensat og destillat fra ligning F.2:

$$\sigma_q = \sqrt{\left(\frac{\partial q}{\partial x} \sigma_x\right)^2 + \left(\frac{\partial q}{\partial y} \sigma_y\right)^2 + \left(\frac{\partial q}{\partial z} \sigma_z\right)^2} \quad (\text{F.2})$$

Med $q = (x + y + z)$ reduseres ligning F.2 til:

$$\sigma_q = \sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + \sigma_z^2} \quad (\text{F.3})$$

Litteraturliste vedlegg

1. Carvajal, A.K., Slizyte, R., Storrø, I., Aursand, M., *Production of high quality oil from fresh herring by-products*. Power-point presentation. The 26th Nordic lipidforum, Ålesund june 19th -22th 2011
2. Internkontrollhåndbok Egersund sildoljefabrikk AS., *Fiskeolje, flytskjema med operasjonsbeskrivelse*. (2011) Utg.3, kap 3, dok.3.3